

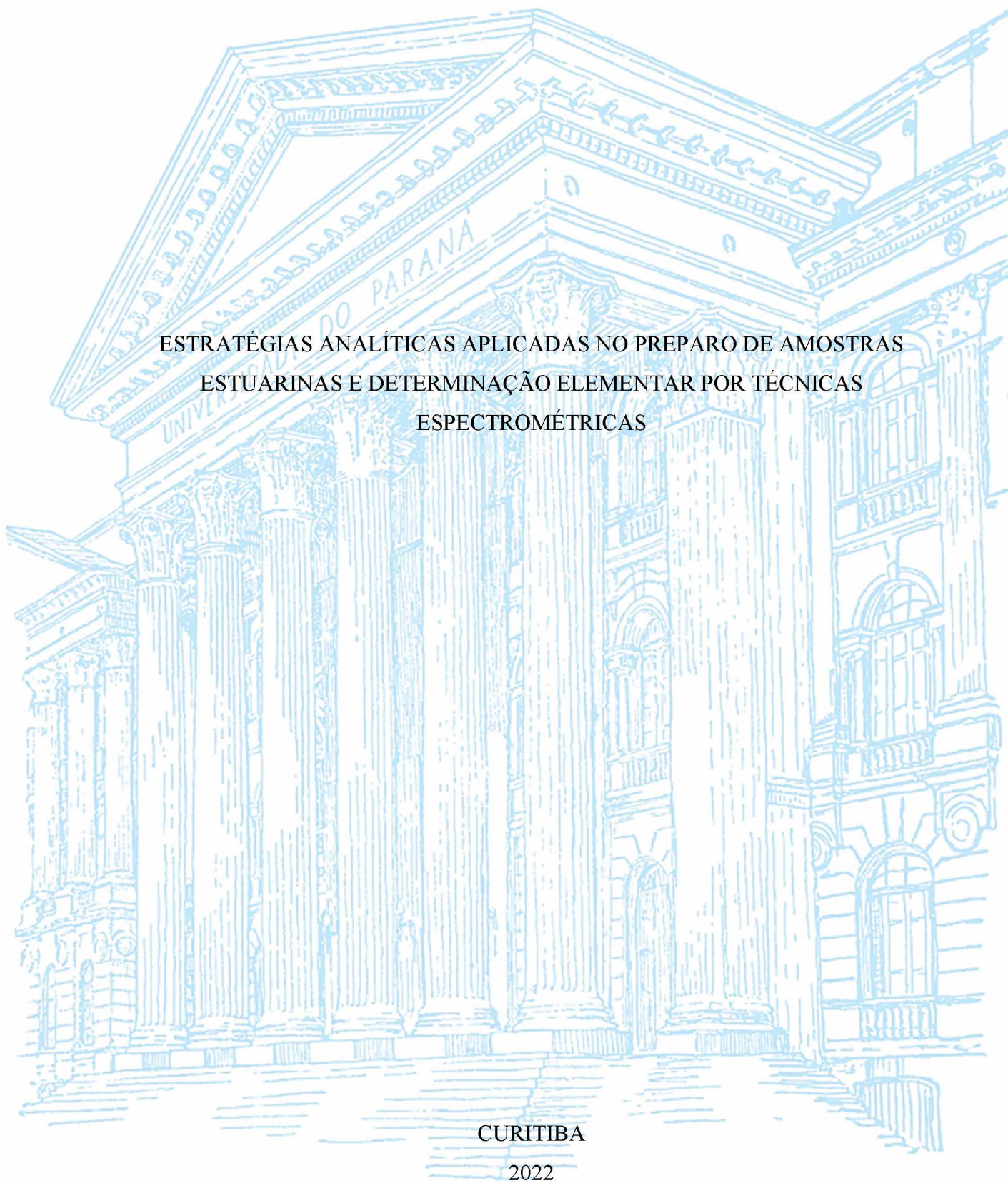
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA SANTOS MOREIRA

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS APLICADAS NO PREPARO DE AMOSTRAS
ESTUARINAS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR TÉCNICAS
ESPECTROMÉTRICAS

CURITIBA

2022



LUANA SANTOS MOREIRA

ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS APLICADAS NO PREPARO DE AMOSTRAS
ESTUARINAS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR TÉCNICAS
ESPECTROMÉTRICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Dias Britto do Amaral
Coorientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Moreira, Luana Santos

Estratégias analíticas aplicadas no preparo de amostras estuarinas e
determinação elementar por técnicas espectrométricas / Luana Santos
Moreira. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Clarice Dias Britto do Amaral

Coorientador: Erik Galvão Paranhos da Silva

1. Solventes. 2. Peixes. 3. Moluscos. 4. Elementos traços. 5.
Espectrometria. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Amaral, Clarice Dias Britto do. IV. Silva, Erik
Galvão Paranhos da. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA - 40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUANA SANTOS MOREIRA** intitulada: **ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS APLICADAS NO PREPARO DE AMOSTRAS ESTUARINAS E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS**, sob orientação da Profa. Dra. CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2022.

CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL
Presidente da Banca Examinadora

MARIO HENRIQUE GONZALEZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE
MESQUITA FILHO/SJR. PRETO)

PATRICIO GUILLERMO PERALTA ZAMORA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

POLIANA MACEDO DOS SANTOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Aos meus pais, Elvira e Janio, por serem meus principais incentivadores e fonte inesgotável de amor.

Aos meus irmãos, Sara e Gabriel, por toda cumplicidade e companheirismo.

Ao meu sobrinho, Henry, sinônimo de fortaleza, esperança, amor e pura luz.

Eu dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e tantas outras bênçãos recebidas. Por me dar coragem, energia e forças para ir em busca da concretização dos meus sonhos e metas, e por ter colocado tantas pessoas especiais no meu caminho até aqui.

A minha família, meus pais Elvira e Janio, irmãos Sara e Gabriel e sobrinho Henry, por serem minha fonte de energia. Por todo carinho, cuidado e suporte para que eu estivesse na Universidade em busca dos meus objetivos. Por depositarem confiança em mim e por torcerem tanto pelo meu sucesso. Agradeço também por toda compreensão pela minha ausência em momentos difíceis/delicados e datas importantes. Vocês sempre serão meu porto seguro, para onde sei que posso voltar. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus familiares, em especial avó Almerinda e prima Sílvia, por me manter em suas orações e torcida incondicional em tudo que me desafio a fazer.

Aos amigos da Bahia e àqueles que fiz em Curitiba, muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

A professora Dra. Clarice Amaral, por ter me recebido de forma tão calorosa em Curitiba/Universidade. Esses anos como parte do seu grupo de pesquisa foram muito produtivos, de muito aprendizado e amadurecimento. Obrigada pela brilhante orientação, confiança, oportunidades, paciência, conselhos e carinho. Foi um privilégio ter sido sua primeira aluna de doutorado e ter participado de tudo isso desde o início.

Ao professor Dr. Erik Galvão, que em 2012 me deu oportunidade de ingressar na pesquisa acadêmica ainda como aluna de iniciação científica. Agradeço por todos esses anos de parceria, conhecimento sempre compartilhado, discussões, troca de ideias, a coorientação durante o doutorado e, sobretudo, sua valiosa amizade.

A professora Dra. Luana Novaes, responsável por “ligar” a ponte Bahia-Paraná (UESC-UFPR). Muito obrigada por acreditar no meu trabalho.

A Dra. Ana Rita Nogueira, por me receber em seu grupo e laboratórios de pesquisas na UFSCar e Embrapa Pecuária Sudeste para realização de parte do meu trabalho. Agradeço a disponibilidade, conhecimento compartilhado e também a participação, avaliação e colaboração no meu exame de qualificação.

Ao professor Mario Henrique Gonzalez, por me receber em seu grupo e laboratório de pesquisas na Unesp/São José do Rio Preto para realização de parte do meu trabalho. Agradeço a disponibilidade e o conhecimento compartilhado.

Aos professores Dr. Patrício Zamora e Dr. Gilberto Abate que compuseram a minha banca de seleção para ingresso no curso de doutorado e, desde então, acompanharam a evolução desse trabalho. Agradeço também a participação, avaliação e colaboração no meu exame de qualificação.

A professora Dra. Poliana Santos e o professor Dr. Frederico Soares que compuseram a banca avaliadora de defesa de doutorado. Agradeço a participação, avaliação e colaboração para que eu pudesse disponibilizar a minha pesquisa na sua melhor versão.

Ao professor Dênio Souto, que junto com a Profª. Clarice, se empenhou para nos proporcionar um local de trabalho apropriado e infraestrutura para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa. Obrigada pelos bons momentos no laboratório, conselhos e disponibilidade.

A Dra. Raquel Machado, Dr. Ívero Pita e Dra. Ana Paula Santana pelas parcerias necessárias para a realização dos trabalhos aqui mencionados. Obrigada pelo acolhimento que recebi durante minha estadia em São Paulo.

Ao Laboratório de Espectrometria, Sensores e Biossensores (LAESB), do qual tive o prazer de fazer parte por quase dois anos. Aos ex e atuais integrantes com os quais tive a alegria de conviver, trabalhar e dar início a esse grupo que, tenho certeza, tem muita contribuição científica a oferecer. Eu sempre acreditei muito em nós e em tudo que nos propusemos a fazer!

Por fim, mas não menos importante, escrevo um agradecimento muito especial a Sayuri Nishida, Jaqueline Volpe, Floriatan Costa, Adriano Silva e Glêydison Soares. Vocês fizeram diferença na minha vida em Curitiba. Cada um ao seu modo! Agradeço os muitos momentos de alegrias e descontração, mas, principalmente, por dividirem àqueles de tristeza. Por todo carinho, por estarem presentes em datas especiais, pelo companheirismo, incentivo, torcida, broncas, enfim... obrigada por serem meus amigos.

A Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) por todo auxílio e oportunidade de concluir meus estudos na pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, de extrema importância para que eu pudesse permanecer em Curitiba e fazer o curso de doutorado.

Muito obrigada!!!

RESUMO

As atividades antrópicas atreladas ao risco de contaminação dos recursos hídricos são uma crescente preocupação para as agências reguladoras, órgãos de saúde pública e para os profissionais que atuam na área. Em sistemas estuarinos, é comum o desenvolvimento de estudos objetivando o levantamento da fauna bentônica e dinâmica de nutrientes e contaminantes. Entretanto, estudos relacionados a impactos atribuídos a espécies químicas e suas interações no ambiente apresentam limitações relacionadas à determinação com rapidez e eficiência dos níveis encontrados em diferentes matrizes ambientais. Diante desta questão, nesta tese, foram propostas alternativas e estratégias analíticas para o preparo de amostras provenientes de sistemas estuarinos brasileiros (tecidos de peixes e moluscos bivalves) com foco na determinação de elementos traço, potencialmente tóxicos e tecnologicamente críticos. Os trabalhos desenvolvidos estão apresentados em quatro capítulos, incluindo a determinação (I) de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) após preparo de amostra por extração com ácido fórmico; (II) de As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni e V por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) após pré-concentração via coprecipitação; e (III) de As e Cd por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após extração utilizando solvente eutético profundo natural (NADES). Por fim (IV), uma abordagem inovadora baseada em inteligência artificial foi aplicada para a seleção de padrões internos utilizados na quantificação de Cd, Pb, Sn e elementos do grupo da platina por ICP-MS. Nos métodos apresentados, os parâmetros de desempenho analítico foram avaliados, incluindo a exatidão, precisão e determinação de limites de detecção e quantificação. As vantagens e potencialidades foram apresentadas, com destaque as melhorias de sensibilidade e adequação aos limites estabelecidos por agências reguladoras, ganhos em simplicidade, rapidez e segurança. Além disso, o uso de reagentes alternativos e diluídos, estratégias de otimização multivariada, inteligência artificial e solventes seguros propiciaram a obtenção de métodos ambientalmente equilibrados, mais eficientes e alinhados aos princípios da Química Analítica Verde. Os trabalhos desenvolvidos dão suporte para aplicações analíticas alternativas mais rápidas, simples e confiáveis, e estudos ambientais podem ser beneficiados pelos avanços gerados nesta tese.

Palavras-chave: Solventes alternativos; Otimização multivariada; Peixes; Moluscos bivalves; Elementos traço; Elementos do grupo da platina; Espectroanalítica; Técnicas baseadas em plasma; Mapa auto-organizável.

ABSTRACT

Human activity associated with the risk of water resource contamination is a growing concern for regulatory agencies, public health agencies, and acting professionals in the field. In estuarine systems, it is common to develop studies aiming at surveying benthic fauna and the dynamics of nutrients and contaminants. However, studies on the impacts of chemical species and their environmental interactions are limited and associated with the rapid and efficient determination of the levels found in different environmental matrices. Thus, this thesis proposes alternatives and analytical strategies for the sample preparation originating in Brazilian estuarine systems, fish tissues, and bivalve mollusks, focusing on determining potentially toxic and technologically critical trace elements. The works developed are presented in four chapters: (I) Determination of Cd and Pb by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) after sample preparation by formic acid extraction; (II) As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni and V by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) after preconcentration via coprecipitation; and (III) As and Cd by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after extraction using a natural deep eutectic solvent (NADES). Finally (IV), an innovative approach based on artificial intelligence was applied to the choice of internal standards for to determination of Cd, Pb, Sn, and platinum group elements by ICP-MS. The proposed methods' performance parameters accuracy, precision, and detection and quantification limits were evaluated. The advantages and potentialities presented highlight the improvements in sensitivity and adequacy to the limits established by regulatory agencies. Also, the use of alternative and diluted reagents, multivariate optimization strategies, artificial intelligence, and safe solvents may lead to the achievement of environmentally balanced and more efficient methods, accordingly to the principles of Green Analytical Chemistry. The developed work supports faster, more straightforward, and more reliable alternative analytical applications, and environmental studies could benefit from the advances generated from this thesis.

Keywords: Alternative solvents; Multivariate optimization; Fishes; Bivalve mollusks; Trace elements; Platinum group elements; Spectroanalytical; Plasma-based techniques; Self-organizing map.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MODIFICADOR QUÍMICO Pd:Mg PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR GF AAS	33
FIGURA 2 –	CURVAS DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO OBTIDAS EM GF AAS	34
FIGURA 3 –	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO NO SINAL DE ABSORBÂNCIA INTEGRADA DOS ANALITOS	35
FIGURA 4 –	PONTUAÇÕES AGREE CALCULADAS PARA OS MÉTODOS	37
FIGURA 5 –	GRÁFICO DE PARETO OBTIDO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL (2 ⁴) NA OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E DETERMINAÇÃO POR MIP OES.....	46
FIGURA 6 –	GRÁFICO DE CONTORNO OBTIDO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURA, INDICANDO A REGIÃO DE MÁXIMA RESPOSTA ANALÍTICA	48
FIGURA 7 –	ESTUDO DO pH NA EXTRAÇÃO DE As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni E V POR COPRECIPITAÇÃO E DETERMINAÇÃO POR MIP OES	49
FIGURA 8 –	REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE ADSORÇÃO DE SUPERFÍCIE ASSOCIADO AO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO DE Mg(OH) ₂ PARA A PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO .	50
FIGURA 9 –	ESPECTROS DE FTIR DOS REAGENTES INICIAIS E DO NADES PREPARADO UTILIZANDO XILITOL (Xy), ÁCIDO MÁLICO (Ma) E ÁGUA.....	58
FIGURA 10 –	MATRIZ DE DISTÂNCIA UNIFICADA PARA OS ANALITOS INVESTIGADOS	69
FIGURA 11 –	APLICAÇÃO DO SOM NOS RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ELEMENTOS ESTUDADOS POR ICP-MS	71
FIGURA 12 –	PLANO DE COMPONENTES PARA OS ISÓTOPOS INVESTIGADOS..	72
FIGURA 13 –	GRÁFICO DE SCORES DA PCA (PC1 vs. PC2) PARA AS AMOSTRAS ESTUDADAS	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	LIMITES MÁXIMOS ($\mu\text{g g}^{-1}$) DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS PARA AMOSTRAS DE PEIXES E MOLUSCOS.....	23
TABELA 2 –	PROGRAMA DE AQUECIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb EM GF AAS	30
TABELA 3 –	VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS NA APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO USANDO ÁCIDO FÓRMICO EM MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS.....	36
TABELA 4 –	PROCEDIMENTOS QUE EMPREGARAM ÁCIDO FÓRMICO NA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM DIFERENTES AMOSTRAS	38
TABELA 5 –	CONCENTRAÇÃO DE Pb DETERMINADA EM TECIDOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES E MOLUSCOS APÓS EXTRAÇÃO COM ÁCIDO FÓRMICO	39
TABELA 6 –	PARÂMETROS OPERACIONAIS E INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NO MIP OES PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR	42
TABELA 7 –	MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES ENVOLVIDOS NO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO E RESPOSTA MÚLTIPLA	45
TABELA 8 –	MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURA PARA AVALIAR AS PROPORÇÕES DOS SOLVENTES ORGÂNICOS	47
TABELA 9 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS MODELOS LINEAR (a), QUADRÁTICO (b) E CÚBICO ESPECIAL (c), AJUSTADOS PARA AS RESPOSTAS MÚLTIPLAS OBTIDAS NO PLANEJAMENTO DE MISTURAS	48
TABELA 10 –	DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS EM CRM LOBSTER HEPATOPANCREAS (TORT-3)	51
TABELA 11 –	DETERMINAÇÃO DE As, Cr, Co, Cu, Mn, Hg E Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$) POR MIP OES EM AMOSTRAS DE MÚSCULO DE PEIXES E MOLUSCOS	52
TABELA 12 –	COMPARAÇÃO ENTRE O PROCEDIMENTO PROPOSTO PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E TRABALHOS DE COPRECIPITAÇÃO QUE UTILIZARAM DIFERENTES TIPOS DE CARREADORES.....	54
TABELA 13 –	PARÂMETROS OPERACIONAIS E INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE As E Cd POR ICP-MS	56
TABELA 14 –	DETERMINAÇÃO DE As E Cd POR ICP-MS EM CRM DOLT-4 E MATERIAL DE REFERÊNCIA UFABC	60

TABELA 15 – APLICAÇÕES DE DES OU NADES COMO SOLVENTES EXTRATORES EM DIFERENTES PREPAROS DE AMOSTRAS UTILIZANDO TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS.....	62
TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DE As (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO, n = 3) EM TECIDOS DE PEIXES E MOLUSCOS DETERMINADOS POR ICP-MS PARA OS DOIS MÉTODOS DE PREPARO DAS AMOSTRAS.....	63
TABELA 17 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA ANÁLISE E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP-MS.....	67
TABELA 18 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO CALCULADOS PARA OS PARES ANALITO/IS QUE MAIS SE DESTACARAM NAS VAZÕES AVALIADAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

ANN	Rede neural artificial, do inglês <i>Artificial neural network</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BG	Sinal de fundo, do inglês <i>Background</i>
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>Certified reference material</i>
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com vapor frio, do inglês <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>
DES	Solvente eutético profundo, do inglês <i>Deep eutectic solvent</i>
DRC	Cela de reação dinâmica, do inglês <i>Dynamic reaction cell</i>
EC	Comunidade Europeia, do inglês <i>European Community</i>
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, do inglês <i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i> , do inglês <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
GAC	Química Analítica Verde, do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, do inglês <i>High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IL	Líquido iônico, do inglês <i>Ionic liquid</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IS	Padrão interno, do inglês <i>Internal standard</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KED	Discriminação por energia cinética, do inglês <i>Kinetic energy discrimination</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantitation</i>

LPME	Microextração em fase líquida, do inglês <i>Liquid-phase microextraction</i>
Matriz- <i>U</i>	Matriz de distância unificada, do inglês <i>Unified distance matrix</i>
MIP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês <i>Microwave-induced plasma optical emission spectrometry</i>
MR	Resposta múltipla, do inglês <i>Multiple response</i>
MW-AD	Digestão ácida convencional assistida por radiação micro-ondas, do inglês <i>Microwave-assisted acid digestion</i>
NADES	Solvente eutético profundo natural, do inglês <i>Natural deep eutectic solvent</i>
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal component analysis</i>
PGE	Elementos do grupo da platina, do inglês <i>Platinum group elements</i>
R ²	Coeficiente de determinação
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
SOM	Mapa auto-organizável, do inglês <i>Self-organizing map</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid-phase extraction</i>
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio, do inglês <i>Tetramethylammonium hydroxide</i>
UAE	Extração assistida por ultrassom, do inglês <i>Ultrasound-assisted extraction</i>
UAE-NADES	Extração assistida por ultrassom utilizando solvente eutético profundo natural, do inglês <i>Natural deep eutectic solvent based ultrasound-assisted extraction</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	AVANÇOS NOS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	18
2.2	ELEMENTOS DE INTERESSE.....	21
2.3	TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR	23
2.4	FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NA QUÍMICA ANALÍTICA	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	GERAL.....	28
3.2	ESPECÍFICOS	28
4	CAPÍTULO I – USO DO ÁCIDO FÓRMICO NO PREPARO DE AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE.....	29
4.1	OBJETIVO	29
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.4	CONCLUSÃO.....	40
5	CAPÍTULO II – COPRECIPITAÇÃO DE $Mg(OH)_2$ COMO ESTRATÉGIA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS.....	41
5.1	OBJETIVO	41
5.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.4	CONCLUSÃO.....	53
6	CAPÍTULO III – EXTRAÇÃO APRIMORADA DE ARSÊNIO E CÁDMIO USANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL E	

	DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO	55
6.1	OBJETIVO	55
6.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	55
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.4	CONCLUSÃO.....	64
7	CAPÍTULO IV – MAPAS AUTO-ORGANIZÁVEIS APLICADOS NA ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO, CHUMBO, ESTANHO E ELEMENTOS DO GRUPO DA PLATINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO	66
7.1	OBJETIVO	66
7.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	66
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
7.4	CONCLUSÃO.....	75
8	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de um ambiente aquático pode ser avaliada a partir do monitoramento da concentração de elementos tóxicos em matrizes incluindo água, sedimentos, vegetação e espécies animais (FANG et al., 2019). Dentre esses organismos, os mariscos e peixes destacam-se como matriz a ser estudada por apresentarem como características resistência às alterações ambientais, capacidade de armazenar quantidades nocivas de elementos tóxicos sem sofrer danos aparentes e importância econômica em várias regiões do planeta. Além disso, representam uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, sendo facilmente encontradas na maioria dos ecossistemas aquáticos, desempenhando um importante papel na cadeia alimentar (BOSCH et al., 2016; COPAT et al., 2013; SOBIHAH et al., 2018).

A determinação de elementos traço e/ou tóxicos nesses tipos de amostras tem sido recorrente devido à sua capacidade de bioacumulação, que fornece informações essenciais sobre os ciclos biogeoquímicos, sendo, por isso, muito utilizadas como indicadores de poluição ambiental (HAO et al., 2013; HESHMATI et al., 2017; TAO et al., 2012; VIEIRA et al., 2011). Por fazerem parte da alimentação diária de uma parcela da população, principalmente àquelas de regiões costeiras, as pesquisas envolvendo a contaminação de peixes e moluscos por elementos tóxicos são relevantes. Esse tipo de alimento é uma das principais fontes de nutrientes para o corpo humano. Entretanto, também podem se tornar a principal via de entrada para contaminantes, o que evidencia a importância do tema e a necessidade de um controle por agências reguladoras quanto aos níveis máximos aceitáveis (BOSCH et al., 2016; GU; HUANG; LIN, 2016; LIANG et al., 2019).

Estudos dessa natureza apresentam desafios relacionados, principalmente, às baixas concentrações em que os elementos químicos são encontrados e a complexidade inerente às matrizes ambientais. A associação desses fatores e a dificuldade em disponibilizar o analito em solução para posterior análise, torna importante a escolha adequada de um preparo de amostra e da técnica utilizada para determinação. Nesse cenário, o aperfeiçoamento da instrumentação analítica é objeto de estudo por grupos de pesquisa em todo o mundo (BALCAEN et al., 2015; DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017). Porém, a simplificação do procedimento de preparo da amostra pode ser tão importante quanto, ou até mesmo superior, podendo reduzir os custos e a complexidade das análises (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; BACON et al., 2020; BURATO et al., 2020).

Nesse contexto, apresenta-se a seguir uma discussão sobre o desenvolvimento de metodologias, os avanços no preparo de amostras e a aplicação de técnicas espectrométricas na

determinação elementar em amostras de peixes e moluscos. Os trabalhos desenvolvidos nesta tese estão organizados em quatro capítulos. Com o objetivo de facilitar a compreensão pelo leitor, os trabalhos foram estruturados em tópicos, incluindo o detalhamento da parte experimental, resultados e discussão, e conclusões parciais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AVANÇOS NOS PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Entre as metodologias de preparo de amostra mais utilizadas para a disponibilização dos analitos em solução, está a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD, do inglês *Microwave-assisted acid digestion*), geralmente realizada com a combinação de uma mistura de ácidos e/ou peróxido de hidrogênio (ROCHA et al., 2013). Para a MW-AD ainda foram propostos métodos que usaram ácidos diluídos, apresentando resultados satisfatórios na decomposição de vários tipos de amostras (BARBOSA et al., 2015; BIZZI et al., 2014a, 2014b; SANTOS et al., 2019). Procedimentos de extração/solubilização em chapas de aquecimento e/ou ultrassom são alternativas aos métodos de digestão convencionais e apresentam como principais vantagens a simplicidade e rapidez na execução (GAMELA; COSTA; PEREIRA-FILHO, 2020).

Nesse contexto, o uso de solventes alternativos como o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH, do inglês *Tetramethylammonium hydroxide*) (CAMPOS et al., 2017; TORRES et al., 2016) e o ácido fórmico (HCOOH) (LOPES et al., 2016; ORESTE et al., 2013; TORMEN et al., 2010, 2012) ganhou destaque por não requerer o uso de radiação micro-ondas ou ultrassom, permitindo, em muitos casos, a solubilização das amostras em temperatura ambiente e garantindo a estabilidade da solução resultante por vários meses. Esses solventes ainda podem ser utilizados no preparo de amostras de forma diluída, o que reduz a quantidade de reagente (minimizando custos e evitando o desperdício), permite a obtenção de baixos limites de detecção (LOD, do inglês *Limit of detection*) e contribui com o aumento da vida útil dos instrumentos (BIANCHI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

Os trabalhos realizados por Torres et al. (2016) e Campos et al. (2017), comprovaram a eficiência do TMAH na extração de espécies inorgânicas, mas esse solvente é de uso limitado, principalmente pela dificuldade de obtenção em níveis de pureza adequados. O ácido fórmico pode ser utilizado como alternativa ao TMAH, apresentando como principais vantagens baixo custo, facilidade de manuseio, possível purificação em alto grau e utilização de pequenas quantidades de amostra (SCRIVER et al., 2005). Devido a sua característica não oxidante, esse ácido também foi considerado como aplicável para análises de especiação química (COVACI et al., 2018; KAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2018).

O uso do ácido fórmico no preparo de amostras para disponibilização dos analitos foi pouco explorado. As vantagens associadas ao uso deste reagente têm influência direta sobre o

ganho de sensibilidade, já que são obtidos baixos valores de branco e, consequentemente, menores LODs. Além disso, podem proporcionar um preparo de amostras simples, de curto tempo de execução e que ainda contribui para a preservação do meio ambiente por permitir um alto rendimento da amostra sem gerar resíduos perigosos (TORMEN et al., 2012).

Apesar das vantagens relacionadas ao uso do ácido fórmico como solvente extrator, a concentração dos elementos em matrizes ambientais continua sendo um fator desafiador. Nesse sentido, a característica de bioacumulação dessas amostras pode não ser suficiente para permitir a determinação por técnicas espectrométricas convencionais (CITAK; TUZEN; SOYLAK, 2009; ES'HAGHI; BARDAJEE; AZIMI, 2016; SAFARI et al., 2017). Nos últimos anos, essas técnicas analíticas passaram por melhorias significativas, embora ainda apresentem limitações relacionadas à sensibilidade e LOD inadequado para algumas aplicações. Em consequência, métodos de preparo de amostras que realizam a separação/pré-concentração de elementos traço têm sido propostos, como extração em fase sólida (ES'HAGHI; BARDAJEE; AZIMI, 2016; SÁ et al., 2020), extração em ponto nuvem (SILVA; ROLDAN; GINÉ, 2009), microextração (KARADAŞ; KARA, 2017; ROSA et al., 2015), adsorção (FEIST; MIKULA, 2014) e coprecipitação (BAHADIR et al., 2014; CITAK; TUZEN; SOYLAK, 2009; SÁ et al., 2018; SOYLAK; AYDIN, 2011).

Entre os procedimentos citados, a coprecipitação se destaca por apresentar vantagens em sua implementação como simplicidade, rapidez, baixo consumo de solvente, capacidade de atingir altos fatores de enriquecimento e capacidade de aplicar simultaneamente as etapas de separação e pré-concentração com base na separação de fases (GOUDA, 2016; SOYLAK; AYDIN, 2011; SOYLAK; AYDIN; KIZIL, 2016). O procedimento ocorre por precipitação dos íons analitos a partir da combinação de um elemento carreador e um agente quelante adequado, que pode incluir mecanismos de adsorção de superfície, troca iônica, precipitação de superfície, oclusão e/ou soluções sólidas (INAGAKI et al., 2009; TUFEKCI et al., 2013). Podem ser utilizados coprecipitantes inorgânicos (CITAK; TUZEN; SOYLAK, 2009), orgânicos (YILDIZ et al., 2016) e, mais recentemente, coprecipitantes que não utilizam elementos carreadores (MENDIL; KARATAS; TUZEN, 2015).

Entre os coprecipitantes inorgânicos, destaque deve ser dado aos hidróxidos metálicos como, por exemplo, hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) que se tornou atraente devido às recuperações quantitativas e fatores de enriquecimento satisfatórios em procedimentos de pré-concentração de elementos traço. Consiste em um precipitado coloidal, sendo a adsorção superficial o principal mecanismo de sua coprecipitação (ATKINS; JONES, 2010). As vantagens incluem o uso de reagentes facilmente purificados e a obtenção de baixos valores de

brancos analíticos, enquanto a possibilidade de contaminação e o alto sinal de fundo (BG, do inglês *Background*), causado pela presença excessiva do elemento carreador, são citados como desvantagens no uso desse hidróxido (HSIEH; CHEN; WANG, 2011). As aplicações que apresentaram maior eficiência foram realizadas em amostras de água do mar que já contém o íon Mg^{2+} , necessário para que todo o procedimento ocorra (ARSLAN; OYMAK; WHITE, 2018; ZHU, 2020). Nos casos em que a matriz estudada apresenta concentração insuficiente desses íons, é necessário otimizar o valor a ser adicionado para que ocorra o procedimento de coprecipitação. A eficiência desse procedimento também foi relatada em amostras de alimentos, como suplementos multivitamínicos/minerais (BEGU; SNELL; ARSLAN, 2019) e molhos de peixe (ZENG et al., 2013).

O preparo das amostras pelos métodos supracitados (MW-AD, aquecimento em bloco digestor com ácidos concentrados ou diluídos, extração e solubilização empregando placas de aquecimento e pré-concentração) utilizam reagentes e solventes que podem ser tóxicos para os seres humanos ou para o meio ambiente. Nesse contexto, métodos e procedimentos que recorrem ao uso de solventes alternativos de baixa toxicidade são incentivados, especialmente àqueles alinhados aos princípios da Química Analítica Verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*). A GAC se baseia no desenvolvimento de métodos sustentáveis por meio da substituição de reagentes tóxicos por alternativas não tóxicas. Além disso, incentiva estratégias de miniaturização, automação e análise direta. A redução nas quantidades de reagentes consumidos e resíduos gerados, ou a descontaminação desses resíduos, pode ajudar a evitar efeitos colaterais prejudiciais e aumentar a sustentabilidade dos métodos analíticos (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

O uso de solventes sustentáveis poderá contribuir de forma efetiva para a adequação integral dos procedimentos às metas da GAC. Esses solventes incluem líquidos iônicos (ILs, do inglês *Ionic liquids*), fluidos supercríticos e, mais recentemente, os solventes eutéticos profundos (DES, do inglês *Deep eutectic solvent*). Frente aos IL, os DES apresentam vantagens como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e não toxicidade, dada a seleção apropriada dos componentes. Essa nova geração de solventes é formada a partir de misturas de ácidos e bases de Brønsted e Lewis (receptores e doadores de ligações de hidrogênio) em proporções bem definidas, em que o ponto de fusão da mistura eutética é inferior aos pontos de fusão dos componentes individuais. Os DES são frequentemente preparados misturando dois reagentes sólidos para formar um produto líquido (CLARKE et al., 2018; PACHECO-FERNÁNDEZ; PINO, 2019).

Além desses compostos, Choi et al. (2011) introduziu o conceito de solvente eutético profundo natural (NADES, do inglês *Natural deep eutectic solvent*). Esses constituem uma subclasse dos DES e são preparados a partir de uma variedade de produtos naturais (metabólitos vegetais), incluindo sais de amônio, açúcares, ácidos orgânicos e cloreto de colina. A toxicidade das substâncias empregadas no preparo de NADES é desprezível e viabiliza o desenvolvimento de aplicações em biotecnologia e bioengenharia. Em Química Analítica, o interesse nos NADES concentra-se em seu uso como solventes extratores em procedimentos de preparo de amostras visando à análise elementar. Apesar de ser uma aplicação recente, têm-se observado um aumento significativo de trabalhos na literatura que fizeram uso desses solventes nessa etapa do método analítico (HABIBI et al., 2013; MATONG; NYABA; NOMNGONGO, 2017; OSOWSKA; RUZIK, 2019; PANHWAR; TUZEN; KAZI, 2018; SANTANA et al., 2019).

2.2 ELEMENTOS DE INTERESSE

A contaminação do ambiente por elementos químicos pode ocorrer de forma natural ou ter aporte antrópico. A elevação dos níveis naturais pode alcançar concentrações com efeitos nocivos aos organismos, isso porque apresentam como característica não serem passíveis de degradação, o que promove um acúmulo destes nos solos, sedimentos e águas, resultando em uma maior toxicidade (CAEIRO et al., 2017). Para os humanos, uma importante via de exposição a esses elementos é a partir do solo, sendo o consumo de alimentos contaminados a principal forma de entrada no corpo (MAHMOOD; MALIK, 2014).

De acordo com sua importância para organismos vivos, os elementos traço podem ser classificados como essenciais (Co, Cu, Mn, Ni e V) e não essenciais/tóxicos (As, Cd, Cr, Hg, Pb, Pt e Sn) (TCHOUNWOU et al., 2012). Assim como os elementos tóxicos, os essenciais podem produzir efeitos deletérios se ingeridos em grandes quantidades. Por desempenharem um papel vital no organismo humano, esses elementos precisam ser melhor controlados em amostras que fazem parte da alimentação diária da população.

Entre os elementos traço, Pt, Pd e Rh constituem os elementos do grupo da platina (PGE, do inglês *Platinum group elements*). Por possuírem propriedades físico-químicas similares, estes são encontrados concomitantemente nos depósitos naturais e estão entre os elementos menos abundantes da crosta terrestre (RAVINDRA; BENCS; VAN GRIEKEN, 2004). São extensivamente empregados em atividades industriais, nas áreas da eletroeletrônica, petróleo e química, além de medicina e odontologia. O uso progressivo de PGE pode favorecer o aumento e dispersão destes no meio ambiente, sendo a principal fonte de contaminação

antropogênica a utilização em conversores catalíticos (PAWLAK; LODYGA-CHRUŚCIŃSKA; CHRUSTOWICZ, 2014; RAVINDRA; BENCS; VAN GRIEKEN, 2004).

O processo de contaminação ocorre, principalmente, por dispersão de material particulado a partir do desgaste e deterioração dos catalisadores. Essas partículas emitidas ficam em suspensão no ar e se depositam nas superfícies de estradas, podendo ser transportadas pelas chuvas para corpos d'água, onde ficam retidos ou entram na cadeia trófica e se bioacumulam (EK; MORRISON; RAUCH, 2004). Os PGE são considerados "poluentes emergentes", para os quais é necessário desenvolver métodos capazes de fornecer estimativas quantitativas confiáveis das vias, cargas e concentrações ambientais.

Assim como os PGE, elementos como o As, Cd, Cr, Hg, Pb e Sn são classificados como potencialmente tóxicos, não desempenham funções biológicas no organismo humano e são frequentemente encontrados em baixas concentrações em matrizes ambientais e de alimentos (LIANG et al., 2019; OLMEDO et al., 2013). O monitoramento desses elementos é importante devido ao uso como indicadores do impacto das atividades antropogênicas no ambiente e na saúde humana.

O controle sobre as concentrações de elementos tóxicos em alimentos para consumo humano, como exemplo músculo de peixes e moluscos bivalves, é realizado por agências governamentais. No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a concentração de contaminantes inorgânicos, enquanto a Comunidade Europeia (EC, do inglês *European Community*) e a Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*) estabelecem essa regulamentação à nível mundial (ANVISA, 2013; EC, 2006, 2008; FAO/WHO, 2011). Dos elementos de interesse no presente trabalho, apenas quatro são regulados por essas agências, sendo eles: As, Cd, Hg e Pb. Os limites máximos permitidos são apresentados na TABELA 1. Nenhuma das agências mencionadas apresentou valores máximos permitidos para as concentrações de Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pd, Pt, Rh, Sn e V considerando as amostras citadas.

TABELA 1 – LIMITES MÁXIMOS ($\mu\text{g g}^{-1}$) DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS PARA AMOSTRAS DE PEIXES E MOLUSCOS

Agência	Tecido/Músculo	As	Cd	Hg	Pb	Referência
ANVISA	Peixe	1,0	0,05	0,5	0,3	(ANVISA, 2013)
	Molusco bivalve	1,0	2,0	0,5	1,5	
EC	Peixe	-	0,05	0,5	0,3	(EC, 2006)
	Molusco bivalve	-	1,0	-	1,5	
EC	Peixe	-	0,05	1,0	-	(EC, 2008)
	Molusco bivalve	-	1,0	-	-	
FAO/WHO	Peixe	-	-	-	0,3	(FAO/WHO, 2011)
	Molusco bivalve	-	2,0	-	-	

FONTE: A autora (2022).

2.3 TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR

A determinação de elementos totais, essenciais ou tóxicos, em matrizes ambientais e de alimentos tornou-se uma exigência crescente da sociedade. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas versáteis, com elevada sensibilidade e que proporcionem análises rápidas e confiáveis foi necessário. A determinação das concentrações dos elementos químicos, normalmente, é realizada por técnicas espectrométricas tais como, a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS, do inglês *Flame atomic absorption spectrometry*) (COSTA et al., 2020), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS, do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectrometry*) (ORESTE et al., 2013; RAMOS-MIRAS et al., 2019), espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES, do inglês *Microwave-induced plasma optical emission spectrometry*) (RÍOS; PEÑUELA; BOTERO, 2017; SÁ et al., 2020), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) (SANTOS et al., 2019), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) (PINHEIRO et al., 2019; TORMEN et al., 2010), que apresentam qualidades bem particulares.

O GF AAS possibilita a obtenção de baixos valores para LODs, uso de pequenas quantidades de amostras e reagentes (na ordem de microlitros), permite a análise de matrizes complexas (inclusive suspensões) e com alto teor de carbono, e apresenta menor custo de equipamento, operação e manutenção quando comparado às técnicas de plasma (ORESTE et al., 2013; ULLAH et al., 2017). No entanto, a determinação multielementar é limitada aos equipamentos modernos, incluindo a Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com

fonte contínua (HR-CS AAS, do inglês *High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*).

O MIP OES apresenta simplicidade operacional, capacidade de determinação multielementar, otimização automática para cada uma das linhas selecionadas, emprego do nitrogênio como gás do plasma, o que reduz muito o custo da análise, baixo consumo de amostra e baixa geração de resíduos. No entanto, a menor temperatura do plasma de nitrogênio oferece menor sensibilidade para alguns elementos em comparação com um típico ICP OES, que utiliza plasma de argônio (GONCALVES; MCSWEENEY; DONATI, 2016; JANKOWSKI; RESZKE, 2013).

O ICP-MS é o que se tem de mais moderno na instrumentação analítica para determinação elementar e apresenta como vantagens elevada sensibilidade, capacidade multielementar e isotópica, além de ampla faixa de trabalho. Entretanto, a ocorrência de interferências espectrais e não espectrais é considerada a maior limitação da técnica (THOMAS, 2013). As interferências não espectrais ocorrem em função da composição da matriz e estão relacionadas a introdução da amostra, geração e transporte de íons do plasma para o detector. Por outro lado, as interferências espectrais ocorrem quando espécies isobáricas ou poliatômicas estão presentes na mesma razão massa/carga (m/z) que o analito (AGATEMOR; BEAUCHEMIN, 2011). Algumas interferências não espectrais podem ser reduzidas ou eliminadas com o uso de estratégias de calibração, enquanto as interferências espectrais são geralmente contornadas através do uso das celas de colisão/reação.

A cela de colisão/reação instrumentalmente está localizada antes do analisador de massas, na qual um gás inerte ou reativo é adicionado para interagir com os íons ou espécies poliatômicas para superar interferências por processos de colisão e/ou reação, respectivamente. Com a adição do gás na cela pode-se trabalhar em duas vertentes: discriminação por energia cinética (KED, do inglês *Kinetic energy discrimination*) ou cela dinâmica de reação (DRC, do inglês *Dynamic reaction cell*) (KORVELA; ANDERSSON; PETTERSSON, 2018; THOMAS, 2013). No KED, um gás de colisão inerte, geralmente o hélio, colide com os analitos e interferências (espécies poliatômicas e, conseqüentemente, maiores), fazendo com que espécies de mesma razão m/z apresentem valores de energia cinética diferentes e, portanto, saiam da cela em tempos diferentes, possibilitando a separação entre analito e interferente (YAMADA, 2015). Na DRC, um gás como amônia, oxigênio, hidrogênio ou metano, reage com as espécies interferentes ou com o analito modificando a razão m/z . Dessa forma, o analito é direcionado para o quadrupolo já livre de interferências. Ou ainda, o gás pode reagir com o próprio analito

para formar produtos cuja razão m/z monitorada será diferente quando comparada com a do analito original (D'ILIO et al., 2011).

A estratégia de calibração por padronização interna tem sido utilizada com eficácia na correção dos efeitos de matriz em ICP-MS (AMARAL et al., 2016; BARROS; PINHEIRO; NÓBREGA, 2020; PINHEIRO et al., 2019). A maior parte dos estudos faz a seleção dos candidatos a padrão interno (IS, do inglês *Internal standard*) a partir da semelhança com o analito em termos de massa, primeira energia de ionização e comportamento químico. Essas características possibilitam aplicar os IS para correção de possíveis flutuações durante a análise compensando os efeitos de matriz (AGATEMOR; BEAUCHEMIN, 2011; CARTER et al., 2018). Apesar de muito utilizada, essa estratégia ainda apresenta controvérsias por existir várias exceções à regra geral quanto à escolha de uma espécie como IS, negligenciando o impacto que uma escolha inadequada pode ter sobre resultados quantitativos (BARROS; PINHEIRO; NÓBREGA, 2020). E ainda existem àqueles trabalhos cujos autores não fornecem justificativas consistentes para o uso de um IS (CASTIÑEIRA et al., 2001). Por esse motivo, ainda existe uma necessidade em entender esse processo para análises em ICP-MS.

2.4 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NA QUÍMICA ANALÍTICA

2.4.1 Otimização de métodos analíticos

Em todas as áreas de pesquisa que envolvam ciência experimental, existe a necessidade de conhecer as variáveis que são importantes e que influenciam no sistema proposto. Essa avaliação é realizada a partir da determinação das melhores condições dessas variáveis para a análise. São duas as metodologias utilizadas na otimização desses métodos: a univariada, onde cada fator é otimizado por vez, e a multivariada, a qual permite que todos os fatores sejam estudados simultaneamente, sendo ainda possível o estudo das interações entre esses fatores (CALADO; MONTGOMERY, 2003; FERREIRA, 2015).

Na otimização univariada, um fator é escolhido por vez para ter seu valor variando nos diferentes níveis, enquanto os outros fatores envolvidos no processo terão seus valores fixados. À medida que a melhor resposta analítica vai sendo obtida para cada fator, o sistema é otimizado. Esse método apresenta como vantagens a simplicidade e a facilidade de interpretação dos dados obtidos. No entanto, o maior gasto de reagentes, a maior demanda de tempo para realização dos experimentos e o fato de não considerar as interações que ocorrem

entre os fatores, são pontos negativos à uma maior utilização desse procedimento nos laboratórios de pesquisa (FERREIRA, 2015; NOVAES et al., 2016; PEREIRA FILHO, 2015).

Já as técnicas de otimização multivariada vêm sendo amplamente utilizadas em química analítica na otimização de variáveis associadas a procedimentos em diversas áreas. Essas metodologias permitem eficiência e economia no processo experimental, resultando em objetividade científica. A otimização multivariada baseia-se na triagem dos fatores estudados a fim de obter os efeitos significativos do sistema de análise que, após determinados, as condições ótimas de operação são obtidas utilizando planejamentos experimentais mais complexos, como exemplo, o planejamento de misturas (NOVAES et al., 2016). Com esse planejamento é possível otimizar as proporções adequadas dos componentes de uma mistura, frequentemente aplicado para àquelas com três fatores, onde é possível avaliar a eficiência dos componentes puros ou em misturas binárias e ternárias (BATISTA et al., 2020; SANTOS et al., 2019). Dessa forma, métodos de otimização multivariada envolvem projetos nos quais os níveis de todas as variáveis são avaliados simultaneamente.

2.4.2 Redes neurais artificiais aplicadas à análise exploratória

É cada vez maior na literatura o interesse da Química Analítica no desenvolvimento de sistemas que empregam inteligência artificial simulando o raciocínio analítico humano, também chamados de computação bioinspirada, os quais permitem conhecimento analítico a ser obtido de forma mais ampla. Dessa forma, técnicas de inteligência artificial com base em Redes Neurais Artificiais têm melhorado sobremaneira a automatização, aquisição e interpretação dos dados adquiridos.

As redes neurais artificiais (ANN, do inglês *Artificial neural network*) têm inspiração neurofisiológica, simulando o funcionamento do cérebro a partir de um neurônio artificial, tendo sido desenvolvida por McCulloch e Pitts (MCCULLOCH; PITTS, 1943). Uma ANN é composta por várias unidades de processamento conectadas por canais de comunicação associados a determinados pesos. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são entradas recebidas por suas conexões. O comportamento inteligente de uma ANN é um efeito global que se explica pelas interações entre as unidades de processamento da rede. As redes podem ser supervisionadas e não-supervisionadas, a depender do aprendizado (LEMES; DAL PINO, 2008).

Um tipo de algoritmo de rede neural que emprega aprendizagem não-supervisionada são os mapas auto-organizáveis (SOM, do inglês *Self-organizing map*). A estratégia de

aprendizagem para esses métodos envolve os processos de competição e cooperação entre os neurônios da rede, os quais são utilizados como classificadores para os dados de entrada, também chamados de elementos para classificação. O treinamento da rede é realizado apenas com os dados de entrada, e a partir da informação extraída com o aprendizado é possível identificar a categoria à qual cada dado pertence, sendo o objetivo desse processo reforçar as ligações que levem o sistema a produzir respostas mais eficientes (HAYKIN, 2001). Alguns trabalhos que fazem uso dessa ferramenta quimiométrica para avaliação e classificação de dados são reportados na literatura (CASTRO; DA SILVA; VIRGENS, 2020; DOS SANTOS et al., 2018; KOWALSKI et al., 2013; SILVA et al., 2019). A aplicação do SOM possibilita a redução da dimensionalidade dos dados, facilitando a interpretação e visualização destes em relação ao conjunto original. De forma geral, eles facilitam a interpretação simultânea de dados de amostras ambientais, processos de controle de qualidade e diagnósticos (BALBINOT et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estabelecer métodos analíticos para a determinação elementar em amostras de peixes e moluscos provenientes de sistemas estuarinos utilizando técnicas espectrométricas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Propor estratégias de preparo de amostras para a determinação de elementos traço, potencialmente tóxicos e tecnologicamente críticos em amostras de peixes (músculo, brânquias e fígado) e moluscos provenientes dos estuários da Baía do Pontal (Ilhéus, Bahia) e Baía de Paranaguá (Paranaguá, Paraná).
- Propor metodologias baseadas em determinações por GF AAS, MIP OES e ICP-MS, visando a determinação do teor total dos elementos.
- Empregar otimização multivariada e ferramentas de análise exploratória na avaliação das variáveis envolvidas nos procedimentos de preparo das amostras.
- Correlacionar os valores de elementos tóxicos encontrados com os estabelecidos pelos órgãos regulamentadores e então estimar a contaminação dos sistemas estuarinos.

4 **CAPÍTULO I – USO DO ÁCIDO FÓRMICO NO PREPARO DE AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM FORNO DE GRAFITE¹**

Neste trabalho, o ácido fórmico foi utilizado como solvente extrator em um procedimento rápido e preciso para determinação de Cd e Pb em tecido biológico por GF AAS. O procedimento consiste na adição de ácido fórmico à amostra, seguida de aquecimento e diluição simples antes da determinação dos analitos por GF AAS. A exatidão foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados TORT-3 (*Lobster hepatopaneas*) e NIST 1577b (*Bovine liver*), alcançando recuperações de 95 – 100% para Cd e 106 – 97% para Pb. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative standard deviation*), com valores iguais a 4,9% e 4,4% para Cd e Pb, respectivamente. Os limites de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of quantitation*) foram 0,010 (Cd) e 0,053 (Pb) $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo inferiores aos valores máximos permitidos pelas principais agências reguladoras. O procedimento proposto foi aplicado a amostras de moluscos e diferentes tecidos de peixes de áreas costeiras do Brasil. Para amostras de peixes, as concentrações variaram de 0,005 a 0,179 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e 0,055 – 16,71 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Nas amostras de moluscos, a variação foi de 0,022 – 0,194 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e 0,232 – 3,478 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Os resultados obtidos estão abaixo dos limites máximos permitidos, exceto para a amostra do molusco *Phacoides pectinatus*, que apresentou concentração de Pb duas vezes maior do que a recomendada pelos órgãos reguladores. O presente estudo oferece um procedimento analítico promissor, simples, de alta frequência, baixo custo e risco ambiental mínimo para a extração de elementos tóxicos em tecidos biológicos. Além disso, fornece limites baixos em conformidade com os LOQs estabelecidos por órgãos reguladores.

4.1 OBJETIVO

Desenvolver um método de preparo de amostras utilizando o ácido fórmico como solvente extrator de Cd e Pb para determinação por GF AAS.

¹ MOREIRA, L. S. et al. Evaluation of trace elements in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectrometry after sample treatment with formic acid. **Food Analytical Methods**, v. 15, p. 1687–1694, 2022. DOI: 10.1007/s12161-022-02240-3

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Instrumentação

Um banho de aquecimento (Fisatom, São Paulo, Brasil) foi usado no procedimento de extração com ácido fórmico. A determinação quantitativa elementar foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (modelo AA 6800, Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com sistema de aquecimento (modelo GFA-EX7, Shimadzu, Tóquio, Japão) e amostrador automático (modelo ASC-6100, Shimadzu, Tóquio, Japão). Para a determinação de Cd (228,8 nm) e Pb (283,3 nm) foi aplicada corrente de 8 e 10 mA, respectivamente, utilizando uma lâmpada de cátodo oco monoelementar (Shimadzu, Tóquio, Japão). O sinal analítico foi obtido por integração da área do pico em combinação com correção do BG usando uma lâmpada de deutério e modo de aquecimento longitudinal. Gás argônio 99,998% (White Martins Praxair, Araucária, Brasil) foi utilizado como gás de purga/proteção a uma vazão de 0,1 e 1,0 L min⁻¹ nas etapas de secagem e pirólise, respectivamente, exceto na etapa de atomização (sem gás). Foram utilizadas alíquotas de 20 µL de amostra e 5 µL de modificador químico, contendo Pd(NO₃)₂/Mg(NO₃)₂ na proporção 1,5:1 (m m⁻¹) em todas as determinações. O programa de aquecimento empregado no GF AAS está apresentado na TABELA 2.

TABELA 2 – PROGRAMA DE AQUECIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb EM GF AAS

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Modo
Pré-secagem	50	15	Rampa
Secagem 1	80	20	
Secagem 2	120	10	
Pré-pirólise	240	10	
Pirólise	700 (Cd) 1000 (Pb)	10	Patamar
Atomização	1300 (Cd) 1600 (Pb)	5	
Limpeza	2200 (Cd) 2400 (Pb)	2	

FONTE: A autora (2022).

4.2.2 Reagentes e soluções padrão

Ácido fórmico 98% m m⁻¹ (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e H₂O₂ 30% v v⁻¹ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados no procedimento de extração. Os modificadores químicos utilizados foram preparados por diluição em HNO₃ 1% v v⁻¹ a partir das soluções padrão de Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂ 10 g L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). As soluções padrão utilizadas na calibração do instrumento foram preparadas a partir

da diluição de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de Cd e Pb (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). As concentrações das soluções analíticas utilizadas para calibração foram 0 – 5 µg L⁻¹ para ambos analitos em HNO₃ e ácido fórmico 1% v v⁻¹. Material de referência certificado (CRM, do inglês *Certified reference material*) de TORT-3 (*Lobster hepatopancreas*) do *National Research Council Canada* (NRCC, Ottawa, Canadá) e NIST 1577b (*Bovine liver*) do *National Institute of Standard and Technology* (NIST, Gaithersburg, Estados Unidos) foram utilizados para avaliar a exatidão do procedimento.

4.2.3 Amostras estudadas e pré-tratamento

As amostras objeto de estudo foram provenientes dos mais importantes sistemas estuarinos do Brasil. Os trabalhos foram realizados levando-se em conta a intensidade com que esses ambientes têm sido afetados por atividades antropogênicas, como a agricultura, o comércio e a urbanização. Esse comportamento tem sido observado em diversas regiões estuarinas, com destaque para a Baía do Pontal (Ilhéus, Bahia) e a Baía de Paranaguá (Paranaguá, Paraná).

Foram investigadas amostras de bivalves das espécies *Phacoides pectinatus* e *Tagelus plebeius*, e peixes das espécies *Tilapia rendalli*, *Plagioscion squamosissimus*, *Lutjanus analis* e *Mugil cephalus* (amostras A, B e C) provenientes do estuário da Baía do Pontal. Também foram estudadas amostras de peixes das espécies *Rhamdia quelen*, *Geophagus brasilienses* e *Hoplias malabaricus* provenientes do estuário da Baía de Paranaguá. As amostras foram lavadas com água destilada para remoção de resíduos. Os diferentes tecidos dos peixes (fígado, brânquias e músculo) e moluscos foram retirados utilizando um bisturi de aço inoxidável. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, congeladas e liofilizadas por 48 h (liofilizador modelo Enterprise I, Terroni, Ltda., São Paulo, Brasil). Posteriormente foram moídas em moinho (modelo TE-350, Tecnal, Ltda., São Paulo, Brasil) e acondicionadas em frascos de polietileno. Todas as etapas foram realizadas utilizando água ultrapura (18,2 MΩ cm) obtida em um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos). O material utilizado foi descontaminado em ácido nítrico (HNO₃ 10% v v⁻¹) por 24 h e exaustivamente enxaguados com água ultrapura antes do uso.

4.2.4 Preparo da amostra

Para o procedimento de solubilização com ácido fórmico, uma massa de 100 mg de amostra foi pesada diretamente em tubo de polipropileno de 15 mL, seguida da adição de 5 mL de ácido fórmico concentrado e agitação em vórtex por aproximadamente 1 min. O tubo foi transferido para um banho de aquecimento e permaneceu em temperatura de 90 °C por 60 min. Após 30 min sob aquecimento, foi adicionado 0,5 mL de H₂O₂. Antes da análise por GF AAS, os extratos foram diluídos para uma concentração final de 50% v v⁻¹. As extrações foram feitas em triplicata para cada amostra (n = 3). Os CRMs de TORT-3 e NIST 1577b foram submetidos ao mesmo procedimento de extração.

4.2.5 Avaliação dos parâmetros analíticos

A eficiência do procedimento utilizado no preparo da amostra foi avaliada pela análise de CRM (TORT-3 e NIST 1577b). O teste t de *Student* (nível de confiança 95%) foi utilizado na comparação estatística e os resultados foram reportados em recuperação quantitativa (%). A precisão foi avaliada pelo RSD (%), calculado a partir de 10 medições independentes do CRM NIST 1577b (n = 10). O LOD e de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of quantitation*) foram calculados com a concentração do analito correspondente a 3 e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão das medidas independentes do branco analítico, executados nas mesmas condições experimentais, dividido pela inclinação da curva de calibração (IUPAC, 1978; SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

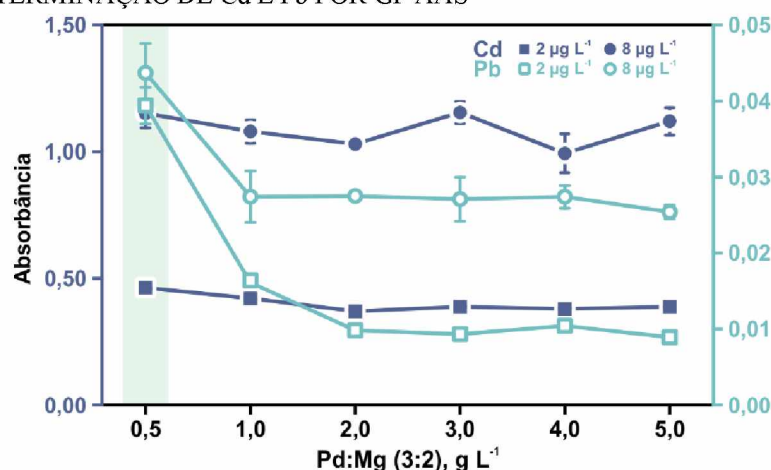
4.3.1 Otimização das condições instrumentais GF AAS

A otimização dos parâmetros operacionais é considerada uma das etapas de maior relevância para a atomização em forno de grafite, devido, principalmente, à ocorrência de interferências químicas, muitas vezes decorrentes da matriz. Otimizar um programa de aquecimento significa estabelecer as melhores temperaturas para as etapas constituintes, de modo a garantir a total remoção da matriz residual, atomização adequada do analito e limpeza apropriada do tubo de grafite para minimizar possíveis efeitos de memória. Nessa tarefa, os modificadores químicos são essenciais, principalmente porque permitem maior estabilidade térmica durante as etapas de pirólise e atomização. Essa estabilidade pode ser do analito ou da

matriz, dependendo da finalidade do trabalho (TORRES et al., 2016). Neste estudo, essa estabilidade térmica é para os analitos, a fim de reduzir os efeitos de matriz.

A seleção do modificador químico foi realizada com base em dados da literatura, que indicavam a mistura entre paládio e magnésio como a mais utilizada para a determinação da maioria dos elementos por GF AAS, razão pela qual é conhecido como modificador universal (WELZ; SCHLEMMER; MUDAKAVI, 1992). A concentração do modificador foi avaliada de forma univariada para cada analito, e os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 1.

FIGURA 1 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MODIFICADOR QUÍMICO Pd:Mg PARA DETERMINAÇÃO DE Cd E Pb POR GF AAS



FONTE: A autora (2022).

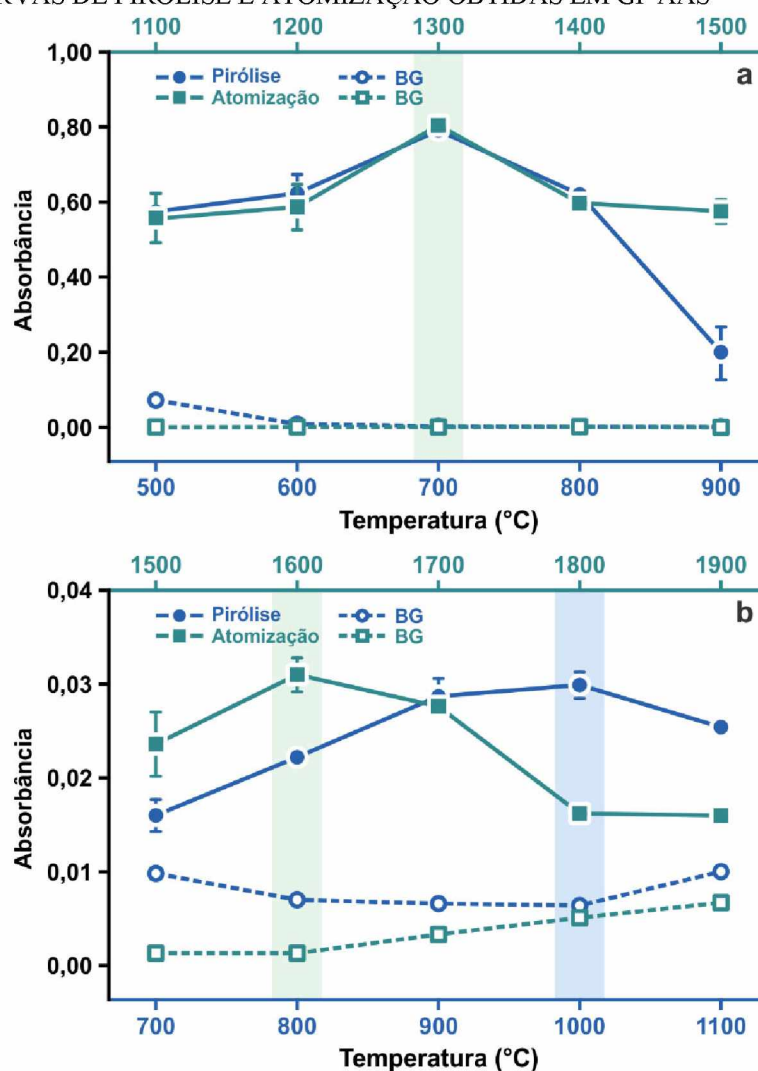
NOTA: Os volumes utilizados foram 3 µL da solução de paládio, 2 µL da solução de magnésio e 20 µL da solução padrão.

A mistura modificadora entre $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi avaliada entre as concentrações de 0,5 – 5 g L⁻¹, correspondendo às razões Pd:Mg (m m⁻¹) iguais a 1,5:1, 3:2, 6:4, 9:6, 12:8 e 15:10. Os experimentos foram realizados com soluções padrão de 2 e 8 µg L⁻¹ para Cd e Pb, preparadas em ácido fórmico 1% v v⁻¹. Nessa etapa de otimização, as temperaturas de pirólise foram fixadas em 600 °C (Cd) e 800 °C (Pb) e a atomização em 1200 °C (Cd) e 1800 °C (Pb). O perfil observado para ambos os analitos indicou queda e posterior estabilidade no sinal de absorbância à medida que a concentração do modificador químico aumentava, sendo mais pronunciada para o Pb. A resposta analítica foi o maior valor de absorbância integrada associado a baixos sinais de fundo e consistência de sinal durante a etapa de atomização. A mistura de 1,5 µg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ e 1 µg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi selecionada para ser utilizada neste trabalho.

O programa de aquecimento foi otimizado de forma univariada, ou seja, variando o fator específico e mantendo os demais fixos. Para o estabelecimento das temperaturas de pirólise e atomização, foram utilizadas soluções padrão (Cd e Pb) em meio de ácido fórmico (1% v v⁻¹). Os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 2. As temperaturas de pirólise

variaram de 500 a 900 °C para Cd e 700 a 1100 °C para Pb, enquanto as temperaturas de atomização variaram de 1100 a 1500 °C para Cd e 1500 a 1900 °C para Pb. O domínio experimental foi escolhido a partir de dados da literatura e temperaturas de atomização recomendadas pelo fabricante do equipamento. Foi observado que as temperaturas que levaram aos maiores valores de absorbância foram 700 °C e 1000 °C na etapa de pirólise, e 1300 °C e 1600 °C na etapa de atomização para Cd e Pb, respectivamente. Além da maior absorbância do sinal, a intensidade do BG e os RSDs (%) foram considerados para determinar a condição de temperatura mais adequada em cada etapa.

FIGURA 2 – CURVAS DE PIROLÍSE E ATOMIZAÇÃO OBTIDAS EM GF AAS



FONTE: A autora (2022).

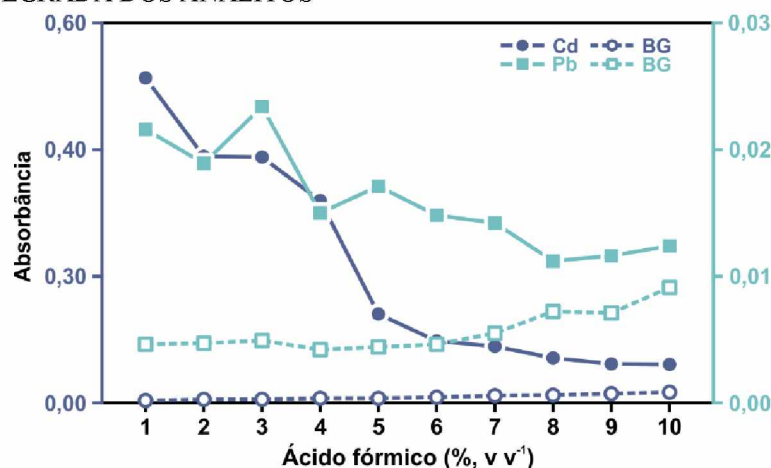
NOTA: Curvas obtidas para as soluções padrão de Cd (a) e Pb (b) preparadas em ácido fórmico 1% (v v⁻¹). A mistura entre 1,5 µg de Pd e 1 µg de Mg foi utilizada como modificador químico. Volumes de análise: 20 µL de amostra e 5 µL de mistura modificadora.

O efeito do teor de ácido fórmico no sinal analítico (absorbância) foi avaliado aumentando a porcentagem desse ácido na solução padrão de Cd e Pb, e os resultados obtidos

são mostrados na FIGURA 3. Para ambos os analitos, a maior absorbância foi obtida para a solução com a menor concentração de ácido fórmico ($1\% \text{ v v}^{-1}$). À medida que a concentração do ácido foi aumentada, observou-se uma diminuição significativa do sinal analítico, sendo mais pronunciada para o Cd, onde a maior concentração ($10\% \text{ v v}^{-1}$) teve uma absorbância 8,5 vezes menor que a obtida para a concentração de $1\% \text{ v v}^{-1}$. Os valores reais de absorbância para as duas concentrações foram 0,5132 e 0,0601 (Cd) e 0,0216 e 0,0133 (Pb), respectivamente.

A diminuição do sinal analítico observada na FIGURA 3 pode estar associada ao aumento do carbono residual resultante das diferentes concentrações de ácido fórmico utilizadas no preparo das soluções padrão. Consequentemente, ocorre o aumento do BG dificultando a determinação dos analitos. Em um sistema de introdução de amostra em forno de grafite, que é do tipo discreto, as propriedades físicas das soluções são menos importantes em comparação às técnicas de plasma, que normalmente usam nebulização. No entanto, podem interferir na interação da solução com as paredes do tubo de grafite, mesmo que o solvente e a matriz da amostra sejam eliminados nas etapas de secagem e pirólise do programa de temperatura (TORMEN et al., 2012).

FIGURA 3 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO NO SINAL DE ABSORBÂNCIA INTEGRADA DOS ANALITOS



FONTE: A autora (2022).

NOTA: A concentração das soluções padrão foi de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Foram utilizadas temperaturas de pirólise de 700°C (Cd) e 1000°C (Pb) e temperaturas de atomização de 1300°C (Cd) e 1800°C (Pb). A mistura entre $1,5 \mu\text{g}$ de Pd e $1 \mu\text{g}$ de Mg foi utilizada como modificador químico. Volumes de análise: $20 \mu\text{L}$ de amostra e $5 \mu\text{L}$ de mistura modificadora.

4.3.2 Parâmetros analíticos

As curvas de calibração foram preparadas pelo método de calibração externa em ácido fórmico ($1\% \text{ v v}^{-1}$). As equações obtidas foram: $y = 0,185C_{\text{Cd}} + 0,046$; $R^2 = 0,991$ e $y = 0,0157C_{\text{Pb}} + 0,0027$; $R^2 = 0,992$. Os coeficientes de determinação ($R^2 > 0,99$) indicaram ajustes

satisfatórios para calibração instrumental. O procedimento proposto foi aplicado nos CRMs TORT-3 e NIST 1577b, cujas recuperações quantitativas são apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 – VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS NA APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO USANDO ÁCIDO FÓRMICO EM MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

	TORT-3 (<i>Lobster hepatopancreas</i>)		NIST 1577b (<i>Bovine liver</i>)	
	Cd	Pb	Cd	Pb
Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	42,3 $\pm$ 1,8	0,225 $\pm$ 0,018	0,50 $\pm$ 0,03	0,129 $\pm$ 0,004
Valor encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	40,1 $\pm$ 3,5	0,239 $\pm$ 0,047	0,498 $\pm$ 0,03	0,126 $\pm$ 0,010
Recuperação (%)	95	106	100	98
Valor $t_{\text{calculado}}$	2,72	1,27	0,35	1,30

FONTE: A autora (2022).

NOTA: média $\pm$ incerteza ($n = 3$), $t_{\text{tabelado}} = 4,303$, 95% de confiança.

Por meio de comparação estatística, foi verificado que os valores de concentração obtidos pelo procedimento de extração com ácido fórmico não diferiram significativamente dos valores certificados ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$), sugerindo que o procedimento proposto forneceu resultados satisfatórios. Embora o ácido fórmico não apresente características oxidantes e o seu mecanismo de ação não seja totalmente elucidado, como os ácidos inorgânicos frequentemente utilizados no preparo de amostras, ele pode promover reações de extração e/ou complexação (OLIVEIRA et al., 2018).

A precisão foi avaliada pelo RSD (%), calculado a partir das medidas independentes do CRM NIST 1577b ($n = 10$), onde foram obtidos valores iguais a 4,9% e 4,4% para Cd e Pb, respectivamente. Para o procedimento de extração foram obtidos LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) iguais a 0,003 (Cd) e 0,018 (Pb) e LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) iguais a 0,010 (Cd) e 0,053 (Pb). Os valores são consideravelmente inferiores aos limites máximos estabelecidos pelos principais órgãos reguladores para a concentração desses elementos em amostras de músculo de peixe e moluscos bivalves (FAO/WHO, CE e ANVISA).

Os menores valores de LOD e LOQ encontrados para o procedimento de extração indicaram uma melhora na sensibilidade quando se faz uso do ácido fórmico diluído. Em estudos que utilizaram técnicas de plasma como ICP-MS (BIANCHI et al., 2017; GRINDLAY et al., 2013) e ICP OES (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; OLIVEIRA et al., 2018), o aumento da sensibilidade foi associado a transferência de carga entre as espécies de carbono e os analitos. Esses valores são equiparáveis aos métodos convencionais, com a vantagem da simplificação do procedimento de preparo, rapidez na obtenção dos dados e exatidão, podendo então a extração ser aplicada para determinação desses analitos em amostras ambientais. Uma

relação de estudos que fizeram uso do ácido fórmico como solvente extrator de espécies inorgânicas em diversas amostras e utilizando diferentes técnicas analíticas para determinação é apresentada na TABELA 4.

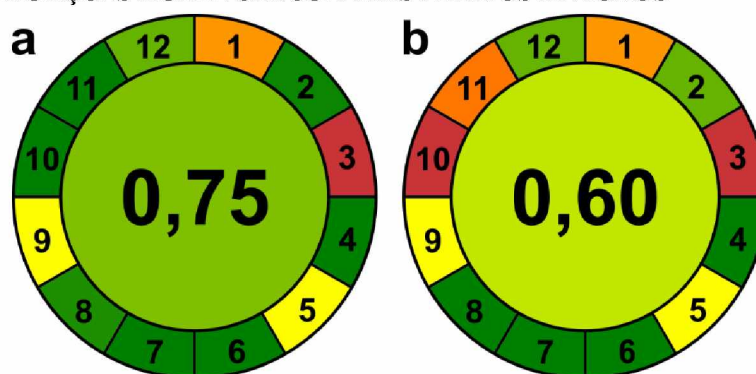
Em relação à frequência analítica, os procedimentos de preparo das amostras (comparando o proposto usando banho de aquecimento e ácido fórmico com o padrão usando forno de micro-ondas e ácido nítrico) apresentaram resultados comparáveis com frequência analítica semelhante: 30 amostras/h para banho de aquecimento e 18 amostras/h para digestão assistida por micro-ondas. A utilização do banho de aquecimento proporcionou resultados satisfatórios semelhantes aos obtidos pela digestão assistida por micro-ondas para a determinação de Cd e Pb em TORT-3. Além disso, esse procedimento pode ser facilmente implementado em laboratórios de rotina.

4.3.3 AGREE score

O método de extração com ácido fórmico foi avaliado quanto à adequação aos princípios da GAC utilizando a Calculadora Analítica Verde – AGREE index (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

O AGREE score fornecido para o método proposto foi de 0,75, valor superior à pontuação obtida no método de digestão ácida convencional (pontuação 0,60) (FIGURA 4). O maior valor atribuído ao método de extração foi associado à substituição do ácido nítrico pelo ácido fórmico, considerado de baixo risco, custo e toxicidade. Além disso, o método proposto apresentou alta frequência analítica (30 amostras/h) e eficiência, utilizando baixos volumes de solventes e baixa geração de resíduos.

FIGURA 4 – PONTUAÇÕES AGREE CALCULADAS PARA OS MÉTODOS



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Extração com ácido fórmico (a) e digestão ácida convencional (b).

TABELA 4 – PROCEDIMENTOS QUE EMPREGARAM ÁCIDO FÓRMICO NA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM DIFERENTES AMOSTRAS

Amostra	Analito	Técnica de detecção	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Referência
Tecidos biológicos marinhos	Ag, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Se	ET AAS ICP OES		0,01 – 0,25 1 – 200	(SCRIVER et al., 2005)
Óleos orgânicos (Nozes e coco babaçu)	Al, As, Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn	ICP-MS	92 – 104%	0,001 – 0,26	(LOPES et al., 2016)
Amostras biológicas	As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Ga, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Ti, U, V e Zn	ICP-MS		0,0005 – 0,22	(TORMEN et al., 2010)
Tecidos biológicos	As, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn	ICP-TOF-MS		0,00005 – 0,006	(NARUKAWA; WILLIE, 2010)
Tecidos biológicos	As, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se e V	ETV-ICP-MS		0,0005 – 0,85	(TORMEN et al., 2012)
Alimentos	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	ICP OES	80,7 – 114%	0,056 – 600 (g/100g)	(OLIVEIRA et al., 2018)
Amostras de carnes	Cd, Pb, Sn	GF AAS	93,7 – 109%	0,0008 – 0,0660	(ORESTE et al., 2013)
Tecidos biológicos	Hg	CV AAS		0,001 – 0,01	(KAN et al., 2006)
Sêmen bovino	Se	ICP-MS		0,00003 – 0,0011	(BIANCHI et al., 2017)

FONTE: A autora (2022).

NOTA: limite de detecção (LOD), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET AAS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de massa com tempo de voo ortogonal e plasma indutivamente acoplado (ICP-TOF-MS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e vaporização eletrotérmica (ETV-ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) e espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS).

4.3.4 Aplicação do procedimento proposto

O procedimento proposto neste estudo foi aplicado na extração de Cd e Pb em diferentes tecidos de peixes (músculo, brânquias e fígado) e moluscos bivalves. O produto final solubilizado apresentou cor escura, sem partículas visíveis e pôde ser facilmente pipetado. As concentrações de Cd foram inferiores ao LOQ para os tecidos de músculo e brânquias de todas as espécies de peixes estudadas. Os moluscos apresentaram concentrações de 0,194 e 0,022 $\mu\text{g g}^{-1}$ para *Phacoides pectinatus* e *Tagelus plebeius*, respectivamente. As concentrações para Pb são apresentadas na TABELA 5.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE Pb DETERMINADA EM TECIDOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES E MOLUSCOS APÓS EXTRAÇÃO COM ÁCIDO FÓRMICO

Tecido	Espécie	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$, média $\pm$ incerteza)
Baía do Pontal (Bahia)		
Músculo	<i>M. cephalus</i> (A)	0,074 $\pm$ 0,003
	<i>M. cephalus</i> (B)	0,141 $\pm$ 0,012
	<i>M. cephalus</i> (C)	0,242 $\pm$ 0,044
	<i>T. rendalli</i>	0,266 $\pm$ 0,199
	<i>P. squamosissimus</i>	0,073 $\pm$ 0,041
	<i>L. analis</i>	0,055 $\pm$ 0,026
Brânquias	<i>M. cephalus</i> (A)	ND
	<i>P. squamosissimus</i>	2,298 $\pm$ 0,328
	<i>L. analis</i>	0,169 $\pm$ 0,003
Fígado	<i>M. cephalus</i> (A)	0,124 $\pm$ 0,003
Total	<i>P. pectinatus</i>	3,478 $\pm$ 0,361
	<i>T. plebeius</i>	0,232 $\pm$ 0,015
Baía de Paranaguá (Paraná)		
Músculo	<i>R. quelen</i>	0,117 $\pm$ 0,023
	<i>G. brasilienses</i>	0,054 $\pm$ 0,012
	<i>H. malabaricus</i>	0,131 $\pm$ 0,021
Fígado	<i>H. malabaricus</i>	16,71 $\pm$ 2,17

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Não determinado (ND).

A maior concentração de Pb foi observada em *Phacoides pectinatus*, espécie procedente da Baía do Pontal. A concentração obtida foi cerca de duas vezes superior ao recomendado pelas agências reguladoras. É sabido que moluscos são organismos bioacumuladores devido à característica associada a obtenção de alimentos por filtração, que maximiza o contato dos tecidos com elementos químicos presentes no ambiente. Também é possível que o maior contato com a fração sedimentar de fundo contribua com o aumento da

absorção desses elementos por esses organismos (JIANG et al., 2018; ROUANE-HACENE et al., 2015).

Nas amostras de peixes, as concentrações de Pb para o tecido músculo estavam abaixo dos valores recomendados, variando na faixa de 0,054 – 0,266 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para as brânquias, a maior concentração foi obtida para a espécie *Plagioscion squamosissimus*. Já os tecidos de fígado apresentaram as maiores concentrações para ambos os analitos. As espécies *Mugil cephalus* (amostra A) e *Hoplias malabaricus* apresentaram concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de 0,179 e 0,910 para Cd e 0,124 e 16,7 para Pb, respectivamente. Entre as espécies estudadas nesse trabalho, *Hoplias malabaricus*, proveniente da Baía de Paranaguá, foi a responsável por bioacumular as maiores concentrações dos analitos.

Em áreas impactadas por atividades antrópicas, as concentrações de elementos químicos em organismos tendem a ser mais elevadas devido à maior exposição (ANANDKUMAR et al., 2018; ŁUCZYŃSKA; PASZCZYK; ŁUCZYŃSKI, 2018). Os peixes apresentam características biológicas semelhantes e tendem a bioacumular espécies químicas em diferentes tecidos com pequenas variações em função da concentração presente no ambiente. No fígado, as concentrações são geralmente elevadas devido à função metabólica que esse órgão desempenha. Nas brânquias, o contato direto com a água para obtenção de oxigênio favorece a absorção das espécies presentes na água (RAMOS-MIRAS et al., 2019).

4.4 CONCLUSÃO

O ácido fórmico foi eficiente para a extração de Cd e Pb em amostras de peixes e moluscos e proporcionou menores limites de detecção, sendo os analitos determinados com precisão e exatidão satisfatórias. O procedimento é atrativo devido à sua simplicidade, rapidez e eficiência, proporcionando uma alternativa simples e de baixo custo aos procedimentos convencionais de digestão ácida frequentemente utilizados. Além disso, apresentou um AGREE score de 0,75, o que indica adequação aos princípios da GAC. As concentrações obtidas para a maioria das amostras foram inferiores aos valores máximos estabelecidos pelas principais agências reguladoras (FAO/OMS, CE e ANVISA – Brasil) para esses analitos, exceto a amostra do molusco *Phacoides pectinatus*, que apresentou alta concentração de Pb, o que indica possível contaminação do sistema estuarino por este elemento.

5 **CAPÍTULO II – COPRECIPITAÇÃO DE $Mg(OH)_2$ COMO ESTRATÉGIA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUZIDO POR MICRO-ONDAS²**

Neste trabalho, um método empregando o procedimento de coprecipitação com hidróxido de magnésio como carreador para separação/pré-concentração de arsênio(V), cádmio(II), cromo(III), cobalto(II), cobre(II), manganês(VII), mercúrio(II), níquel(II) e vanádio(V) foi desenvolvido. O método foi aplicado em amostras de peixes e mariscos, e os elementos foram determinados por MIP OES. O planejamento fatorial completo de dois níveis para quatro variáveis e um planejamento de mistura foram empregados para avaliar e otimizar os fatores envolvidos nesse sistema. Em condições otimizadas, a exatidão do procedimento foi avaliada utilizando CRM, obtendo-se recuperações de 92 – 105% para os elementos estudados. O método proposto apresentou limites de detecção na faixa de 0,01 – 0,33 $\mu g\ g^{-1}$ e fatores de enriquecimento de 5, 17, 6, 25, 24, 25, 25, 25 e 13 para os analitos As^{5+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{7+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} e V^{5+} , respectivamente. As ferramentas quimiométricas aplicadas foram eficazes para otimizar as variáveis importantes envolvidas no procedimento de coprecipitação desenvolvido. O método proposto apresentou simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade, permitindo a determinação dos analitos por MIP OES.

5.1 OBJETIVO

Desenvolver um método de pré-concentração utilizando o carreador $Mg(OH)_2$ para coprecipitação de quantidades traço de As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni e V e posterior determinação por MIP OES.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Instrumentação

A determinação quantitativa elementar foi realizada em um espectrômetro de emissão ótica com plasma induzido por micro-ondas (modelo 4200 MP-AES, Agilent Technologies,

² MOREIRA, L. S. et al. Coprecipitation magnesium(II) hydroxide as a strategy of pre-concentration for trace elemental determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 169, p. 105899, 2020. DOI: 10.1016/j.sab.2020.105899

Melbourne, Austrália), equipado com um gerador (modelo 4107 N₂, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) e bomba peristáltica de cinco canais. As condições operacionais e instrumentais selecionadas para determinação dos analitos estão apresentadas na TABELA 6. As amostras de peixes e moluscos foram digeridas em micro-ondas (UltraWAVE, Milestone, Sorisole, Itália). As medidas de pH foram realizadas em pHmetro de bancada (modelo PHS3BW, BEL Engineering®, Milão, Itália) e a centrifugação (modelo Excelsa II 206 BL, FANEM, São Paulo, Brasil) foi utilizada para acelerar a separação do precipitado.

TABELA 6 – PARÂMETROS OPERACIONAIS E INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NO MIP OES PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR

Parâmetro instrumental	Condição operacional
Frequência de micro-ondas (GHz)	2,45
Potência do plasma (kW)	1,0
Tempo de integração (s)	8
Nebulizador/Câmara de nebulização	OneNeb®/Ciclônica (duplo passo)
Posição de visualização	0 (As); -30 (Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni e V)
Fluxo de gás do nebulizador (L min ⁻¹)	0,75 (As); 0,50 (Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni e V)
Comprimento de onda (nm)	As I 197,2; Cd I 228,80; Cr I 425,43; Co I 340,51; Cu I 324,75; Mn I 403,08; Hg I 435,83; Ni I 352,45; V I 438,99
Linha atômica (I)	

FONTE: A autora (2022).

5.2.2 Reagentes e soluções padrão

Os experimentos foram realizados com o uso de HNO₃ e HCl (Synth, Diadema, Brasil) purificados em um sistema de destilação sub-boiling, Distillacid™ (modelo BSB-939-IR, Berghof, Eningen, Alemanha). Foram utilizados os reagentes: cloreto de magnésio, acetato de etila, acetona, metanol (Merck, Bedford, Estados Unidos) e hidróxido de sódio (Synth, Diadema, Brasil). As soluções padrão foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni e V (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça). As concentrações das soluções analíticas utilizadas para calibração foram 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µg L⁻¹. O CRM TORT-3 foi utilizado para avaliar a exatidão do método desenvolvido.

5.2.3 Preparo da amostra

5.2.3.1 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

Após a etapa de pré-tratamento, as amostras foram pesadas diretamente em tubos de digestão para micro-ondas. Esse procedimento foi realizado com 200 mg de amostra, 5 mL de HNO_3 (2 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹). Volumes de 150 mL de água e 5 mL de HNO_3 concentrado foram adicionados à câmara de reação única que foi pressurizada com nitrogênio gasoso a 40 bar. O programa de aquecimento para a digestão foi aplicado em seis etapas sucessivas: (1) 2,5 min de rampa até 180 °C, (2) 2,5 min de patamar em 180 °C, (3) 2,5 min de rampa até 220 °C, (4) 5 min de patamar em 220 °C, (5) 10 min de rampa até 240 °C e (6) 10 min de patamar em 240 °C. Em todas as etapas foram utilizadas potência de 1500 watts e pressão de 110 bar. Os digeridos obtidos foram diluídos para um volume final de 25 mL e refrigerados a aproximadamente 4 °C até a análise. Esse mesmo procedimento de digestão também foi aplicado no TORT-3.

5.2.3.2 Estratégia de otimização

O procedimento de coprecipitação foi otimizado aplicando-se o planejamento fatorial completo em dois níveis para quatro variáveis (2⁴), onde foram estudados os parâmetros críticos para essa extração. Os fatores e níveis estudados foram: concentrações (mol L^{-1}) de hidróxido de sódio (C_{NaOH} , $3,64 \times 10^{-3}$ – $7,28 \times 10^{-3}$) e cloreto de magnésio (C_{MgCl_2} , $7,09 \times 10^{-4}$ – $2,12 \times 10^{-3}$), tipo de dispersor (TD, HCl/HNO_3) e volume de solvente orgânico acetato de etila (EA, 0 a 1,25 mL).

Um planejamento de mistura simplex centroide também foi aplicado para avaliar a influência dos solventes orgânicos no procedimento. Nesse planejamento, acetato de etila, acetona e metanol foram estudados em diferentes proporções. O pH, um parâmetro crítico em todo processo, foi cuidadosamente avaliado para aumentar a eficiência da extração.

Para obter uma única condição experimental envolvendo todos os elementos estudados, os resultados foram tratados utilizando a resposta múltipla (MR, do inglês *Multiple response*) de acordo com a equação (1) (BEZERRA et al., 2019). A análise e o processamento dos dados obtidos no trabalho foram realizados no software Statistica® 12 (StatSoft, Tulsa, Estados Unidos).

$$\text{MR} = \frac{I_{\text{As}}}{\text{HI}_{\text{As}}} + \frac{I_{\text{Cd}}}{\text{HI}_{\text{Cd}}} + \frac{I_{\text{Cr}}}{\text{HI}_{\text{Cr}}} + \frac{I_{\text{Co}}}{\text{HI}_{\text{Co}}} + \frac{I_{\text{Cu}}}{\text{HI}_{\text{Cu}}} + \frac{I_{\text{Mn}}}{\text{HI}_{\text{Mn}}} + \frac{I_{\text{Hg}}}{\text{HI}_{\text{Hg}}} + \frac{I_{\text{Ni}}}{\text{HI}_{\text{Ni}}} + \frac{I_{\text{V}}}{\text{HI}_{\text{V}}} \quad (1)$$

Onde: I_{As} = intensidade obtida para o analito As no experimento.

HI_{As} = intensidade mais alta obtida para o analito As no bloco estudado.

5.2.3.3 Procedimento de coprecipitação

O procedimento de coprecipitação por $\text{Mg}(\text{OH})_2$ foi otimizado utilizando soluções padrão. No tubo de ensaio contendo 25 mL de amostras digeridas simuladas, foram adicionados $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni e V, $7,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de magnésio e 1 mL dos solventes acetona e acetato de etila na proporção 1:1. O pH foi ajustado para 12,2 com solução de hidróxido de sódio 6 mol L^{-1} . O tubo foi agitado manualmente por alguns segundos e depois centrifugado a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado remanescente foi solubilizado com 1 mL de HNO_3 5 mol L^{-1} . Os analitos foram determinados por MIP OES e a resposta analítica foi a intensidade de emissão.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Otimização das condições de coprecipitação

5.3.1.1 Planejamento fatorial

A otimização multivariada de algumas condições experimentais foi realizada para extrair o maior número possível de elementos, a fim de obter a melhor eficiência no procedimento e a maior sensibilidade na determinação. Os domínios experimentais para cada fator, nível máximo, mínimo e ponto central foram definidos com base em dados da literatura (SÁ et al., 2018). A matriz experimental do planejamento fatorial aplicado, valores reais e codificados e respostas analíticas, apresentadas como MR, está apresentada na TABELA 7. As réplicas foram realizadas no ponto central para permitir uma melhor avaliação do efeito de um fator no domínio experimental estudado, estimando a variância e o erro experimental (FERREIRA et al., 2018).

Para interpretação dos resultados encontrados, foram avaliados os efeitos dos fatores principais e de todas as possíveis interações entre esses fatores com os respectivos erros padrão, sendo o objetivo identificar quais deles seriam estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (FERREIRA et al., 2018).

TABELA 7 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA OTIMIZAÇÃO DOS FATORES ENVOLVIDOS NO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO E RESPOSTA MÚLTIPLA

Experimento	C _{NaOH} (x 10 ⁻³)	C _{MgCl₂} (x 10 ⁻³)	TD	EA (mL)	Resposta múltipla
1	3,64 (-1)	0,709 (-1)	HCl (-1)	0,00 (-1)	8,841
2	7,28 (1)	0,709 (-1)	HCl (-1)	0,00 (-1)	9,205
3	3,64 (-1)	2,12 (1)	HCl (-1)	0,00 (-1)	4,977
4	7,28 (1)	2,12 (1)	HCl (-1)	0,00 (-1)	7,339
5	3,64 (-1)	0,709 (-1)	HNO ₃ (1)	0,00 (-1)	7,407
6	7,28 (1)	0,709 (-1)	HNO ₃ (1)	0,00 (-1)	8,084
7	3,64 (-1)	2,12 (1)	HNO ₃ (1)	0,00 (-1)	6,080
8	7,28 (1)	2,12 (1)	HNO ₃ (1)	0,00 (-1)	7,853
9	3,64 (-1)	0,709 (-1)	HCl (-1)	1,25 (1)	2,013
10	7,28 (1)	0,709 (-1)	HCl (-1)	1,25 (1)	7,796
11	3,64 (-1)	2,12 (1)	HCl (-1)	1,25 (1)	3,533
12	7,28 (1)	2,12 (1)	HCl (-1)	1,25 (1)	6,531
13	3,64 (-1)	0,709 (-1)	HNO ₃ (1)	1,25 (1)	4,460
14	7,28 (1)	0,709 (-1)	HNO ₃ (1)	1,25 (1)	6,521
15	3,64 (-1)	2,12 (1)	HNO ₃ (1)	1,25 (1)	2,736
16	7,28 (1)	2,12 (1)	HNO ₃ (1)	1,25 (1)	7,193
17	5,46 (0)	1,41 (0)	HCl/HNO ₃ (0)	0,625 (0)	5,220
18	5,46 (0)	1,41 (0)	HCl/HNO ₃ (0)	0,625 (0)	4,886
19	5,46 (0)	1,41 (0)	HCl/HNO ₃ (0)	0,625 (0)	6,130

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Resultados analíticos para As, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Hg, Ni, e V.

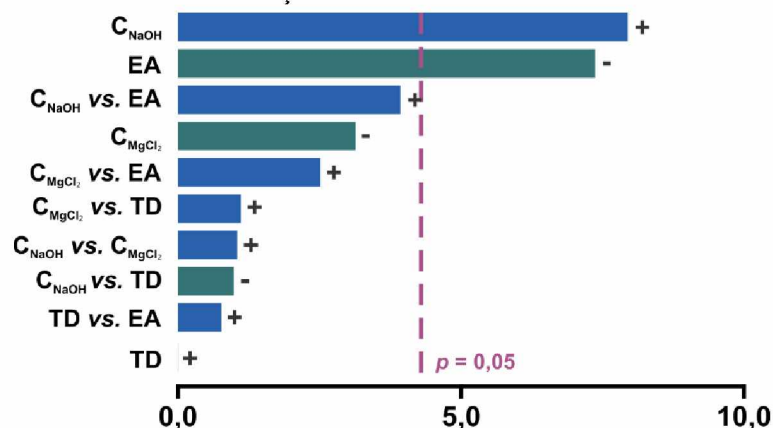
LEGENDA: concentração de hidróxido de sódio (C_{NaOH} mol L⁻¹), concentração de cloreto de magnésio (C_{MgCl₂} mol L⁻¹), tipo de dispersor (TD), Volume de solvente orgânico acetato de etila, mL (EA).

O gráfico de pareto, que apresenta os efeitos padronizados de todos os parâmetros do modelo, está apresentado na FIGURA 5. Os fatores estatisticamente significativos foram C_{NaOH} e EA, apresentando valores dos efeitos calculados com sinais opostos. Para a C_{NaOH} foi encontrado um valor de efeito positivo, enquanto para o EA o valor do efeito foi negativo. A partir dessas observações, é possível inferir que para as condições de preparo de amostra estudadas, uma eficiente extração dos analitos por coprecipitação é conseguida com maiores concentrações de hidróxido de sódio e menores volumes do solvente orgânico. Outra importante consideração a ser feita, consiste no fato do maior valor de intensidade encontrado para os analitos ter sido obtido no experimento de sinal oposto para esses dois fatores. A interação entre eles apresentou efeito com sinal positivo, estando de acordo com as observações feitas até o momento.

A validação do modelo proposto foi realizada a partir da verificação do ajuste entre os dados experimentais e os valores preditos. Para isso, foram avaliados a partir da análise de variância (ANOVA, do inglês *Analysis of variance*) e na correlação existente entre os valores

preditos e observados. Além disso, o método da regressão linear foi aplicado para obtenção da equação de uma reta que também possibilita a avaliação do ajuste para o modelo proposto (FERREIRA et al., 2018).

FIGURA 5 – GRÁFICO DE PARETO OBTIDO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL (2^4) NA OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E DETERMINAÇÃO POR MIP OES



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: concentração de hidróxido de sódio (C_{NaOH} , mol L⁻¹), concentração de cloreto de magnésio (C_{MgCl_2} , mol L⁻¹), tipo de dispersor (TD), e volume de acetato de etila (EA, mL).

A ANOVA para o planejamento fatorial indicou a falta de ajuste com valor de $p > 0,05$, o que significa que os dados obtidos estão sendo satisfatoriamente descritos. O teste de Fisher (teste F) foi aplicado para verificar o ajuste do modelo proposto, no qual o valor de F calculado para a falta de ajuste foi de 3,06. Esse valor é menor que o F tabelado de 19,3, indicando que o erro puro se confunde com a falta de ajuste, ou seja, o modelo proposto não apresenta falta de ajuste e descreve a região experimental adequadamente (PIMENTEL; NETO, 1996). Outra avaliação foi realizada considerando o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9013$) que evidenciou uma correlação satisfatória, com valor de R^2 maior que 0,90.

Para as variáveis que não foram significativas, as condições $C_{MgCl_2} 7,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e HNO₃ como TD foram utilizadas como as mais apropriadas para os experimentos posteriores. Em seguida, foi realizado um planejamento de mistura para verificar a ação de solventes orgânicos na coprecipitação e uma avaliação univariada do pH para obter a melhor condição da C_{NaOH} .

5.3.1.2 Planejamento de mistura

Para avaliar a influência de solventes orgânicos no procedimento de coprecipitação, foi empregado um planejamento de mistura simplex centroide envolvendo diferentes

proporções de acetato de etila (EA), acetona (AC) e metanol (MT). A matriz experimental com os valores codificados e reais, além de sinal analítico, é apresentada na TABELA 8.

TABELA 8 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO DE MISTURA PARA AVALIAR AS PROPORÇÕES DOS SOLVENTES ORGÂNICOS

Experimento	Metanol (μL)	Acetona (μL)	Acetato de etila (μL)	Resposta múltipla
1	1000 (1)	0 (0)	0 (0)	8,645
2	0 (0)	1000 (1)	0 (0)	10,597
3	0 (0)	0 (0)	1000 (1)	9,622
4	500 (0,5)	500 (0,5)	0 (0)	7,552
5	500 (0,5)	0 (0)	500 (0,5)	10,359
6	0 (0)	500 (0,5)	500 (0,5)	10,696
7	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	10,944
8	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	10,449
9	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	333,3 (0,333)	10,816

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Aplicado com 25 mL de amostra digerida, C_{MgCl_2} $7,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, pH 12 e 5 min de centrifugação.

Assim como no planejamento fatorial, foram realizadas repetições no ponto central para permitir uma melhor avaliação do efeito de um fator no domínio experimental estudado, estimando-se variância e erro experimental (FERREIRA et al., 2018). As misturas entre os solventes foram estudadas e a avaliação dos resultados foi realizada a partir da ANOVA (TABELA 9).

Os modelos linear, quadrático e cúbico especial foram testados. Apenas o tipo cúbico especial apresentou modelo com efeito significativo, enquanto os tipos linear e quadrático não apresentaram ajuste adequado. Para essas duas circunstâncias a falta de ajuste foi significativa, com valor de $p < 0,05$. Outra avaliação foi realizada considerando o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$), que apresentou correlação satisfatória ($R^2 > 0,90$). O teste F mostrou que a redução de resíduos da expansão do modelo pela introdução de termos cúbicos era vantajosa, apesar de tornar a função matemática mais complexa (BEZERRA et al., 2008; PIMENTEL; NETO, 1996). Um modelo cúbico especial foi então ajustado aos dados experimentais para descrever a região experimental, representada na FIGURA 6, por melhor se adequar ao planejamento de mistura proposto.

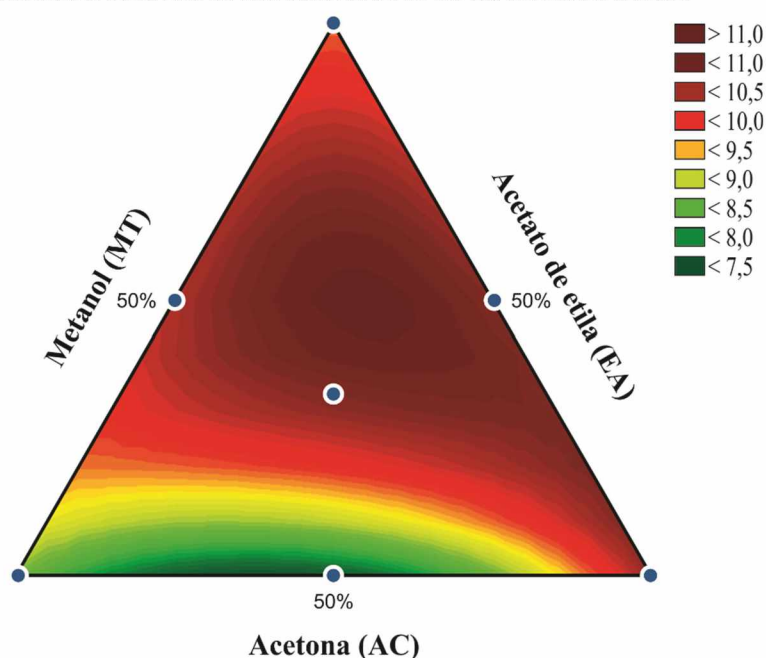
TABELA 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS MODELOS LINEAR (a), QUADRÁTICO (b) E CÚBICO ESPECIAL (c), AJUSTADOS PARA AS RESPOSTAS MÚLTIPLAS OBTIDAS NO PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Modelo	Fonte de variação	SS	Df	MS	F	Valor p
a)	Regressão	2,981	2	1,490	1,16	0,375
	Falta de ajuste	7,575	4	1,894	28,73	0,034
	Erro puro	0,132	2	0,066		
	Total	10,688	8	1,336		
b)	Regressão	8,988	5	1,797	3,17	0,186
	Falta de ajuste	1,569	1	1,569	23,80	0,039
	Erro puro	0,132	2	0,066		
	Total	10,688	8	1,336		
c)	Regressão	10,556	6	1,759	26,69	0,037
	Erro total	0,132	2	0,066		
	Total	10,688	8	1,336		

FONTE: A autora (2022).

NOTA: soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), estatística crítica Fisher (F).

FIGURA 6 – GRÁFICO DE CONTOURNO OBTIDO PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURA, INDICANDO A REGIÃO DE MÁXIMA RESPOSTA ANALÍTICA



FONTE: A autora (2022).

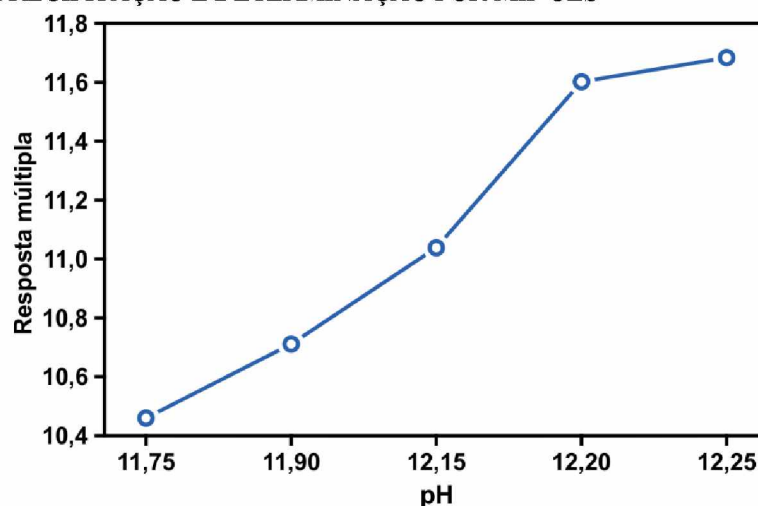
Considerando os resultados de MR para cada experimento, da ANOVA e a análise do gráfico de contorno, foi estabelecido que a mistura de acetato de etila com acetona na proporção 1:1 proporcionou uma melhoria na eficiência de extração dos analitos no procedimento de coprecipitação, que foi associado à mudança na constante dielétrica obtida pela adição de solventes orgânicos, que diminuiu a solubilidade do precipitado de $Mg(OH)_2$ (INAGAKI et al.,

2009). A mistura nessas proporções foi utilizada no procedimento de coprecipitação para a determinação de As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni e V por MIP OES.

5.3.1.3 Efeito do pH

Um fator crítico para a coprecipitação eficaz de elementos traço é o pH, uma vez que este é responsável pela formação do precipitado de $Mg(OH)_2$ (BAHADIR et al., 2014; CITAK; TUZEN; SOYLAK, 2009; ELÇI; SARAÇOĞLU, 1998). Por esse motivo, a C_{NaOH} foi avaliada de forma univariada na faixa de pH de 11,75 a 12,25. Esses valores foram escolhidos com base na literatura e o estudo foi realizado em condições previamente otimizadas. Os resultados são apresentados na FIGURA 7.

FIGURA 7 – ESTUDO DO pH NA EXTRAÇÃO DE As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni E V POR COPRECIPITAÇÃO E DETERMINAÇÃO POR MIP OES



FONTE: A autora (2022).

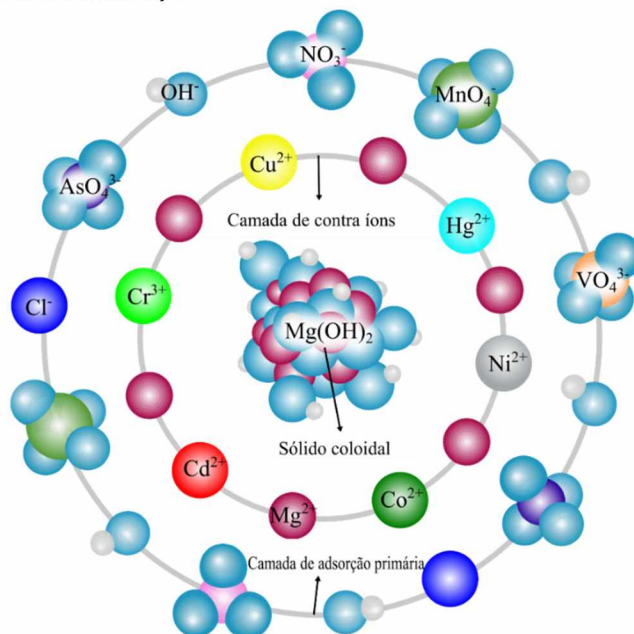
NOTA: 25 mL de amostra, $10 \mu g L^{-1}$ dos analitos, $C_{MgCl_2} 7,09 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ e 5 min de centrifugação.

Foi observado que a partir do pH 12,2 o sinal analítico mostrou uma tendência a se tornar constante. Esse valor foi então estabelecido para outros experimentos. As condições otimizadas que melhoraram a eficiência de extração dos analitos pelo procedimento de coprecipitação foram: pH 12,2; $7,09 \times 10^{-4} mol L^{-1} C_{MgCl_2}$; 1 mL de acetato de etila e acetona (1:1) e 1 mL $HNO_3 5 mol L^{-1}$ para solubilização do precipitado.

Conforme Atkins e Jones (2010), a adsorção superficial consiste no principal mecanismo de coprecipitação para o $Mg(OH)_2$. Nele, os cátions presentes na amostra são atraídos pelo precipitado de $Mg(OH)_2$ formado, que possui carga negativa, e uma primeira camada de adsorção é formada ao seu redor. Esse precipitado, agora com carga positiva, atrai os ânions presentes no meio, formando uma segunda camada de adsorção. Assim, cátions e

ânions são separados na primeira e segunda camadas de adsorção, respectivamente (ZENG et al., 2013). A FIGURA 8 representa o mecanismo descrito.

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE ADSORÇÃO DE SUPERFÍCIE ASSOCIADO AO PROCEDIMENTO DE COPRECIPITAÇÃO DE $Mg(OH)_2$ PARA A PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO



FONTE: A autora (2022).

5.3.2 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos foram determinados para as condições ótimas obtidas de acordo com as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) e Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (INMETRO, 2018; IUPAC, 1978). As equações obtidas foram: $y = 2,0C_{As} + 17,8$; $y = 253,3C_{Cd} - 165,3$; $y = 1843,9C_{Cr} + 767,6$; $y = 209,9C_{Co} - 1092,5$; $y = 3853,0C_{Cu} - 3996,2$; $y = 940,3C_{Mn} + 122,7$; $y = 14,3C_{Hg} + 45,6$; $y = 378,2C_{Ni} + 64,8$; $y = 167,3C_V - 812,7$. Todos os coeficientes de determinação (R^2) foram $> 0,99$, indicando ajustes satisfatórios das curvas analíticas. O fator de enriquecimento foi determinado pela divisão entre as inclinações das curvas de calibração com pré-concentração e sem pré-concentração. Os valores estimados foram: As = 5; Cd = 17; Cr = 6; Co e Ni = 25; Cu = 24; Mn = 25; Hg = 25; V = 13.

Os valores em branco para o procedimento de coprecipitação foram obtidos a partir de dez medidas das soluções em branco. Os valores médios foram $< 0,05 \mu g g^{-1}$ para As, Cd, Co e Hg. Para Cr, Cu e Mn os valores foram 0,14, 0,25 e $0,12 \mu g g^{-1}$, respectivamente. Valores de

branco ligeiramente mais altos foram obtidos para Ni ($1,27 \mu\text{g g}^{-1}$) e V ($0,65 \mu\text{g g}^{-1}$). Os valores de LOD e LOQ foram calculados conforme descrito na seção 4.2.5. No procedimento otimizado, os LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) foram As: 0,328; Cd: 0,046; Cr: 0,017; Co: 0,038; Cu: 0,011; Mn: 0,008; Hg: 0,116; Ni: 0,171 e V: 0,010. Os LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) foram As: 1,09; Cd: 0,151; Cr: 0,056; Co: 0,127; Cu: 0,035; Mn: 0,028; Hg: 0,388; Ni: 0,568 e V: 0,033.

5.3.3 Exatidão e aplicação

A exatidão do procedimento de coprecipitação proposto foi avaliada com o CRM TORT-3. A TABELA 10 apresenta as recuperações obtidas ao comparar os valores experimentais com os certificados e os resultados para o teste t de *Student*, aplicado para verificar se houve diferença estatística significativa entre esses valores.

TABELA 10 – DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS EM CRM LOBSTER HEPATOPANCREAS (TORT-3)

Analito	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	$t_{\text{calculado}}$
As	$59,5 \pm 3,8$	$54,98 \pm 1,95$	92	4,01
Cd	$42,3 \pm 1,8$	$41,32 \pm 3,52$	97	0,48
Cr	$1,95 \pm 0,24$	$2,04 \pm 0,10$	104	1,56
Co	1,06 ^(a)	$1,11 \pm 0,07$	105	1,24
Cu	497 ± 22	$508,7 \pm 6,3$	102	3,22
Mn	$15,6 \pm 1,0$	$14,48 \pm 0,76$	93	2,55
Hg	$0,292 \pm 0,022$	$0,300 \pm 0,035$	103	0,40
Ni	$5,30 \pm 0,24$	$4,99 \pm 0,26$	94	2,07
V	$9,1 \pm 0,4$	$9,12 \pm 0,45$	100	0,08

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Valores obtidos com o procedimento de coprecipitação por MIP OES (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e valor de $t_{\text{calculado}}$ de acordo com o teste t de *Student*, $t_{\text{tabelado}} = 4,303$.

LEGENDA: (a) valor informativo é listado devido a informações insuficientes para avaliar com precisão as incertezas.

Para os analitos estudados, os valores de recuperação variaram de 92% a 105% e $t_{\text{calculado}}$ de 0,08 a 4,01 (valores abaixo do t_{tabelado} de 4,30 para $n = 3$, nível de confiança de 95%), indicando que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos. Após verificação da exatidão, foi aplicado o procedimento de coprecipitação para a pré-concentração dos analitos nas amostras de peixes e moluscos, e os valores encontrados são apresentados na TABELA 11.

Neste trabalho, foram encontradas concentrações superiores às recomendadas (limites máximos apresentados na TABELA 1), em média 5 vezes maior para As em todas as amostras e 8 vezes maior para Hg apenas na amostra de *Phacoides pectinatus*. Uma concentração elevada desses contaminantes nas amostras de moluscos já era esperada devido à característica

bioacumuladora intrínseca aos bivalves, sendo por esse motivo muito utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental (OLMEDO et al., 2013; ROUANE-HACENE et al., 2015). No entanto, as altas concentrações de As nas amostras de músculo de peixe são preocupantes porque indicam uma contaminação da Baía do Pontal (Ilhéus, Bahia) por esse elemento tóxico.

TABELA 11 – DETERMINAÇÃO DE As, Cr, Co, Cu, Mn, Hg E Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$) POR MIP OES EM AMOSTRAS DE MÚSCULO DE PEIXES E MOLUSCOS

Analito	Músculo de peixe				Total	
	<i>M. cephalus</i> (A)	<i>T. rendalli</i>	<i>P. squamosissimus</i>	<i>L. analis</i>	<i>T. plebeius</i>	<i>P. pectinatus</i>
As	4,583 $\pm$ 0,389	4,670 $\pm$ 0,42	4,625 $\pm$ 0,176	5,486 $\pm$ 0,196	5,139 $\pm$ 0,126	5,568 $\pm$ 0,094
Cr	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,198 $\pm$ 0,046	3,323 $\pm$ 0,279
Co	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,471 $\pm$ 0,005	0,326 $\pm$ 0,002
Cu	0,309 $\pm$ 0,021	0,095 $\pm$ 0,005	0,084 $\pm$ 0,004	< LOQ	0,998 $\pm$ 0,004	1,736 $\pm$ 0,024
Mn	0,138 $\pm$ 0,010	0,689 $\pm$ 0,055	< LOQ	< LOQ	26,11 $\pm$ 0,45	3,905 $\pm$ 0,315
Hg	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	7,956 $\pm$ 0,823
Ni	0,835 $\pm$ 0,033	0,725 $\pm$ 0,003	0,826 $\pm$ 0,029	0,699 $\pm$ 0,053	< LOQ	< LOQ

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Valores obtidos com o procedimento de coprecipitação por MIP OES (média $\pm$ desvio padrão, n = 3).

Esses contaminantes podem bioacumular (e biomagnificar para Hg) ao longo dos níveis tróficos da cadeia alimentar (FANG et al., 2019; HAO et al., 2013; HESHMATI et al., 2017; TAO et al., 2012; ZHANG; CAMPBELL; JOHNSON, 2012). Sendo a espécie humana àquela a ocupar o nível mais alto, a preocupação citada anteriormente se torna ainda mais agravante, isso porque essas espécies de peixes e moluscos fazem parte da alimentação diária da população local e, a longo prazo, ainda não se sabe quais prejuízos à saúde humana a exposição a esses contaminantes, mesmo que em baixas concentrações, poderá causar.

Para fins de comparação, não foram encontrados estudos que fizeram uso de um procedimento de coprecipitação para determinar As e/ou Hg em amostras de peixes e moluscos. No entanto, outros procedimentos de pré-concentração foram aplicados para esse fim, como extração em fase sólida (SÁ et al., 2020), extração de fase sólida micro dispersiva magnética (ES'HAGHI; BARDAJEE; AZIMI, 2016), e microextração de circulação de amostra persistente (SAFARI et al., 2017).

No trabalho desenvolvido por Sá et al. (2020), a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-phase extraction*) foi empregada para determinar a concentração de As e Hg em amostras de tecido de peixe (músculo) por MIP OES. O procedimento proposto a partir da funcionalização da sílica com ácido p-aminobenzoico (PABA-MCM-41) forneceu valores de

LOD iguais a 2,7 e 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, LOQ iguais a 9,6 e 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ e fatores de enriquecimento de 25 e 7 para As e Hg, respectivamente. As concentrações na amostra estavam abaixo dos valores de LOQ.

Para o presente trabalho, todas as amostras estudadas apresentaram concentrações abaixo dos LOQ para Cd e V (valores iguais a 0,151 e 0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). As amostras de músculo de peixe ainda apresentaram concentrações abaixo dos LOQ para Cr e Co (iguais a 0,056 e 0,127 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) e valores de concentração variando de 0,084 a 0,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cu, Mn e Ni. Já as amostras de moluscos apresentaram concentrações menores que LOQ apenas para Ni (0,568 $\mu\text{g g}^{-1}$) e valores que variaram de 0,33 a 26,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, Co, Cu e Mn.

Ainda no trabalho desenvolvido por Sá et al. (2020), mencionado anteriormente, o procedimento de pré-concentração empregando SPE também foi aplicado para determinar Cd, Cr e Cu no músculo de peixe. Foram obtidos valores de LOD iguais a 0,8, 0,04, 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$, LOQ iguais a 2,8, 0,1, 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, e fatores de enriquecimento de 25 para Cd e Cr, e 26 para Cu. Os valores de concentração encontrados foram 0,910 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, 1,432 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e estavam abaixo do LOQ para Cd.

Na TABELA 12 é apresentada uma relação de trabalhos que utilizaram o procedimento de coprecipitação para os analitos estudados (com agentes carreadores inorgânicos, orgânicos e na sua ausência) em diferentes tipos de amostras e determinação por F AAS.

5.4 CONCLUSÃO

As ferramentas quimiométricas utilizadas foram eficientes na otimização das variáveis envolvidas no procedimento de coprecipitação, com o planejamento de mistura apresentando a condição de resposta analítica máxima. O procedimento representa uma alternativa apropriada em termos de custos para a determinação elementar quando comparado a técnicas instrumentais de maior custo, como ICP-MS e ICP OES. A simplicidade, sensibilidade e outros parâmetros analíticos podem ser citados como as principais vantagens. Os resultados indicam a viabilidade da aplicação desse procedimento de coprecipitação visando a separação/pré-concentração de As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni e V e posterior determinação por MIP OES.

TABELA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE O PROCEDIMENTO PROPOSTO PARA OS ANALITOS ESTUDADOS E TRABALHOS DE COPRECIPITAÇÃO QUE UTILIZARAM DIFERENTES TIPOS DE CARREADORES

Agente coprecipitante	Analito	Amostra	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Fator de enriquecimento	Técnica de detecção	Referência
Zr(OH) ₄	Pb, Co, Cu, Cd, Fe e Ni	Amostra de alimentos	0,27 – 2,50	25	F AAS	(CITAK; TUZEN; SOYLAK, 2009)
Tm(OH) ₃	Cu, Co, Cd, Ni, Fe e Pb	Amostra de alimentos e ambientais	0,10 – 1,60	120	F AAS	(SOYLAK; AYDIN, 2011)
Pr(OH) ₃	Cd, Ni, Cu, Pb, Fe, Co e Mn	Amostras de água do meio ambiente	0,71 – 5,18	45	F AAS	(SOYLAK; AYDIN; KIZIL, 2016)
Ni(II)-QAN	Co, Cu, Fe, Pb e Mn	Amostras de alimentos e produtos de maquiagem	0,03 – 0,83	50 – 100	F AAS	(YILDIZ et al., 2016)
Mo(VI)-DDTC	Pb, Cd, Zn e Co	Amostras ambientais	0,10 – 2,20	150 – 200	F AAS	(TUFEKCI et al., 2013)
APSAL (CEFC)	Cr, Cu, Fe, Pb e Zn	Amostras de água e alimentos	0,20 – 1,20	100	F AAS	(GOUDA, 2016)
BCP (CEFC)	Cu, Pb, Zn, Fe e Cr	Amostras de água e alimentos	0,28 – 3,08	25	F AAS	(MENDIL; KARATAS; TUZEN, 2015)
Mg(OH) ₂	As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni e V	Peixes e moluscos	0,008 – 0,328 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5 – 25	MIP OES	Este trabalho

FONTE: A autora (2022).

NOTA: limite de detecção (LOD), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES), hidróxido de zircônio (Zr(OH)₄), hidróxido de túlio(III) (Tm(OH)₃), hidróxido de praseodímio(III) (Pr(OH)₃), ácido 2-[(E)-(8-hidroxi-2-metil quinoline-5-il) diazenil] benzoico (Ni(II)-QAN), Ni(II) como elemento carreador, (Mo(VI)-DDTC) dietilditiocarbamato e Mo(VI) como elemento carreador, (APSAL) 4-(2-hidroxibenzilidenamino)-1,2-di-hidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona, (CEFC) coprecipitação livre de elemento carreador, (BCP) 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina e hidróxido de magnésio(II), (Mg(OH)₂).

6 **CAPÍTULO III – EXTRAÇÃO APRIMORADA DE ARSÊNIO E CÁDMIO USANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL E DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO³**

Neste trabalho, um NADES preparado a partir de ácido málico, xilitol e água foi usado como solvente na extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasound-assisted extraction*) para a determinação de As e Cd em amostras de peixes e moluscos por ICP-MS. A formação do solvente foi confirmada por análise de espectroscopia no infravermelho, que mostrou a presença de ligações de hidrogênio entre os componentes. As determinações elementares foram realizadas usando os modos de análise padrão e KED. Um aumento de sensibilidade foi observado usando o modo KED, o que pode ser atribuído à transferência de carga entre o carbono e os analitos quando o NADES, fonte de carbono, é introduzido no plasma. Os LOD foram de 12,7 e 0,100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para As e Cd, respectivamente, e a exatidão do procedimento de extração foi avaliada pela comparação entre métodos. As concentrações de Cd nas amostras de peixes e moluscos ficaram abaixo dos LOQs, enquanto as concentrações de As variaram entre 1,88 e 12,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, superando os valores máximos recomendados pelos órgãos reguladores.

6.1 OBJETIVO

Desenvolver um método de preparo de amostras utilizando um NADES, preparado a partir da mistura de xilitol, ácido málico e água, combinado com UAE, para a extração de elementos potencialmente tóxicos e determinação por ICP-MS.

6.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.2.1 Instrumentação

Um Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*, modelo Vertex 70, Bruker, Estados Unidos) foi utilizado para caracterizar o solvente. As análises foram realizadas em um espectrômetro de

³ MOREIRA, L. S. et al. Enhanced extraction of arsenic and cadmium from environmental samples using a natural deep eutectic solvent and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1080/03067319.2020.1826460

massa quadrupolar com plasma indutivamente acoplado (modelo NexION 300X, PerkinElmer, Waltham, Estados Unidos), equipado com um sistema de correção/eliminação de interferências por KED. Foram avaliadas duas condições para as determinações das concentrações de As e Cd nas amostras: modo padrão e modo KED, com a introdução de gás hélio na cela de colisão/reação em uma taxa de fluxo de 3 mL min⁻¹. Argônio 99,999% (White Martins Praxair, São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás gerador do plasma, para introdução de amostra e no sistema de nebulização. As condições operacionais, características instrumentais e os isótopos monitorados de cada elemento encontram-se descritos na TABELA 13.

TABELA 13 – PARÂMETROS OPERACIONAIS E INSTRUMENTAIS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE As E Cd POR ICP-MS

Parâmetro instrumental	Condição operacional
Potência de radiofrequência (kW)	1,60
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	18,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2
Vazão do gás no nebulizador (L min ⁻¹)	1,02
Nebulizador/Câmara de nebulização	Concêntrico/Ciclônica
Isótopos monitorados (m/z)	⁷⁵ As ⁺ e ¹¹⁴ Cd ⁺
Tempo de permanência (s)	25
Gás de colisão	Hélio

FONTE: A autora (2022).

6.2.2 Reagentes e soluções padrão

Reagentes de grau analítico foram utilizados para o preparo das soluções. O procedimento de digestão foi realizado com o uso de HNO₃ purificado, conforme descrito na seção 5.2.2, e H₂O₂. O NADES foi preparado usando ácido DL-málico e xilitol (99%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). As soluções padrão utilizadas foram preparadas diluindo soluções estoque individuais contendo 1000 mg L⁻¹ de As e Cd (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). As concentrações das soluções analíticas utilizadas para calibração foram 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 e 15 µg L⁻¹. O CRM DOLT-4 (*Dogfish liver*, Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá, Ottawa, Canadá) e o material de referência UFABC (*Thunnus tissue*, produzido pela Universidade Federal do ABC, São Paulo, Brasil) foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos aplicados.

6.2.3 Preparo do NADES

O NADES preparado à base de xilitol (Xy), ácido málico (Ma) e água foi preparado utilizando razão molar 1:1:10 (Xy:Ma:água). Os componentes foram pesados, misturados em béquer e mantidos sob aquecimento à temperatura de 50 °C por 2 h em placa de aquecimento, com agitação de 220 rpm (DAI et al., 2013; SANTANA et al., 2019). Para caracterização do solvente, os espectros de infravermelho do NADES produzido e dos materiais de partida foram obtidos à temperatura ambiente (25 °C). Aproximadamente 1 mg do componente foi pesado em balança analítica em conjunto com 100 mg de brometo de potássio (KBr), previamente seco em estufa por 24 h a 105 °C. A mistura foi homogeneizada até a obtenção de um pó fino que foi comprimido na forma de disco. Para obtenção do espectro do solvente preparado, um filme foi formado na superfície do disco de KBr com o auxílio de uma microespátula. Os espectros de FTIR foram obtidos no modo de transmitância, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando 16 varreduras acumuladas e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

6.2.4 Preparo da amostra

6.2.4.1 UAE-NADES

Para a UAE-NADES, aproximadamente 90 mg das amostras ($n = 3$) foram pesados em tubos de polipropileno, seguido da adição de 9 mL de NADES e sonicação da mistura por 45 min em banho ultrassônico (modelo Q3/40A, Eco-Sonics, São Paulo, Brasil) operado a 40 kHz. Após a sonicação, foram adicionados 6 mL de água e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min, seguida por filtração. O mesmo procedimento de extração foi aplicado ao material de referência UFABC.

6.2.4.2 MW-AD

O método padrão de preparo das amostras para conversão dessas à forma líquida foi por MW-AD (micro-ondas modelo Start D, Milestone, Milão, Itália). Nessa etapa do trabalho, buscou-se baixo teor de carbono residual e baixa acidez da amostra para que não fosse necessária alta diluição antes das determinações por ICP-MS. Foi preconizado o uso de reagentes diluídos, a fim de se buscar experimentos menos nocivos ao meio ambiente, resultando em menor geração de resíduos.

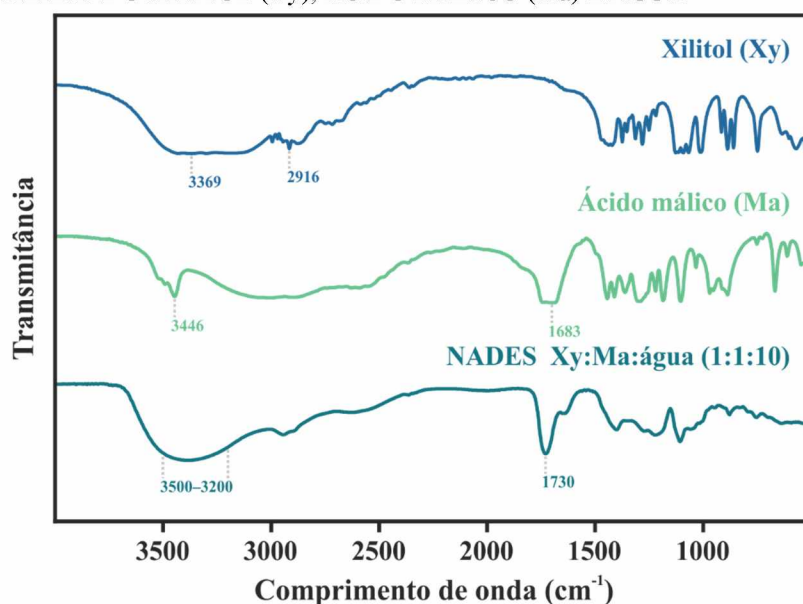
Uma massa de 200 mg de amostra foi pesada em tubo de digestão para micro-ondas, seguido da adição de 6 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} purificado conforme descrito na seção 5.2.2, e 2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30% v v⁻¹) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O programa de aquecimento para a digestão foi aplicado em quatro etapas sucessivas: (1) 10 min de rampa até 100 °C, (2) 10 min de rampa até 200 °C, (3) 20 min de patamar em 200 °C e (4) 10 min de resfriamento. O volume final foi aferido para 15 mL com água ultrapura. As digestões foram feitas em triplicata para cada amostra. O procedimento de MW-AD foi aplicado ao CRM DOLT-4 e ao material de referência UFABC.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Caracterização do NADES

O NADES obtido foi uma mistura monofásica líquida. Embora isso seja um forte indicador da formação de uma mistura eutética, uma avaliação foi feita com base no espectro de FTIR. A presença de ligações de hidrogênio no solvente é parcialmente responsável por suas propriedades e tem sido empregada em estratégias para confirmação da síntese (DAI et al., 2013; FERNÁNDEZ et al., 2018). A FIGURA 9 mostra os espectros de FTIR dos componentes base e do NADES preparado em uma razão molar de 1:1:10 (Xy:Ma:água).

FIGURA 9 – ESPECTROS DE FTIR DOS REAGENTES INICIAIS E DO NADES PREPARADO UTILIZANDO XILITOL (Xy), ÁCIDO MÁLICO (Ma) E ÁGUA



FONTE: A autora (2022).

O espectro do NADES apresentou banda de absorção característica na região de 3330 – 3440 cm^{-1} , correspondendo ao alongamento do grupo –OH. Mudanças nessa região espectral são o principal indicador da formação de ligações de hidrogênio (GHAEDI et al., 2017; SILVA et al., 2020). Além disso, a banda correspondente ao alongamento C=O foi deslocada de 1683 cm^{-1} (Ma) para 1730 cm^{-1} (NADES), refletindo um aumento da densidade de elétrons do oxigênio da carbonila (DAI et al., 2015; SANTANA et al., 2019). A interação intermolecular entre a carbonila do Ma e, provavelmente, o OH do xilitol aumenta a força da vibração C=O alterando sua frequência. Essas observações confirmaram a formação do solvente e sugeriram a existência de ligações de hidrogênio entre os componentes.

6.3.2 Parâmetros analíticos

As curvas de calibração foram preparadas com a diluição dos padrões dos elementos inorgânicos no meio do solvente Xy:Ma:água. As equações das curvas analíticas obtidas usando o modo padrão e o modo KED, respectivamente, foram: Intensidade = $7253C_{75\text{As}^+} + 5854$; Intensidade = $88,6C_{75\text{As}^+} + 35,4$ e Intensidade = $21454C_{114\text{Cd}^+} + 5516$; Intensidade = $1169C_{114\text{Cd}^+} + 236,5$. Todos os coeficientes de determinação (R^2) foram $> 0,99$, indicando ajustes satisfatórios das curvas analíticas.

Os valores de LOD e LOQ foram calculados conforme descrito na seção 4.2.5. Foram obtidos LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$) iguais a 0,0315 e 0,0127 para $^{75}\text{As}^+$ nos modos padrão e KED, respectivamente. Já para $^{114}\text{Cd}^+$, o valor foi igual a 0,0001 nos dois modos de análise. Os LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) correspondentes foram 0,105 e 0,0422 para $^{75}\text{As}^+$ e 0,0005 e 0,0004 para $^{114}\text{Cd}^+$.

No modo KED, foi observada sensibilidade aumentada com o uso do NADES, o que pode ser explicado pelo alto teor de carbono do solvente. Vários estudos relataram que os ganhos de sinal observados após a introdução de uma fonte de carbono no plasma podem ser causados pelo aumento da ionização de elementos com alto potencial de ionização (entre 9 e 11 eV), como resultado de reações de transferência de carga entre as espécies de carbono (como C^+ , CO^+ e CO_2^+) e os analitos no plasma (ALLAIN et al., 1991; DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017). Sabe-se que os sinais para As e Se aumentam na presença de C^+ , embora esse efeito também tenha sido investigado para outros elementos com maior energia de ionização (GRINDLAY et al., 2013; PEREIRA et al., 2010; WILTSCHE; WINKLER; TIRK, 2015).

No presente estudo, esse efeito foi mais pronunciado para o $^{75}\text{As}^+$, o que já era esperado devido a diferença observada entre os valores do potencial de ionização dos analitos (9,47 e

8,68 eV para As e Cd, respectivamente), estando o valor para o As dentro da faixa crítica mencionada anteriormente. Com isso, o efeito de matriz observado para Cd não pode ser explicado pela hipótese de transferência de carga envolvendo C^+ , aplicável no caso do arsênio. No trabalho desenvolvido por Grindlay et al. (2013) foi relatado que o Cd pode apresentar reações de transferência de carga com outras espécies de carbono, como CO^+ ou CO_2^+ , portanto, uma melhora menos significativa, ou até mesmo imperceptível, poderia ser esperada para esse elemento.

Nesse mesmo trabalho desenvolvido por Grindlay et al. (2013), a mudança da intensidade do sinal na presença de carbono, de diferentes fontes e em diferentes concentrações, foi relatada para vários elementos difíceis de ionizar. Para $^{75}As^+$, os valores de intensidade aumentaram na presença de C na concentração de 5 g L^{-1} , enquanto que para $^{114}Cd^+$ nenhuma mudança de intensidade foi observada nessa mesma concentração, embora a supressão do sinal tenha sido observada na presença de C em 30 g L^{-1} . Sensibilidade melhorada devido ao uso de um reagente com alto teor de carbono também foi relatada por Bianchi et al. (2017), onde a solução diluída de ácido fórmico foi eficaz no preparo de amostras de sêmen bovino, atuando como fonte de carbono que aumentou o sinal de Se. A exatidão do método MW-AD também foi avaliada usando os materiais de referência DOLT-4 e UFABC. Os resultados são apresentados na TABELA 14.

TABELA 14 – DETERMINAÇÃO DE As E Cd POR ICP-MS EM CRM DOLT-4 E MATERIAL DE REFERÊNCIA UFABC

Analito	Valor certificado (µg g ⁻¹)	MW-AD (µg g ⁻¹)		Recuperação (%)	
		Padrão	KED	Padrão	KED
<i>Dogfish liver</i> (DOLT-4)					
⁷⁵ As ⁺	9,66 ± 0,620	8,18 ± 0,531	9,77 ± 0,517	85	101
¹¹⁴ Cd ⁺	24,3 ± 0,800	26,9 ± 0,642	22,5 ± 0,959	111	93
<i>Thunnus tissue</i> (UFABC)					
⁷⁵ As ⁺	5,15 ± 0,600	4,80 ± 0,080	4,89 ± 0,120	93	95
¹¹⁴ Cd ⁺	0,028 ± 0,005	0,061 ± 0,090	0,026 ± 0,002	> 120	94

FONTE: A autora (2022).

NOTAS: digestão ácida convencional assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) e discriminação por energia cinética (KED).

A comparação dos valores certificados com os obtidos experimentalmente, usando o teste t de *Student*, mostrou que não houve diferença significativa entre os valores certificados e os obtidos no modo de análise KED, com os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ($t = 4,303$, $n = 3$, nível de confiança de 95%). A eficiência do procedimento UAE-NADES foi avaliada usando o

material de referência UFABC, com concentrações conhecidas dos elementos. Para análise utilizando ICP-MS nos modos padrão e KED, respectivamente, as concentrações (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e recuperações (entre parênteses, em relação aos valores certificados) foram $5,82 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$ (112%) e $5,11 \pm 0,15$ (99%) para $^{75}\text{As}^+$. Os valores para $^{114}\text{Cd}^+$ ficaram abaixo do LOQ em ambos os modos de análise.

As melhores recuperações obtidas no modo KED mostraram a eficiência dessa ferramenta em minimizar interferências de espécies poliatômicas ou elementos isobáricos. A redução da energia cinética em conjunto com uma barreira de energia potencial posicionada após a cela, resultou na eliminação quase completa dessas interferências (YAMADA, 2015). Para o isótopo mais abundante de Cd, possíveis interferências podem ocorrer devido à presença de espécies isobáricas, íons moleculares formados a partir da matriz (óxidos e hidróxidos) e as espécies $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$ (MURPHY; VETTER, 2013). No caso do As, pode haver interferência da espécie $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, o que é comumente observado devido ao uso de gás argônio nas análises por ICP-MS e à presença de cloro em amostras ambientais (ZHAO et al., 2018).

O cloreto de colina e o ácido oxálico (na razão molar 1:2) foram utilizados anteriormente para a extração de elementos químicos em tecidos de peixes. No trabalho de Habibi et al. (2013), esse solvente foi utilizado na extração de Cu, Zn e Fe dos tecidos muscular, hepático e branquial, antes da determinação dos elementos por F AAS. No trabalho desenvolvido por Panhwar et al. (2018), As e Se foram extraídos para subsequente determinação por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET AAS, do inglês *Electrothermal atomic absorption spectrometry*), enquanto Rastegarifar et al. (2017) utilizaram esses extratores para a determinação de Hg total nos tecidos muscular e hepático por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS, do inglês *Cold vapor atomic absorption spectrometry*). Em todos os casos, foi necessária a adição de HNO_3 diluído para a extração completa dos analitos.

No trabalho desenvolvido por Thongsaw et al. (2019), um novo método de microextração em fase líquida com solvente eutético profundo assistido por ultrassom (UAE-DES-LPME), baseado em cloreto de colina e fenol (na razão molar 1:3), foi utilizado para a pré-concentração e especiação de mercúrio total (Hg^{2+}) e metilmercúrio (CH_3Hg^+) no tecido de músculo de peixes antes da análise pelo ET AAS. A separação das espécies foi realizada ajustando o pH da solução com ou sem a adição de ditizona como agente quelante.

Na TABELA 15, é possível verificar trabalhos recentes que utilizaram um DES ou NADES como solvente extrator de espécies inorgânicas em diferentes procedimentos de preparo de amostras antes da determinação por técnicas analíticas espectrométricas.

TABELA 15 – APLICAÇÕES DE DES OU NADES COMO SOLVENTES EXTRATORES EM DIFERENTES PREPAROS DE AMOSTRAS UTILIZANDO TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS

Composição	Razão molar	Analito	Matriz	Método de preparo	Técnica de detecção	LOD (ng L ⁻¹)	Referência
Cloreto de colina:ácido oxálico	1:2	As, Cr, Mo, Sb, Se e V	Solos de agricultura	UAE e aquecimento	ICP OES	90,0 – 1000	(MATONG; NYABA; NOMNGONGO, 2017)
Cloreto de colina:ácido oxálico	1:3	As e Sb	Água, mel e arroz	VA–ME	HG AAS	7,50 e 15,6	(ALTUNAY; ELIK; GÜRKAN, 2019a)
Prolina:ácido málico	2:1	As e Se	Arroz	UA–ME	HG AAS	1,70 e 3,00	(ELIK; DEMIRBAS; ALTUNAY, 2019)
Cloreto de colina:fenol	1:3	As	Água e meio ambiente	UA–LPME	ET AAS	10,0	(ZOUNR; TUZEN; KHUHAWAR, 2017)
Cloreto de colina:fenol	1:4	Cd	Alimentos e água	UA–LPME	ET AAS	0,0230	(ZOUNR et al., 2018)
Cloreto de zinco:acetamida	1:2	Cd	Água	UA–DDLLME	F AAS	46,0	(LASHARI et al., 2019)
Ácido cítrico:sacarose	1:3	Cd e Pb	Vegetais	HI–ME	F AAS	350 e 170	(ALTUNAY; ELIK; BINGÖL, 2020)
Cloreto de zinco:acetamida	1:2	Cd e Pb	Cosméticos	UA–ME	F AAS	860 e 660	(KAZI et al., 2019)
Ácido cítrico:sacarose	3:2	Cd, Cu e Pb	Mel	UA–DLLME	F AAS	77,0 – 290	(ALTUNAY; ELIK; GÜRKAN, 2019b)
Xilitol:ácido málico:água	1:1:10	As e Cd	Peixes e moluscos	UAE	ICP–MS	81,5 e 0,700	Este trabalho

FONTE: A autora (2022).

NOTA: limite de detecção (LOD), extração assistida por ultrassom (UAE), microextração assistida por vórtex (VA–ME), microextração assistida por ultrassom (UA–ME), microextração em fase líquida assistida por ultrassom (UA–LPME), microextração líquido-líquido dupla dispersiva assistida por ultrassom (UA–DDLLME), microextração induzida por aquecimento (HI–ME) e microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (UA–DLLME).

6.3.3 Determinação de As e Cd em amostras de peixes e moluscos

As concentrações de As nas amostras variaram de 1,88 a 12,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, conforme apresentado na TABELA 16, enquanto as concentrações de Cd estavam abaixo do LOQ.

TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DE As (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO, $n = 3$) EM TECIDOS DE PEIXES E MOLUSCOS DETERMINADOS POR ICP-MS PARA OS DOIS MÉTODOS DE PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostra/Tecido		MW-AD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	UAE-NADES ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Músculo	<i>M. cephalus</i> (A)	2,59 $\pm$ 0,110	2,68 $\pm$ 0,280
	<i>M. cephalus</i> (B)	5,00 $\pm$ 0,263	5,05 $\pm$ 0,350
	<i>M. cephalus</i> (C)	3,57 $\pm$ 0,028	3,87 $\pm$ 0,070
	<i>L. analis</i>	7,14 $\pm$ 0,300	5,97 $\pm$ 0,080
	<i>P. squamosissimus</i>	2,28 $\pm$ 0,434	1,88 $\pm$ 0,110
Brânquias	<i>M. cephalus</i> (A)	3,77 $\pm$ 0,360	3,40 $\pm$ 0,200
Fígado	<i>M. cephalus</i> (A)	10,5 $\pm$ 0,870	7,34 $\pm$ 0,110
Total	<i>T. plebeius</i>	5,14 $\pm$ 0,887	4,42 $\pm$ 0,030
	<i>P. pectinatus</i>	11,1 $\pm$ 1,16	12,0 $\pm$ 0,160

FONTE: A autora (2022).

NOTA: digestão ácida convencional assistida por radiação micro-ondas (MW-AD), extração assistida por ultrassom utilizando solvente eutético profundo natural (UAE-NADES).

Uma avaliação adicional foi realizada considerando a recuperação quantitativa de As quando comparados os procedimentos de digestão convencional e extração (AOAC, 2012). As recuperações obtidas variaram na faixa de 70% a 108%, o que foi considerado satisfatório para esses níveis de concentração. Além disso, o teste t foi aplicado e mostrou que não houve diferença significativa (nível de confiança 95%) entre os resultados dos dois métodos de preparo das amostras, com o valor de $t_{\text{calculado}} (t = 0,190) < t_{\text{tabelado}} (t = 4,303, \text{ para } n = 3)$.

As concentrações totais de arsênio nas amostras de peixes e moluscos superaram o valor máximo permitido pela ANVISA (limite máximo apresentado na TABELA 1). Entre as espécies e órgãos dos peixes estudados, a maior concentração foi encontrada no fígado de *Mugil cephalus* (A), enquanto a menor concentração foi encontrada no músculo de *Plagioscion squamosissimus*. Para a espécie *Mugil cephalus* (amostra A), foi observado que a sequência de acúmulo de As nos órgãos seguiu a ordem: músculo < brânquias < fígado. Uma sequência semelhante foi observada por Ramos-Miras et al. (2019), que investigou o conteúdo de As, e outros elementos tóxicos, nos tecidos musculares e hepáticos das espécies de peixes *Scomber japonicus* (2,90 e 16,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) e *Auxis rochei* (2,78 e 7,31 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) da Baía de Almería, Espanha.

Para os moluscos, os valores obtidos foram $4,42 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Tagelus plebeius* e $12,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para *Phacoides pectinatus*. Essas concentrações são muito maiores do que as relatadas por Copat et al. (2013) (*D. trunculus*, $1,53 \mu\text{g g}^{-1}$) e Gu et al. (2016) (*Perna viridis*, $0,540 \mu\text{g g}^{-1}$), que determinaram as concentrações de As (e outros elementos) em moluscos do Golfo da Catânia (Itália) e da Baía Daya (China), respectivamente.

As maiores concentrações de As foram encontradas no músculo de peixe da espécie *Lutjanus analis*, fígado de peixe *Mugil cephalus* (A) e marisco *Phacoides pectinatus*. A amostra de músculo apresentou valores 6 vezes superior ao limite máximo estabelecido pela ANVISA.

No trabalho desenvolvido por Olmedo et al. (2013), foram relatadas as concentrações de As e Cd em produtos de peixes ($0,427 \mu\text{g g}^{-1}$ para As) e moluscos bivalves ($0,222$ e $0,110 \mu\text{g g}^{-1}$ para As e Cd, respectivamente). Nos estudos realizados por Pacheco et al. (2017), foram relatadas concentrações de Cd variando de $0,05$ a $0,210 \mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de fígado de peixes coletados na Baía do Pontal, região sul do estado da Bahia. Já na pesquisa de Bilandžić et al. (2018), foram determinadas as concentrações de As e Cd em 11 espécies de peixes comprados em supermercados de diferentes cidades da Croácia, com valores variando de $0,520 - 3,40 \mu\text{g g}^{-1}$ para As e de $0,019 - 0,123 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd. Portanto, em comparação aos resultados obtidos neste trabalho, as amostras analisadas apresentaram maiores concentrações de As, mas menores concentrações de Cd.

A bioacumulação de elementos tóxicos em mexilhões foi investigada por Rouane-Hacene et al. (2015), com as concentrações de Cd variando de $0,50 - 0,67 \mu\text{g g}^{-1}$ ao longo de um ano, valores muito superiores aos encontrados para amostras semelhantes no presente trabalho. As maiores concentrações de elementos inorgânicos aqui relatadas para as amostras de fígado de peixe e moluscos estão de acordo com a literatura, e podem ser explicadas pelo alto potencial de bioacumulação já conhecido para esses tecidos. Os dados de concentração total obtidos neste trabalho podem fornecer um ponto de partida para estudos mais elaborados, que tenham como objetivo investigar possíveis implicações ambientais e nutricionais, bem como a avaliação de diferentes espécies químicas de As.

6.4 CONCLUSÃO

Um NADES preparado a partir de ácido málico, xilitol e água, foi adequado para a extração de As e Cd presentes em amostras ambientais. Simplicidade e segurança foram aspectos positivos desse procedimento, considerado uma alternativa válida aos métodos convencionais. O emprego do NADES, como fonte de carbono no plasma de argônio, impactou

positivamente a sensibilidade do método devido aos efeitos de transferência de carga. Os resultados obtidos neste trabalho viabilizam o desenvolvimento de novas aplicações baseadas em solventes ecologicamente corretos para a análise elementar. A aplicação do procedimento em amostras de peixes e moluscos indicou que as concentrações de arsênio foram superiores aos limites estabelecidos pelos órgãos reguladores, enquanto as concentrações de cádmio em todas as amostras ficaram abaixo dos limites estabelecidos. No entanto, a gravidade dos efeitos adversos à saúde está relacionada à forma química do arsênio, e depende do tempo e dose de exposição. Além de poder auxiliar no mapeamento de um sistema estuarino, as características de bioacumulação das amostras estudadas permitiram inferências sobre as distribuições de contaminantes em diferentes tecidos de um mesmo organismo.

7 **CAPÍTULO IV – MAPAS AUTO-ORGANIZÁVEIS APLICADOS NA ESCOLHA DO PADRÃO INTERNO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO, CHUMBO, ESTANHO E ELEMENTOS DO GRUPO DA PLATINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO⁴**

Neste trabalho, os comportamentos dos padrões internos frente a diferentes vazões do gás de colisão (He), foram estudados para a determinação de Cd, Pb, Pd, Pt, Rh e Sn em amostras de peixes e moluscos por ICP-MS. Os elementos Bi, Ge, In, Sc e Y foram selecionados como padrões internos, considerando suas massas e primeiras energias de ionização. A exatidão do método aplicado foi avaliada por experimentos de adição e recuperação, realizados em três níveis de concentração para a análise de duas amostras distintas. Os resultados foram avaliados utilizando o SOM. Os melhores pares analito/IS foram: $^{114}\text{Cd}^+ / ^{74}\text{Ge}^+$, $^{195}\text{Pt}^+ / ^{74}\text{Ge}^+$ e $^{208}\text{Pb}^+ / ^{74}\text{Ge}^+$. Para $^{103}\text{Rh}^+$, $^{106}\text{Pd}^+$ e $^{120}\text{Sn}^+$, maior exatidão foi alcançada sem o uso de um IS. O gás hélio ($2,8 \text{ mL min}^{-1}$) foi usado na cela de colisão para os analitos, exceto para Sn, e as recuperações variaram de 98 a 101% em condições ideais. O uso do SOM como ferramenta de análise exploratória foi uma abordagem eficaz para a seleção dos padrões internos mais adequados.

7.1 OBJETIVO

Investigar o comportamento de diferentes IS (Bi, Ge, In, Sc e Y), combinados ao uso de gás hélio em cela de colisão de um ICP-MS, e avaliar os resultados utilizando o SOM na seleção das melhores condições para quantificação de Cd, Pb, Pd, Pt, Rh e Sn.

7.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.2.1 Instrumentação

Os experimentos foram realizados utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Agilent 7800, Agilent Technologies, Japão), equipado com uma cela de colisão/reação operada com gás He (99,999%, White Martins Praxair, Brasil).

⁴ MOREIRA, L. S. et al. Self-organizing map applied to the choice of internal standards for the determination of Cd, Pb, Sn, and platinum group elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, v. 233, p. 122534, 2021. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122534

Argônio (99,999%, White Martins Praxair, Sertãozinho, Brasil) foi usado como gás gerador do plasma e no sistema de introdução e nebulização da amostra. As demais condições operacionais, características instrumentais e os isótopos monitorados para cada elemento encontram-se descritas na TABELA 17.

TABELA 17 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA ANÁLISE E DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP-MS

Parâmetro		Condição operacional
Potência do gerador de radiofrequência (kW)		1,55
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)		12
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)		0,5
Vazão do gás do nebulizador (L min ⁻¹)		1,0
Vazão gás He (mL min ⁻¹)		2,8; 4,3; 5,8
Integração tempo/massa (s)		0,3
Número de replicatas		3
Nebulizador/Câmara de nebulização		Concêntrico/Tipo Scott, duplo passo
Modo de operação		Modo padrão e modo de colisão/gás He
Isótopo (m/z)	Padrão interno	²⁰⁹ Bi ⁺ , ⁷⁴ Ge ⁺ , ¹¹⁵ In ⁺ , ⁴⁵ Sc ⁺ e ⁸⁹ Y ⁺
	Analito	¹¹¹ Cd ⁺ , ¹¹² Cd ⁺ , ¹¹⁴ Cd ⁺ , ²⁰⁶ Pb ⁺ , ²⁰⁷ Pb ⁺ , ²⁰⁸ Pb ⁺ , ¹⁰⁵ Pd ⁺ , ¹⁰⁶ Pd ⁺ , ¹⁰⁸ Pd ⁺ , ¹⁹⁴ Pt ⁺ , ¹⁹⁵ Pt ⁺ , ¹⁹⁶ Pt ⁺ , ¹⁰³ Rh ⁺ , ¹¹⁶ Sn ⁺ , ¹¹⁸ Sn ⁺ e ¹²⁰ Sn ⁺

FONTE: A autora (2022).

7.2.2 Reagentes e soluções padrão

As soluções padrão analíticas foram preparadas diariamente por diluição adequada de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de Cd, Pb, Pd, Pt, Rh e Sn (Qhemis, Jundiaí, Brasil) em HNO₃ 1% v v⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado para os padrões internos avaliados (Sc, Ge, Y, In e Bi). As concentrações das soluções analíticas utilizadas para curva de calibração foram 0; 0,05; 0,075; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 5,0; 10 e 25 µg L⁻¹ em HNO₃ 1% v v⁻¹. A exatidão do método foi avaliada por experimentos de adição e recuperação nos níveis de concentração 1,0; 5,0 e 10 µg L⁻¹ para duas amostras com diferentes complexidades (músculo e brânquias).

7.2.3 Preparo da amostra

O preparo da amostra foi realizado por MW-AD, conforme descrito na seção 6.2.4.2. Uma diluição adicional de 20 vezes foi realizada para ajustar o teor total de sólidos dissolvidos (≤ 0,1% m v⁻¹), condição crítica para determinações em ICP-MS.

7.2.4 Processamento dos dados

Todos os dados foram processados utilizando a razão entre os sinais analíticos líquidos para o analito e o IS. O SOM foi aplicado como ferramenta de análise exploratória, permitindo a visualização de dados de alta dimensão na forma de um mapa bidimensional mais simples e dinâmico (VESANTO; ALHONIEMI, 2000). As variáveis utilizadas no mapa foram as recuperações quantitativas (%) obtidas nos ensaios de adição de padrão para determinação de Cd, Pb, Pd, Pt, Rh e Sn em amostras distintas. As condições operacionais avaliadas foram a vazão do gás hélio (0; 2,8; 4,3 e 5,8 mL min⁻¹) e a aplicabilidade de Bi, Ge, In, Sc e Y como padrões internos. O mapa bidimensional, plano de componentes e a matriz de distância unificada (Matriz-U, do inglês *Unified distance matrix*) foram obtidos empregando o pacote de software SOM Toolbox, versão 2.1 (VATANEN, 2012). A ferramenta foi implementada em rotina própria no software Matlab (R2014a, Matworks, Estados Unidos) operando em condições padrão (VESANTO et al., 1999).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Análise exploratória dos dados

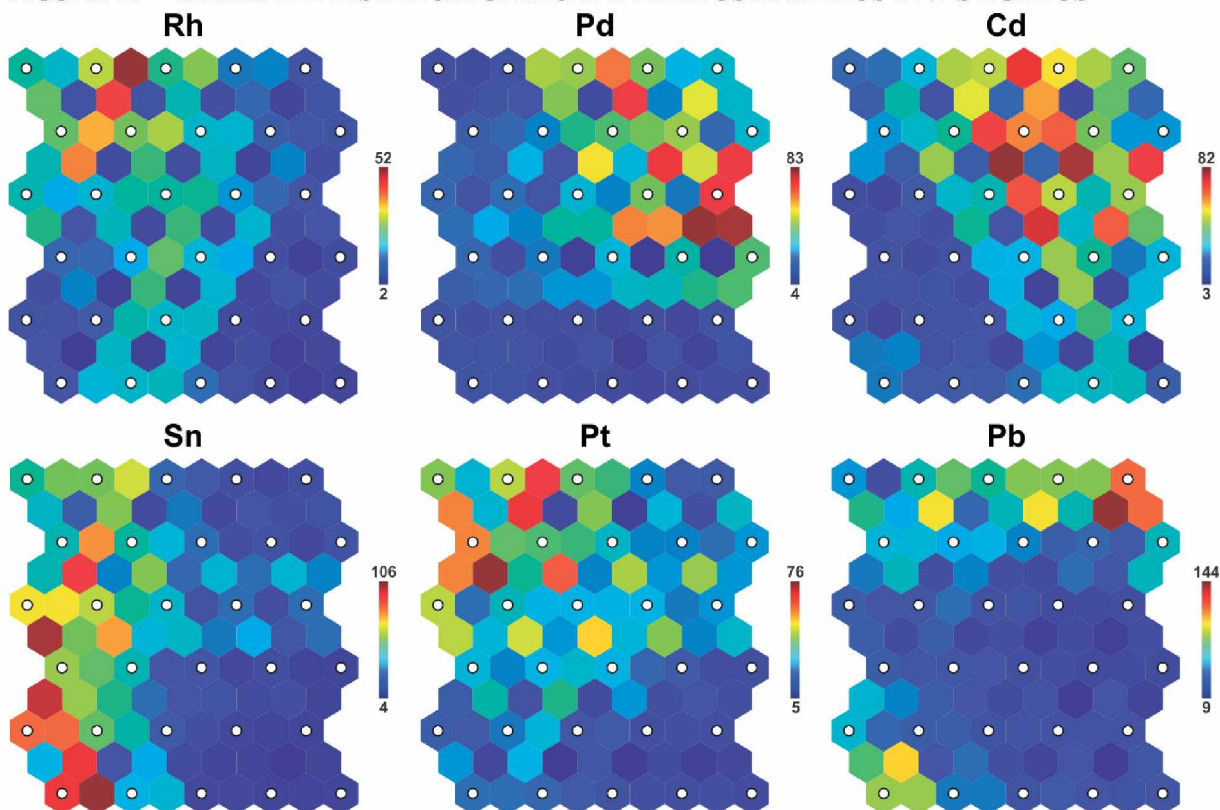
As recuperações quantitativas foram calculadas para duas amostras, músculo de peixe (amostra A) e brânquias (amostra B), em três níveis de concentração (1,0; 5,0 e 10 µg L⁻¹), e a avaliação foi realizada por SOM. Diferentes condições operacionais foram investigadas, incluindo variações na vazão de gás He e o emprego de diferentes padrões internos. Cinco elementos (Bi, Ge, In, Sc e Y) foram investigados como potenciais IS. Foram selecionados elementos de massa baixa (⁴⁵Sc⁺, ⁷⁴Ge⁺), massa média (⁸⁹Y⁺, ¹¹⁵In⁺) e massa alta (²⁰⁹Bi⁺), e cujas primeiras energias de ionização (eV) (5,79 In; 6,40 Y; 6,54 Sc; 7,29 Bi e 7,89 Ge) fossem similares às dos analitos (7,34 Sn; 7,41 Pb; 7,46 Rh; 8,33 Pd; 8,96 Pt e 8,99 Cd) (BECHLIN et al., 2015; TANNER, 1995; THOMPSON; HOUK, 1987).

De acordo com a AOAC Internacional, são aceitáveis recuperações nos intervalos de 40 – 120% para concentrações de 1 µg L⁻¹, enquanto valores na faixa de 60 – 115% são aceitáveis para 5 e 10 µg L⁻¹ (AOAC, 2012). As recuperações obtidas para as duas amostras estudadas, considerando todas as condições avaliadas, variaram de 2 – 283%. Os dados indicaram que os isótopos de todos os analitos apresentaram recuperações fora dos limites aceitáveis. O aumento ou supressão do sinal pode ter sido resultado de interferências espectrais

e não espectrais (causadas por concomitantes ou isótopos de outros analitos), interferência de matriz, IS inadequado ou excesso de gás He na cela de colisão. Considerando íons que são poliatômicos ou possuem a mesma m/z , as espécies $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2$, $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2$ e $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ poderiam potencialmente interferir na determinação dos isótopos mais abundantes de Cd; $^{102}\text{Ru}^{16}\text{O}$ poderia interferir na determinação de $^{118}\text{Sn}^+$; $^{88}\text{Sr}^{16}\text{O}$, $^{89}\text{Y}^{16}\text{O}$, $^{90}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$ e $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2$ poderiam interferir na determinação de Pd; $^{180}\text{Hf}^{16}\text{O}$ poderia interferir na determinação de $^{196}\text{Pt}^+$; e $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}$ poderia interferir na determinação de $^{103}\text{Rh}^+$. Essas variações mostram a complexidade e dificuldade na determinação desses elementos por ICP-MS, conforme relatado anteriormente (MACHADO et al., 2017). Portanto, é desejável desenvolver estratégias capazes de minimizar esses efeitos ou que possam facilitar a seleção de IS adequados (HSU; JIANG; SAHAYAM, 2013; MACHADO et al., 2017; NIEMELÄ et al., 2004).

Neste trabalho, a abundância isotópica foi utilizada como critério para selecionar os isótopos a serem avaliados, sendo eles $^{114}\text{Cd}^+$, $^{208}\text{Pb}^+$, $^{106}\text{Pd}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$, $^{103}\text{Rh}^+$ e $^{120}\text{Sn}^+$. As Matrizes U para os analitos (FIGURA 10), que mostram as separações obtidas com base na distância unificada, indicaram a formação de dois clusters.

FIGURA 10 – MATRIZ DE DISTÂNCIA UNIFICADA PARA OS ANALITOS INVESTIGADOS



FONTE: A autora (2022).

Um dos clusters foi formado pelos IS In e Y, cujos pares com os analitos apresentaram as menores recuperações para as amostras. Os pares analito/IS com Bi, Ge e Sc formaram um segundo cluster com recuperações satisfatórias. As análises sem o uso de um IS também apresentaram boas recuperações e, por esse motivo, foram agrupadas no segundo cluster. Na FIGURA 11A estão apresentadas as matrizes destacando a distribuição das variáveis aplicadas no mapa. Os planos de componentes dos isótopos selecionados estão apresentados na FIGURA 11B, enquanto os demais estão apresentados na FIGURA 12.

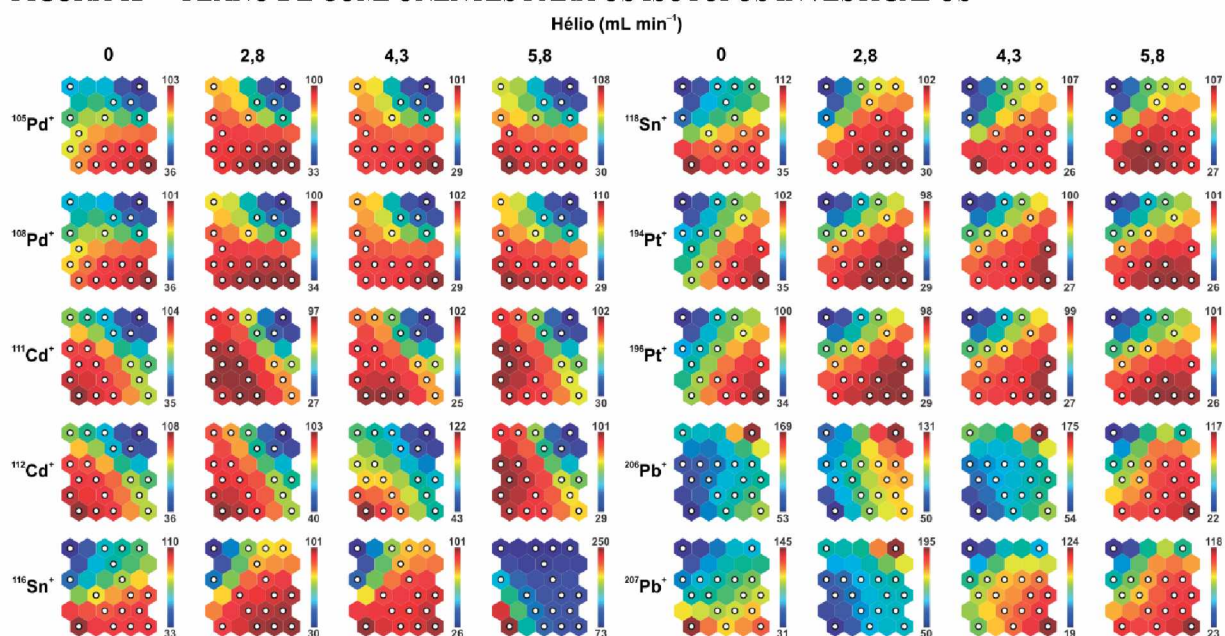
Os planos de componentes permitiram inferências sobre o comportamento das condições operacionais avaliadas no mapa em função da recuperação quantitativa (%). Neste caso, foi obtido um mapa composto por 30 neurônios (6×5), condição aplicada para todos os analitos. A disposição das variáveis no mapa é dada pela distância calculada (distância euclidiana entre vetores), utilizada pelo algoritmo empregado no Toolbox. A avaliação dos planos para os analitos sugeriu que os valores de recuperação foram influenciados por mudanças na vazão de gás He e pelos diferentes padrões internos utilizados. A partir da disposição dos IS no mapa foi possível fazer a correspondência com o plano de componentes e indicar a melhor condição, ou seja, o melhor par analito/IS.

A análise por SOM indicou que para $^{114}\text{Cd}^+$, a utilização do Bi como IS (sem gás de colisão) proporcionou uma recuperação média de 97% considerando os três níveis de concentração avaliados. Boas recuperações também foram obtidas sem o uso de IS, com 98% quando não utilizado gás de colisão e 101% com fluxo de He a $2,8 \text{ mL min}^{-1}$. Quando Ge foi utilizado como IS, recuperações médias de 100% foram obtidas com fluxos de He a 2,8 e $4,3 \text{ mL min}^{-1}$. De forma geral, a melhor condição para a determinação desse analito foi obtida com fluxo de He a $2,8 \text{ mL min}^{-1}$. A supressão de sinal observada quando utilizada a maior vazão de gás foi associada à perda de sensibilidade resultante de colisões entre o gás, as espécies interferentes e o analito, o que leva a um desvio no feixe de íons que chega ao detector (THOMAS, 2013).

Para a determinação de $^{208}\text{Pb}^+$, as melhores recuperações médias foram obtidas sem gás de colisão e com fluxo de He a $2,8 \text{ mL min}^{-1}$. Utilizando Ge como IS, uma recuperação média de 101% foi obtida para ambos modos de operação. Enquanto que Bi como IS proporcionou recuperação de 98%, com fluxo de He a $2,8 \text{ mL min}^{-1}$. A vazão de $2,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada porque proporcionou uma recuperação mínima média de 36%, comparada a 15% quando o gás de colisão não foi utilizado. A utilização do gás nessa vazão ainda permitiu recuperações adequadas de 102% nas análises sem IS.

resultaram em recuperações que variaram de 89 a 113%. Recuperações de 100% foram obtidas para esses três analitos ao utilizar Bi como IS, associado ao maior fluxo de gás de colisão estudado (5,8 mL min⁻¹). Uma recuperação de 100% também foi obtida para ¹⁹⁵Pt⁺, quando utilizado Ge como IS e o fluxo de He a 2,8 mL min⁻¹. Na utilização do Ge como IS, foi obtida uma recuperação média de 97% para esses três analitos. Por fim, foi obtida uma recuperação média de 99% para a determinação de ¹²⁰Sn⁺ sem o uso do gás He e padronização interna. Ao utilizar Ge como IS, foi obtida uma recuperação média de 100%, enquanto o uso de Sc proporcionou recuperações de 86 e 90% em fluxos de He 2,8 e 5,8 mL min⁻¹, respectivamente. Como mencionado anteriormente, as recuperações médias obtidas quando utilizados Y e In foram inferiores a 70% para a maioria dos analitos, com exceção do Pb que apresentou recuperações variando de 36% a 153%.

FIGURA 12 – PLANO DE COMPONENTES PARA OS ISÓTOPOS INVESTIGADOS



FONTE: A autora (2022).

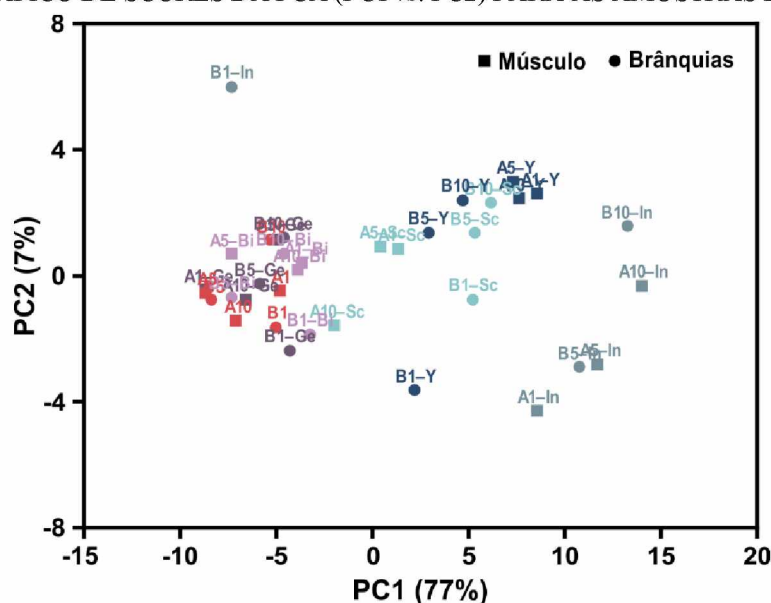
NOTA: Cores quentes (vermelho) indicam valores altos, enquanto cores frias (azul) indicam valores baixos.

Com esse estudo, foi observado que nem todos os elementos mais adequados como padrões internos seguiram a regra geral de possuir propriedades semelhantes às dos analitos, como massa e/ou energia de ionização. Com base nessa regra, seria esperada a formação dos seguintes pares analito/IS: Cd/In, Pd/In, Rh/In, Sn/In e Pt/Bi, devido à similaridade de massa; Cd/Ge, Pd/Ge, Pt/Ge, Rh/Bi e Sn/Bi, devido à similaridade das energias de ionização; e o par Pb/Bi por atender a ambas condições. No entanto, entre os resultados obtidos, os únicos pares selecionados como a melhor condição foram Cd/Ge e Pt/Ge, para os quais as primeiras energias de ionização são 7,89 (Ge), 8,96 (Pt) e 8,99 (Cd). As maiores recuperações nas amostras para

determinação de Rh, Pd e Sn foram obtidas sem o uso de IS, enquanto Pb apresentou melhores valores quando associado ao Ge (Pb/Ge). Com exceção do Sn, o gás de colisão foi necessário para proporcionar determinações livre de interferências. Apesar de não apresentar similaridade em massa e energia de ionização, as boas recuperações obtidas com o par Sn/Sc foram associadas aos elementos fazerem parte do mesmo grupo no sistema periódico.

A adequação do SOM para avaliação dos dados foi ainda avaliada por comparação com os resultados obtidos por meio da análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal component analysis*). O gráfico de scores da PCA (PC1 vs. PC2) é mostrado na FIGURA 13. Embora a PCA tenha apresentado resultados semelhantes aos obtidos pelo SOM, uma avaliação completa só seria possível com a inclusão de um maior número de componentes principais para explicar a variabilidade dos dados. Enquanto isso, a abordagem SOM forneceu uma visualização simples e eficiente para avaliar e selecionar os pares analito/IS mais adequados.

FIGURA 13 – GRÁFICO DE SCORES DA PCA (PC1 vs. PC2) PARA AS AMOSTRAS ESTUDADAS



FONTE: A autora (2022).

NOTA: amostra de músculo de peixe (A) e amostra de brânquias (B).

Os resultados desse trabalho indicaram que a seleção de um IS é uma tarefa complexa que vai além da semelhança com as propriedades físico-químicas do analito. Observações semelhantes foram encontradas em outro estudo relatado na literatura (TANGEN; LUND, 1999). No trabalho desenvolvido por Machado et al. (2020) foi relatado que a composição da matriz também é um fator importante a ser considerado na escolha de um IS, o que foi associado à presença de possíveis contaminantes na amostra, causando efeitos complexos e irregulares no

senal do analito. Já no trabalho desenvolvido por Barros et al. (2020) a eficácia de um único IS para corrigir efeitos de matriz para analitos de diferentes massas foi associada à sofisticação das configurações instrumentais dos equipamentos atuais.

7.3.2 Aplicação em amostras de peixes e moluscos

Para fins de aplicação, apenas dois modos operacionais foram avaliados: sem gás e He a uma vazão de 2,8 mL min⁻¹. Entre essas duas condições, os pares analito/IS que proporcionaram recuperações mais próximas de 100% para as amostras A e B, nos três níveis de concentração, são apresentados na TABELA 18. Nessa tabela também é possível verificar os valores de LOD e LOQ para essas condições, que foram calculados conforme descrito na seção 4.2.5.

TABELA 18 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO CALCULADOS PARA OS PARES ANALITO/IS QUE MAIS SE DESTACARAM NAS VAZÕES AVALIADAS

Isótopo	Modo de operação	Padrão interno	LOD (µg g ⁻¹)	LOQ (µg g ⁻¹)
¹⁰³ Rh ⁺	He	NA	0,001	0,005
¹⁰⁶ Pd ⁺	He	NA	0,175	0,582
¹¹⁴ Cd ⁺	He	Ge	0,043	0,143
¹²⁰ Sn ⁺	Sem gás	NA	0,024	0,080
¹⁹⁵ Pt ⁺	He	Ge	0,003	0,010
²⁰⁸ Pb ⁺	He	Ge	0,682	2,28

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Para o modo de operação com gás He foi utilizada uma vazão de 2,8 mL min⁻¹.

LEGENDA: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), não se aplica (NA).

Para todas as amostras, as concentrações de Pb, Pd, Pt, Rh e Sn ficaram abaixo do LOQ. Apenas a amostra de fígado da espécie *Lutjanus analis* apresentou concentração acima do LOQ para Cd ($0,978 \pm 0,012$ µg g⁻¹). Algumas agências regulamentam a concentração de elementos tóxicos em amostras de peixes e moluscos (conforme apresentado na TABELA 1). No entanto, os limites máximos permitidos para peixes correspondem apenas ao tecido muscular (parte comestível). No trabalho desenvolvido por Pacheco et al.(2017), foram relatadas concentrações de Cd variando de 0,05 a 0,21 µg g⁻¹ em amostras de fígado de peixes coletadas na mesma área de estudo. Para fins de comparação, a concentração para uma amostra similar encontrada nesse estudo foi quase 5 vezes maior do que as relatadas pelos autores. Como já discutido anteriormente (seção 4.3.4), os peixes tendem a bioacumular espécies químicas em diferentes tecidos, sendo o fígado o órgão com maiores concentrações devido à função

metabólica que desempenha nos organismos (RAMOS-MIRAS et al., 2019; SOBIHAH et al., 2018).

7.4 CONCLUSÃO

Esse trabalho desenvolveu uma estratégia para escolha de diferentes padrões internos, juntamente com um gás de colisão, para determinação de elementos de difícil ionização por ICP-MS. Embora relatos da literatura mostrem que semelhanças em termos de massa e energia de ionização são desejáveis para bons pares analito/IS, há um número suficientemente grande de exceções a essa regra. Os critérios para a escolha de um IS devem incluir considerações experimentais e não apenas funções teóricas. O uso de padronização interna e tecnologia de colisão efetivamente atenuam ou eliminam interferências espectrais e não espectrais, permitindo uma quantificação precisa. A análise exploratória por meio do SOM proporcionou visualização e avaliação simples e efetiva dos resultados, possibilitando a proposição dos melhores pares analito/IS. As melhores recuperações foram obtidas usando Ge como IS e gás He na cela de colisão na vazão de 2,8 mL min⁻¹.

8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta tese demonstram avanços significativos para a promoção de métodos de preparo de amostras mais simples, rápidos e seguros. Esses procedimentos associados a técnicas como GF AAS, MIP OES e ICP-MS forneceram alta sensibilidade nas determinações de elementos traço, potencialmente tóxicos e tecnologicamente críticos em amostras de sistemas estuarinos. O uso de solventes menos tóxicos, quando comparados aos ácidos oxidantes, ecologicamente corretos e alinhados aos princípios da GAC proporcionou recuperações satisfatórias para os analitos. Ferramentas quimiométricas de otimização multivariada e análise exploratória foram empregadas para obtenção de máxima resposta analítica livre de interferências, proporcionando uma redução no tempo de execução do procedimento experimental e na complexidade das análises dos dados, resultando em objetividade científica. Os resultados obtidos corroboram com a ideia de que investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de procedimentos analíticos de preparo de amostras são tão importantes quanto às recorrentes melhorias nas técnicas espectroanalíticas de determinação.

REFERÊNCIAS

- AGATEMOR, C.; BEAUCHEMIN, D. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 66–83, 2011.
- ALLAIN, P. et al. Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 1497–1498, 1991.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; BINGÖL, D. Simple and green heat-induced deep eutectic solvent microextraction for determination of lead and cadmium in vegetable samples by flame atomic absorption spectrometry: a multivariate study. **Biological Trace Element Research**, v. 198, n. 1, p. 324–331, 2020.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Innovative and practical deep eutectic solvent based vortex assisted microextraction procedure for separation and preconcentration of low levels of arsenic and antimony from sample matrix prior to analysis by hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 293, p. 378–386, 2019a.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Monitoring of some trace metals in honeys by flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-dispersive liquid liquid microextraction using natural deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 49–59, 2019b.
- AMARAL, C. D. B. et al. Critical evaluation of internal standardization in ICP tandem mass spectrometry and feasibility of the oxygen reaction for boron determination in plants. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 6, p. 1179–1184, 2016.
- ANANDKUMAR, A. et al. Human health risk assessment and bioaccumulation of trace metals in fish species collected from the Miri coast, Sarawak, Borneo. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 655–663, 2018.
- ANVISA. **Resolução No 42, 29 de agosto de 2013**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brazil, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/asudelegis/navisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html. Acesso em: 10 de maio de 2020.
- AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: LATIMER, G. W. (Ed.). **AOAC Official Methods of Analysis**. 20. ed. Rockville: AOAC International, 2012. p. 18.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, 2015.
- ARSLAN, Z.; OYMAK, T.; WHITE, J. Triethylamine-assisted $Mg(OH)_2$ coprecipitation/preconcentration for determination of trace metals and rare earth elements in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 1008, p. 18–28, 2018.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Chemical Principles: The Quest for Insight**. 5. ed. New York: Clancy Marshall, 2010.

- BACON, J. R. et al. Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, p. 9–53, 2020.
- BAHADIR, Z. et al. Separation and preconcentration of lead, chromium and copper by using with the combination coprecipitation-flame atomic absorption spectrometric determination. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 1030–1034, 2014.
- BALBINOT, L. et al. Classification of antarctic algae by applying Kohonen neural network with 14 elements determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 725–730, 2005.
- BALCAEN, L. et al. Inductively coupled plasma - Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements - A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 894, p. 7–19, 2015.
- BARBOSA, J. T. P. et al. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212–217, 2015.
- BARROS, A. I.; PINHEIRO, F. C.; NÓBREGA, J. A. Space charge effects and internal standardization in a four ion lenses interface: What is changing in quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry? **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 167, p. 105825, 2020.
- BATISTA, M. A. S. et al. Artificial neural network employment for element determination in Mugil cephalus by ICP OES in Pontal Bay, Brazil. **Analytical Methods**, v. 12, n. 29, p. 3713–3721, 2020.
- BECHLIN, M. A. et al. Contributions on the use of bismuth as internal standard for lead determinations using ICP-based techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1879–1886, 2015.
- BEGU, E.; SNELL, B.; ARSLAN, Z. Simultaneous separation of arsenic and cadmium from interfering salt matrix of multivitamin/mineral supplements by sequential coprecipitation and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 412–418, 2019.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.
- BEZERRA, M. A. et al. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941–959, mar. 2019.
- BIANCHI, S. R. et al. Determination of selenium in bovine semen by ICP-MS using formic acid for sample preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 2357–2364, 2017.
- BILANDŽIĆ, N. et al. Element contents in commercial fish species from the Croatian market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 71, p. 77–86, 2018.
- BIZZI, C. A. et al. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica Chimica Acta**, v. 837, p. 16–22, 2014b.

BIZZI, C. A. et al. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, p. 332–338, 2014a.

BOSCH, A. C. et al. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 32–48, 2016.

BURATO, J. S. DA S. et al. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 43, p. 202–225, 2020.

CAEIRO, S. et al. Environmental risk assessment in a contaminated estuary: An integrated weight of evidence approach as a decision support tool. **Ocean & Coastal Management**, v. 143, p. 51–62, 2017.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CAMPOS, N. S. et al. Alkaline solubilization of chicken tissues monitored by raman spectroscopy followed by Pb determination by GF AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 353–362, 2017.

CARTER, J. A. et al. Traditional calibration methods in atomic spectrometry and new calibration strategies for inductively coupled plasma mass spectrometry. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 1–25, 2018.

CASTIÑEIRA, M. M. et al. Development of a procedure for the multi-element determination of trace elements in wine by ICP-MS. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n. 5, p. 553–558, 2001.

CASTRO, J. D. S.; DA SILVA, E. G. P.; VIRGENS, C. F. Evaluation of models to predict the influence of chemical pretreatment on the peels of *Nephelium lappaceum* L. based on pyrolysis kinetic parameters obtained using a combined Fraser-Suzuki function and Friedman's isoconversional method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 149, p. 104827, 2020.

CHOI, Y. H. et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant Physiology**, v. 156, p. 1701–1705, 2011.

CITAK, D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Simultaneous coprecipitation of lead, cobalt, copper, cadmium, iron and nickel in food samples with zirconium(IV) hydroxide prior to their flame atomic absorption spectrometric determination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2302–2307, 2009.

CLARKE, C. J. et al. Green and sustainable solvents in chemical processes. **Chemical Reviews**, v. 118, p. 747–800, 2018.

COPAT, C. et al. Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: Consumption advisories. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 33–37, 2013.

COSTA, F. S. et al. Multivariate optimization of an ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 12, n. 19, p. 2509–2516, 2020.

COVACI, E. et al. Eco-scale non-chromatographic method for mercury speciation in fish using formic acid extraction and UV–Vis photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 155–162, 2018.

D'ILIO, S. et al. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 698, n. 1–2, p. 6–13, 2011.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 2013.

DAI, Y. et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14–19, 2015.

DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; WILLIAMS, C. B. Recent advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, p. 1283–1296, 2017.

DOS SANTOS, A. M. P. et al. Evaluation of minerals, toxic elements and bioactive compounds in rose petals (*Rosa* spp.) using chemometric tools and artificial neural networks. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 98–108, 2018.

EC (Commission Regulation). **Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance)**. Bruxelas: Official Journal of the European Union, 2006. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

EC (Commission Regulation). **Commission Regulation (EC) No 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance)**. Bruxelas: Official Journal of the European Union, 2008. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2008/629/oj>>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

EK, K. H.; MORRISON, G. M.; RAUCH, S. Environmental routes for platinum group elements to biological materials—a review. **Science of The Total Environment**, v. 334–335, p. 21–38, 2004.

ELÇI, L.; SARAÇOĞLU, S. Applying magnesium hydroxide coprecipitation method for trace analysis to dialysis concentrate. **Talanta**, v. 46, p. 1305–1310, 1998.

ELIK, A.; DEMIRBAS, A.; ALTUNAY, N. Developing a new and simple natural deep eutectic solvent based ultrasonic-assisted microextraction procedure for determination and preconcentration of As and Se from rice samples. **Analytical Methods**, v. 11, p. 3429–3438, 2019.

ES'HAGHI, Z.; BARDAJEE, G. R.; AZIMI, S. Magnetic dispersive micro solid-phase extraction for trace mercury pre-concentration and determination in water, hemodialysis solution and fish samples. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 170–177, 2016.

FANG, T. et al. Distribution, bioaccumulation and trophic transfer of trace metals in the food web of Chaohu Lake, Anhui, China. **Chemosphere**, v. 218, p. 1122–1130, 2019.

FAO/WHO. **Joint FAO/WHO Food standards programme codex committee on contaminants in foods**. Hague, Netherlands: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2011.

FEIST, B.; MIKULA, B. Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 147, p. 302–306, 2014.

FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á. et al. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, v. 1038, p. 1–10, 2018.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GAMELA, R. R.; COSTA, V. C.; PEREIRA-FILHO, E. R. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in pepper samples by ICP OES. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 1, p. 69–77, 2020.

GHAEDI, H. et al. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. **Journal of Molecular Liquids**, v. 242, p. 395–403, 2017.

GONCALVES, D. A.; MCSWEENEY, T.; DONATI, G. L. Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 1097–1104, 2016.

GOUDA, A. A. A new coprecipitation method without carrier element for separation and preconcentration of some metal ions at trace levels in water and food samples. **Talanta**, v. 146, p. 435–441, 2016.

GRINDLAY, G. et al. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 42–49, 2013.

GU, Y. G.; HUANG, H.-H.; LIN, Q. Concentrations and human health implications of heavy metals in wild aquatic organisms captured from the core area of Daya Bay's Fishery Resource Reserve, South China Sea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 90–94, 2016.

HABIBI, E. et al. A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 61–67, 2013.

HAO, Y. et al. Trace elements in fish from Taihu Lake, China: Levels, associated risks, and trophic transfer. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 89–97, 2013.

HAYKIN, S. **Redes Neurais: Princípios e prática**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2001.

HESHMATI, A. et al. Dietary exposure to toxic and essential trace elements by consumption of wild and farmed carp (*Cyprinus carpio*) and Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) in Iran. **Chemosphere**, v. 173, p. 207–215, 2017.

HSIEH, H. F.; CHEN, Y.-H.; WANG, C.-F. A magnesium hydroxide preconcentration/matrix reduction method for the analysis of rare earth elements in water samples using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 983–990, 2011.

HSU, W. H.; JIANG, S. J.; SAHAYAM, A. C. Determination of Pd, Rh, Pt, Au in road dust by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry with slurry sampling. **Analytica Chimica Acta**, v. 794, p. 15–19, 2013.

INAGAKI, K. et al. Coprecipitation in Trace Element Analysis. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p. 11.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2018.

IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis—II. Data interpretation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 33, p. 241–245, 1978.

JANKOWSKI, K.; RESZKE, E. Recent developments in instrumentation of microwave plasma sources for optical emission and mass spectrometry: Tutorial review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1196, 2013.

JIANG, Z. et al. Metal concentrations and risk assessment in water, sediment and economic fish species with various habitat preferences and trophic guilds from Lake Caizi, Southeast China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 1–8, 2018.

KAN, M. et al. Determination of total mercury in biological samples using flow injection CVAAS following tissue solubilization in formic acid. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1259–1263, 2006.

KARADAŞ, C.; KARA, D. Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for preconcentration and determination of trace amounts of copper by flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 220, p. 242–248, 2017.

- KAZI, T. G. et al. A rapid ultrasonic energy assisted preconcentration method for simultaneous extraction of lead and cadmium in various cosmetic brands using deep eutectic solvent: A multivariate study. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 51, p. 40–48, 2019.
- KORVELA, M.; ANDERSSON, M.; PETTERSSON, J. Internal standards in inductively coupled plasma mass spectrometry using kinetic energy discrimination and dynamic reaction cells. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 10, p. 1770–1776, 2018.
- KOWALSKI, C. H. et al. Application of Kohonen neural network for evaluation of the contamination of Brazilian breast milk with polychlorinated biphenyls. **Talanta**, v. 116, p. 315–321, 2013.
- LASHARI, A. A. et al. Developed a modified liquid–liquid micro-extraction method for the preconcentration of cadmium in groundwater samples of aquifers at different depth in a coal mining area. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–12, 2019.
- LEMES, M. R.; DAL PINO, A. A tabela periódica dos elementos químicos prevista por redes neurais artificiais de Kohonen. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1141–1144, 2008.
- LIANG, G. et al. Analysis of heavy metals in foodstuffs and an assessment of the health risks to the general public via consumption in Beijing, China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 6, p. 909, 2019.
- LOPES, G. S. et al. An evaluation of the use of formic acid for extraction of trace elements from brazil nut and babassu coconut and its suitability for multi-element determination by ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 42, p. 1229–1235, 2016.
- LUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; LUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 60–67, 2018.
- MACHADO, R. C. et al. Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 271–275, 2017.
- MACHADO, R. C. et al. Internal standardization as a strategy to overcome non-spectral interferences in the determination of As, Cd and Pb in mineral fertilizers by synchronous vertical dual view (SVDV) ICP OES. **Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 39–45, 2020.
- MAHMOOD, A.; MALIK, R. N. Human health risk assessment of heavy metals via consumption of contaminated vegetables collected from different irrigation sources in Lahore, Pakistan. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 91–99, 2014.
- MATONG, J. M.; NYABA, L.; NOMNGONGO, P. N. Determination of As, Cr, Mo, Sb, Se and V in agricultural soil samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after simple and rapid solvent extraction using choline chloride-oxalic acid deep eutectic solvent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 152–157, 2017.
- MCCULLOCH, W. S.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **The Bulletin of Mathematical Biophysics**, v. 5, n. 4, p. 115–133, 1943.

MENDIL, D.; KARATAS, M.; TUZEN, M. Separation and preconcentration of Cu(II), Pb(II), Zn(II), Fe(III) and Cr(III) ions with coprecipitation method without carrier element and their determination in food and water samples. **Food Chemistry**, v. 177, p. 320–324, 2015.

MURPHY, K. E.; VETTER, T. W. Recognizing and overcoming analytical error in the use of ICP-MS for the determination of cadmium in breakfast cereal and dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 4579–4588, 2013.

NARUKAWA, T.; WILLIE, S. Dried deposits of biological tissues solubilized using formic acid for LA ICP-TOF-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 1145–1148, 2010.

NIEMELÄ, M. et al. Determination of platinum and rhodium in dust and plant samples using microwave-assisted sample digestion and ICP-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 521, n. 2, p. 137–142, 2004.

NOVAES, C. G. et al. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331–346, 2016.

OLIVEIRA, A. F. DE et al. The use of diluted formic acid in sample preparation for macro- and microelements determination in foodstuff samples using ICP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 7–12, 2018.

OLMEDO, P. et al. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. **Environment International**, v. 59, p. 63–72, 2013.

ORESTE, E. Q. et al. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. **Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1590–1595, 2013.

OSOWSKA, N.; RUZIK, L. New potentials in the extraction of trace metal using natural deep eutectic solvents (NADES). **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 926–935, 2019.

PACHECO, C. S. V. et al. Determination and evaluation of metallothionein and metals in *Mugil cephalus* (Mullet) from Pontal Bay, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, p. 84–90, 2017.

PACHECO-FERNÁNDEZ, I.; PINO, V. Green solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, p. 42–50, 2019.

PANHWAR, A. H.; TUZEN, M.; KAZI, T. G. Choline chloride–oxalic acid as a deep eutectic solvent–based innovative digestion method for the determination of selenium and arsenic in fish samples. **Journal of AOAC International**, v. 101, p. 1183–1189, 2018.

PAWLAK, J.; LODYGA-CHRUŚCIŃSKA, E.; CHRUSTOWICZ, J. Fate of platinum metals in the environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 3, p. 247–254, 2014.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREEnness metric approach and software. **Analytical Chemistry**, v. 92, p. 10076–10082, 21 jul. 2020.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

PEREIRA, C. D. et al. Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1763–1768, 2010.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268–277, 1996.

PINHEIRO, F. C. et al. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 471–478, 2019.

RAMOS-MIRAS, J. J. et al. Potentially toxic elements in commonly consumed fish species from the western Mediterranean Sea (Almería Bay): Bioaccumulation in liver and muscle tissues in relation to biometric parameters. **Science of The Total Environment**, v. 671, p. 280–287, 2019.

RASTEGARIFARD, F.; GHANEMI, K.; FALLAH-MEHRJARDI, M. A deep eutectic solvent-based extraction method for fast determination of Hg in marine fish samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 39, p. 5741–5748, 2017.

RAVINDRA, K.; BENCS, L.; VAN GRIEKEN, R. Platinum group elements in the environment and their health risk. **Science of The Total Environment**, v. 318, n. 1–3, p. 1–43, 2004.

RÍOS, S. E. G.; PEÑUELA, G. A.; BOTERO, C. M. R. Method validation for the determination of mercury, cadmium, lead, arsenic, copper, iron, and zinc in fish through microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 10, p. 3407–3414, 2017.

ROCHA, D. L. et al. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 79–92, 2013.

ROSA, F. C. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction: an efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 211–217, 2015.

ROUANE-HACENE, O. et al. Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels *Mytilus galloprovincialis* from Algerian west coast, applied to environmental monitoring. **Oceanologia**, v. 57, p. 362–374, 2015.

SÁ, I. P. et al. Determination of trace elements in meat and fish samples by MIP OES using solid-phase extraction. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 238–248, 2020.

SÁ, I. P. et al. Pré-concentração baseada na coprecipitação usando cromato de prata como carreador para determinação de cobre por FAAS. **Química Nova**, v. 42, p. 10–16, 2018.

SAFARI, Y. et al. Persistent sample circulation microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectroscopy for trace determination of heavy metals in fish species marketed in Kermanshah, Iran, and human health risk assessment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 2915–2924, 2017.

SANTANA, A. P. R. et al. Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. **Talanta**, v. 199, p. 361–369, 2019.

SANTOS, H. M. et al. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 273, p. 159–165, 2019.

SCRIVER, C. et al. Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP–AES. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 7, p. 1460–1466, 2005.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21, 2011.

SILVA, D. T. DA et al. Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 89, 2020.

SILVA, E. DOS S. et al. Evaluation of macro and micronutrient elements content from soft drinks using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v. 273, p. 9–14, 2019.

SILVA, E. L.; ROLDAN, P. DOS S.; GINÉ, M. F. Simultaneous preconcentration of copper, zinc, cadmium, and nickel in water samples by cloud point extraction using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol and their determination by inductively coupled plasma optic emission spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 1133–1138, 2009.

SOBIHAH, N. N. et al. Bioaccumulation of heavy metals in maricultured fish, *Lates calcarifer* (Barramudi), *Lutjanus campechanus* (red snapper) and *Lutjanus griseus* (grey snapper). **Chemosphere**, v. 197, p. 318–324, 2018.

SOYLAK, M.; AYDIN, A. Determination of some heavy metals in food and environmental samples by flame atomic absorption spectrometry after coprecipitation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1242–1248, 2011.

SOYLAK, M.; AYDIN, A.; KIZIL, N. Multi-element preconcentration/separation of some metal ions in environmental samples by using co-precipitation. **Journal of AOAC International**, v. 99, p. 273–278, 2016.

TANGEN, A.; LUND, W. A multivariate study of the acid effect and the selection of internal standards for inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 54, n. 13, p. 1831–1838, 1999.

TANNER, S. D. Characterization of ionization and matrix suppression in inductively coupled “cold” plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, n. 11, p. 905–921, 1995.

TAO, Y. et al. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and potential health risk assessment from Taihu lake, China.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 81, p. 55–64, 2012.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: LUCH, A. (Ed.). **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**. Experientia Supplementum. Springer Basel, 2012. v. 101p. 133–164.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners**. 3 ed. New York: CRC Press, 2013.

THOMPSON, J. J.; HOUK, R. S. A study of internal standardization in inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Applied Spectroscopy**, v. 41, n. 5, p. 801–806, 1987.

THONGSAW, A. et al. Speciation of mercury in water and biological samples by eco-friendly ultrasound-assisted deep eutectic solvent based on liquid phase microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 197, p. 310–318, 2019.

TORMEN, L. et al. Determination of trace elements in biological samples treated with formic acid by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 11, p. 959–966, 2010.

TORMEN, L. et al. The use of electrothermal vaporizer coupled to the inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic, selenium and transition metals in biological samples treated with formic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 717, p. 21–27, 2012.

TORRES, D. P. et al. Sequential factorial designs for method development of the determination of Cd and Pb in fish and shrimp by GF AAS after sample freeze-drying and tetramethylammonium hydroxide solubilization. **Analytical Methods**, v. 8, n. 21, p. 4263–4271, 2016.

TUFEKCI, M. et al. Determination of Pb(II), Zn(II), Cd(II), and Co(II) ions by flame atomic absorption spectrometry in food and water samples after preconcentration by coprecipitation with Mo(VI)-diethyldithiocarbamate. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 1107–1115, 2013.

ULLAH, A. K. M. A. et al. Development and validation of a GF-AAS method and its application for the trace level determination of Pb, Cd, and Cr in fish feed samples commonly used in the hatcheries of Bangladesh. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 15, 2017.

VATANEN, T. **Self-Organizing Map algorithm (SOM Toolbox 2.1)**, 2012. Disponível em: <<http://research.ics.aalto.fi/software/somtoolbox/>>. Acesso em: 20 de junho de 2021.

VESANTO, J. et al. **Self-organizing map in Matlab: the SOM Toolbox**. Proceedings of the Matlab DSP Conference. **Anais...** Finland: Espoo, 1999.

VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. Clustering of the self-organizing map. **IEEE Transactions on Neural Networks**, v. 11, n. 3, p. 586–600, 2000.

VIEIRA, C. et al. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 923–932, 2011.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R. Palladium nitrate–magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performance for the determination of 21 elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, n. 8, p. 1257–1271, 1992.

WILTSCHE, H.; WINKLER, M.; TIRK, P. Matrix effects of carbon and bromine in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, p. 2223–2234, 2015.

YAMADA, N. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 110, p. 31–44, 2015.

YILDIZ, E. et al. A new chelating reagent and application for coprecipitation of some metals in food samples by FAAS. **Food Chemistry**, v. 194, p. 143–148, 2016.

ZENG, X. C. et al. Determination of trace lead in fish sauces by ID-ICP-MS after $\text{Mg}(\text{OH})_2$ coprecipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 22, p. 584–594, 2013.

ZHANG, L.; CAMPBELL, L. M.; JOHNSON, T. B. Seasonal variation in mercury and food web biomagnification in Lake Ontario, Canada. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 178–184, 2012.

ZHAO, F. et al. Enzyme-assisted extraction and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of arsenic species in fish. **Journal of Chromatography A**, v. 1573, p. 48–58, 2018.

ZHU, Y. Determination of rare earth elements in seawater samples by inductively coupled plasma tandem quadrupole mass spectrometry after coprecipitation with magnesium hydroxide. **Talanta**, v. 209, p. 120536, 2020.

ZOUNR, R. A. et al. A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 253, p. 277–283, 2018.

ZOUNR, R. A.; TUZEN, M.; KHUHAWAR, M. Y. Ultrasound assisted deep eutectic solvent based on dispersive liquid liquid microextraction of arsenic speciation in water and environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Molecular Liquids**, v. 242, p. 441–446, 2017.

ANEXOS

ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

MOREIRA, L. S.; COSTA, F. S.; LIDORIO, R. C.; TOLEDO, L. W. S.; OLIVEIRA, A.; GONZALEZ, M. H.; DA SILVA, E. G. P.; AMARAL, C. D. B. et al. Evaluation of trace elements in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectrometry after sample treatment with formic acid. **Food Analytical Methods**, v. 15, p. 1687–1694, 2022. DOI: 10.1007/s12161-022-02240-3

MOREIRA, L. S.; SÁ, I. P.; MACHADO, R. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; DA SILVA, E. G. P.; AMARAL, C. D. B. Coprecipitation magnesium(II) hydroxide as a strategy of pre-concentration for trace elemental determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 169, p. 105899, 2020. DOI: 10.1016/j.sab.2020.105899

MOREIRA, L. S.; SÁ, I. P.; MACHADO, R. C.; NOGUEIRA, A. R.; AMARAL, C. D. B. Use of pre-concentration via coprecipitation $Mg(OH)_2$ for trace elements determination in fish and shellfish by MIP OES. **15th Rio Symposium on Atomic Spectrometry**, 6 – 11, Outubro 2019, Mendoza, Argentina.

MOREIRA, L. S.; SANTANA, A. P. R.; COSTA, F. C.; VERA, J. B.; GONZALEZ, M. H.; DA SILVA, E. G. P.; AMARAL, C. D. B. Enhanced extraction of arsenic and cadmium from environmental samples using a natural deep eutectic solvent and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1080/03067319.2020.1826460

MOREIRA, L. S.; COSTA, F. S.; MACHADO, R. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; GONZALEZ, M. H.; DA SILVA, E. G. P.; AMARAL, C. D. B. Self-organizing map applied to the choice of internal standards for the determination of Cd, Pb, Sn, and platinum group elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 233, p. 122534, 2021. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122534

MOREIRA, L. S.; CHAGAS, B. C.; PACHECO, C. S. V.; SANTOS, H. M.; DE MENEZES, L. H. S.; NASCIMENTO, M. M.; BATISTA, M. A. S.; DE JESUS, R. M.; AMORIM, F. A. C.; SANTOS, L. N.; DA SILVA, E. G. P. Development of procedure for sample preparation of cashew nuts using mixture design and evaluation of nutrient profiles by Kohonen neural network. **Food Chemistry**, v. 273, p. 136–143, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.050

SANTOS, H. M.; COUTINHO, J. P.; AMORIM, F. A. C.; LÔBO, I. P.; **MOREIRA, L. S.;** NASCIMENTO, M. M.; DE JESUS, R. M. Microwave-assisted digestion using diluted HNO_3 and H_2O_2 for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 273, p. 159–165, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.074

BATISTA, M. A. S.; SANTOS, L. N.; CHAGAS, B. C.; LÔBO, I. P.; NOVAES, C. G.; GUEDES, W. N.; DE JESUS, R. M.; AMORIM, F. A. C.; PACHECO, C. S. V.; **MOREIRA, L. S.;** DA SILVA, E. G. P. Artificial neural network employment for element determination in *Mugil cephalus* by ICP OES in Pontal Bay, Brazil. **Analytical Methods**, v. 12, n. 29, p. 3713–3721, 2020. DOI: 10.1039/D0AY00799D

COSTA, F. S.; **MOREIRA, L. S.**; DA SILVA, A. M.; SILVA, R. J.; SANTOS, M. P.; DA SILVA, E. G. P.; GRASSI, M. T.; GONZALEZ, M. H.; AMARAL, C. D. B. Natural deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction in the medicinal herb sample preparation and elemental determination by ICP OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 104510, 2022. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104510