

Fabiana Lopes Pedrosa

**Química verde aplicada para determinação de arsênio em tecido
animal e vegetal por ICP-MS**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2021

Fabiana Lopes Pedrosa

**Química verde aplicada para determinação de arsênio em tecido
animal e vegetal por ICP-MS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2021

P372q	Pedrosa, Fabiana Lopes Química verde aplicada para determinação de arsênio em tecido animal e vegetal por ICP-MS / Fabiana Lopes Pedrosa. -- São José do Rio Preto, 2021 78 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Mario Henrique Gonzalez 1. Preparo de amostra (Química). 2. Química verde. 3. Química analítica. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Fabiana Lopes Pedrosa

**Química verde aplicada para determinação de arsênio em tecido
animal e vegetal por ICP-MS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Clarice Dias Britto do Amaral
UFPR – Curitiba

Prof^a. Dr^a. Mirian Cristina dos Santos
UNESP – Câmpus de Araraquara

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

23 de julho de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais Heliana e Roberto, por
sempre me apoiarem e acreditarem que eu seria capaz de
atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por ter me dado coragem e sabedoria para enfrentar todas as dificuldades encontradas durante o caminho.

Aos meus pais Heliana e Roberto e à minha irmã Patrícia, por todo o apoio, incentivo e amor profundo e sincero, por terem me erguido em todos os momentos da minha vida.

Ao Douglas, por todo amor, apoio, carinho e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez pelas orientações neste trabalho de mestrado e por toda atenção e compreensão que teve comigo.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista (UNESP – IBILCE) e ao Departamento de Química e Ciências Ambientais por mais esta oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço a bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob os processos nº 2019/22113-8, 2017/18531-3 e 2015/08873-9 e ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT-DATREM – processos FAPESP 14/509454 e CNPq 465571/2014-0) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Agradeço aos amigos que fiz nessa jornada Floriatan e Márcio, o caminho fica mais fácil quando é compartilhado. Agradeço também por participarem diretamente no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo com discussões e conselhos.

Ao meu amigo Luís agradeço pela amizade sincera, carinho e apoio por tornar meus dias mais fáceis e pelos incentivos quando as coisas pareciam que não iam acontecer.

A todos do Grupo de Inovação em Química Analítica Verde (GIQAV) pela troca de experiências, ajuda e conhecimentos. Em especial ao Rafael, Érica e Bruna pela amizade, por toda a ajuda, companheirismo e por proporcionarem um bom ambiente de trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento e a otimização de novas metodologias que diminuam o impacto ao meio ambiente e contribuam para uma química mais sustentável se faz necessário, assim a busca por métodos analíticos que minimizem o uso de reagente e de energia e que reduzam a quantidade de resíduos gerados é recomendável pelos conceitos da Química Verde. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de dois procedimentos de preparo de amostras para tecidos vegetal e animal: um baseado na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) e um segundo empregando radiação ultravioleta (UV), utilizando HNO_3 diluído e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como oxidante auxiliar, para amostra vegetal (Marandu, EMBRAPA E1001a) e tecido animal (Peixe – Tissue the Fish-Ipen) e determinação de arsênio empregando espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Para a otimização dos procedimentos foram aplicados planejamentos fatoriais do tipo Doehlert, onde, a triagem e o ajuste fino das variáveis envolvidas nos processos foram realizadas e os modelos matemáticos gerados foram avaliados pela ANOVA ($p < 0,05$), onde não apresentaram falta de ajuste significativa. A melhor condição experimental para a decomposição de aproximadamente 200 mg de ambas as amostras por MW-AD foi uma mistura de 6 mL de HNO_3 (5 mol L^{-1}) associada a 2,0 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹), tempo de 15 minutos e temperatura de 190 °C, com um teor de 5 e 3 % de carbono residual para a forrageira marandu e o tecido de peixe, respectivamente. Para a metodologia de UV, a melhor condição para ambos tecidos foi de 150 mg de amostra, 6 mL de HNO_3 ($0,65 \text{ mol L}^{-1}$), 2,0 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹) em um tempo de 24 minutos, com recuperação de arsênio de 93% para o marandu e 85% para o tecido de peixe. Os resultados mostraram que esses dois métodos estão de acordo com a Química Verde, evidenciando vantagens como o emprego de menores quantidade de solventes, de tempo de reação e de geração de resíduos, sendo considerados pela a Eco-Escala analítica métodos ambientalmente amigáveis e uma alternativa válida aos métodos convencionais de preparo de amostra.

Palavras-chave: Análise elementar. Preparo de amostra. UV. Radiação micro-ondas. ICP-MS.

ABSTRACT

The development and optimization of new methodologies that reduce the impact on the environment and contribute to more sustainable chemistry is necessary, as well as a search for analytical methods that minimize the use of reagent and energy and that reduce the amount of waste generated is recommended by the concepts of Green Chemistry. This work aimed to develop and optimize two sample preparation procedures: one based on Microwave-assisted Acid Digestion (MW-AD) and a second using ultraviolet (UV) radiation, using dilute nitric acid and hydrogen peroxide as auxiliary oxidant, for vegetable (Marandu, EMBRAPA E1001a) and animal tissue (Fish tissue, IPEN) and arsenic determination using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For the optimization of the procedures, Doehlert design was used, in which the screening and fine-tuning of the variables involved in the processes performed and the generated mathematical models were assessed by ANOVA ($p < 0.05$), where non-synchronized lack of adjustment. The best experimental condition for decomposition of approximately 200 mg of both samples by MW-AD was a mixture of 6 mL of HNO_3 (5 mol L^{-1}) and 2.0 mL of H_2O_2 ($30\% \text{ v v}^{-1}$), time of 15 min and temperature of 190°C , with a content of 5 and 3% of residual carbon for marandu and fish, respectively. For the UV methodology, the best condition for both tissues was 150 mg of sample, 6 mL of HNO_3 (0.65 mol L^{-1}), 2.0 mL of H_2O_2 ($30\% \text{ v v}^{-1}$) in one time 24 minutes, with 95% of recovery for arsenic in marandu and 93% for fish tissue. The results confirm that these two are in accordance with Green Chemistry, showing advantages such as the use of lower amounts of solvents, reaction time and waste generation, considered by the Eco-scale analytical environmentally friendly methods, and a valid alternative to conventional methods of sample preparation.

Keywords: Elemental analysis. Sample preparation. UV. Microwave radiation. ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Projeto da câmara (A) e protótipo utilizado nas etapas experimentais (B).....	36
Figura 2 – Gráficos de resíduo e valores preditos para o modelo estatístico A (Marandu) e B (Peixe)	47
Figura 3 – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de Marandu (A) e peixe (B)	48
Figura 4 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Doehlert usando a resposta múltipla, para amostra de marandu	51
Figura 5 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Doehlert usando a resposta múltipla, para amostra de peixe	51
Figura 6 – Valores preditos para o modelo quadrático para amostra de Marandu (A) e peixe (B)	55
Figura 7 – Gráfico de Pareto para a variável porcentagem de recuperação nas determinações de arsênio no Marandu (A) e peixe (B).	56
Figura 8 – Superfície de resposta e gráfico de contorno traçados a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de Marandu	60
Figura 9 – Superfície de resposta e gráfico de contorno traçados a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de peixe.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de dados do planejamento fatorial do tipo Doehlert para avaliação da eficiência de digestão em meio ácido assistida por radiação micro-ondas, nas amostras marandu e peixe.....	35
Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para análise por ICP OES para a determinação de carbono residual nos digeridos das amostras estudadas	35
Tabela 3 – Matriz de dados do planejamento fatorial tipo Doehlert para avaliação da eficiência de extração em meio ácido assistida por radiação ultravioleta, nas amostras marandu e peixe	37
Tabela 4 – Parâmetros instrumentais aplicados na determinação de As por ICP-MS	39
Tabela 5 – Pontos de penalidade para calcular a Eco-Escala analítica.....	42
Tabela 6 – Teores totais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre em marandu e peixe	43
Tabela 7 – Matriz de planejamento fatorial tipo Doehlert incluindo as variáveis experimentais e a resposta analítica (teor de carbono removido) utilizados na obtenção do modelo matemático.....	44
Tabela 8 – Análise de variância do modelo matemático obtido a partir no planejamento fatorial do tipo Doehlert	46
Tabela 9 – Matriz de planejamento fatorial tipo Doehlert para as variáveis tempo, volume de H ₂ O ₂ , porcentagem de HNO ₃ , porcentagem de recuperação de arsênio e desejabilidade, como respostas aplicada ao procedimento de extração com radiação (UV) em amostras de marandu e peixe.....	53
Tabela 10 – Análise de variância do modelo matemático obtido com os dados experimentais modelado no planejamento fatorial do tipo Doehlert	54
Tabela 11 – Comparação dos métodos MW-AD e UV neste estudo com outros trabalhos relatados na literatura	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of variance</i>)
CP	Ponto central (do inglês, <i>Central point</i>)
CRM	Material de referência certificado (do inglês, <i>Certified Reference Material</i>)
DRC	Célula de reação dinâmica (do inglês, <i>Dynamic reaction cell</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês, <i>Environmental Protection Agency</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GAC	Química Analítica Verde (do inglês, <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Química Verde (do inglês, <i>Green Chemistry</i>)
GHS	Sistema harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (do inglês, <i>Globally Harmonized System</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
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 Quantification</i>)
MS	Média quadrática (do inglês, <i>Mean square</i>)
MW-AD	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (do inglês, <i>Microwave-assisted Acid Digestion</i>)
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
PP	Ponto de penalidade (do inglês, <i>penalty points</i>)
RF	Potência de radiofrequência (do inglês, <i>radiofrequency power</i>)
RSD	Desvio de padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês, <i>Response Surface Methodology</i>)

SS	Soma quadrática (do inglês, <i>Sum of squares</i>)
TOC	Carbono orgânico total (do inglês, <i>Total Organic Carbon</i>)
UV	Ultravioleta (do inglês, <i>ultraviolet</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>F</i>	Estatística crítica de Fisher
K	Número de fatores
kHz	Quilohertz
n	Número de réplicas
N	Número de experimentos
<i>p</i>	Probabilidade
R²	Coeficiente de determinação
R²ajus	Coeficiente de determinação ajustado
S	Desvio padrão
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E FUNDAMENTOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Química verde e química analítica verde.....	16
2.2	Toxicidade do Arsênio	17
2.3	Técnicas de otimização multivariada	19
2.3.1	Planejamento fatorial do tipo Doehlert.....	19
2.3.2	Avaliação do modelo matemático	20
2.4	Preparo de amostra por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	22
2.5	Preparo de amostra empregando extração ácida assistida pela radiação ultravioleta	26
2.6	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	29
3	OBJETIVOS	32
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
4.1	Reagentes, soluções e amostras.....	33
4.2	Otimização multivariada.....	33
4.2.1	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	33
4.3	Otimização multivariada da extração ácida assistida por UV empregando uma câmara de foto-oxidação	36
4.4	Determinação de Arsênio total por ICP-MS	38
4.5	Análise de dados	39
4.6	Avaliação de parâmetros de desempenho.....	39
4.7	Avaliação dos métodos ambientalmente verdes.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Otimização multivariada do procedimento MW-AD	43
5.2	Otimização multivariada do procedimento de extração assistida por UV em câmara de foto-oxidação	53
5.3	Avaliação de parâmetros de desempenho dos métodos analíticos	61

5.4	Avaliação dos métodos ambientalmente verdes.....	63
6	CONCLUSÃO.....	67
7	ETAPAS EM DESENVOLVIMENTO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTOS

O desenvolvimento de experimentos que empregam a decomposição de uma ampla variedade de matrizes no preparo de amostra frequentemente tem por objetivo quantificar elementos químicos presentes nestas matrizes. Contudo nessa etapa de manipulação da amostra busca-se minimizar os problemas de contaminação e perdas durante a análise química (KRUG, 2006; ROCHA et al., 2013).

Existe um interesse no desenvolvimento de métodos de preparo de amostra fundamentados na decomposição ácida, que buscam diminuir custos com reagentes químicos e energia. Essa busca é uma das finalidades da Química Verde (GC), e sua introdução é progressivamente mais recorrente nos preparos de amostras, que é a etapa que consome maior quantidade de reagente e energia além da geração de elevadas quantidades de resíduos químicos (KOEL, 2016; ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015).

As formas convencionais de preparo de amostra por via úmida ainda requerem altos volumes de reagentes e longos períodos de reação, além de elevadas temperaturas, todos esses fatores são considerados desfavoráveis em atenção aos princípios da Química Verde (ARMENTA et al., 2017, GAIUSZKA et al., 2013).

A radiação ultravioleta (UV) pode ser utilizada em processos alternativos às formas convencionais de preparo de amostra, como a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD). O uso da UV nos procedimentos de preparo de amostra apresenta vantagens, como a decomposição da matéria orgânica de forma mais simples, econômica em termos de reagentes, energia, custo de instrumentação e com alta frequência analítica (BENDICHO et al., 2010, KOMOROWICZ et al., 2019).

Na MW-AD emprega-se radiação micro-ondas promovendo assim o aquecimento do meio reacional, aumentando a reatividade química e promovendo a extração dos analitos (MELLO; BARIN; GUARNIERI, 2014). A decomposição de matrizes orgânicas também pode ser promovida pela radiação UV que apresenta energia suficiente para que ocorram as transições eletrônicas, levando a quebra de ligações químicas e geração de radicais livres que destroem a matéria orgânica, decompondo-a (GOUVÊA et al., 2014). Nesses dois procedimentos experimentais, empregam-se menores volumes de solventes, tempos de extração e energia, corroborando com os princípios da Química Verde.

Em todos esses métodos de preparo de amostra, o papel do solvente é fundamental para que se tenha dissolução de sólidos e extração de analitos desejáveis. Além disso, devem ser investigados e avaliados alguns fatores, como diferentes concentrações e tipos de soluções de solventes extratores, a temperatura e o tempo reacional, para a obtenção das melhores condições experimentais (FERREIRA et al., 2004).

A presença de elementos contaminantes em amostras animais e vegetais têm se tornado objeto de muitos trabalhos (VINATORU et al., 2017; MOHAMMED; MOHAMMED; MOHAMMED, 2017; MECHE, et al., 2010). O desenvolvimento de um preparo de amostra para a extração desses elementos são estratégias fundamentais para que através de um método apropriado de análise seja possível determiná-los, avaliando assim, os possíveis impactos provocados pela contaminação, desequilíbrio ecológico e também aos danos à saúde em seres vivos (AMARAL; NÓBREGA; NOGUEIRA, 2013; SALEH et al., 2020).

Aliado a estes quesitos, o desenvolvimento de um único método analítico simples e reproduzível de decomposição de amostras animais e vegetais são de suma importância, pois apresentam vantagens que aceleram e simplificam o preparo de amostra. Há poucos trabalhos na literatura que relatam uma única condição experimental desenvolvida de procedimento de preparo de amostra para diferentes tipos matriciais (CARRILHO et al., 2002; SANTOS et al., 2010). Estes trabalhos utilizam procedimentos únicos de preparo de amostras e que envolvem o uso de uma mesma condição reacional, com quantidades e tipos de reagentes iguais para uma decomposição eficiente e rápida de materiais de composições diferentes. Além disso, dentre esses trabalhos há uma grande parcela que utilizam técnicas analíticas com fonte de plasma, como a espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), que apresentam alta sensibilidade e ampla faixa de trabalho, sendo eficientes na análise multielementar corroborando com os preceitos da Química Verde (NOVAES et al., 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Química verde e química analítica verde

A Química Verde surge com a necessidade de implementar condutas químicas, que propõem controle e prevenção da poluição ambiental (GAŁUSZKA et al., 2013). Através de tecnologias limpas e ambientalmente sustentáveis é possível prevenir a poluição ambiental e riscos para a saúde dos seres vivos (WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Na década de 90 de acordo com Anastas e Warner (1998) a Química Verde, foi definida como “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente” definição também do âmbito da Agência de Proteção Ambiental (EPA). Ainda em (1998) Anastas e Warner, divulgaram o que se acredita ser o primeiro manual de Química Verde, na qual foram descritos os vários princípios que referenciamos hoje como “Os 12 princípios da química verde”.

Esses princípios têm sido cada vez mais empregados para o desenvolvimento de métodos analíticos, com o propósito de minimizar os impactos sobre o meio ambiente, através da diminuição ou eliminação da utilização e geração de substâncias que ofereçam perigos (TOBISZEWSKI; MECHLINSKA; NAMIESNIK, 2010). Desta forma, houve uma adequação desses princípios com a finalidade de se atribuir à química analítica, passando a existir o conceito de Química Analítica Verde (GAC).

Em 2013, Gałuszka e colaboradores postularam os “12 princípios da Química Analítica Verde” que foram: 1) Uso de análise direta para evitar tratamento da amostra, quando possível; 2) Tamanho e número mínimo de amostras; 3) Sempre que possível realizar análise in situ; 4) A integração de processos e operações analíticas que economizem energia e redução no uso de reagentes; 5) Sempre que possível, utilizar métodos automatizados e miniaturizados; 6) Evitar os processos de derivatização, se possível; 7) Evitar produção de elevados volumes de resíduos e propiciar uma gestão adequada para eles; 8) Preferir métodos multielementares ou multiparâmetros; 9) Minimização do consumo de energia; 10) Emprego de reagentes obtidos de fonte renovável; 11) Eliminação ou substituição de reagentes tóxicos e 12) Aumento da segurança operacional. Dessa forma, novas metodologias e técnicas analíticas estão sendo desenvolvidas com critérios amigáveis ao meio ambiente perfeitamente

associados à proteção e conservação de ecossistemas visando a proteção ao operador também (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015).

2.2 Toxicidade do Arsênio

É de grande interesse a determinação e o monitoramento dos elementos químicos potencialmente tóxicos em matrizes diversas, que podem causar danos aos seres vivos e ao meio ambiente (TCHOUNWOU et al., 2012). Na lista prioritária de substâncias perigosas de 2015 da agência dos Estados Unidos para substâncias tóxicas e registro de Doenças, o arsênio é considerado o elemento mais tóxico devido a sua persistência e não degradabilidade (ATSDR, 2015).

O arsênio elementar apresenta número atômico 33 e é um sólido metálico acinzentado. O arsênio inorgânico encontra-se principalmente na forma de arsenito (AsO_3^{-3} , $\text{As}^{(\text{III})}$) e o arseniato (AsO_4^{-3} , $\text{As}^{(\text{V})}$), onde, através de processos de oxidação-redução podem se interconverter. Como descrito na literatura, o arsênio pode ser encontrado em peixes e frutos do mar, e em água potável para o consumo humano. Devido à natureza altamente tóxica, mesmo em baixas concentrações, este pode causar impactos negativos à saúde dos seres vivos (WATANABE; HIRANO, 2013). O grau de toxicidade do arsênio inorgânico está diretamente atrelado ao fator de seu estado de valência, onde o $\text{As}^{(\text{III})}$ inorgânico apresenta 100 vezes a toxicidade do $\text{As}^{(\text{V})}$, por ser mais solúvel em água e biodisponível (MARTINEZ et al., 2011).

Naturalmente o arsênio pode ser encontrado em rochas e sedimentos, então, quando a água entra em contato com essas rochas acontece a solubilização do arsênio e isso propicia o seu transporte para os corpos d'águas. Já as fontes antropogênicas de contaminação incluem as atividades de mineração, aplicações de herbicidas, fungicidas, inseticidas, pesticidas, tintas, cosméticos e preservante de madeiras (KHOEI et al., 2019; CHOONG et al., 2007; BUNDSCHUH et al., 2012).

O arsênio representa um dos contaminantes mais prevalentes em termos de área afetada e número de pessoas. Águas subterrâneas poluídas por arsênio vem se tornando um problema crescente e mundial. Acredita-se que uma população de aproximadamente 200 milhões de pessoas em quase 70 países possa estar ameaçada por utilizar águas potáveis (destinada ao consumo humano) com elevado teor de arsênio, que ultrapassa a concentração limite permitida pela Organização Mundial da Saúde (WHO), que é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (BHATTACHARYA et al., 2006). Em

mais de 70 países, incluindo Índia, Canadá, Estados Unidos e Austrália, estudos indicam altos níveis de arsênio em suas águas subterrâneas (DEB et al., 2013; MAITY et al., 2012). Com o intuito de conter a exposição de suas populações pelo arsênio, agências de proteção ambiental como a dos Estados Unidos (EPA, 2001), Europa (Resolução n. 40/EC, 2003) e do Brasil (Resolução n. 357/2005 CONAMA) adotaram o limite máximo estabelecido pela WHO. Porém Bangladesh, Índia, México e Vietnã, que são os países mais contaminados pelo metaloide, apresentam uma legislação que permite até $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio em água (HUG et al, 2001).

O metaloide pode entrar em contato com os seres humanos através da ingestão direta de água e também por meio de alimentos, como arroz, carnes bovinas e peixes, além de cereais que são bastante comuns em várias regiões do mundo. O solo irrigado com água contaminada com arsênio é a principal rota de contaminação de lavouras, ameaçando assim a saúde dos ecossistemas humanos e do solo (PRAVEEN et al., 2019).

O monitoramento e determinação das espécies de arsênio no meio ambiente é de suma importância, já que a exposição, inalação e ingestão pelo ser humano apresentam efeitos altamente tóxicos, sendo associados a inúmeros problemas de saúde, tais como, câncer, diabetes, espessamento e descoloração da pele, dores estomacais, náusea, vômito, diarreia, dormência nas mãos e pés, paralisia parcial, cegueira e doenças pulmonares e cardiovasculares (KOUTROS et al., 2018).

No trabalho de Rahman, Naidu e Bhattacharya (2009) foi estudado a problemática do acúmulo de arsênio na colheita de arroz em Bangladesh, onde o arroz, sendo o alimento básico foi responsável pela ingestão de $0,20 - 0,35 \text{ mg dia}^{-1}$ de arsênio entre os habitantes. Chakraborty et al. (2014) estudaram o acúmulo de arsênio em culturas alimentares nas regiões da Índia e Bangladesh, sugerindo que as plantações de alimentos têm causado diversos efeitos na saúde das pessoas que residem na área.

A contaminação por arsênio, tornou-se um tópico significativo para pesquisa, por conta da sua alta toxicidade e persistência no meio ambiente. Por ser de grande ameaça global, há a necessidade de estudos que descreva novos procedimentos e metodologias de preparo de amostras, para identificar possíveis contaminações por arsênio para a avaliação de sua toxicidade e bioacumulação em diferentes matrizes.

2.3 Técnicas de otimização multivariada

A quimiometria emprega ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e otimização de condições experimentais. Com a utilização dessas ferramentas é possível estudar e identificar, dentre as inúmeras variáveis experimentais, quais delas de fato apresentam maiores efeitos sobre a resposta que está sendo avaliada e quais podem ser negligenciadas, não afetando de modo significativo o sistema estudado (BEZERRA et al., 2008; CALLAO, 2014). No desenvolvimento de um método analítico deve-se realizar um estudo com a finalidade de otimizar as variáveis e condições experimentais associadas a eficiência de um processo analítico (FERREIRA et al., 2007).

Com o emprego de técnicas de planejamento multivariado é possível avaliar simultaneamente um grande número de variáveis aplicadas em diversos procedimentos experimentais e matrizes, e além disso, possibilita determinar os efeitos de interação entre essas variáveis estudadas, com o objetivo de obter o melhor resultado analítico possível. A partir dessa otimização é possível estudar e analisar diversas variáveis de uma só vez, reduzindo os números de experimentos necessários a serem realizados. Desse modo, o emprego desta ferramenta afeta diretamente a diminuição do custo e tempo de ensaios experimentais, envolvendo maior rapidez e eficiência (NOVAES et al., 2017; PEREIRA-FILHO, 2017), o que também corrobora com os princípios da química analítica verde.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta estatística de otimização baseada no planejamento fatorial que analisa e otimiza as variáveis dentro de um domínio de funcionamento do processo, com a finalidade de modelar e encontrar uma região ótima da superfície investigada, de forma que a resposta varie de maneira mais pronunciada e desejada. Essa metodologia faz uso de planejamentos fatoriais, como por exemplo, modelo Box-Behnken, composto central e Doehlert, para a modelagem e maximização da resposta (GÜRAY et al., 2020; FERREIRA et al., 2007; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.3.1 Planejamento fatorial do tipo Doehlert

O planejamento utilizando o delineamento Doehlert é uma ferramenta estatística de otimização que faz uso da modelagem experimental que pode ser usada

para mapear uma área ampla no domínio de forma mais eficiente, uma vez que mais níveis são atribuídos às variáveis de estudo (NOVAES et al., 2016; BEZERRA et al., 2019).

Com a utilização desse tipo de planejamento é possível obter as variáveis em número de níveis em quantidades diferentes e o maior nível para a variável mais representativa sobre a resposta. Nesse tipo de modelagem, o total de experimento necessário é (N), $N = K^2 + K Co$, onde, K é o número de variáveis e Co é o número de pontos centrais (FERREIRA et al., 2004; GUIMARÃES-SILVA et al., 2012).

A utilização de otimização simultânea de respostas múltiplas geradas pela aplicação de experimentos multivariados, Doehlert, tem aumentado devido à necessidade de estabelecer uma relação confiável e que satisfaça o funcionamento de um método analítico. Muitos trabalhos na literatura aplicam essa técnica estatística para estudo de uma grande variedade de matriz, tais como petrolífera (CASSELA et al., 2002), alimentícia (MOMENBEIK et al., 2006), fertilizantes minerais (SOUZA et al., 2014) e invertebrados marinhos (SANTOS et al., 2010).

2.3.2 Avaliação do modelo matemático

Com o objetivo de garantir a confiabilidade do modelo matemático é preciso testá-lo para constatar se de fato esse modelo gerado descreve o sistema de estudo. A natureza de um modelo ajustado, mesmo que aproximado, é representar concordância entre as variáveis estudadas experimentalmente, bem como as suas interações dentro de um significativo domínio (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para atestar a qualidade do modelo matemático gerado é realizada a análise de variância (ANOVA), onde é possível verificar a concordância entre as respostas experimentais e as respostas previstas pelo modelo. A ANOVA é uma ferramenta estatística que avalia numericamente a qualidade do ajuste de um modelo, aplicando o estudo da significância dos efeitos através do cálculo dos parâmetros do modelo proposto, como de regressão e resíduos. Nessa etapa do estudo a ANOVA tem como fonte de variabilidade os efeitos principais e de interação das variáveis estudadas no sistema de estudo (PEREIRA-FILHO, 2017; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; CALLAO, 201; BEZERRA et al., 2019).

No estudo da significância estatística da regressão realiza-se a distribuição de *Fisher* (Teste F), para estabelecer um comparativo entre a relação da média quadrática da regressão e a média quadrática do resíduo, respectivamente, MSreg/MSres, F-calculado. O F-calculado dessa relação é comparado com o valor correspondente tabelado da distribuição F, em função do grau de liberdade e do intervalo de confiança. Preferencialmente, espera-se que o F-calculado seja maior que o F-tabelado, indicando que o modelo gerado é representativo, além disso sugerindo uma boa aproximação entre as variáveis e a resposta (BEZERRA et al., 2008).

Outro parâmetro comparativo sobre a qualidade do modelo, considerando a distribuição F, é a relação da média quadrática da Falta de ajuste (MSfaj) e do Erro Puro (MSpe). Neste caso, para que o modelo seja considerado ajustado aos pontos experimentais obtidos é preciso que a relação MSfaj e da MSpe seja o mais baixo possível, inferior ao F-tabelado, associado ao respectivo nível de confiança e graus de liberdade (FERREIRA et al., 2004; BEZERRA et al., 2019). Em resumo, para que exista uma boa concordância entre as respostas experimentais e as previstas pelo modelo, conferindo um modelo ajustado, o modelo de regressão deve ser significativo, e a falta de ajuste deve ser pouco significativa.

Uma forma de estudar as multirespostas de um planejamento estatístico é através de uma abordagem matemática desenvolvida pelos autores Derringer e Suich (1980), a qual permite a transformação das respostas individuais obtidas em cada experimento a partir da otimização experimental, em uma escala adimensional de desejabilidade individual (d_i). Estes autores propuseram um método para otimização simultânea, onde cada uma das respostas (y) obtida experimentalmente está associada a um valor de desejabilidade individual (d_i). A abordagem converte cada resposta experimental (y) em uma função de desejabilidade individual (d_i), que varia dentro do intervalo entre 0 e 1. Se a resposta for desejada, terá valor 1 e, se a resposta estiver fora da região aceitável, terá valor igual a 0.

Em suma, para determinar as funções de desejabilidade é preciso definir valores mínimos, máximos e o valor alvo para compor a resposta dada pela desejabilidade individual. A função de desejabilidade pode descrever a maximização da resposta aceitável e satisfatória entre dois valores limite denominado intervalo alvo, descrita pela função de desejabilidade (d_i) (DERRINGER; SUICH, 1980). Essa abordagem matemática possibilita a busca do ponto alvo-resposta desejada dentre as respostas experimentais associadas às variáveis aplicadas pelo planejamento

estatístico otimizado. O valor de cada resposta de desejabilidade individual é calculada de acordo com a **Equação 1**, onde, o valor L e de U foram a menor e a maior porcentagem de recuperação de arsênio no conjunto de respostas obtidas experimentalmente (neste trabalho), e o valor T foi o valor alvo (desejado) com valor 1, indicando 100% de recuperação de arsênio.

$$di = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^t & \text{se } T \leq y \leq U \\ 0 & \text{se } y > U \end{cases} \quad (\text{Equação 1})$$

A otimização e o desenvolvimento dos procedimentos de extrações verdes têm sido realizados por meio de um delineamento experimental multivariada, como ferramenta estatística para monitorar e descrever a influência das variáveis sobre a(s) resposta analítica (CANDIOTI et al., 2014). O uso de ferramentas estatísticas multivariadas é uma alternativa viável para a obtenção de uma condição experimental cujo o objetivo é a minimização do consumo de reagentes, a redução de geração de resíduos e minimização de energia, buscando estar em conformidade com os princípios da Química Verde (FERREIRA et al., 2004). Além disso, a aplicação do planejamento multivariado leva definir as variáveis mais apropriadas para a aplicação experimental desejada (BEZERRA et al., 2019).

2.4 Preparo de amostra por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

Em meados da década de 70, já se fazia uso da radiação de micro-ondas (MW) com a finalidade de decomposição de amostras por via úmida. Todavia, essa alternativa se tornou popular quando foi associada a digestão ácida (MW-AD), reduzindo o tempo de preparo de amostra e minimizando a quantidade de reagentes e de resíduos gerados (ZHOU et al., 1996).

A energia de micro-ondas é uma forma de radiação eletromagnética que interage com a solução ácida ou mistura de ácidos no meio reacional promovendo o aquecimento da solução. Dois processos contribuem para o aquecimento: a interação do campo elétrico das micro-ondas com os íons da solução da amostra,

proporcionando a migração iônica e a rotação dos dipolos das moléculas dipolares. A contribuição desses dois processos acarreta o aquecimento do material exposto a essa radiação, de forma uniforme e localizada (KRUG et al., 2019).

A alta pressão gerada nos frascos fechados é uma forma de melhorar o desempenho do processo de decomposição, proporcionando assim a utilização de temperaturas superiores ao ponto de ebulição do ácido selecionado, isso acarreta em uma melhor eficiência de decomposição em tempos menores. Além disso, em sistemas fechados a perda de analitos por volatilização é minimizada reduzindo a contaminação por fatores externos (MULLER et al., 2016).

A adição de água no meio reacional também pode facilitar o aquecimento no interior dos frascos, uma vez que as moléculas de água sofrem vigorosamente influência do campo eletromagnético produzido pelas micro-ondas, sendo que soluções de ácidos diluídos podem ser empregadas nesse sistema com resultados efetivos (MELLO; BARIN; GUARNIERI, 2014).

Carrilho et al. (2002) empregaram um volume de 2,0 mL de HNO_3 concentrado com 1,0 mL de H_2O_2 30% v v⁻¹ na digestão de amostras biológicas empregando uma massa de 300 mg. Araújo et al. (2002) realizaram o estudo de diferentes soluções de HNO_3 (2; 3; 5; 7 e 14 mol L⁻¹) para extração de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Zn e Ba em amostras vegetais e determinação por ICP OES. Neste estudo observaram que o teor de carbono residual nas condições avaliadas foi inferior a 13% m v⁻¹ e não apresentaram problemas de interferência na recuperação dos elementos estudados.

A eficiência de decomposição fazendo uso de soluções de HNO_3 diluído é justificada devido um encadeamento de reações que acontecem no interior dos frascos levando à regeneração *in situ* do ácido nítrico (HNO_3). O HNO_3 diluído, quando aquecido em sistemas fechados, principalmente pela radiação micro-ondas, tem como produto reacional o óxido de nitrogênio (NO), que em atmosfera oxidante se oxida a dióxido de nitrogênio (NO_2), que por sua vez reage com a água formando novamente o HNO_3 e o ácido nitroso (HNO_2). Os compostos nitrosos se decompõem, levando a formação de NO, explicando a hipótese da formação de uma reação em cadeia dentro dos frascos reacionais (GONZALEZ et al., 2009). Dessa forma, enquanto tiver HNO_3 aquecido em atmosfera oxidante a matéria orgânica é oxidada e produz CO_2 , NO e H_2O .

A eficiência da decomposição por radiação micro-ondas depende do pré-tratamento da amostra, que inclui a moagem, trituração e também o tipo de solvente utilizado. Nesse sentido, menores tamanhos de partículas tornam a digestão mais eficiente, aumentando assim a superfície de contato das partículas com o solvente utilizado. Outro fator relevante é o tipo de solvente utilizado para o preparo de amostra, sendo que, solventes com constante dielétrica e maior polaridade, apresentaram aumento na capacidade de absorção da radiação micro-ondas (KRUG, 2006).

Momen, Zachariadis e Anthemidis (2007) utilizaram um planejamento fatorial para otimizar sete variáveis, como, os volumes de HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2 , tempo de digestão/pré-digestão, temperatura de aquecimento e massa da amostra. Uma vantagem deste estudo foi avaliar com precisão os efeitos principais dentre um maior número de variáveis, utilizando apenas 8 experimentos sem perda substancial de informações. O método analítico desenvolvido foi de uma mistura digestora composta por HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2 para determinar Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb e Zn em amostras de castanhas comerciais.

Gonzalez et al. (2009) observaram um decréscimo do teor de carbono residual quando massa equivalente de 200 mg de material de referência de músculo bovino (NIST 8414) foi digerida com uma mistura oxidante de 2 mL de HNO_3 combinado com 1,0 mL de H_2O_2 30% v v⁻¹.

O uso do planejamento fatorial fracionado para otimizar a extração de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em amostras de tecido bovino em forno de micro-ondas foi proposto por Matos et al. (2009). O método mostrou-se eficiente na condição otimizada com potência de 650 W, tempo de digestão de 7 min, 100 μL de HNO_3 , 0 100 μL de H_2O_2 (30% v v⁻¹) e massa de amostra de 50 mg, apresentando melhores recuperações e menores níveis de teor de carbono residual, inferior a 1,1%.

Andrade, Nascentes e Costa et al. (2012), empregaram ácido diluído em procedimento MW-AD para a extração de Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo e Zn por ICP OES em amostras de biomassa residual. Um planejamento fatorial completo 2³ foi aplicado para otimizar três variáveis: temperatura, volume da mistura ácida digestora e o tempo. A condição otimizada foi de 200 mg de amostra com 8 mL de HNO_3 7,0 mol L⁻¹ e aquecimento por 20 min a 180 °C e potência máxima de 750 W.

Bressy et al. (2013) estudaram o emprego de soluções diluídas de HNO_3 nas concentrações de 14,2, 7,1 e 4,0 mol L⁻¹ associado a 1 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹) em digestão de três tipos de amostras de tomate para a determinação de Al, Ba, Cd, Co,

Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V e Zn por ICP-MS. As melhores recuperações foram quando empregou-se uma mistura de 3,5 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2 30% (m m^{-1}), correspondendo a uma concentração final de aproximadamente HNO_3 7,1 mol L^{-1} .

Khan et al. (2014) estudaram o procedimento analítico aplicando a digestão assistida por micro-ondas para a determinação de 23 oligoelementos por ICP-MS. Sugeriram a utilização de 7 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2 para a digestão de 500 mg de em amostras de canela, cúrcuma, coentro e cominho. A solução de HNO_3 (70% v v^{-1}) apresentou recuperação entre 91 a 107%.

Barbosa et al. (2015), realizaram o estudo de ácido diluído associado à MW para a extração de elementos traços em amostras vegetais e quantificação por ICP-MS. Recomendaram o uso de 7 mL de HNO_3 (2,1 mol L^{-1}) com 1 mL de H_2O_2 30% (v v^{-1}) suficiente para digestão de 250 mg de material de referência certificado de farinha de arroz (NIST 1568a). A solução de HNO_3 (14% v v^{-1}) apresentou recuperação superior a 95% para Cu, Fe, Mg, Mn e Zn. Muller et al. (2016) estudaram a relação entre concentrações de H_2O_2 (30% e 50% v v^{-1}) e temperatura do meio reacional com o teor de carbono residual após a digestão utilizando radiação micro-ondas para extração de elementos traços em amostras de leite em pó. O método mostrou-se eficiente, com soluções finais com baixa acidez e toxicidade.

Tarantino et al. (2016) empregaram o procedimento de digestão ácida assistida por micro-ondas utilizando HNO_3 diluído para determinação de oligoelementos em amostras de arroz para a determinação de Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Se e Zn por ICP-MS. Nesse estudo foi aplicado um planejamento fatorial, onde a condição ideal para a digestão de 250 mg de amostra foi a uma temperatura de 200 °C, tempo de digestão de 20 minutos e concentração de 4,5 mol L^{-1} de HNO_3 . Os autores consideraram que a otimização do método através do planejamento estatístico de forma multivariada apresentou vantagens em relação ao custo, minimização de resíduos e segurança do analista.

Brito et al. (2017) empregaram uma mistura oxidante de HNO_3 e H_2O_2 para extração de As, Cd e Pb e quantificação por ICP-MS em amostras de farinhas de vegetais. Neste estudo uma massa de 500 mg foi digerida com 6 mL de HNO_3 (7 mol L^{-1}) e 2 mL de H_2O_2 (30%). Foram obtidos digeridos com teor de carbono residual inferior a 0,21%.

Correia et al. (2017) estudaram a aplicação de um planejamento fatorial para a otimização do procedimento do MW-AD em amostras de farinha de mandioca, milho e trigo, para determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, S, Sb, Sr e Zn por ICP-MS. As variáveis avaliadas foram concentração de HNO_3 e H_2O_2 , que foram otimizados e relacionados com eficiência de digestão, dado pelo teor de carbono residual. A condição escolhida após a otimização foi de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e 5% (m m^{-1}) de H_2O_2 .

Souza et al. (2018) avaliaram as concentrações dos elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn na linhaça e amostras de gergelim por ICP OES. Empregaram um planejamento fatorial completo para otimizar a digestão ácida assistida por micro-ondas avaliando as variáveis, temperatura, concentração de HNO_3 , volume de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o tempo de digestão das amostras de linhaça e gergelim. A condição escolhida após a otimização foi de $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 , 0,5 mL de H_2O_2 , temperatura de 195°C e o tempo de 20 minutos.

Lima et al. (2018) desenvolveram um único procedimento analítico para o preparo de amostras de diferentes tecidos de siri-azul utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas para a determinação de Cu, Mn, Fe e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Nesse estudo foi aplicado um planejamento fatorial e a função desejabilidade (di) para a otimização das variáveis: temperatura, tempo de digestão, volume de H_2O_2 e HNO_3 . O método mostrou-se eficiente na condição otimizada em 160°C , 21 minutos, 1,0 mL de HNO_3 ($65\% \text{ m m}^{-1}$), 1,0 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$).

2.5 Preparo de amostra empregando extração ácida assistida pela radiação ultravioleta

A busca pelo preparo de amostra mais verde através de metodologias mais ecológicas, simples e econômicas é crescente por parte da comunidade científica (CLARK, 2005). A implementação da radiação (UV) pode fornecer vantagem na conversão da amostra em outra forma que permita a determinação dos analitos de interesse que compõem essa amostra (POYATOS et al., 2010; GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996). A radiação UV induz efeitos fotolíticos e fotocatalíticos aplicados em processos de remediação de contaminantes através da decomposição

da matéria orgânica que contém elementos inorgânicos tóxicos (CAPELO-MARTINEZ et al., 2004).

A radiação UV cobre uma faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético que varia entre 100 a 400 nm e que pode ser subdividida em: UVA (315 – 400 nm), UVB (315 – 280 nm) e UVC (280 – 100 nm) (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996). Existem três fontes luminescentes de ultravioleta: deutério, xenônio e vapor de mercúrio. Na prática laboratorial o mais utilizado é a fonte de vapor de mercúrio por descarga de arco por apresentar baixo custo, boa eficiência energética proporcionando uma boa conversão da energia elétrica em radiação UV (GOUVÊA et al., 2014).

O mecanismo de foto-oxidação de substâncias orgânicas por radiação UV ocorre através da geração de radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), que iniciam as reações em cadeia nas substâncias orgânicas contidas nas amostras mineralizadas, onde estes radicais apresentam alto poder oxidante que são os responsáveis pela oxidação da matéria orgânica (KIM et al., 2012; NASUHOGLU; YARGEAU; BERK, 2011).

Os radicais $\cdot\text{OH}$ são gerados através da associação da radiação UV com o H_2O_2 , acarretando uma quebra homolítica das moléculas de H_2O_2 . Deste modo, o H_2O_2 , que é um ácido fraco, com potencial oxidante relativamente alto (1,77 V) e que individualmente (isto é, sem uso de UV) não gera radicais hidroxila. Assim, o H_2O_2 na presença de luz UV, absorve radiação em 254 nm, produzindo radicais hidroxilas que são responsáveis pelo processo de oxidação da amostra, como demonstrado na **Equação 2** (BRAUN; MAURETTE; OLIVEROS, 1991; NASUHOGLU; YARGEAU; BERK, 2011).

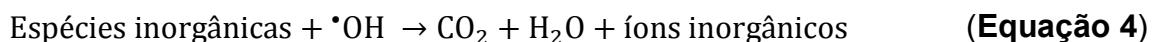


Porém, em meios reacionais com altas concentrações de H_2O_2 , as moléculas de H_2O_2 podem reagir com $\cdot\text{OH}$ produzindo radicais de menor potencial de oxidação, $\text{HO}_2\cdot$ (**Equação 3**).



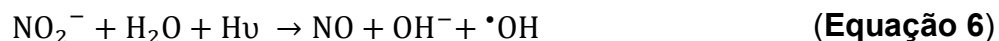
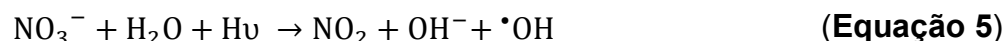
O $\cdot\text{OH}$ é altamente reativo, praticamente não seletivo e um poderoso oxidante. Normalmente o uso desse oxidante é empregado na decomposição de compostos orgânicos o que leva a uma mineralização completa, resultando em compostos mais

simples, como, CO₂, H₂O e íons inorgânicos (SHAHIDI; ROY; AZZOUZ, 2015; POYATOS et al., 2010), como apresentado na **Equação 4**.



A decomposição de compostos orgânicos pode estar relacionada com a taxa de reação (k), de forma que em pH básico devido à presença de íons carbonato e bicarbonato ocorre a diminuição da velocidade de reação. Isso por que esses íons reagem com $\cdot\text{OH}$, diminuindo a quantidade de radicais livres disponíveis para degradar os compostos orgânicos e diminuindo consequentemente a velocidade da reação (SHAHIDI; ROY; AZZOUZ, 2015; MOTA et al., 2008).

Soluções de HNO₃, além de terem capacidade oxidante quando utilizados concomitantemente com a radiação UV, também apresentam uma fonte geradora de radicais $\cdot\text{OH}$ auxiliando na dissociação da ligação do analito com a matéria orgânica, (GILBERT; BAGGOTT, 1991), reduzindo o tempo necessário para a decomposição dos compostos orgânicos:



Esses ácidos nitrosos expostos a radiação UV levam a formação dos íons nitrito, que em contato com a radiação se decompõem produzindo outros radicais $\cdot\text{OH}$. Portanto, o emprego de HNO₃ é essencial para obtenção de resultados satisfatórios em processos de extração em materiais biológicos, onde sua presença com H₂O₂ associado à radiação UV tem seu poder catalítico aumentado (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996; MANJUSKA; DASH; KARUNASAGAR, 2007).

A aplicação da radiação UV no preparo de amostra tem apresentado inúmeras vantagens notáveis na área de análise de elementos traços relacionados principalmente com rapidez e eficiência, com o uso de pequenos volumes de ácidos diluídos e adição de solução de H₂O₂ combinado a luz UV, eliminando a necessidade de uso de reagentes concentrados (GOUVÊA et al., 2014). Muitos trabalhos relatados na literatura vêm explorando a extração de analitos inorgânicos em variados tipos de amostras, apresentando as potencialidades do uso da radiação ultravioleta no tratamento de diferentes tipos de matrizes (HOLLMAN et al., 2020; ROSARIO-ORTIZ; WERT; SNYDER, 2010).

A comparação de métodos convencionais MW-AD de amostras de mel com a digestão promovida pela radiação UV foi estudada por Buldini et al. (2001). No método foi empregado uma lâmpada UV de 500 W, e uma proporção das misturas oxidantes de 1 mL de H_2O_2 concentrado combinado com 10 μL de HNO_3 por 30 min e temperatura de amostra mantida por 85 °C. Os resultados obtidos pela digestão promovida pela radiação UV apresentaram recuperação variando de 97 – 103% para Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Ni e Zn.

Manjusha et al. (2007) estudaram a decomposição de 250 mg de amostras alimentícias, após aplicação da fotólise UV com 200 μL de H_2O_2 (30% v v⁻¹) na presença de 7 mL do oxidante HNO_3 durante 1 h (65 °C), para determinação de selênio. Observaram que a aplicação da radiação UV foi um procedimento bem-sucedido com recuperações na faixa de 94 – 103%.

Janssens et al. (2019) empregaram a combinação da luz UV com H_2O_2 para degradação de amostras medicinais em efluentes de água residuais. Em apenas 10 minutos de irradiação utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio de 600 W a degradação apresentou um aumento linear em relação ao tempo e quantidade de H_2O_2 adicionado, apresentando remoção acima de 98%.

Aplicação da radiação UV também foi utilizada com sucesso para extração de oligoelementos em amostras de chorume proveniente de aterro sanitário (MORAIS; ZAMORA, 2005), pesticida (STÜLP; SILVA; MARMITT, 2008), efluentes (BARRERA et al., 2012), além de fármacos em águas residuais (KEEN et al., 2012; YUAN et al., 2009).

2.6 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

Existe uma tendência crescente à busca do uso de métodos de análise de elementos traços baseados em técnicas espectrométricas, principalmente o ICP-MS. Essa busca tem ocorrido principalmente pela possibilidade de análise multielementar com baixos limites de detecção da ordem de nanogramas e pictogramas e boa precisão (VANHAECKE, 2002). Essa técnica tem a vantagem em relação ao ICP OES, devido a sua maior capacidade de detecção.

Apesar das vantagens já descritas acima, as medidas no ICP-MS podem sofrer dois tipos de interferências: espectrais e não espectrais. As interferências não espectrais são devido à presença de altos teores salinos e sólidos dissolvidos, que

prejudicam o processo de transporte e amostragem dos íons. Também podem provocar a obstrução do orifício do cone de amostragem na interface plasma-espectrômetro de massa, afetando a sensibilidade durante a análise (SANTOS, 2007). Esse tipo de interferência é mais simples de ser resolvida, e para evitá-la ou superá-la basta realizar uma limpeza periódica dos cones da interface ou a diluição das soluções de amostras (TYLER, 1994).

A introdução de soluções com percentual elevado de carbono pode provocar a formação de íons poliatômicos, como por exemplo, íons que contém carbono C_2^+ , CO_2^+ , ArC^+ , que podem afetar no sinal dos analitos a serem determinados por apresentarem a mesma razão m/z do analito de estudo. Além disso, a presença de altas quantidade de carbono no ICP-MS podem interferir na diminuição da temperatura e densidade de elétrons no plasma, já que é necessária alta energia para dissociarem, interferindo na diminuição da quantidade de íons transportados para serem analisados e conseqüentemente é afetado a detecção do sinal analítico FIALHO; PEREIRA; NÓBREGA, 2011).

A determinação de arsênio por ICP-MS, pode ser afetada pelos interferentes espectrais causados por íons poliatômicos. Esse tipo de interferente pode estar associado aos elementos que constitui a própria matriz, de reagentes utilizados no preparo de amostra ou de espécies geradas por elementos originários do plasma com combinação com os gases atmosféricos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Em relação aos interferentes, como por exemplo: $^{36}Ar^{39}K^+$, $^{43}Ca^{16}O_2^+$, $^{23}Na^{12}C^{40}Ar^+$, $^{59}Co^{16}O^+$, $^{36}Ar^{38}Ar^1H^+$, associados a determinação de arsênio, o cloreto é um dos mais crítico devido à formação $^{40}Ar^{35}Cl^+$ (m/z 75).

Uma forma de minimizar possíveis interferências espectrais é empregando uma célula de colisão com discriminação por energia cinética (Kinetic Energy Discrimination – KED). Na célula de colisão, uma densidade alta de gás inerte selecionado, serve como foco das colisões com íons moleculares interferentes de diâmetros maiores comparados com os dos íons do analito sem prejuízo na sensibilidade do método analítico. Essa referida colisão induz a perda da energia cinética tanto dos íons interferentes, como também dos íons do analito, possibilitando a separação e discriminação dos íons analito dos íons interferentes através da diferença de energia cinética entre eles (SIMPSON et al., 2001). Outra forma de suprimir interferentes espectrais é aplicando a célula dinâmica de reação, onde, um gás que apresente uma alta reatividade e seletividade, promova a eliminação de espécies isobáricas

baseando-se na discriminação por massa fundamentado no mecanismo reacional. Essas reações podem acontecer de três formas, como, a reação de transferência de carga, reação das espécies interferentes ou reação de íons do próprio analito com geração de nova espécie iônica com sua respectiva razão massa/carga sem possíveis interferentes, como exemplo, a determinação de arsênio através da conversão do íon $^{75}\text{As}^+$ em $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$ pela reação com gás oxigênio (SALAZAR et al., 2011; D'ILIO et al., 2011).

Pétursdóttir et al. (2014) estudaram o desempenho de ICP-MS/MS em quatro modos de operação, sem gás, modo de colisão com gás hélio e modo de reação com hidrogênio e oxigênio para especiação de As em amostras de arroz, observando uma perda na sensibilidade para os modos com a aplicação de gás hidrogênio (H_2) e hélio (He).

No procedimento proposto por An et al. (2015) foi investigado o uso da célula de colisão para a determinação de arsênio em amostras com alto teor de cloreto. Utilizando uma vazão de 3 mL min^{-1} de gás hélio apresentou uma melhora da sensibilidade por um fator de até 2,5, visto que a presença de carbono no plasma, ou moléculas que contém carbono em sua matriz, aumentam a intensidade do sinal de elementos que apresentam altas energias de ionização, como por exemplo o arsênio, por meio do processo de transferência de carga causada pelo C^+ (PETTINE et al., 2007).

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo unir os fundamentos das Química Analítica Verde para o desenvolvimento de um procedimento único de preparo de amostra para tecido animal e vegetal em meio ácido assistida por radiação micro-ondas e outro empregando radiação UV. A aplicação de técnicas de planejamento multivariado para otimização das variáveis associadas ao procedimento de extração visando a determinação de arsênio por ICP-MS foi criticamente avaliada. Após o desenvolvimento de ambas as metodologias, cada método de preparo de amostra foi classificado no quesito ambientalmente amigável por meio da Eco-Escala analítica.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os materiais utilizados neste estudo, tais como, as vidrarias, frascos, tubos de ensaio, ponteiras entre outros materiais foram previamente higienizados com Extran, detergente livre de metais, descontaminados e desmineralizados em banhos ácidos contendo HNO_3 (10% v v⁻¹) durante 24 horas e lavadas com água ultrapura obtida pelo sistema de purificação, modelo Direct-Q® (Merck Millipore, Alemanha) com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹ / 25 °C.

Ácido nítrico (HNO_3 65% v v⁻¹) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30% v v⁻¹) (Merck, Alemanha) foram utilizados no preparo da solução extratora e nos protocolos de digestão ácida convencional. O HNO_3 (65 % v v⁻¹) utilizado foi purificado em um subdestilador, modelo MA178-001 subCLEAN (Milestone, Itália).

Soluções padrão contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka® Analytical traceCERT® CRMs for ICP-MS) em HNO_3 1% v v⁻¹ (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de arsênio foi empregada no preparo das soluções padrão para a construção das curvas analíticas de calibração. As soluções foram preparadas a partir de diluições simultâneas e a curva linear de trabalho para as soluções de calibração foi de 0,1 – 15 µg L⁻¹.

Para otimização e desenvolvimento do método MW-AD e extração assistida por radiação ultravioleta na câmara de foto-oxidação, empregou-se amostra de tecido vegetal, candidato à material de referência, *Brachiaria Brizantha*, Marandu (Embrapa, São Carlos, Brasil) e candidato à material de referência de Tecido de Peixe (IPEN, São Paulo, Brasil), que possuem valor certificado de arsênio total de 1,69 ± 0,70 mg kg⁻¹ e 5,90 ± 0,27 mg kg⁻¹ respectivamente.

4.2 Otimização multivariada

4.2.1 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

Um micro-ondas, modelo Multiwave-Go (Anton Paar, Áustria – adquirido no processo FAPESP 2017/18531-3) e equipado com frascos de TFM®PTFE e sensor de temperatura Multiwave (Anton-Paar, Áustria) foi utilizado para a digestão total das amostras.

Para estabelecer as condições ótimas no MW-AD foi aplicado um delineamento multivariado através do planejamento fatorial do tipo Doehlert. A otimização foi conduzida pela avaliação das variáveis: concentração da solução extratora (HNO_3 2, 5, 8, 11 e 14 mol L^{-1}), temperatura (130, 140, 150, 160, 170, 180 e 190 °C) e tempo (10, 15 e 20 min). A massa de amostra (200 mg), a potência da radiação micro-ondas (850 W) e o volume de HNO_3 (6 mL) e H_2O_2 (2 mL) mantiveram-se inalteradas neste procedimento. O objetivo desse planejamento foi a triagem destas variáveis estabelecidas a partir das variáveis utilizadas previamente nos trabalhos de (GONZALEZ et al., 2009; BARBOSA et al., 2015; BIZZI et al., 2014; GOUVEIA et al., 2001), que apontaram a concentração ácida, a temperatura e o tempo de digestão como as variáveis significativas na avaliação da eficiência de digestão. Ficando evidente que mesmo com a diminuição do poder oxidante do ácido, devida a sua diluição, ciclos de reações ocorrem e regeneram o HNO_3 no sistema, isso se dá pelo emprego do H_2O_2 , que atua como agente oxidante auxiliar, sendo fonte de oxigênio para o reciclo do HNO_3 . Promovendo, assim, o aumento do poder do sistema de oxidar a matéria orgânica conduzindo a uma decomposição satisfatória, após altas temperaturas e em menores tempos de digestão (BARBOSA et al., 2015).

A eficiência de digestão foi avaliada com base na determinação do teor de carbono residual por ICP OES e recuperação do elemento, arsênio, utilizando ICP-MS. O teor de carbono residual foi expresso como a relação entre o conteúdo de carbono dissolvido das digestões finais e o teor de carbono presente nas amostras originais. A partir do delineamento multivariado foi possível realizar randomicamente 15 experimentos, incluindo três repetições no ponto central. As condições empregadas no planejamento fatorial do tipo Doehlert estão reportadas na **Tabela 1**. Através da análise de variância (ANOVA) foi possível avaliar o modelo matemático pela análise de regressão e o teste de falta de ajuste, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O carbono total foi determinado em um analisador elementar, modelo CHNS-O (EA 1108, Fisons Instruments, Itália) e o ICP OES com configuração Dual View, modelo 5110 (Agilent Technologies, alocado na Embrapa Pecuária Sudeste). A configuração radial foi empregada para análise de carbono residual e as condições instrumentais para determinação de carbono total (193,03 nm) estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 1 – Matriz de dados do planejamento fatorial do tipo Doehlert para avaliação da eficiência de digestão em meio ácido assistida por radiação micro-ondas, nas amostras marandu e peixe

Experimento	HNO ₃ (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1 (CP)	8 (0)	160 (0)	15 (0)
2 (CP)	8 (0)	160 (0)	15 (0)
3 (CP)	8 (0)	160 (0)	15 (0)
4	14 (1)	160 (0)	15 (0)
5	11 (0,5)	190 (0,866)	15 (0)
6	11 (0,5)	170 (0,289)	20 (0,817)
7	2 (−1)	160 (0)	15 (0)
8	5 (−0,5)	130 (−0,866)	15 (0)
9	5 (−0,5)	150 (−0,289)	10 (−0,817)
10	11 (0,5)	130 (−0,866)	15 (0)
11	11 (0,5)	150 (−0,289)	10 (−0,817)
12	5 (−0,5)	190 (0,866)	15 (0)
13	8 (0)	180 (0,577)	10 (−0,817)
14	5 (0,5)	170 (0,289)	20 (0,817)
15	8 (0)	140 (−0,577)	20 (0,817)

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: Variáveis apresentadas em termos do valor real não codificado e valor codificado. Ao final da digestão, as soluções foram avolumadas a 25 mL e diluídas em proporção de 1:5 (amostra:água) com concentração final de HNO₃ 1% v v⁻¹.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para análise por ICP OES para a determinação de carbono residual nos digeridos das amostras estudadas

Parâmetros instrumentais	Condições operacionais
Posição de visualização	Axial
Potência de radiofrequência (kW)	1,2
Fluxo do plasma (L min ⁻¹)	12
Fluxo de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1
Fluxo de gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	One Neb®
Comprimento de onda (nm)	193,027 I atômica

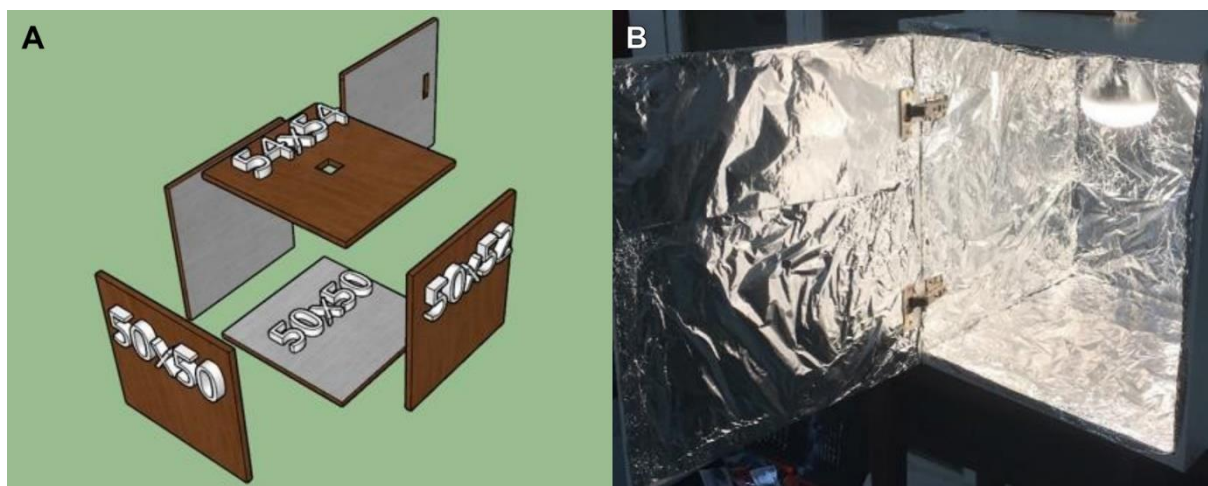
Fonte: Elaborado pela autora.

Foi utilizado argônio com pureza de 99,999% (White Martins Praxair, São Paulo, Brasil) para a geração do plasma, a nebulização e para o gás auxiliar. A curva analítica de calibração para carbono residual foi de 0 – 2000 mg L⁻¹ preparada a partir de uma solução padrão (4,00 g L⁻¹) de Biftalato de Potássio (C₈H₅KO₄) com concentração de 20000 mg L⁻¹ (Synth, São Paulo, Brasil).

4.3 Otimização multivariada da extração ácida assistida por UV empregando uma câmara de foto-oxidação

Para a extração foram utilizados béqueres de 100 mL fechados com vidro relógio que foram posicionados no interior da câmara de foto-oxidação (**Figura 1A**), feita de madeira (comprimento: 50 x 50 cm; altura: 50 x 52 cm; largura: 54 x 54 cm). No interior da câmara foram posicionados 12 béqueres. A temperatura em cada um dos 12 béqueres com água destilada foi monitorada por 1 hora 30 minutos, e após 15 min de irradiação com a lâmpada UV a temperatura máxima atingida e mantida em cada um dos béqueres foi de 80 °C, independentemente da posição do béquer em relação à lâmpada UV. A temperatura se manteve a mesma e constante. Logo, os experimentos tiveram início após 15 min de irradiação, mantendo assim a temperatura em todos os experimentos a 80 °C.

Figura 1 – Projeto da câmara (A) e protótipo utilizado nas etapas experimentais (B)



Fonte: Elaborado pela autora.

A construção e instalação dos componentes elétricos e recobrimento da superfície interna com folha de alumínio foi realizada no grupo de pesquisa (**Figura 1B**). Foram fixadas as posições dos béqueres e altura relativa, em relação ao nível da base da caixa de madeira e da lâmpada UV. Uma lâmpada UVA (modelo Ultra-Vitalux, 300 W, Osram, Alemanha) foi posicionada no topo dessa estrutura, que através da descarga de mercúrio e filamento de tungstênio, mimetiza o espectro de emissão da radiação solar.

Um planejamento fatorial do tipo Doehlert foi usado para verificar a influência e as interações das seguintes variáveis e níveis: tempo de extração (12, 24, 36, 48 e 60 min), volume de H_2O_2 (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mL) e volume de HNO_3 (1, 3, e 5 %). O planejamento fatorial totalizou 15 experimentos incluindo três repetições no ponto central (**Tabela 3**). Os experimentos foram realizados randomicamente e a escolha destas variáveis foi pautada em estudos anteriores (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996; BENDICHO et al., 2010; HOLLMAN et al., 2020).

Tabela 3 – Matriz de dados do planejamento fatorial tipo Doehlert para avaliação da eficiência de extração em meio ácido assistida por radiação ultravioleta, nas amostras marandu e peixe

Experimento	HNO_3 (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1 (CP)	36 (0)	5 (0)	3 (0)
2 (CP)	36 (0)	5 (0)	3 (0)
3 (CP)	36 (0)	5 (0)	3 (0)
4	60 (1)	5 (0)	3 (0)
5	48 (0,5)	8 (0,866)	3 (0)
6	48 (0,5)	6 (0,289)	5 (0,817)
7	12 (−1)	5 (0)	3 (0)
8	24 (−0,5)	2 (−0,899)	3 (0)
9	24 (−0,5)	4 (−0,289)	1 (−0,817)
0	48 (0,5)	2 (−0,866)	3 (0)
11	48 (0,5)	4 (−0,289)	1 (−0,817)
12	24 (−0,5)	8 (0,866)	3 (0)
13	36 (0)	7 (0,577)	1 (−0,817)
14	24 (−0,5)	6 (0,289)	5 (0,817)
15	36 (0)	3 (−0,577)	5 (0,817)

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: Variáveis apresentadas em termos do valor real não codificado e valor codificado. Ao final da digestão, as soluções foram avolumadas a 25 mL e diluídas em proporção de 1:5 (amostra:água) com concentração final de HNO_3 1% v v⁻¹.

Aproximadamente 150 mg da amostra foi pesada e transferida para o béquer, seguido da adição de diferentes volumes e composições de misturas extratoras e tempos variados. Posteriormente, os béqueres foram agitados por 2 minutos e em seguida tampados com vidro relógio. Após a extração todas as amostras tiveram seus volumes ajustados quantitativamente com água ultrapura para 15 mL, filtradas em papel filtro quantitativo (25 μm , 80 g m⁻²) para evitar entupimento durante as análises

por ICP-MS e diluídas em proporção de 1:5, tendo sua concentração dentro da faixa linear de trabalho da curva analítica para posterior análise por ICP-MS.

A eficiência da extração (porcentagem de recuperação de arsênio) foi avaliada com base na resposta desse planejamento estatístico, com a finalidade de se encontrar a melhor condição única para ambas matrizes, animal e vegetal.

4.4 Determinação de Arsênio total por ICP-MS

Estudos preliminares realizados por Oliveira et al. (2017), otimizaram o método ICP-MS para a determinação de arsênio total em amostras similares às estudadas neste trabalho. Utilizaram os modos de operação padrão e KED para identificar as condições que fornecessem resultados mais precisos. Esse estudo foi conduzido para corrigir possíveis interferências poliatômicas $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ao $^{75}\text{As}^+$. Testaram no modo KED, cinco taxas de fluxo de hélio levando em consideração a perda de sensibilidade. Observaram que no modo KED a intensidade do sinal foi menor do que no modo padrão e diminuiu com o aumento da vazão de gás de hélio, devido ao maior número de colisões e perda também do elemento de interesse, o arsênio. Além disso, operando no modo KED proporcionou baixos valores de limites de detecção e quantificação semelhantes aos valores obtidos no modo de operação padrão. Apresentaram assim a não necessidade do uso do KED. Portanto, para o desenvolvimento deste trabalho as análises foram feitas no modo de operação padrão e o isótopo analisado foi $^{75}\text{As}^+$ e os demais parâmetros operacionais do ICP-MS estão apresentados na **Tabela 4**.

As análises dos extratos e digeridos diluídos para a determinação de arsênio foram realizadas por ICP-MS, modelo NexION 300X (Perkin-Elmer, Estados Unidos), equipado com a tecnologia de célula universal. O sistema de introdução de amostra foi equipado com nebulizador concêntrico, uma câmara ciclônica e uma tocha de quartzo com um tubo injetor de quartzo. Para o desenvolvimento deste presente trabalho as análises foram feitas no modo de operação padrão e o isótopo analisado foi $^{75}\text{As}^+$. Para a geração do plasma foi utilizado gás argônio (99,996 %, White Martins Praxair, São Paulo, Brasil). A curva de calibração para as análises dos digeridos foi realizada em meio de HNO_3 1% (v v⁻¹).

Tabela 4 – Parâmetros instrumentais aplicados na determinação de As por ICP-MS

Parâmetros instrumentais	Condições operacionais
Potência de radiofrequência (kW)	1,6
Vazão de gás de plasma (L min ⁻¹)	18
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2
Vazão de gás do nebulizador (mL min ⁻¹)	1
Fluxo de captação da amostra (mL min ⁻¹)	0,7
Número de varreduras por leitura (sweeps)	50
Leituras (replicatas)	1
Número de leituras (readings)	3
RPq3 (V)	0,25
Faixa de Calibração (µg L ⁻¹)	0,1 – 15
Isótopo	⁷⁵ As ⁺

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: RPq3: relacionado a voltagem aplicada às hastes do quadrupolo.

4.5 Análise de dados

Todos os parâmetros estatísticos foram gerados e avaliados aplicando o software Statistica, versão 10 (StatSoft, Tulsa, Estados Unidos). Cálculos rotineiros foram feitos utilizando o software Microsoft® Excel®, versão 2013 (Microsoft, Redmond, Estados Unidos).

4.6 Avaliação de parâmetros de desempenho

Os procedimentos propostos foram avaliados a partir dos seguintes parâmetros analíticos: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, levando-se em consideração as diretrizes fornecidas por agências nacionais e internacionais (ICH, 2005; IUPAC, 1978; INMETRO, 2018). O LOD e LOQ foram estimados utilizando a **Equação 7** e **8**, respectivamente, a partir do desvio padrão (Sb) da medida do sinal analítico de 10 brancos preparados nas mesmas condições das amostras, dividido pela inclinação da curva analítica (a).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{\text{Sb}}{a} \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\text{Sb}}{a} \quad (\text{Equação 8})$$

A exatidão foi avaliada por meio da análise do candidato à material de referência *Brachiaria brizantha* cv *Marandu* (E1001a) e candidato à material de referência de peixe (IPEN) submetidos ao procedimento MW-AD e ao procedimento de extração ácida assistida por radiação ultravioleta em condições otimizadas. Os resultados experimentais foram comparados com os valores certificados dos respectivos analitos ao nível de confiança de 95%, onde $t\text{-calculado} < t\text{-tabelado}$ indicam a inexistência de diferença significativa entre a média e o valor certificado (GEMPERLINE, 2006). Além disso, foi calculado a recuperação quantitativa (%) conforme a **Equação 9** (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C1}{C2} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 9)}$$

C1 – Concentração do analito quantificada no procedimento.
C2 – Concentração de referência.

A precisão foi avaliada com base no desvio padrão relativo (RSD) estimada em porcentagem (INMETRO, 2018; MITRA, 2003), calculado pela **Equação 10**. Para uma determinada confiabilidade o experimento foi realizado sob condições similares ao mesmo procedimento de medições, mesmo operador e mesmo sistema de medição em dez repetições distintas ($n = 10$). Os critérios de aceitação do desvio padrão foram avaliados com base nas orientações da AOAC International (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

$$\text{RSD}(\%) = \left(\frac{Dp}{Xc} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 10)}$$

Dp – Desvio padrão da medida.
Xc – Média das medidas.

4.7 Avaliação dos métodos ambientalmente verdes

Esforços pela busca do desenvolvimento de preparo de amostra mais ecológico e eficaz são uma tendência emergente cada vez mais praticada. Assim é necessário avaliar os processos analíticos quanto à sua anuência aos conceitos da Química Verde, que pregam a redução da quantidade de reagentes consumidos e consequentemente a redução de geração de resíduos, onde os reagentes tóxicos

devem ser substituídos por equivalentes mais seguros e solventes alternativos devem ser preferidos (BIZZI et al., 2017).

Há uma dificuldade de avaliar o quão verde é um processo analítico. Neste sentido, a Eco-Escala Analítica surgiu como uma metodologia de avaliação dos procedimentos analíticos em função da possibilidade de ser atribuída como um método analítico verde (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015). Esta metodologia tem o propósito de expressar quantitativamente o caráter verde, abordando uma classificação em função da pontuação obtida em cada método analítico aplicado, avaliando assim, o quão verde é o método analítico.

A Eco-Escala baseia-se no cálculo da pontuação em função da especificidade e o impacto gerado pela quantidade e tipo de reagentes, gasto energético, geração de resíduos, riscos atribuídos ao meio ambiente, a saúde e a segurança ocupacional, com base no Sistema harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS). Essa ferramenta assume que o procedimento ideal, identificado pela minimização de reagentes, energia e de geração de resíduos, tem 100 pontos na Eco-Escala. Pontos de penalidade são delegados para cada parâmetro (quantidade de reagentes, perigo, energia e resíduos) em um processo analítico que não estão em conformidade com o ideal (GAŁUSZKA et al. 2012).

Pontos de penalidade são atribuídos às categorias de reagentes devido a classificação dos perigos apresentados pelos mesmos em um procedimento analítico. Duas palavras de sinalização são usadas no GHS: sem nenhum perigo; “perigo” (perigo mais grave) e “advertência” (perigo menos grave). Pontos de penalidade são atribuídos para os reagentes utilizados em um procedimento analítico, por exemplo o HNO_3 (65%) e o H_2O_2 (30%) apresentam pela Eco-Escala o valor de 4 pontos de penalidade (Perigo PP) para cada um dos reagentes devido ao perigo individual apresentado. E como cada substância perigosa envolvida no procedimento influencia de acordo com a sua quantidade, basta assim, multiplicar os pontos de penalidade atribuídos ao perigo com a pontuação atribuída à quantidade em mililitros (mL) (**Tabela 5**) utilizada de reagente, obtendo assim pontos de penalidade total para cada um dos reagentes (GAŁUSZKA et al., 2012).

Tabela 5 – Pontos de penalidade para calcular a Eco-Escala analítica

	Reagentes	PP Subtotal	PP Total ¹
Quantidade	< 10 mL (g)	1	
	10 – 100 mL (g)	2	
	> 100 mL (g)	3	
Perigo	Nenhum	0	
	Risco menos grave	1	
	Risco mais grave	2	
Energia	≤ 0,1 kWh por amostra		0
	≤ 1,5 kWh por amostra		1
	> 1,5 kWh por amostra		2
Risco ocupacional	Processo analítico hermético		0
	Emissão de vapores/gases		3
Quantidade de resíduo	Nenhum		0
	< 1 mL		1
	1 – 10 mL		3
	> 10 mL		5
Característica	Reciclável		0
	Degradação		1
	Passivo		2
	Não admite tratamento		3

Fonte: Elaborado pela autora e adaptado de Galuszka et al. (2012).

Nota: Os PPs são identificados a cada categoria de perigo representada por um reagente.

¹ Subtotal multiplicado pelo PPs do critério “Perigo”.

Através dessa abordagem para avaliar o quão verde é a metodologia recomendaram que os pontos totais sejam calculados e subtraídos de 100 pontos. O resultado obtido da subtração é descrito em uma escala, onde a pontuação superior a 75 pontos classifica o método como excelente método verde, valores entre 75 e 50 pontos refere-se a um método verde aceitável e inferiores a 50 classifica uma análise inaceitável como método verde. A soma dos pontos de penalidade para todo o procedimento deve ser incluída no cálculo da Eco-Escala, de acordo com a seguinte fórmula mostrada abaixo, na **Equação 11**.

$$\text{Eco Escala Analítica} = 100 \text{ pontos} - \text{Pontos totais de penalidade} \quad (\text{Equação 11})$$

Neste presente trabalho foi aplicado o conceito da Eco-Escala analítica com o propósito de classificar e comparar o nível ambientalmente amigável dos procedimentos de preparo de amostra desenvolvido por radiação UV e por MW-AD.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização multivariada do procedimento MW-AD

Buscou-se obter um único procedimento de decomposição de amostra animal e vegetal em meio ácido que fosse pautado nos princípios da química verde. Assim, foi empregado um planejamento fatorial do tipo Doehlert que permitiu avaliar o conjunto de variáveis (tempo, temperatura e concentração de HNO_3), de forma a encontrar uma condição única experimental associada ao preparo para ambas as amostras animal e vegetal.

Com o uso de ácidos diluídos, o aquecimento no interior do frasco é facilitado, pois as moléculas de água são afetadas significativamente pelo campo eletromagnético estabelecido pelas micro-ondas. O uso de H_2O_2 como agente oxidante auxiliar em sistemas de digestão em micro-ondas é reconhecido como fonte geradora de oxigênio possibilitando a regeneração do HNO_3 em altas temperaturas, diminuindo assim o tempo de digestão. Sendo assim, variáveis como temperatura, tempo e concentração de HNO_3 , são muitas vezes otimizadas com o propósito da obtenção de decomposições satisfatórias (BARBOSA et al., 2015; TARANTINO et al., 2016).

Inicialmente foi realizada a análise elementar para avaliar o teor original de carbono total nas amostras antes do procedimento de digestão. Estes valores são apresentados na **Tabela 6**, sendo que a porcentagem original de carbono total variou de 43,7 e 46,2% para amostra de marandu e peixe, respectivamente. O maior teor de nitrogênio e enxofre foi na amostra de peixe, em torno de 14,2% e 3,1%, respectivamente.

Tabela 6 – Teores totais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre em marandu e peixe

Matriz	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)
Marandu	43,7	6,7	1,7	2,5
Peixe (IPEN)	46,2	7,4	14,2	3,1

Fonte: Elaborado pela autora.

Foram realizados 15 experimentos, dos quais três foram repetições do ponto central. Após as digestões, todos os digeridos apresentaram soluções límpidas e sem

resíduos sólidos aparentes, o que pode ser um indício que a matéria orgânica possa ter sido decomposta. O conteúdo de carbono removido variou de 81% a 97% e 65% a 97%, para as amostras de marandu e de peixe, respectivamente (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Matriz de planejamento fatorial tipo Doehlert incluindo as variáveis experimentais e a resposta analítica (teor de carbono removido) utilizados na obtenção do modelo matemático

Experimento	Variável			Carbono removido (%)	
	X1	X2	X3	Marandu	Peixe
	HNO ₃ (mL)	Temp (°C)	Tempo (min)		
1 (CP)	8	160	15	96	90
2 (CP)	8	160	15	95	85
3 (CP)	8	160	15	95	88
4	14	160	15	97	89
5	11	190	15	95	94
6	11	170	20	96	88
7	2	160	15	94	77
8	5	130	15	81	67
9	5	150	10	92	65
10	11	130	15	96	86
11	11	150	10	96	85
12	5	190	15	95	97
13	8	180	10	95	90
14	5	170	20	94	78
15	8	140	20	93	85

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: ponto central (CP).

Utilizando uma solução de ácido mais concentrado (experimento 5) o teor de carbono removido foi de 95% para o marandu e de 94%, para o tecido de peixe. O procedimento proposto (experimento 12), que utiliza a condição de 5 mol L⁻¹ a 190 °C em 15 minutos, se destacou por apresentar teores de carbono removido de 95% e 97% para as amostras de marandu e peixe. Dessa forma, pode-se alegar que a eficiência de decomposição da matéria orgânica foi praticamente igual utilizando HNO₃ concentrado e diluído (auxiliados por H₂O₂) nas mesmas condições de temperatura e tempo (ARAUJO et al., 2002).

Após a decomposição de amostras de plantas empregando HNO₃ diluído e radiação MW, Muller et al. (2016) verificaram que teores de carbono residual de até

12% não causaram interferências na determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS. Considerando o valor de 12% como adequado para o trabalho em ICP-MS, esses resultados indicaram que a condição (experimento 12) para ambas as amostras conduziu à uma satisfatória decomposição das amostras.

Existe fortemente uma problemática relacionada à presença de carbono nas determinações de arsênio. Os átomos de carbono podem se recombinar formando grafita, que podem depositar-se na superfície parcialmente fria dos cones metálicos causando obstrução dos orifícios afetando consideravelmente o processo de amostragem, ionização e a estabilidade do plasma promovendo a redução do sinal analítico do arsênio (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017; PETTINE et al., 2007). Como o isótopo $^{75}\text{As}^+$ apresenta potencial de ionização relativamente alto, por isso necessita de um plasma mais energético e mais efetivo para a sua ionização. Além disso, a presença de carbono no plasma pode aumentar o sinal analítico de analíticos com alto potencial de ionização, como por exemplo, o arsênio. A população de íons de C^+ ou espécies que contenham carbono e que são formados no plasma se associam ao arsênio a ser determinado levando a formação de cátion radical mais estável. De forma que espécie como arsênio transfere elétrons para espécies mais estáveis, neste caso, as espécies que contém carbono, suprimindo assim, a determinação do arsênio (D'ILIO et al., 2011).

O emprego da ANOVA foi realizado para avaliar se o modelo se ajustou aos dados e explicar o comportamento da resposta através da variação e interação das variáveis. Portanto, a partir da ANOVA pode verificar o quanto o modelo foi capaz de descrever o comportamento da resposta baseado no fundamento da significância da regressão e na evidência de falta de ajuste. Estes dados são apresentados na **Tabela 8**.

O coeficiente de determinação (R^2) permitiu estimar a variabilidade das variáveis do processo otimizado tendo como base o efeito nas respostas, uma medida de grau de ajuste, que é determinada pela variável independente. A análise de regressão para os modelos foi capaz de descrever a máxima variabilidade das variáveis com 93 e 85%, para o planejamento estatístico aplicado ao tecido de peixe e marandu, respectivamente. O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}), apresentou a máxima variação explicável de 91,4 e 82,5%, para o tecido de peixe e marandu, descrevendo que o modelo ajustado foi adequado para os dados obtidos,

explicitando uma boa capacidade preditiva (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; NOVAES et al., 2017).

Tabela 8 – Análise de variância do modelo matemático obtido a partir no planejamento fatorial do tipo Doehlert

Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	F-tabelado	R ²	R ² ajus
<i>Amostra de Peixe (p < 0,05)</i>							
Regressão	1057,4	4	243,8	14,85	5,19	0,927	0,914
Falta de ajuste	69,5	3	23,1	3,68	19,16		
Erro puro	12,6	2	6,3				
Total	1139,6	14					
<i>Amostra de Marandu (p < 0,05)</i>							
Regressão	137,6	4	34,3	5,91	5,19	0,850	0,825
Falta de ajuste	29,3	3	9,7	97,00	19,16		
Erro puro	0,2	2	0,1				
Total	196,5	14					

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), estatística crítica Fisher (F), coeficiente de determinação (R²), coeficiente de determinação ajustado (R²ajus).

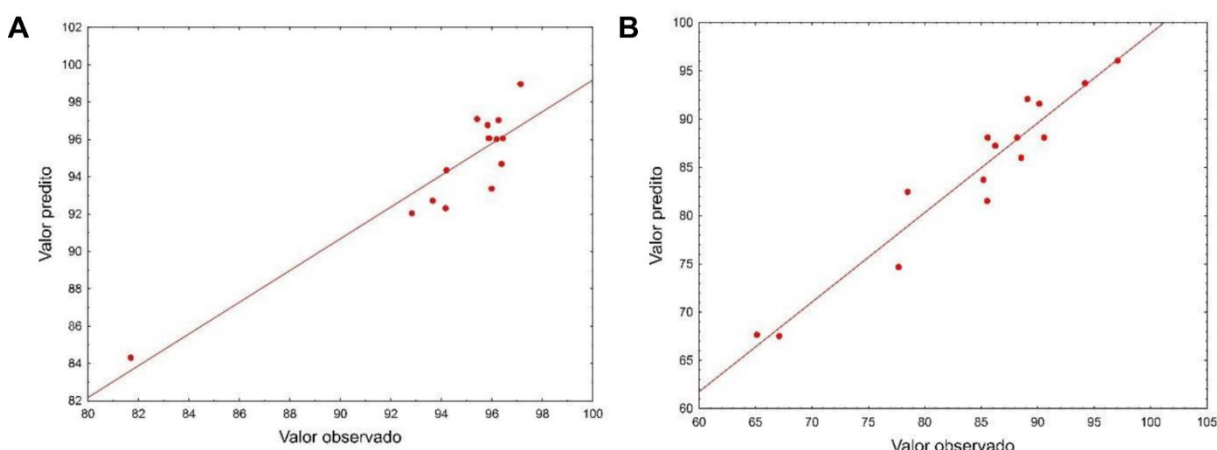
O valor de F-calculado foi comparado com o valor da distribuição F-tabelado com 95% de confiança para avaliação da falta de ajuste entre a relação dos dados experimentais e o modelo estatístico. O teste de falta de ajuste indicou que o modelo quadrático aplicado ao planejamento estatístico para matriz animal (peixe) não apresentou falta de ajuste, com uma relação desejável entre a variável e a resposta, ou seja, $F_{Df=3,2} \text{ calculado } 3,68 < F_{Df=3,2} \text{ tabelado } 19,16$ em seus respectivos graus de liberdade, indicando em termos estatístico, que apenas o erro aleatório inerente ao sistema experimental está associado a média quadrática da falta de ajuste (MSfaj) e a média quadrática do erro puro (MSpe).

Outra alternativa para avaliar o modelo em relação a falta de ajuste, é através da análise da regressão, que avalia a relação entre uma variável dependente e um conjunto de variáveis independente. O uso dessa análise permitiu a comparação do valor de F-calculado com o valor da distribuição F-tabelado com 95% de confiança, em seus respectivos graus de liberdade, sendo que a relação entre a soma quadrática de regressão em relação da variação total com a soma quadrática dos resíduos, resulta em F-calculado (ACHCAR, 1995). O modelo estatístico para o tecido de peixe apresentou um $F_{Df=4,5} \text{ calculado } 14,85 > F_{Df=4,5} \text{ tabelado } 5,19$, e para o marandu $F_{Df=}$

$F_{3,2}$ calculado 5,91 > $F_{3,2}$ tabelado 5,19, inferindo boa relação entre a resposta e as variáveis aplicadas, descrevendo que o modelo de regressão forneceu uma boa aproximação entre as variáveis e a resposta para ambas amostras, ou seja, a regressão foi estatisticamente significativa.

Ainda para verificar sobre a falta de ajuste foi avaliado o gráfico de resíduos, que é a diferença entre um valor observado e sua estimativa de acordo com o modelo, que é o valor previsto. A distância global minimizada dos pontos em relação à reta indica que a soma dos quadrados dos resíduos é mínima (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Os resíduos apresentaram uma distribuição aleatória sem nenhuma tendência a anormalidade, apresentando uma relação significativa dos valores preditos, de ambos os modelos com os observados experimentalmente (Figura 2).

Figura 2 – Gráficos de resíduo e valores preditos para o modelo estatístico A (Marandu) e B (Peixe)



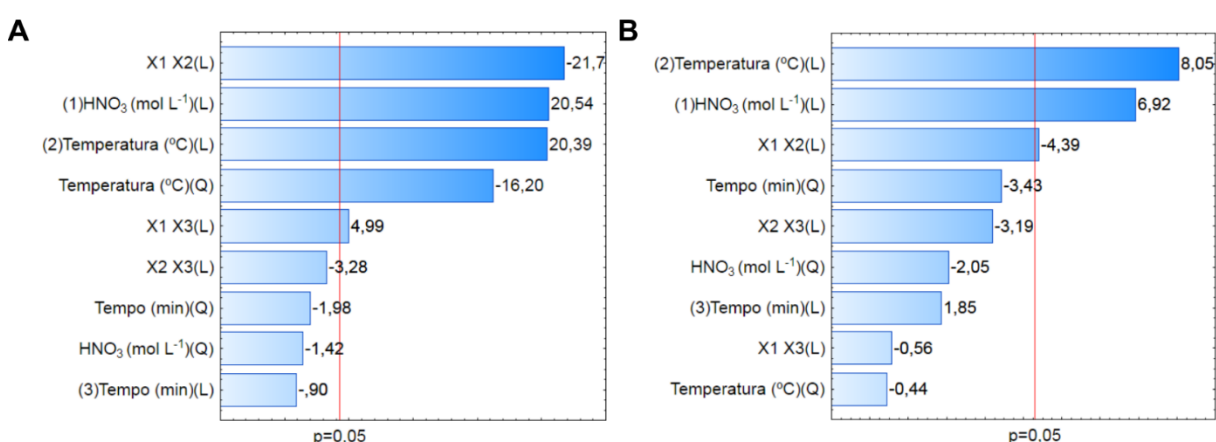
Fonte: Elaborado pela autora.

A reta de regressão deu origem aos valores preditos pelo modelo estatístico e os pontos são os valores experimentais obtidos. O modelo ajustado representa a relação entre a resposta e as variáveis, não verificando a contribuição da parcela de resíduo deixado pelo modelo sinalizado pela soma quadrática residual (PEREIRA-FILHO, 2017). Os gráficos do valor observado vs. as respostas observadas pelos modelos estatísticos confirmam visualmente a qualidade dos ajustes.

Foi avaliado quantitativamente os efeitos padronizados de algumas das variáveis e as possíveis interações previstas pelo modelo quadrático entre os pares que ressaltam maior e menor influência sobre a resposta obtida, comparando-a um

valor de t-crítico dado pela distribuição t de Student com um nível de significância de 95%, sinalizado pela linha vermelha vertical no eixo x, com seu respectivo grau de liberdade (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010) mostrados no gráfico de Pareto (**Figura 3**). O gráfico de Pareto foi utilizado com a finalidade de avaliar e identificar estimativas significativas do comportamento das variáveis e da resposta experimental (o teor de carbono removido), dentro do domínio experimental investigado.

Figura 3 – Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de Marandu (A) e peixe (B)



Fonte: Elaborado pela autora.

Como evidenciado, a interação das variáveis concentração de HNO₃ e temperatura no planejamento estatístico em amostras de marandu apresentou maior efeito padronizado (-21,70) indicando sinergismo entre esses dois componentes, sugerindo que quando o fator vai de um nível (valor) mais alto para um nível mais baixo influencia significativamente o aumento da remoção de carbono (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009). Soluções mais diluídas de HNO₃ combinadas a gradientes de temperatura mais intensa vem sendo cada vez mais utilizada para decomposição de amostras orgânicas (KRUG, 2006; BARELA et al., 2017). Essa mesma relação foi relatada por Nóbrega et al. (2012). Como nas digestões em micro-ondas, os frascos são fechados, viabiliza o aumento da pressão devido ao fechamento dos frascos, isso faz com que a temperatura também aumente, possibilitando a utilização de temperaturas superiores ao ponto de ebulição do ácido selecionado. Contudo, utilizando concentrações de HNO₃ diluído já é suficiente para elevar o poder oxidante do meio, obtendo assim teores de carbono removidos maiores

após altas temperaturas. Além disso, soluções de ácido diluído são desejáveis quando se trabalha com ICP-MS, porque podem minimizar problemas relacionados à interferência de transporte na etapa de introdução de amostra e também prevenir possíveis danos aos componentes instrumentais (BARELA et al., 2017).

A variável temperatura (X2) associada a variável concentração HNO_3 (X1) foi um parâmetro importante na digestão. Nesse sentido, o uso de soluções diluídas foi suficiente para proporcionar a eficiência da decomposição de amostras orgânicas, sendo assim, condizente com a química verde, já que se utiliza menor quantidade de reagente (GONZALEZ et al., 2009).

A variável temperatura (X2) apresentou efeito (20,39), menor em relação a variável concentração de HNO_3 (X1). A variável concentração de HNO_3 foi o componente principal que exerceu a maior influência na eficiência da oxidação de compostos orgânicos das amostras vegetal, devido ao seu poder de oxidação e consequentemente a eficiência da digestão de amostras vegetais, resultado semelhante do que foi relatado anteriormente (ARSLAN; TYSON, 2007; ARAÚJO et al., 2002).

No modelo correspondente ao planejamento estatístico em amostras de peixe, a variável temperatura (X2) apresentou maior efeito (8,05), sendo maior em relação ao fator HNO_3 (X1). A relação da temperatura (T) e a taxa de reação (k) fica evidente pela equação de Arrhenius ($k = Ae^{-E_a/RT}$), onde o termo representado por A é o fator pré-exponencial; E_a é a energia de ativação; R a constante universal dos gases. Esse modelo mostra matematicamente, que com o aumento da temperatura (T) há um aumento das colisões das moléculas no meio reacional (ATKINS; JONES, 2006). Portanto, aumentando a velocidade de reação tem-se um aumento proporcional da taxa de reação e consequentemente o aumento da decomposição da matéria orgânica da matriz de estudo.

A interação entre as variáveis concentração de HNO_3 (X1) e temperatura (X2) obtida pelo tecido de peixe teve efeito padronizado negativo (-4,39), indicando também o sinergismo entre essas duas componentes, sugerindo que na condição que promove a melhor extração, o efeito simultâneo de maiores valores de temperatura associado a baixos valores de concentração de HNO_3 favoreceram a formação de espécies intermediárias.

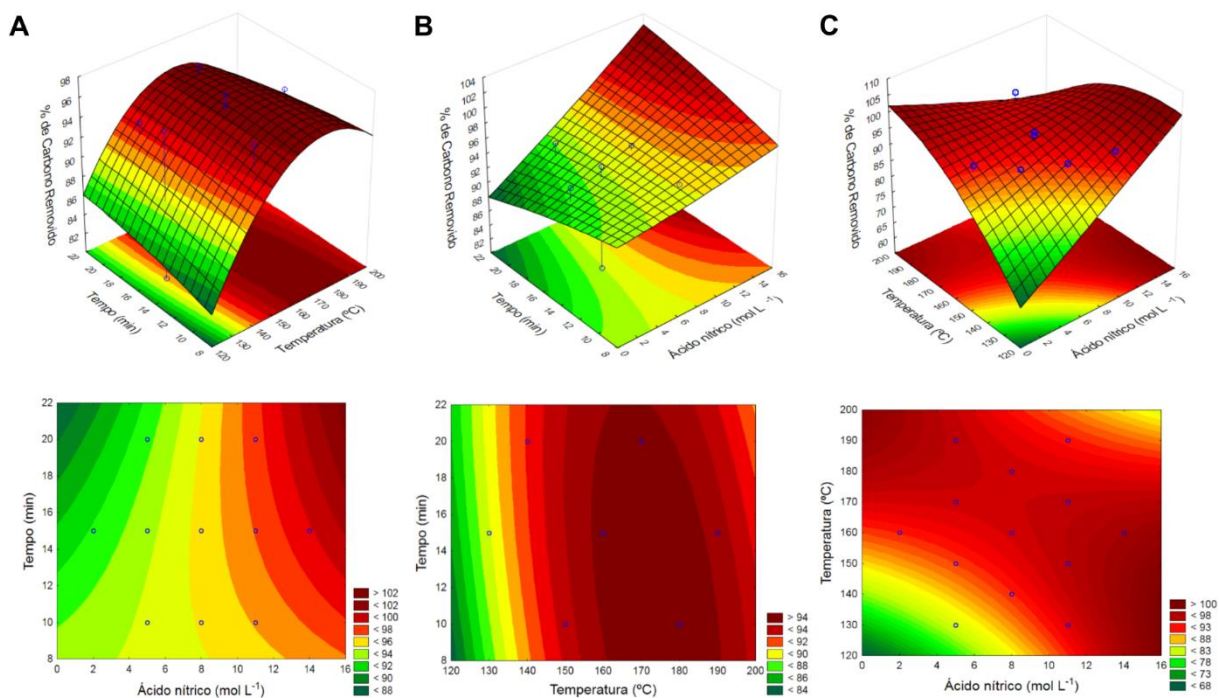
A eficiência do procedimento de digestão também depende da composição química original da amostra. Em temperaturas mais elevadas o aumento da pressão

de vapor do HNO_3 e a regeneração do mesmo no meio reacional, afetam significativamente o poder de oxidar uma maior quantidade de compostos orgânicos, convertendo gradativamente moléculas orgânicas complexas em mais simples, como, isômeros do ácido nitrobenzóico e outros compostos orgânicos com estruturas alifáticas. Por outro lado, considerando que parte do analito está ligado a fração de proteínas, aminoácidos estruturais e lipídios que compõem essas amostras, logo em temperaturas mais brandas a digestão pode não ser eficiente, por não ser possível a clivagem destas ligações, dificultando assim a liberação/extração do elemento em solução para sua determinação (GONZALEZ et al., 2009; WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPPLE, 1989).

Embora, alguns procedimentos indicam a utilização de altas concentrações dos ácidos para aumentar a eficiência da decomposição diminuindo a porcentagem de carbono residual (BARELA et al., 2017), este presente planejamento otimizado sugere que a utilização de ácidos mais diluídos e temperaturas mais elevadas, a quantidade de carbono removido das amostras foi semelhante ou até melhores do que empregando soluções mais concentradas.

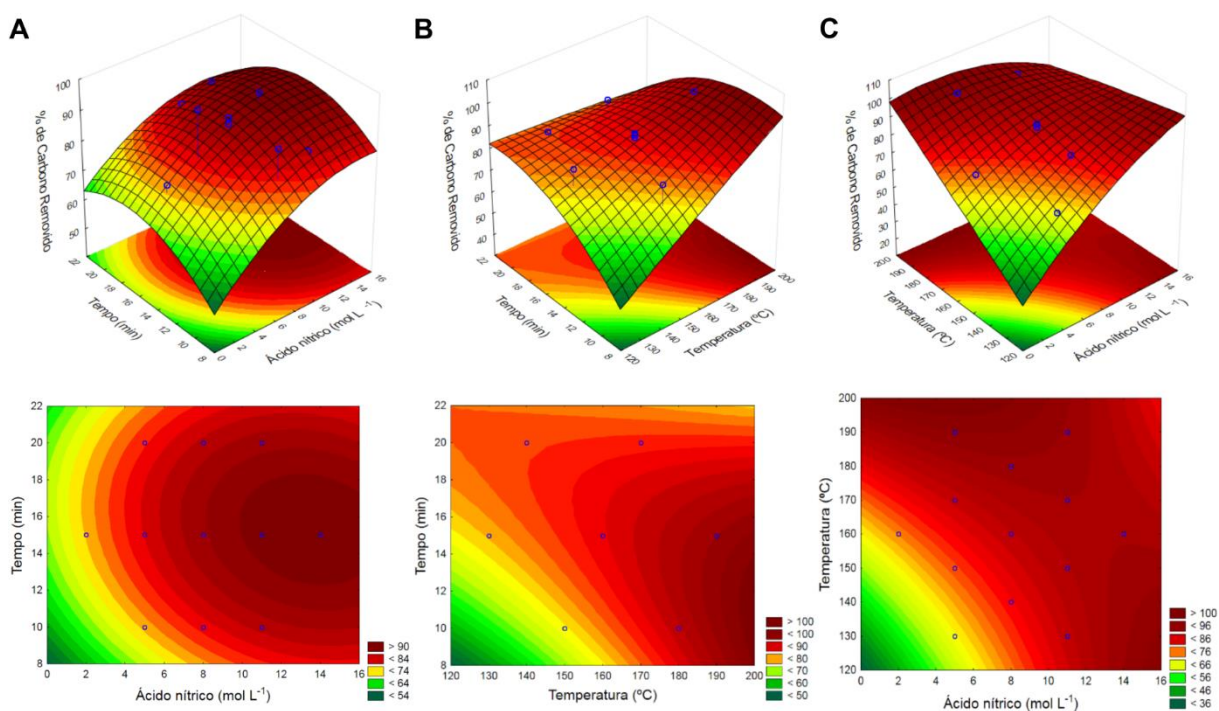
A partir do modelo obtido foi possível gerar gráficos de contorno e delinear as superfícies de resposta (**Figura 4** e **Figura 5**) representativa em relação a variação das proporções das variáveis da solução digestora (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

Figura 4 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Doehlert usando a resposta múltipla, para amostra de marandu



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Doehlert usando a resposta múltipla, para amostra de peixe



Fonte: Elaborado pela autora.

Através da relação entre as variáveis e as respostas obtidas experimentalmente dentro do domínio estudado e condição de contorno foi possível encontrar a condição ótima que reproduziu as interações das variáveis e de suas variações em relação às respostas previstas pelo modelo de forma otimizada.

Como esperado, de acordo com os valores de porcentagem de carbono removido, observou-se que soluções de HNO_3 mais concentradas proporcionaram uma melhor oxidação da matéria orgânica, confirmando a importância desta variável no processo de digestão das amostras. Na etapa de abertura dos frascos de digestão, para digeridos obtidos em soluções de HNO_3 concentrado pode-se observar uma intensa liberação de gás, devido a maior quantidade de geração do NO_2 gasoso durante a oxidação dos constituintes orgânicos.

O uso de uma solução contendo HNO_3 (2 mol L^{-1}) não foi eficiente para promover a digestão desejável de amostras de peixe apresentando porcentagem de carbono removido de 77%. Uma possível explicação seria a maior quantidade de lipídios e proteínas estruturais nas amostras de tecido animal, já que estes constituintes requerem maiores temperaturas e concentrações de HNO_3 para a sua decomposição (GONZALEZ et al., 2009).

Quando a variável concentração ácida foi mantida em HNO_3 (5 mol L^{-1}) e a temperatura e o tempo foram alterados de 170 a 190 °C, no tempo de 20 e 15 minutos, respectivamente (experimentos 14 e 12) para amostra de peixe, a porcentagem de remoção de carbono aumentou de 78% para 97%. Comportamento semelhante também foi observado na amostra de marandu, quando a concentração ácida foi mantida em 5 mol L^{-1} e a temperatura elevada de 130 para 190 °C (experimentos 8 e 12), a remoção de carbono aumentou de 81% para 95%. Sendo assim, seguindo os preceitos da química analítica verde, foi escolhido a condição de digestão que fez uso de soluções diluídas com menor uso de reagentes, apresentando vantagens como a minimização da geração de resíduos e uma menor acidez residual do digerido, favorecendo digeridos sem a necessidade de diluição elevadas, e minimizando o desgaste nos equipamentos e acidentes operacionais (CHEMAT; GARRIGUES; GUARDIA, 2019; TOBISZEWSKI; MECHLINSKA; NAMIESNIK, 2010).

Além disso, a escolha única de um procedimento de MW-AD proposto para o preparo de amostra de derivado animal e vegetal empregando a mesma quantidade

e tipo de reagentes em temperatura e tempo iguais provou ser eficiente, rápido e com aumento da frequência analítica, uma vez que uma mesma condição reacional é aplicada para ambas composições matriciais. Portanto, a otimização da solução digestora escolhida, que forneceu as condições de resposta dentro do delineamento experimental, para ambas matrizes foram: 6 mL de HNO_3 (5 mol L^{-1}), temperatura de 190°C e tempo de 15 minutos, com remoção de carbono superior a 94% para ambas matrizes.

5.2 Otimização multivariada do procedimento de extração assistida por UV em câmara de foto-oxidação

Para otimizar o método foi estudado diferentes tempos de extração (12 – 60 min), volume de H_2O_2 (2 – 8 mL) e porcentagem de HNO_3 diluído (1 – 3%) para extração assistida por radiação UV, em amostra de marandu e peixe. Para a matriz do planejamento, a função de desejabilidade foi calculada, de forma a relacionar a porcentagem de recuperação de arsênio (resposta experimental obtida) com a interação das variáveis. As amostras apresentaram desejabilidade variando de 0 a 0,97 para ambos os tecidos, vegetal (marandu) e animal (peixe). Dos 15 experimentos, três foram repetições do ponto central conforme a matriz de dados reportada na **Tabela 9**. Ao realizar este cálculo para todos os quinze experimentos, a função matemática foi ajustada a cada valor de desejabilidade individual para modelar o comportamento dos dados e assim fazer previsões em relação a localização do ponto ótimo que relaciona as variáveis com a resposta.

Tabela 9 – Matriz de planejamento fatorial tipo Doehlert para as variáveis tempo, volume de H_2O_2 , porcentagem de HNO_3 , porcentagem de recuperação de arsênio e desejabilidade, como respostas aplicada ao procedimento de extração com radiação (UV) em amostras de marandu e peixe

Experimento	Variável			Recuperação (%)		Desejabilidade (di)	
	X1	X2	X3	Marandu	Peixe	Marandu	Peixe
1 (CP)	36	5	3	98	93	0,93	0,93
2 (CP)	36	5	3	90	97	0,63	0,97
3 (CP)	36	5	3	91	93	0,66	0,93
4	60	5	3	–	149	–	0,00
5	48	8	3	97	–	0,90	–
6	48	6	5	121	108	0,50	0,84

7	12	5	3	73	84	0,00	0,84
8	24	2	3	95	93	0,85	0,94
9	24	4	1	90	4	0,66	0,00
10	48	2	3	116	94	0,61	0,94
11	48	4	1	133	122	0,23	0,55
12	24	8	3	79	78	0,25	0,77
13	36	7	1	101	89	0,97	0,88
14	24	6	5	96	76	0,86	0,75
15	36	3	5	143	95	0,00	0,95

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: X1 – HNO₃ (mL), X2 – temperatura (°C), X3 – tempo (min), ponto central (CP).

Através do planejamento fatorial do tipo Doehlert foi possível gerar um modelo matemático para avaliar a relação satisfatória do comportamento das variáveis com a resposta experimental monitorada dentro do domínio estudado. Por meio da ANOVA (**Tabela 10**), foi possível avaliar a adequação do modelo ajustado.

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,661 e 0,520 para o peixe e marandu, respectivamente. Embora tenha sido observado evidências de desajuste aos dados experimentais, os gráficos de resíduos versus os valores preditos (**Figura 6**) para ambas matrizes apresentaram distribuição normal e nenhum indício de anormalidade, ou seja, o modelo matemático gerado não apresentou variância entre os dados preditos pelo modelo e os dados observados experimentalmente.

Tabela 10 – Análise de variância do modelo matemático obtido com os dados experimentais modelado no planejamento fatorial do tipo Doehlert

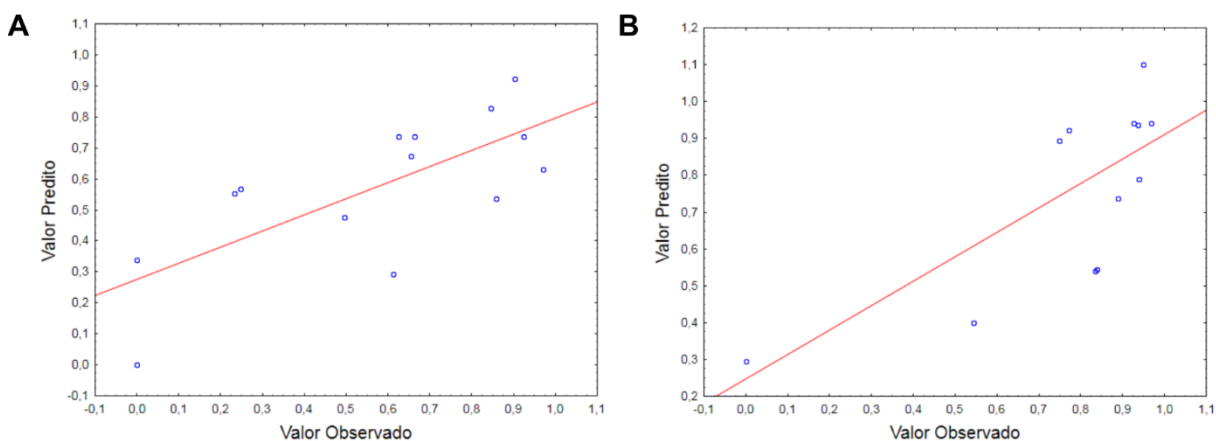
Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	F-tabelado	R^2	R^2_{ajus}
<i>Amostra de Peixe ($p < 0,05$)</i>							
Regressão	0,460	5	0,092	0,77	6,26	0,661	0,600
Falta de ajuste	0,480	2	0,240	480	19,00		
Erro puro	0,001	2	0,001				
Total	1,420	13					
<i>Amostra de Marandu ($p < 0,05$)</i>							
Regressão	0,460	5	0,010	0,06	5,19	0,520	0,434
Falta de ajuste	0,640	2	0,320	642	19,16		
Erro puro	0,001	2	0,001				
Total	1,330	13					

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), estatística crítica Fisher (F), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}).

Desse modo, o quociente entre o MSfaj/MSpe pode ter sido inflado como resultado da subestimação do valor do MSpe, sugerindo que a MSfaj e MSpe refletiram apenas os erros aleatórios inerentes ao sistema investigado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; NOVAES et al., 2017), concluindo que isso não afetaria a precisão da condição ótima de extração para ambas matrizes.

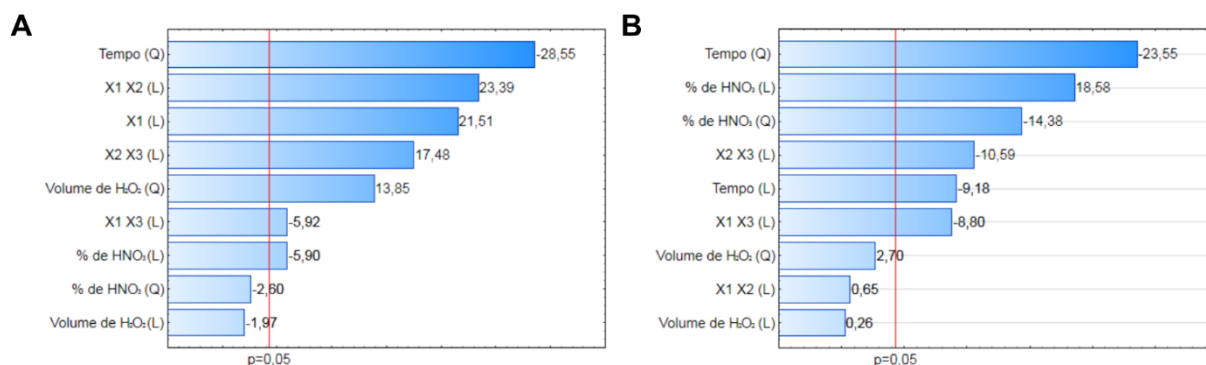
Figura 6 – Valores preditos para o modelo quadrático para amostra de Marandu (A) e peixe (B)



Fonte: Elaborado pela autora.

Através do desenvolvimento do planejamento estatístico foi possível gerar o gráfico de Pareto (**Figura 7**), avaliando a importância de todas as variáveis, bem como as possíveis interações que apresentaram influência para a extração de arsênio nas amostras de marandu e peixe. A magnitude dos efeitos é representada por colunas e a linha vertical indica significância estatística em $p = 0,05$, assim as variáveis com valores que excedem a linha vermelha são estatisticamente significantes em um nível de confiança de 95%.

Figura 7 – Gráfico de Pareto para a variável porcentagem de recuperação nas determinações de arsênio no Marandu (A) e peixe (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi possível verificar que a variável tempo foi significativa e apresentou maior efeito negativo (-28,5) para o marandu e também para o tecido de peixe (-23,5). Esse efeito demonstrou que há um aumento da recuperação de arsênio à medida que a variável tempo variou de um nível superior para um nível inferior. Possivelmente isto ocorre porque em maiores tempos de extração produtos da degradação da matéria orgânica podem ser utilizados como doadores de elétrons, os quais atuam reduzindo o sulfato presente na amostra à sulfeto (POSTGATE et al., 1984). Tanto a amostra de marandu como a de peixe têm em suas composições proteínas que a partir da sua quebra também podem gerar sulfetos que antes estavam presentes em suas estruturas. De forma que o sulfeto gerado, pode ser complexado com o arsênio produzindo o precipitado de sulfetos de arsênio, contribuindo assim para a perda de arsênio nos extratos após tempos maiores de extração (TECLU et al., 2009). Além disso, o sulfato pode se reduzir a sulfeto gerando o carbonato (matéria orgânica (C, H, O) + $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{HCO}_3^-$), o qual também pode levar a precipitação do arsênio, na forma de seus carbonatos (BARBOSA et al., 2009). E com a presença de carbonato no meio reacional, pode ocorrer o consumo de radicais livres por parte do carbonato. Condição desfavorável ao aumento da decomposição do material orgânico presente nas amostras (BULDINI et al., 2002).

Foram satisfatórios os valores de recuperação alcançados em menor tempo de exposição. Como esperado do ponto de vista químico, tanto o H_2O_2 como o HNO_3 , associados a luz UV, desempenharam um papel de geradores de espécies radicalares altamente reativas para o processo de extração, como descrito nas equações 2 e 5 (GILBERT; BAGGOTT, 1991). As reações do tipo radicalar ocorrem em tempos

curtos, de forma que o $\cdot\text{OH}$ apresenta uma reatividade elevada, com alto potencial de oxidação de 2,33 V e uma taxa de reação na ordem de $109 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O mesmo efeito foi verificado por Gilbert e Baggott (1991), onde descreveram que as reações radicalares atingiram altas eficiências de degradação da matéria orgânica em tempos menores de exposição à radiação.

O menor tempo de extração do planejamento estatístico (12 minutos, experimento 7) utilizando a concentração de HNO_3 de 3% e volume de H_2O_2 de 5 mL, não foi suficiente para atingir recuperações superiores a 80% para amostra de marandu. Já em 36 min e na mesma condição de extração mencionada foram obtidas recuperações de arsênio superiores a 90% para ambas matrizes, indicando que 12 minutos não foi suficiente para se obter uma extração eficiente para ambas amostras. O efeito positivo (23,3) da interação entre a variável tempo (X_1) e o volume de H_2O_2 (X_2) foi favorável no procedimento de extração empregando radiação UV em amostra de marandu, indicando que a interação entre os componentes favoreceu a formação de espécies radicalares ($\cdot\text{OH}$) de elevado poder oxidante no meio reacional (MORO et al., 2013).

Foi observado que o aumento do volume de H_2O_2 afetou a disponibilidade de radicais livres no meio reacional. Quando o volume de 2 mL de H_2O_2 foi utilizado com solução de 3% de HNO_3 em um tempo de extração de 24 min (experimento 8), apresentaram 95 e 93% de recuperação (desejabilidade de 0,85 e 0,92) de arsênio para marandu e peixe, respectivamente foi alcançado. Já os valores de recuperação utilizando a mesma condição diferindo apenas com o aumento do volume de H_2O_2 para 8 mL (experimento 12) a recuperação foi de 79 e 78%, sendo menor comparado a utilização de 2 mL de H_2O_2 , provavelmente devido ao consumo dos radicais ($\cdot\text{OH}$) em maiores volume de H_2O_2 , como pode ser expressa pela seguinte equação: $\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2\cdot$. Embora outro radical ($\cdot\text{OH}_2$) seja gerado, seu potencial de oxidação é muito menor do que da espécie radicalar (DAUD et al., 2010).

A interação entre as variáveis volume de H_2O_2 e porcentagem de HNO_3 associado à radiação ultravioleta teve seu efeito positivo (17,4) para a extração de arsênio nas amostras de marandu, podendo indicar que a interação entre essas variáveis favoreceram o aumento da formação de espécies de radicais livres ($\cdot\text{OH}$). Pode-se inferir que em baixa quantidade de ambas variáveis, a formação de radicais pode não ser efetiva para obtenção de uma condição de decomposição eficiente da

matéria orgânica e conseqüentemente a não liberação do elemento químico de estudo para a fase aquosa. Portanto, considerando que o arsênio esteja fortemente ligado à fração de sílica presente na amostra vegetal, é requerido um método de extração mais oxidante (agressivo), contando com a combinação de maiores quantidades de HNO_3 e de H_2O_2 , que são geradores de radicais livres quando associados a radiação UV, para alcançar resultados satisfatórios de extração de arsênio (NIU et al., 2013).

A variável individual, volume de H_2O_2 (X2), apresentou efeito menor (13,8) em relação a interação desta variável e a porcentagem de HNO_3 (17,4). Embora a variável (X2) tenha menor efeito, esta variável é importante na extração, pois também pode ser responsável pela manutenção da espécie oxidativa em solução na forma de $\bullet\text{OH}$, o mesmo foi verificado por Souza et al. (2014).

Na amostra de peixe a porcentagem de HNO_3 (X3) individual apresentou efeito positivo (18,5), desempenhando um papel importante no procedimento de extração para esse tipo de matriz. Solução de HNO_3 quando associado com a radiação UV também apresentam uma fonte importante de radicais $\bullet\text{OH}$, a partir do nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), uma vez que estas espécies absorvem prontamente a radiação ultravioleta, com espectro de absorção da radiação UV em 310 nm ($\epsilon = 22,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 360 nm ($\epsilon = 7,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente (KEEN et al., 2012).

A temperatura em um procedimento de decomposição é um parâmetro importante que afeta a eficiência de digestão, já que para digerir uma variedade de moléculas orgânicas, diferentes temperaturas são necessárias (WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989). A temperatura atingida a 80 °C pelo procedimento de extração utilizando o protótipo com luz ultravioleta utilizada no presente trabalho seria teoricamente insuficiente para a decomposição completa das proteínas (com temperatura média de decomposição por volta de 160 °C). De acordo com Barela e colaboradores (2017) a presença de carboidratos nas amostras pode auxiliar na melhoria do processo de decomposição da matéria orgânica.

É relatado na literatura que em baixos valores de pH, ou seja, com o aumento da utilização de soluções ácidas associada a altas quantidade de H_2O_2 é possível ocorrer a solvatação de um próton (H^+ proveniente do HNO_3) pelo H_2O_2 , formando o íon oxônio (H_3O_2^+), e que conseqüentemente, a atuação do H_2O_2 como fonte geradora de radicais livres é reduzida, afetando assim na diminuição da extração. Outro efeito relatado é que em altas concentrações de H^+ , este pode reagir com os radicais livres

($\cdot\text{OH}$) formando água, suprimindo o efeito radicalar na decomposição da matéria orgânica (DAUD et al., 2010). Assim, o estudo das variáveis quantitativas de HNO_3 e também do volume de H_2O_2 associados a radiação UV em um período de tempo são critérios importantes neste tipo de procedimento.

Para a amostra de marandu a interação da variável volume de H_2O_2 (X2) juntamente com a porcentagem de HNO_3 (X3) apresentou efeito positivo significativo (17,4), indicando a necessidade da interação dessa mistura oxidante, promovida pela adição do H_2O_2 juntamente com o HNO_3 . Como mencionado por Calle et al. (2013), amostras de ervas e plantas constituem parte do analito ligado a fração de sílica presente na amostra e isso explicaria a possível necessidade de um meio reacional com mais constituintes geradores de espécies radicalares (mais oxidante), visando o rompimento das ligações do arsênio com a sílica, liberando assim, o analito para o solvente presente no meio reacional.

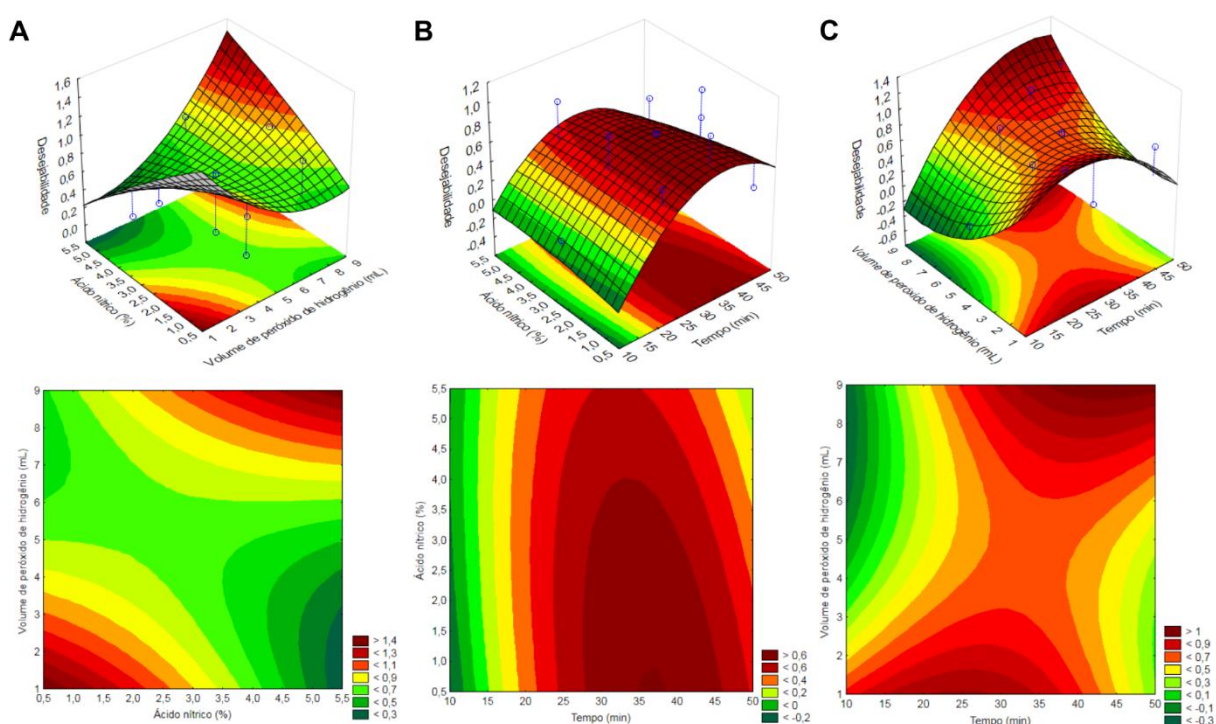
A extração obtida em temperatura à 80 °C, foi adequada para a decomposição das matrizes. Um ponto importante a ser considerado é que elementos que em geral são perdidos por volatilização em sistema aberto de extração, como por exemplo, o arsênio, este foi extraído pela condição otimizada do procedimento de preparo de amostra proposto a 80 °C. Como ocorre a interação entre a radiação ultravioleta e os solventes extratores para a geração de radicais hidroxila em um tempo necessariamente curto, foi evitada assim, a perda do analito por volatilização ou por precipitação. Porém, nos experimentos 4 (marandu) e 5 (peixe), nos tempos de reação de 60 e 48 min, respectivamente, foi evaporado todo o solvente, não sendo possível determinar a quantidade de arsênio extraído nesses experimentos.

A resposta (porcentagem de recuperação de arsênio) foi codificada de 0 (resposta indesejada; baixa porcentagem de recuperação de arsênio) a 1 (resposta desejada; alta porcentagem de recuperação de arsênio) usando uma função de desejabilidade individual (di). A função desejabilidade foi usada para modelar as superfícies de resposta e os gráficos de contorno ajustados (**Figura 8** e **Figura 9**) para avaliar a melhor condição experimental para ambas matrizes.

Como observado foi possível descrever o comportamento do sistema de extração e definir a condição experimental otimizada. As variáveis volume de H_2O_2 , porcentagem de HNO_3 e o tempo associados a radiação ultravioleta afetaram o procedimento de extração em ambas matrizes, possivelmente relacionado ao poder oxidativo atribuído a sinergia entre a radiação UV e a mistura extratora.

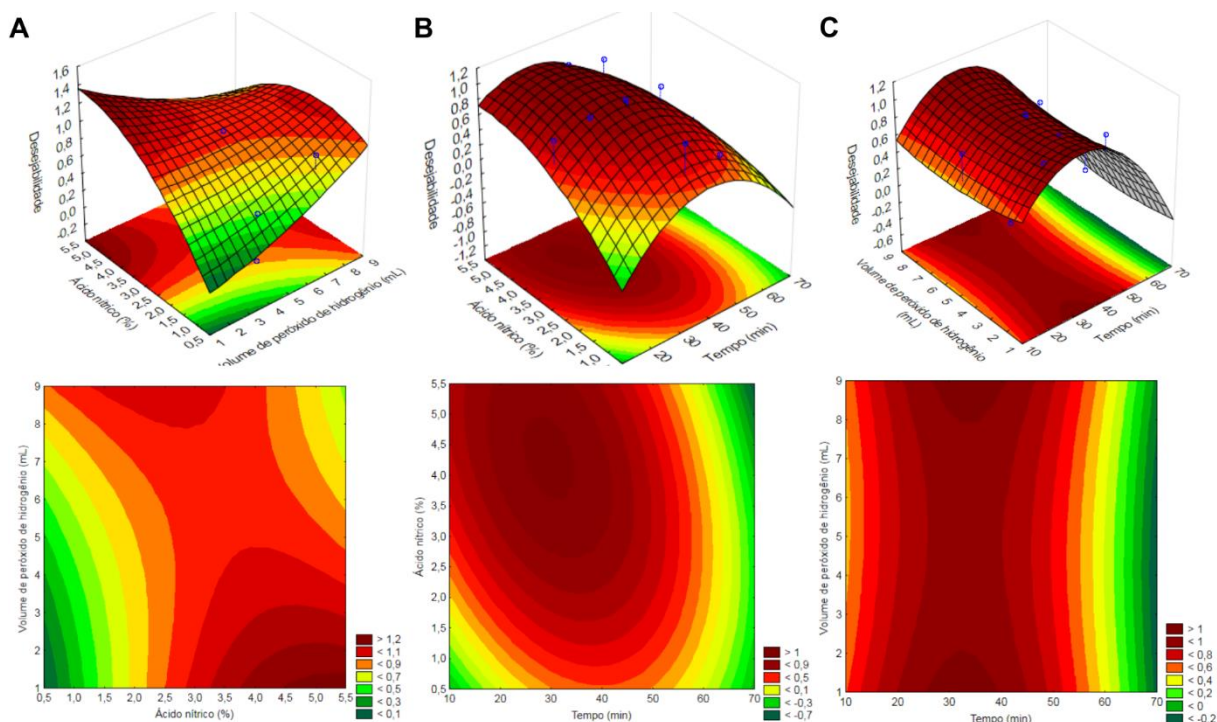
As condições otimizadas para extração assistida por radiação UV foram 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹), solução de HNO_3 3% (v v⁻¹) em tempo de 24 minutos, com recuperações para As de 95 e 93%, e desejabilidade 0,8 e 0,9, para os tecidos de peixe e vegetal, respectivamente. Tais condições corroboram com os preceitos da química analítica verde para minimização das quantidades de reagentes, menor tempo de reação e redução na geração de resíduos, além dos custos para o procedimento de extração.

Figura 8 – Superfície de resposta e gráfico de contorno traçados a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de Marandu



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9 – Superfície de resposta e gráfico de contorno traçados a partir do planejamento fatorial do tipo Doehlert para amostra de peixe.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Avaliação de parâmetros de desempenho dos métodos analíticos

Os resultados obtidos pelas análises por ICP-MS para o método consolidado de MW-AD e utilizando radiação UV apresentou curva analítica com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9949 para MW-AD e 0,9979 utilizando radiação UV, e a linearidade foi considerada aceitável conforme limites aceitáveis determinado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), com R^2 foi superior a 0,990. O LOQ e o LOD foram determinados a partir de medidas independentes de 10 brancos analíticos preparados nas mesmas condições das amostras. Sendo o LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) obtido de 0,17 e o LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 0,54 para o método MW-AD. Foram inferiores aos valores previamente relatados na literatura para procedimentos semelhantes de MW-AD. Barbosa et al. (2015) encontraram LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 7,0 para o As; Maciel et al. (2014) relataram LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 3,0; e Brito et al. (2017) relataram LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 3,0 e LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 9,0 para o As. Os resultados obtidos de LOD e LOQ para o método empregando UV neste trabalho, apresentou LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 0,16 e o LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 0,48. Ambos os métodos

propostos, MW-AD e UV neste trabalho, apresentaram sensibilidade e boa faixa linear de trabalho para determinação de As.

Os resultados das análises dos candidatos a materiais de referência aplicados nos métodos de MW-AD e utilizando UV forneceram recuperações aceitáveis, com valores de 88% e 90% e 93 e 85% para amostra de marandu e peixe, respectivamente. Nos dois métodos, as determinações não apresentaram diferença significativa em comparação aos valores certificados considerando que todos os valores t -calculado $<$ t -tabelado ($n = 3$). O teste t de Student indicou que não houve diferença significativa entre os valores obtidos experimentalmente e certificados, confirmando a eficiência da extração ácida assistida por radiação micro-ondas e por UV.

A precisão foi avaliada com base no desvio padrão relativo (RSD) obtido nas determinações quantitativas das amostras. Os RSDs ($n = 3$) encontrado para o método MW-AD foi de 11 e 3% para as amostras marandu e peixe, respectivamente. Uma possível explicação para o alto valor de RSD para a amostra de marandu pode ser devido a granulometria e forma das partículas, sendo uma amostra não tão homogênea e com boa distribuição de tamanhos de partículas. Dessa forma a matriz apresenta diferentes áreas superficiais de contato com o solvente, resultando em diferentes velocidades de decomposição, podendo comprometer a extração do arsênio de forma homogênea na amostra de marandu. Além disso, considerando que parte do elemento químico, arsênio, está ligado a fração de sílica presente na amostra, isso dificulta o rompimento das ligações do arsênio com a sílica e consequentemente a não liberação do arsênio para o solvente presente no meio reacional (CALLE et al., 2013). Embora o emprego da amostra de marandu apresenta essa desvantagem que resulta em alto valor de RSD, observa-se que tanto a amostra marandu como a de peixe apresentaram RSDs menores que 15% estando em conformidade com a norma de referência, INMETRO. Os resultados indicaram que o procedimento (MW-AD) e UV foram promissores na extração de As e que o ICP-MS forneceu sensibilidade necessária para este conjunto de amostras.

Os resultados obtidos de RSD cujas etapas de preparo de amostra foram empregadas à radiação UV o RSD foi de 0,69 e 1,59 para as determinações realizadas com as amostras marandu e peixe, respectivamente.

5.4 Avaliação dos métodos ambientalmente verdes

A ferramenta da Eco-Escala analítica foi aplicada para avaliar o quanto, ou em que extensão um processo ou procedimento conseguiu cumprir os princípios da Química Verde. Considerando as metodologias propostas neste trabalho, foi comparado os diferentes procedimentos aplicados pelo MW-AD com ácidos diluídos e pela radiação UV. A Eco-Escala analítica compara diferentes parâmetros e etapas em um procedimento analítico como, amostragem, preparo de amostra, análise, calibração, validação de método analítico, consumo de energia, geração de resíduos e risco ocupacional atribuindo pontos de penalidade à todas as substâncias envolvidas (GAŁUSZKA et al., 2012). Sabendo que a Eco-Escala varia de 0 a 100, os pontos totais de penalização foram somados e descontados do valor máximo.

Para o procedimento MW-AD foi atribuída a penalidade do uso do HNO_3 (4 pontos), o uso de H_2O_2 (4 pontos), formação de vapor ácido (3 pontos), geração de resíduo ácido (5 pontos), gasto energético alto (0 pontos), uso do ICP-MS (1 ponto), segurança (2 pontos), além da falta de tratamento do resíduo ácido (3 pontos). No procedimento utilizando a radiação UV as penalidades foram o uso do HNO_3 (4 pontos), o uso de H_2O_2 (4 pontos), formação de vapor ácido (3 pontos), geração de resíduo ácido (5 pontos), gasto energético (0 pontos), uso do ICP-MS (1 ponto), segurança (2 pontos) e falta de tratamento do resíduo ácido (3 pontos). Dessa forma, as pontuações obtidas foram 78 pontos para ambos os métodos (MW-AD) e UV. Os pontos obtidos da subtração classificam os procedimentos analíticos que empregam, MW-AD e UV, como excelentes métodos verdes.

Outro parâmetro considerado foi o consumo de energia elétrica (**Equação 12**) para a extração do arsênio nos diferentes procedimentos, MW-AD e por UV.

$$\text{Consumo (kWh)} = \frac{(\text{Potência, W}) \times \frac{\text{Tempo (h)}}{1000}}{\text{Amostra}} \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde, (KWh) é o consumo de energia elétrica para a extração; Potência (W) é atribuída à potência do equipamento; tempo (h) é o tempo de extração e amostra é a quantidade de amostra extraída ou digerida. O consumo de energia elétrica para a extração foi de 0,01 KWh por amostra para a câmara de foto-oxidação utilizando radiação UV e 0,05 KWh por amostra para MW-AD. Em termos de aproveitamento de

energia, a extração auxiliada pela radiação UV foi mais ecológica, utilizando menos energia em relação ao procedimento de MW-AD.

O método de digestão MW-AD é considerado um procedimento analítico eficaz e bem estabelecido para a decomposição de amostras orgânicas (ARAUJO et al., 2002; GONZALEZ et al., 2009). Porém, nem todos os laboratórios de preparo de amostra têm esse sistema pelo alto custo de compra e manutenção do próprio instrumento e dos acessórios. Com a implementação da câmara de foto-oxidação por radiação UV utilizada neste trabalho teve-se um custo total de R\$ 490,32, duzentas vezes menor quando comparado com o custo de aquisição do sistema de MW-AD (US\$ 16.000,00). Nesse sentido, vale ressaltar que a aquisição do sistema de preparo de amostra utilizando radiação UV foi mais econômica.

A utilização do protótipo para a extração aplicando a radiação UV, permitiu alcançar boas recuperações (> 90%) utilizando menor concentração de HNO_3 ($0,65 \text{ mol L}^{-1}$) e consequentemente menor geração de resíduos comparado ao procedimento de MW-AD que fez uso de maior concentração de HNO_3 (5 mol L^{-1}). A MW-AD apresentou um tempo total (tempo da rampa de aquecimento, permanência e de resfriamento) de 45 minutos para 12 amostras digeridas (16 amostras são digeridas em 1 hora), a câmara de foto-oxidação com radiação UV levou um tempo total de 24 minutos para extrair 12 amostras (30 amostras são extraídas em 1 hora). Em tais condições, melhor frequência analítica foi encontrada empregando a radiação UV no preparo de amostra.

Apesar dos métodos de extração assistida por radiação micro-ondas se mostrar rápido e eficiente, o método de extração por UV oferece vantagens como facilidade de uso, simplicidade, menor volume e concentração de reagentes, levando a menores volumes de resíduos gerados e com menor tempo de extração, acarretando em uma maior frequência analítica.

Tabela 11 – Comparação dos métodos MW-AD e UV neste estudo com outros trabalhos relatados na literatura

Matriz	Método	Analito	Técnica	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Extrator (Tipo e concentração)	Recuperação (%)	Referência
Espinafre	MW-AD	As e Cd	ICP-MS	60	190	HNO ₃ (70%) + H ₂ O ₂ (30%)	91 – 98	(KHAN et al., 2014)
Tecido de Ostra	MW-AD	As, Cd, Pb e Hg	ICP-MS	5	200	HNO ₃ (65%) + H ₂ O ₂ (30%) + HF	81 – 99	(YANG et al., 2007)
Farinha de arroz	MW-AD	As e Cd	ICP-MS	57	200	HNO ₃ (32%) + H ₂ O ₂ (30%)	101 – 102	(BRITO et al., 2017)
Planta	UV	Cd, Pb, Fe, Cu, Ni, Zn e Co	HPLC	60	85	H ₂ O ₂ (30%)	97 – 100	(BULDINI et al. 1996)
Amostras de chorume	UV	C	TOC	180	–	H ₂ O ₂ (30%)	97	(MORAIS; ZAMORA, 2005),
Marandu e peixe	MW-AD	As	ICP-MS	45	190	HNO ₃ (23%) + H ₂ O ₂ (30%)	88 e 90	Este estudo
Marandu e peixe	UV	As	ICP-MS	24	80	HNO ₃ (3%) + H ₂ O ₂ (30%)	93 e 85	Este estudo

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), carbono orgânico total (TOC), digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ultravioleta (UV).

A **Tabela 11**, compara as condições experimentais do método de MW-AD e com UV obtidos neste trabalho com os valores relatados na literatura. Comparando com os métodos MW-AD, este trabalho utilizou a mesma condição experimental e com concentrações menores de reagente para a extração de arsênio para os dois tipos de matrizes com complexidade diferentes, o que não é amplamente documentado na literatura.

A utilização da radiação UV para o preparo de amostra para a extração de elementos químicos ainda é pouco explorada, evidenciando a importância de avaliar seu potencial associado a química verde frente aos métodos de preparo de amostra convencionais que fazem uso de maiores quantidades de reagentes, tempo, temperatura reacional e com maior consumo de energia.

6 CONCLUSÃO

A utilização de um planejamento fatorial do tipo Doehlert permitiu estabelecer uma combinação ideal entre a concentração de HNO_3 , o tempo e temperatura de reação para a MW-AD. A melhor condição experimental foi obtida com a adição de 6 mL de solução de HNO_3 (5 mol L^{-1}) com 2 mL de H_2O_2 (30% v v⁻¹), temperatura de digestão de 190 °C por 15 minutos, com valores de carbono residual inferiores a 8% para ambas matrizes. O método proposto proporcionou baixos valores de LOQ, LOD e RSD (%), apresentou recuperação na faixa de 88 e 90% para arsênio em material de referência, marandu e peixe respectivamente, não evidenciando diferença estatisticamente significativa em relação aos valores certificados.

O procedimento de extração assistida por radiação UV proposto mostrou-se eficiente e altamente recomendável para extração de arsênio em matrizes vegetais e animais. Foi um processo de preparo de amostra simples, eficiente, com boa eficiência energética, alta frequência analítica e que priorizou a minimização do consumo de reagentes. A melhor condição experimental para ambas matrizes foram: tempo de extração de 24 minutos, volume de 2 mL de H_2O_2 (30 v v⁻¹) e 6 mL de solução de HNO_3 ($0,65 \text{ mol L}^{-1}$). A introdução do H_2O_2 e HNO_3 no sistema possibilitou a ocorrência do sinergismo dessas duas variáveis fornecendo o aumento da geração de espécies radiculares oxidantes, mediante a UV, aumentando significativamente a eficiência do procedimento. Utilizando a radiação UV as recuperações de arsênio foram de 93% e 85%, e os RSDs foi de 0,69 e 1,59, para o tecido vegetal e animal respectivamente.

O procedimento proposto pela câmara de foto-oxidação empregando a radiação UV se mostrou eficiente e confiável para a determinação de arsênio em amostra animal e vegetal, com as vantagens associadas ao menor consumo de reagentes, baixa temperatura de extração, quando comparados ao método MW-AD. Sendo, portanto, uma alternativa válida aos procedimentos de preparo de amostra convencionais. Além disso, o sistema UV é fácil de implementar, já que a lâmpada UV é disponível comercialmente de baixo custo comparado a aquisição do sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas. E por fim, o uso da Eco-Escala analítica mostrou que os métodos foram excelentes procedimentos verdes, com pontuação de 78 para ambos os métodos investigados neste estudo, classificando-os como excelentes métodos verdes.

7 ETAPAS EM DESENVOLVIMENTO

Deve-se ressaltar que toda condição pandêmica (COVID-19), principalmente em 2020 e primeiro semestre de 2021, nos impossibilitou de realizar boa parte do projeto, impactando diretamente na obtenção de evidências experimentais, uma vez que o comitê COVID-IBILCE/UNESP (<https://www.ibilce.unesp.br/Home/plano-ibilce--versao-de-07-de-maio-de-2021.pdf>) só autorizava pesquisas de nível 3 e 4, e a região de São José do Rio Preto – SP esteve e está em período de lockdown parcial. As atividades experimentais foram desenvolvidas respeitando o distanciamento social em adequação às diretrizes estabelecidas pela instituição e pelos órgãos de Saúde Pública competentes.

REFERÊNCIAS

- ACHCAR, J. A. **Planejamento de experimentos em engenharia e industria**. Brasil, ICMSC-USP, São Carlos-SP, 1995.
- AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants- A Review. **Talanta**, v. 115, p. 291–299, 2013.
- AN, J. et al. Combined use of collision cell technique and methanol addition for the analysis of arsenic in a highchloride-containing sample by ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 77–81, 2015.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press: New York, 1998.
- ANDRADE, F.P.; NASCENTES, C.C.; COSTA, L.M. Exploratory analysis for elemental characterization of biomass residues from biodiesel production by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analytical Letters**, v. 45, n. 18, p. 2835–2844, 2012.
- ARAÚJO, G. C. L. et al. A. Effect of acid concentration on closed vessel microwave-assisted acid digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2121–2132, 2002.
- ARMENTA, S. et al. Chapter One: Green Analytical Chemistry: The Role of Green Extraction Techniques. In: IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. **Comprehensive Analytical Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2017, p. 1–25.
- 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.; TYSON, J. F. Slurry sampling for determination of lead in marine plankton by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 86, n. 2, p. 227–234, 2007.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority List of Hazardous Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. United States, 2015.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Porto Alegre: Editora Bookman, 2006.
- 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.

BARBOSA, L. D. P. **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na bioremediação de efluentes ácidos contendo metais**. 2009. Dissertação (Mestrado em engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

BARELA, P. S. et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. **Fuel**, v. 204, p. 85–90, 2017.

BARRERA, M. et al. Photolytic treatment of organic constituents and bacterial pathogens in secondary effluent of synthetic slaughterhouse wastewater. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 9, p.1335–1350, 2012.

BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BENDICHO, C. et al. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p.681–691, 2010.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, 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, 2019.

BHATTACHARYA, P. et al. Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. **Science of The Total Environment**, v. 358, n. 1-3, p. 97–120, 2006.

BIZZI, C. A. et al. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted solutions of nitric acid and H₂O₂ for the determination of multi-elements of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p.332–338, 2014.

BIZZI, C. A. et al. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 8, p.1448–1466, 2017.

BRAUN, A. M.; MAURETTE, M. T.; OLIVEROS, E. **Photochemical technology**. v Chichester: John Wiley & Sons, 1991.

BRESSY, F. C. et al. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. **Microchemical Journal**, v. 109, p.145–149, 2013.

BRITO, A. L. B. et al. Determination of inorganic constituents and physicochemical characterization of functional flour sample. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 112-118, 2017.

BULDINI, P. L. et al. Ion Chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p.487-495, 2001.

BULDINI, P. L.; RICCI, L.; SHARMA, J. L. Recent Applications of sample preparation technique in food Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 47–70, 2002.

BULDINI, P. L. et al. Sample pretreatment by UV photolysis for the ion chromatographic analysis of plant material. **Journal of Chromatography A**, v. 739, n. 1-2, p. 167-173, 1996.

CALLAO, M. P. Multivariate experimental project in environmental analysis. **TrAC-Trends Analytical Chemistry**, v. 62, p.86–92, 2014.

CALLE, I. DE LA et al. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p.234–241, 2013.

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and optimization of multiple responses. Using the Desirability Function in Developing Analytical Methods. **Talanta**, v. 124, p.123–138, 2014.

CAPELO-MARTINEZ et al. Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 4, p.331–340, 2004.

CARRILHO, E. N. V. M. et al. Microwave-Assisted Acid Decomposition of Animal- and Plant-Derived Samples for Element Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 15, p.4164–4168, 2002.

CASSELLA, R. J.; SANTANA, O. D. DE; SANTELLI, R. E. Determination of arsenic in petroleum refinery streams by electrothermal atomic absorption spectrometry after multivariate optimization based on Doehlert design. **Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p.1967–1978, 2002.

CHAKRABORTY, S. et al. Arsenic accumulation in food crops: a potential threat in the Bengal Delta plain. **Water Quality, Exposure and Health**, v. 6, p. 233–246, 2014.

CHEMAT, F.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. D. L. Portability in analytical chemistry: a green and democratic way for sustainability. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 19, p. 94–98, 2019.

CLARK, J.H. Green Chemistry and environmentally friendly technologies. in: AFONSO, C. A. M.; CRESPO, J. G. (EDs.), **Green Separation Processes**, WILEY-VCH, Weinheim, p. 3–18, 2005.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n 357, de 17 e março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2005.

CORREIA, F. O. et al. Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. **Microchemical Journal**, v.135, p. 190–198, 2017.

D'ILIO, S. et al. Dynamic reaction cell ICP- MS for determination 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.

DAUD, N. K.; HAMEED, B. H. Decolorization of acid red 1 by fenton-like process using rice husk ash-based catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1-3, p. 938–944, 2010.

DEB, D. et al. Nutritional deficiency and arsenic manifestations: a prospective study in an arsenic endemic region of West Bengal, India. **Public Health Nutrition**, v. 16, n. 9, p.1644–1655, 2013.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

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, n. 7, p. 1283-1296, 2017.

EMBRAPA. Certificado de Análises: material de referência RM-Agro E1001a (*Brachiaria brizantha* cv *Marandu*). São Carlos, Brasil, 2013.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Technical fact sheet: Final rule for arsenic in drinking water**. 2001.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry– review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p.1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2–14, 2007.

FIALHO, L. L.; PEREIRA, C. D.; NÓBREGA, J. A. Combination of cool plasma and collision-reaction interface for correction of polyatomic interferences on copper signals in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. **Spectrochimica Acta: part B: atomic spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 389–393, 2011.

GAŁUSZKA, A. et al. The 12 principles of green analytical chemistry and the mnemonic meaning of green analytical practices. **Analytica Chimica Acta**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GEMPERLINE, P. (ED.). **Practical Guide to Chemometrics**. 2. ed. Nova York: CRC Press, 2006.

GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, United Nations, New York, USA, 2011.

GILBERT, A.; BAGGOTT, J. **Essentials of Molecular Photochemistry**. 1. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991.

GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, v. 2-3, p. 111–133, 1996.

GONZALEZ, M. H. et al. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396–401, 2009.

GOUVÊA, M. M. et al. Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para pré-tratamento de amostras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 337–343, 2014.

GOUBEIA, S. T. et al. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 2, p. 269–275, 2001.

GUIMARÃES-SILVA, A. K. et al. Evaluation of signal-to-background and Mg II/Mg I ratios as response for the optimization of rare earth elements determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 753–762, 2012.

GÜRAY, T. et al. Determination of optimization parameters based on the Box-project Behnken for extracting a cloud point from quinoline yellow using Brij 58 and applying this method to real samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 243, p.118800, 2020.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOLLMAN, J. et al. Degradation of pharmaceutical mixtures in aqueous solutions using UV/peracetic acid: kinetics, degradation pathways and comparison with UV/H₂O₂. **Chemosphere**, v. 248, p.125911, 2020.

HUG, S. J. et al. Solar Oxidation and Removal of Arsenic at Circumneutral pH in Iron Containing Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 10, p. 2114–2121, 2001.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization. Anais. Geneva, Switzerland: ICH, 2005.

INMETRO. **Orientação sobre validação de Métodos Analíticos**. Rio de Janeiro, Brasil: Coordenação Geral de Acreditação, 2018.

IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. data interpretation Analytical chemistry division. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 33, n. 6, p. 241–245, 1978.

JANSSENS, R. et al. Coupling of nanofiltration and UV, UV/TiO₂ and UV/H₂O₂ processes for the removal of anti-cancer drugs from real secondary wastewater effluent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p.103351, 2019.

KEEN, O. S. et al. The role of effluent nitrate in trace organic chemical oxidation during UV disinfection. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5224–5234, 2012.

KHAN, N. et al. Determination of minor and trace elements in aromatic spices by micro-wave assisted digestion and inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 158, p. 200–206, 2014.

KHOEI, A. J. et al. Application of physical and biological methods to remove heavy metals, arsenic and pesticides, Malathion and Diazinon from water. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 1, p. 21–28, 2019.

KIM, T. H. et al. Degradation and toxicity assessment of sulfamethoxazole and chlortetracycline using electron beam, ozone and UV. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227-228, p. 237–242, 2012.

KOEL, M. Do we need Green Analytical Chemistry? **Green Chemistry**, v. 18, n.4, p. 923–931, 2016.

KOMOROWICZ, I. et al. Arsenic speciation in mushrooms using dimensional chromatography coupled to an ICP-MS detector. **Chemosphere**, v. 233, p. 223–233, 2019.

KOUTROS, S. et al. Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 110, n.11, p.1273–1274, 2018.

KRUG, F. J. (ED.). **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 6. ed. Santa Maria: UFSM, 2006.

KRUG, F. J. et al. Solubilização e decomposição e sólidos inorgânicos. In: KRUG, F.J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar**. São Paulo: EditSBQ, 2019. p. 211–240.

LATIMER, G. W. (ED.). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th Edition, 2016. 20. ed. Rockville: AOAC International, 2016, p. 18.

LIMA, D. C. et al. Application of the factorial design and the desirability function to develop a unique analytical procedure for the determination of metals in different tissues of blue crab (*Callinectes danae*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.29, n. 9, p. 1885–1893, 2018.

MACIEL, J. V. et al. Feasibility of microwave- induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 145, p. 927-931, 2014.

MAITY, J. P. et al. Arsenic-induced health crisis in peri-urban villages of Moyna and Ardebok villages, West Bengal, India: an exposure assessment study. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 34, p. 563–574, 2012.

MANJUSKA, R.; DASH, K.; KARUNASAGAR, D. UV photolysis assisted digestion of food sample for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 260–265, 2007.

MARTINEZ, V. D. et al. Arsenic Exposure and the Induction of Human Cancers. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

MATOS, W. O. et al. Partial microwave-assisted wet digestion of animal tissue using a baby-bottle sterilizer for analyte determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 6, p. 615–618, 2009.

MECHE, A. et al. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. **Microchemical Journal**, v. 94, n. 2, p. 171–174, 2010.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; GUARNIERI, R. A. Microwave heating. In: FLORES, E. M. M (Ed.). **Microwave-assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014, p. 77–98.

MITRA, S. (ED.). **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.

MOHAMMED, E.; MOHAMMED, T.; MOHAMMED, A. Optimization of an acid digestion procedure for the determination of Hg, As, Sb, Pb and Cd in fish muscle tissue. **MethodsX**, v. 4, p. 513–523, 2017.

MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N. J. A. Stratis. Use of fractional factorial design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP-OES technique. **Talanta**, v. 71, n.1, p. 443–451, 2007.

MOMENBEIK, F. et al. Sensitive determination of carbohydrates labelled with p-nitroaniline by capillary electrophoresis with photometric detection using a 406 nm light-emitting diode. **Electrophoresis**, v. 27, n. 20, p. 4039–4046, 2006.

MORAIS, J. L.; ZAMORA, P. P. Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 123, n. 1-3, p.181–186, 2005.

MORO, G. D. et al. Comparison of UV/H₂O₂ based AOP as an end treatment or integrated with biological degradation for treating landfill leachates. **Chemical Engineering Journal**, v. 218, p. 133–137, 2013.

MOTA, A. L. N. et al. Advanced oxidation processes and their application in the petroleum industry: A Review. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 2, n. 3, p. 122–142, 2008.

MULLER, E. I. et al. Microwave-assisted wet digestion with H_2O_2 at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 156-157, p. 232–238, 2016.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

NASUHOGLU, D., YARGEAU, V., BERK, D. Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation ($\lambda = 254 \text{ nm}$). **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n.1, p. 67–75, 2011.

NIU, J. et al. Effects of environmental factors on sulfamethoxazole photodegradation under simulated sunlight irradiation: Kinetics and mechanism. **Journal Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1098–1106, 2013.

NÓBREGA, J. A. et al. Microwave-assisted digestion of organic: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272-276, 2012.

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.

NOVAES, C. G. et al. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology – Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017.

OLIVEIRA, L. H. B. et al. Evaluation of Distribution and Bioaccumulation of Arsenic by ICP-MS in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultivated in Different Environments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2455–2463, 2017.

PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EduFSCar, 2017.

PETTINE, M. et al. Dissolved inorganic carbon effect in the determination of arsenic and chromium in mineral waters by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 599, n. 2, p. 191–198, 2007.

PÉTURSDÓTTIR, Á. H. et al. Hydride generation ICP-MS as a simple method for determination of inorganic arsenic in rice for routine biomonitoring. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 5392–5396, 2014.

POSTGATE, J. R. et al. A. The genomes of *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v. 130, n. 7, p. 1597–1601, 1984.

POYATOS, J. M. et al. Advanced oxidation processes for wastewater treatment: State of the Art. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 205, n. 187, p. 187–204, 2010.

PRAVEEN, A. et al. Arsenic accumulation in Canna: Effect on the antioxidant defense system. **Applied Geochemistry**, v. 108, p.104360, 2019.

RAHMAN, M.M.; NAIDU, R.; BHATTACHARYA, P. Arsenic contamination in groundwater in the Southeast Asia region. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 31, p. 9–21, 2009.

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

ROSARIO-ORTIZ, F. L.; WERT, E.C.; SNYDER, S.A. Evaluation of UV/H₂O₂ treatment for product oxidation pharmaceuticals in wastewater. **Water Research**, v. 44, n. 5, p. 1440–1448, 2010.

SALAZAR, R. F. S. et al. Performance evaluation of collision–reaction interface and internal standardization in quadrupole ICP-MS measurements. **Talanta**, v. 86, p. 241–247, 2011.

SALEH, T. A. et al. Analytical methods for speciation, detection and measurement of mercury in water, oil and gas. **Analytical Chemistry**, v. 132, p.116016, 2020.

SANTOS, S. B. **Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelo método PIXE e ICP-MS**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SANTOS, W.P.C. et al. Optimization of a centrifugation and ultrasound assisted procedure for the determination of traces and key elements in marine invertebrates by ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p.169–173, 2010.

SHAHIDI, D.; ROY, R.; AZZOUZ, A. Advances in catalytic oxidation of organic pollutants – Prospects for thorough mineralization by natural clay catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 174–175, p. 277–292, 2015.

SIMPSON, L. A. et al. A dynamic reaction cell (DRC) solution to oxide-based interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis of the noble metals. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 12, p. 1375–1380, 2001.

SOUZA, L. A. et al. Determination and in vitro bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 8–14, 2018.

SOUZA, S. D. et al. Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in fertilizer minerals by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Parte B: Atomic Spectroscopy**, v. 96, p. 1–7, 2014.

STÜLP, S.; SILVA, C. P.; MARMITT, S. Avaliação eletroquímica e degradação fotoquímica do pesticida Malathion. *Revista Liberato*, v. 9, n. 12, p. 7–12, 2008.

TARANTINO, T. B. et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for multielement determination in rice by ICP OES and ICP-MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1007–1015, 2016.

TECLU, D. et al. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphatereducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2, p. 1157–65, 2009.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry: Theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 2869–2878, 2010.

TYLER, G. ICP-MS, or ICP-AES and AAS? - A comparison. Varian, ICP-MS instruments at work. Australia, 1994.

VANHAECKE, F. ICP-MS: Alternative means for the elimination of interferences. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n.1, p. 20–21, 2002.

VINATORU, A. et al. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **Analytical Chemistry**, v. 97, p. 159–178, 2017.

WATANABE, T.; HIRANO, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 969–979, 2013.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of sources, chemistry, risks, and best available strategies for remediation. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 42, p. 111–122, 2011.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Analytica Chimica Acta**, v. 226, p. 1–16, 1989.

YANG, K. X. et al. Determination of metals in marine species by microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, n. 10, p. 1177–1181, 2007.

YUAN, F. et al. Degradation of selected pharmaceutical products in aqueous solution with UV and UV/H₂O₂. **Water Research**, v. 43, n.6, p. 1766–1774, 2009.

ZHOU, C. Y. et al. Microwave digestion of biological samples with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetra acetic acid for element determination. **Talanta**, v. 43, n. 7, p. 1061–1068, 1996.