

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE As E Cd POR HPLC-ICP-MS EM  
FORRAGEIRA BRACHIARIA BRIZANTHA STAPF. CV. MARANDU  
CULTIVADA EM SOLO PREVIAMENTE CONTAMINADO**

**CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS,  
área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

**Orientadora: Ana Rita de Araujo Nogueira**

**\* bolsista CNPq**

**São Carlos - SP  
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A485eq

Amaral, Clarice Dias Britto do.

Especiação química de As e Cd por HPLC-ICP-MS em forrageira *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu cultivada em solo previamente contaminado / Clarice Dias Britto do Amaral. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

91 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

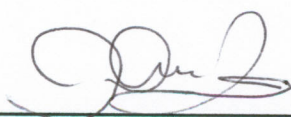
1. Química analítica. 2. Especiação química. 3. Arsênio. 4. Cádmio. 5. Fitoquelatinas. 6. HPLC-ICP-MS. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

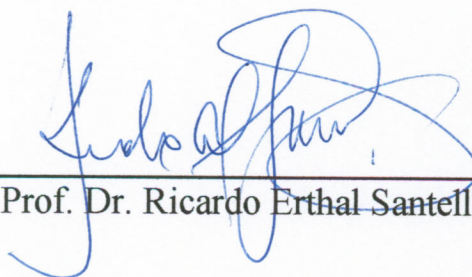
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata Clarice Dias Britto do Amaral, realizada em 21 de março de 2014:*



---

Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



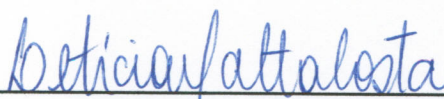
---

Prof. Dr. Ricardo Erthal Santelli



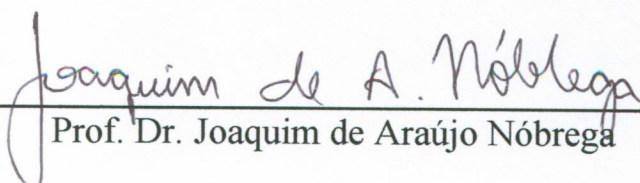
---

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha



---

Profa. Dra. Letícia Malta Costa



---

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

***“Porque se chamavam homens,  
também se chamavam sonhos  
e sonhos não envelhecem”***

(Milton Nascimento, Lô Borges e Márcio Borges)

*Dedico este trabalho aos meus pais  
por serem minha inesgotável  
fonte de incentivo e amor  
e ao Pedro pelo seu cuidado, amor e  
por compartilhar comigo momentos únicos!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais!

Aos meus pais pelo suporte, apoio, carinho e cuidado constante. Vocês representam o lugar seguro para onde sei que posso voltar. Amo vocês e sou muito grata por tudo!

Ao Pedro por estar na minha vida, por dividir comigo momentos muito especiais, pelo seu imenso coração que me inspira a ser um ser humano melhor. Poderia dizer muitas coisas, mas me limito a dizer EU TE AMO e obrigada por tudo!

Às minhas irmãs Janaína e Karina, por serem as minhas melhores amigas, por depositarem confiança em mim e por torcerem tanto pelo meu sucesso, amo vocês incondicionalmente!

Aos meus familiares que mesmo distantes sempre torceram muito por mim, avós, tios(as), primos(as), cunhados(as) e sobrinhos(as), obrigada por fazerem parte da minha vida.

À minha sogra Maria Helena e ao meu sogro Pedro Alexandrino (*in memoriam*) por todo o carinho e incentivo e por me tratarem como uma filha.

A todos os amigos de Ubá, Viçosa e aos que fiz em São Carlos, saibam que vocês têm um lugar especial na minha vida!

À Ana Rita pela amizade, grande confiança depositada, conselhos, orientação, carinho e por ser um pouco a nossa “mãe” em São Carlos!

Aos professores Joaquim e Edenir por toda ajuda durante a realização deste trabalho, mas mais do que isso, pelos conselhos e exemplos de vida e profissionalismo.

A todos os amigos do atual Gaia e ex-Gaia pelas muitas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente pelos inesquecíveis momentos de descontração: Alex, Aline, Amália, Amanda Augusto, Amanda

Maria, Ana Beatriz, Caio, Carla, Carol, Catarinie, Érica, Eveline, George, Jenny, Jomarc, Jonatan, Jozemir, Juan, Luana, Luciana, Lucimar, Mário, Marcelo, Natália, Patrícia, Poliana, Raquel, Renata, Rodolfo, Rodrigo Salazar, Rodrigo Rodrigues, Sidnei, Silmara, Tatiane, Thiago, Wendel e Wladiana.

À Embrapa Pecuária Sudeste pela infra-estrutura concedida para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e amigos da Embrapa Pecuária Sudeste: Ane Lysie, Gilberto Batista, Gilbertinho, Natal, Cidinha, Victor, Carlos, Cadu, Cris, Silvia Brondi, Sr. Avaré e Sr. Mineiro por toda ajuda e amizade.

Ao professor Daniel Cardoso do IQSC-USP por ter concedido o uso do equipamento ESI-MS e ao seu aluno de doutorado Leandro Arrivetti por toda ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários da UFSCar em especial aos funcionários do Departamento de Química.

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFSCar e em especial às funcionárias da secretaria da pós-graduação por toda atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas bolsas e recursos concedidos para pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelos recursos concedidos para a pesquisa.

A todos que de alguma forma participaram da realização deste sonho.

Muito obrigada!!!

## LISTA DE ABREVIATURAS

As(III) – Arsênio trivalente

As(V) – Arsênio pentavalente

AsB - Arsenobetaína

AsC – Arsenocolina

CE - Eletroforese capilar

CRI – Interface de colisão e reação

DMA - Ácido dimetilarsônico

DRC – Cella dinâmica de reação

ESI-MS - Espectrometria de massa com ionização por eletrospray

GC – Cromatografia gasosa

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

GSH - Glutathiona

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IC - Cromatografia iônica

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

ICP-QMS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e arranjo quadrupolar

IFS – Padrão de interferência

LC - Cromatografia líquida

LOD – Limite de detecção

MMA - Ácido monometilarsênico

MTs – Metalotioneínas

m/z – Razão massa/carga

PCs - Fitoquelatinas

PCn - ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly (n = 2–11)

RP – Fase reversa

SEC – Cromatografia de exclusão por tamanho



SFC - Cromatografia com fluido supercrítico

CRM - Material de referência certificado

TMA - Íon tetrametilarsônio

TMAO – Óxido de tetrametilarsônio

TOF – Analisador por tempo de voo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.1.1 Principais isótopos do As e Cd, abundância isotópica e seus principais interferentes poliatômicos. ....	10
Tabela 4.1.2.1 Condições operacionais para ICP-QMS (820 MS Varian).....	29
Tabela 4.1.4.1 Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas Ethos 1 (Milestone) para digestão total da amostra e do material de referência certificado.....	31
Tabela 4.2.1.1 Condições operacionais do acoplamento HPLC-ESI-MS .....	35
Tabela 5.1.2.1 Determinação de As e Cd por ICP-QMS em amostra e em material de referência certificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ), valores de recuperação do CRM (%) e limites de detecção e quantificação ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) introduzindo $80 \text{ mL min}^{-1}$ de $\text{H}_2$ na CRI.....	42
Tabela 5.1.2.2 Valores máximos permitidos de arsênio e cádmio para solos e águas subterrâneas. <sup>106</sup> .....	43
Tabela 5.1.4.1 Concentração das espécies de As e soma das mesmas na amostra ( $\text{mg kg}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ) para os diferentes procedimentos de extração empregados com e sem o uso do IFS. ....	48
Tabela 5.1.4.2 Recuperações (% , média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ) das espécies de arsênio adicionadas antes do procedimento de extração ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie) com e sem uso de IFS. ....	50
Tabela 5.1.4.3 Comparação entre os parâmetros de desempenho com e sem o uso do IFS para os procedimentos de extração. ....	53
Tabela 5.1.6.1 Razão As(III)/As(V) extraída e porcentagem total de As extraída para as condições da amostra avaliadas. ....	59
Tabela 5.1.6.2 Concentração das espécies de arsênio ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontradas na planta armazenada sob diferentes condições. ....	63
Tabela 5.2.2.1 Glutationa (GSH), fitoquelatinas (PC2 e PC3), formas reduzidas dos complexos e complexos As-PC encontradas nas amostras de forrageira.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.2.3.1 Foto da “planta desenvolvida” e das mudas no dia em que foi feito o corte.....	37
Figura 4.2.3.2 Caixas de germinação onde foram plantadas sementes de forrageira para avaliação dos teores de As e Cd a ser adicionados. ....	38
Figura 4.2.3.3 Amostras germinadas após receberem 20 mg L <sup>-1</sup> de As e de Cd e das folhas e raízes pré-moagem. ....	38
Figura 5.1.1.1 Foto das forrageiras cultivadas em vasos para estudo de especiação de arsênio e cádmio.....	40
Figura 5.1.3.1 Cromatogramas das espécies de As obtidos por HPLC-ICP OES em diferentes valores de pH, fase móvel: tampão fosfato (25 mmol L <sup>-1</sup> ).....	45
Figura 5.1.3.2 Cromatograma das espécies de As (50 µg L <sup>-1</sup> ) obtidos por HPLC-ICP-MS, fase móvel: pH 5,6 e tampão fosfato (12,5 mmol L <sup>-1</sup> ). ....	45
Figura 5.1.4.1 Cromatogramas (HPLC-ICP-QMS) obtidos para as espécies de As e para a possível interferência em m/z 77 para os procedimentos 1 – 6, respectivamente (a) - (f). ....	54
Figura 5.1.4.2 Comparação entre os cromatogramas (referentes ao extrato do Procedimento 3) obtidos por HPLC-ICP-QMS sem (a) e com a utilização do método do IFS (b). ....	55
Figura 5.1.6.1 Concentração de espécies de As na amostra (mg kg <sup>-1</sup> ; média±desvio padrão; n=3) em função do tempo e condições de armazenamento.....	58
Figura 5.2.1.1 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS; (a) padrão inorgânico de As, (b) padrão inorgânico de Cd, (c) padrões inorgânicos de As, Cd e glutathiona. ....	66
Figura 5.2.1.2 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS para Cd e As dos extratos das amostras armazenadas sob temperatura de -18 °C.....	67

Figura 5.2.1.3 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS para Cd e As dos extratos das amostras armazenadas sob temperatura de -80 °C.....	67
Figura 5.2.2.1 Espectro de massa do padrão de PC <sub>2</sub> degradado.....	70
Figura 5.2.2.2 Separação dos padrões de glutatona (m/z 308); PC <sub>2</sub> (m/z 540) e PC <sub>3</sub> (m/z 772) através do acoplamento HPLC-ESI-MS. ....	71
Figura 5.2.2.3 Espectro de massa dos compostos GSSG (m/z 538) e PC <sub>2</sub> oxidada (m/z 613) observados quando injetada uma mistura de GSH, PC <sub>2</sub> , PC <sub>3</sub> , As e Cd. ....	72
Figura 5.2.2.4 Cromatograma HPLC-ESI-MS da amostra de caule das mudas e espectros de massa dos compostos GSH (m/z 308); PC <sub>2</sub> (m/z 540); PC <sub>3</sub> (m/z 772); As <sup>(III)</sup> -PC <sub>3</sub> (m/z 844); GS-As <sup>(III)</sup> -PC <sub>2</sub> (m/z 919) e As <sup>(III)</sup> -(GS) <sub>3</sub> (m/z 993). 78	

## RESUMO

### **Especiação química de As e Cd por HPLC-ICP-MS em forrageira *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu cultivada em solo previamente contaminado**

As recentes pesquisas e progressos em química analítica evidenciam que a determinação do teor total de um elemento, embora essencial, é limitada uma vez que não é suficiente para fornecer informações a respeito de biodisponibilidade e toxicidade das espécies. Geralmente, as plantas são a principal via de entrada de elementos químicos (essenciais ou tóxicos) na cadeia alimentar. A especiação de arsênio em plantas é importante uma vez que o mesmo pode ser encontrado nas formas inorgânicas, mais tóxicas ou formas metiladas, menos tóxicas. Além disso, tanto o As como o Cd podem se ligar a fitoquelatinas (tri peptídeos) que são formados no tecido vegetal como um mecanismo de defesa ao estresse causado por elementos potencialmente tóxicos. Este projeto de pesquisa visou a determinação e a especiação dos elementos As e Cd em forrageira do gênero *Brachiaria brizantha* cv. Marandu cultivada em solo previamente contaminado com esses elementos. Na primeira parte do trabalho os contaminantes foram adicionados ao solo e após determinado período as forragens foram cortadas, liofilizadas e moídas em moinho criogênico, bem como determinados os teores totais de As e Cd por ICP-QMS, sendo obtidos  $2,3 \pm 0,27$  mg kg<sup>-1</sup> de As e  $2,9 \pm 0,07$  mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Na segunda parte do trabalho, a separação e a identificação das espécies As(III), As(V), MMA (ácido monometilarsênico) e DMA (ácido dimetilarsônico) foram realizadas utilizando coluna de troca aniônica e o acoplamento HPLC-ICP-MS. Diferentes preparos de amostra envolvendo os extratores água, metanol e ácido nítrico diluído foram avaliados para a especiação de As. O método do padrão de interferência (IFS), utilizando <sup>83</sup>Kr<sup>+</sup>, foi empregado para corrigir interferências

espectrais sobre  $^{75}\text{As}^+$  causadas por espécies poliatômicas, como  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ . O procedimento de extração que utilizou solução de ácido nítrico diluído a 90 °C foi o mais eficiente, com recuperação quantitativa (~90 %) das quatro espécies de As avaliadas. Melhoria na exatidão de 77 % para 94 % foi obtida utilizando o método IFS. A terceira parte do trabalho envolveu o estudo da estabilidade de espécies de As ao longo de 12 meses em amostras armazenadas sob diferentes condições e temperaturas, com determinações realizadas bimestralmente. Para as espécies de arsênio avaliadas, a liofilização seguida por moagem criogênica foi o procedimento de preparo que forneceu os melhores resultados. Baixas temperaturas isoladamente não se mostraram adequadas para o armazenamento das amostras, pois resultaram em recuperações pouco eficientes, sendo o tamanho de partícula da amostra determinante na escolha do melhor procedimento de armazenamento. A quarta parte do trabalho abordou a avaliação de espécies de As-fitoquelatinas e Cd-fitoquelatinas empregando HPLC-ICP-MS na determinação dos isótopos e HPLC-ESI-MS na determinação das fitoquelatinas. Não foram encontradas fitoquelatinas nas amostras armazenadas por longo período, mesmo que em baixas temperaturas, o que evidencia a instabilidade das espécies. Amostras recém-cortadas e extraídas foram analisadas por ESI-MS, sendo encontradas entre raízes, folhas e caule, principalmente glutathiona (m/z 308); as fitoquelatinas PC<sub>2</sub> (m/z 540) e PC<sub>3</sub>(m/z 772), as respectivas formas oxidadas dessas e o composto As-PC<sub>3</sub> (m/z 844). As novas exigências legais e restrições ao comércio exigem o desenvolvimento de procedimentos analíticos para medir espécies metalóides em grande variedade de tecidos animais e vegetais. Com o uso complementar de técnicas como ICP-MS e ESI-MS acopladas à HPLC tem se tornado viável a determinação de espécies pouco exploradas.

## ABSTRACT

### **Chemical speciation of As and Cd by HPLC-ICP-MS in *Brachiaria Brizantha* Stapf. cv. Marandu forage grown in a previously contaminated soil**

Recent research and advances in analytical chemistry show that the total content determination of an element, although it is essential, is limited since it is not sufficient to provide information about the bioavailability and toxicity of the species. Furthermore, plants are usually the main route of chemical elements (essential or toxic) entry in the food chain. Arsenic speciation in plants is important since it can be found in inorganic forms, more toxic, or methylated forms, less toxic. Moreover, both As and Cd can bind to phytochelatin (tri peptides) that are formed in plant tissue as a defense mechanism to the stress caused by potentially toxic elements. This research project aimed the determination and speciation of As and Cd in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu forage grown in previously contaminated soil. In the first part of the work, these contaminants were added to the soil and after a certain period of time the forages were harvested, frozen-dried and ground in freezer mill containing liquid N<sub>2</sub>. As well as it was determined the total content of As and Cd by ICP-QMS. The mean concentrations found were  $2.3 \pm 0.27$  mg kg<sup>-1</sup> of As and  $2.9 \pm 0.07$  mg kg<sup>-1</sup> of Cd. In the second part of the work, the separation and identification of As(III), As(V), MMA (monomethylarsonic acid), and DMA (dimethylarsinic acid) species were performed using an anion exchange column and HPLC-ICP-MS. Different sample preparation involving water, diluted nitric acid solution and a water–methanol mixtures were evaluated in order to extract As species in plant samples. The interference standard (IFS) method using <sup>83</sup>Kr<sup>+</sup>, was employed to minimize spectral interferences on <sup>75</sup>As<sup>+</sup> determination caused by polyatomic species such as <sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>. The procedure that presented the best

performance was the one using nitric acid solution with extractions carried out at 90 °C, an efficiency of 90 % and quantitative extraction of all four As species were achieved. Improvement in accuracy from 77 % to 94 % was obtained using the IFS method. The third part of the work evaluated the As species stability in samples stored under different temperatures along 12 months, with periodical determination of them (each two months). It can be concluded that for As species evaluated, lyophilization and frozen-dried were the best sample preparation strategies. Sample storage at low temperatures resulted in poor extraction efficiency, furthermore, the sample particle size was the critical factor for choosing the best processing and storage procedure of sample. The fourth part addressed the evaluation of As-phytochelatin and Cd-phytochelatin species using HPLC-ICP-MS for the isotopes determination and HPLC-ESI-MS in order to do the phytochelatin analysis. Phytochelatin were not found in the samples stored for long periods, even at low temperatures, which demonstrates the species instability. Freshly-harvested and extracted samples were analyzed by ESI-MS and mainly glutathione ( $m/z$  308); the phytochelatin  $PC_2$  ( $m/z$  540) and  $PC_3$  ( $m/z$  772), their respective oxidized forms and the compound As- $PC_3$  ( $m/z$  844) were found among roots, leaves and stems. The new legal requirements and trade restrictions require the development of analytical procedures to measure metalloid species in a variety of animal and plant tissues. With the combination of techniques such as ICP-MS and ESI-MS coupled to HPLC has become feasible the determination of uncommon species.



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Especificação química.....	3
2.2. O acoplamento HPLC-ICP-QMS.....	5
2.3. Estratégias para corrigir interferências em ICP-QMS.....	9
2.4. Especificação de As.....	13
2.5. Especificação de Cd.....	15
2.6. A forrageira <i>Brachiaria brizantha</i> Stapf. cv. Marandu.....	16
2.7. Preparo de amostra para especificação.....	18
2.8. Estabilidade das espécies.....	23
3. Objetivos.....	26
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Plantio e cultivo da forrageira, determinação do teor total de arsênio e cádmio e especificação de arsênio.....	27
4.1.1. Plantio e cultivo das forrageiras.....	27
4.1.2. Instrumentação.....	28
4.1.3. Reagentes e soluções padrão.....	30
4.1.4. Determinação total de arsênio e cádmio por ICP-QMS. ....	30
4.1.5. Otimização das condições de separação de espécies de arsênio em coluna cromatográfica.....	31
4.1.6. Procedimentos de extração das espécies de As em forrageira.....	32
4.1.7. Estudo da estabilidade das espécies de arsênio à longo prazo, pré-tratamento da amostra e condições de armazenamento.....	34
4.2. Determinação de As e Cd ligados a fitoquelatinas.....	35
4.2.1. Instrumentação.....	35
4.2.2. Reagentes e padrões.....	36
4.2.3. Cultivo das amostras e procedimento de extração das fitoquelatinas.....	36
5. Resultados.....	39
5.1. Plantio e cultivo da forrageira, determinação do teor total de arsênio e cádmio e especificação de arsênio.....	39

5.1.1.	Plantio e cultivo das forrageiras.....	39
5.1.2.	Determinação do teor total de As e Cd na forrageira .....	40
5.1.3.	Otimização das condições de separação de espécies de arsênio por cromatografia líquida de alta eficiência .....	43
5.1.4.	Resultados obtidos para os procedimentos de extração empregados para especiação de As e avaliação do uso do método do padrão de interferência (IFS). .....	46
5.1.5.	Conclusões Parciais.....	55
5.1.6.	Estudo da estabilidade de espécies de arsênio em plantas armazenadas sob diferentes condições e temperaturas ao longo de 12 meses	56
5.1.7.	Conclusões Parciais.....	65
5.2.	Determinação de Cd e As ligados a fitoquelatinas.....	65
5.2.1.	HPLC-ICP-QMS .....	65
5.2.2.	HPLC-ESI-MS .....	68
5.2.3.	Conclusões Parciais.....	79
6.	Conclusões Gerais .....	80
7.	Referências Bibliográficas .....	82

## 1. Introdução

Os elementos químicos se apresentam como constituintes naturais de solos, águas, plantas e outros meios ou resultantes de intervenções antrópicas. Apresentam uma importância indiscutível para preservação e vitalidade dos tecidos vegetais e animais, bem como para o equilíbrio do planeta considerando-se os seus complexos mecanismos de conservação das espécies nele presentes. A forma como um elemento se encontra na matriz e a quantidade ingerida ou absorvida do mesmo por organismos vegetais e animais determinam a toxicidade ou essencialidade desse elemento.

A presença de metais potencialmente tóxicos no solo seja proveniente de adubação, pesticidas e herbicidas, seja por um descarte indevido de resíduos, está estreitamente ligada à contaminação de organismos vivos que tenham algum tipo de vínculo com esse meio. Na maioria das vezes as plantas são a principal via de entrada de elementos químicos (essenciais ou tóxicos) na cadeia alimentar, apresentando benefícios ou riscos para a saúde humana. A determinação de metais e não metais em materiais vegetais é importante para se ter conhecimento de fontes de nutrientes e minerais, além do que a avaliação dos constituintes de materiais vegetais pode ser explorada para ajudar na recuperação de solos contaminados ou para tratar de desnutrição mineral.<sup>1,2</sup>

As recentes pesquisas e progressos em química analítica evidenciam que a determinação do teor total de um elemento, embora essencial, é limitada uma vez que não é suficiente para fornecer informações a respeito da biodisponibilidade, toxicidade, essencialidade, transporte e características físico-químicas, informações potencialmente obtidas em análises de especiação. O mesmo elemento a depender da sua forma pode ser essencial ou tóxico; espécies inorgânicas de arsênio, As(III) e As(V), são as mais tóxicas, enquanto as formas orgânicas DMA e MMA, são relativamente menos tóxicos e a arsenocolina (AsC) e arsenobetaína (AsB) são consideradas não tóxicas. A ligação do Cd e de

outros metais à metalotioneínas em tecidos animais e à fitoquelatinas em tecidos vegetais é um mecanismo de defesa de tais organismos a fim de diminuir a toxicidade do metal livre nos seus tecidos.<sup>3,4</sup>

O crescimento intenso em pesquisas sobre especiação química estimulou o desenvolvimento e utilização de técnicas hífenadas (acopladas) o que propicia uma detecção mais confiável e robusta das espécies, pois une técnicas de separação como cromatografia líquida ou gasosa a técnicas analíticas de determinação com baixos limites de detecção, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

O preparo de amostra é um ponto crucial em especiação, pois deve-se preservar as espécies químicas em suas formas originais. Portanto, a escolha do preparo de amostra deve ser determinada de acordo com a matriz e com o fator de pré-concentração requeridos, para que seja minimizada a diferença entre a concentração do analito na amostra e os limites de detecção da instrumentação analítica escolhida. Além disso, durante a amostragem e extração dos analitos, diversos fatores podem comprometer a estabilidade das espécies, o que requer uma condição de compromisso entre o preparo de amostra, as espécies avaliadas e o tipo de amostra.

De acordo com esse contexto torna-se extremamente relevante o estudo de elementos potencialmente tóxicos em alimento animal (forrageiras) cultivadas em solos contaminados, devido ao potencial dano que os mesmos podem causar quando são transportados da solução do solo para a planta. Em especial essa proposta vai além, pois busca a especiação química dos elementos Cd e As, a fim de avaliar como essas espécies se distribuem no tecido vegetal.

Os resultados desta tese de doutoramento são apresentados na forma de capítulos cujo conteúdo é brevemente descrito a seguir. É apresentada uma breve revisão bibliográfica que versa sobre especiação química, o acoplamento HPLC-ICP-MS como instrumentação empregada neste tipo de estudo, estratégias para minimizar interferências em ICP-MS, a importância do tipo de

amostra empregada, o preparo de amostra para especiação, as espécies investigadas, os elementos objetos de estudo e a estabilidade das espécies. Assim como em relação aos materiais e metodologias, a apresentação dos resultados é dividida em dois grandes grupos. Após esses, é apresentada uma conclusão de cada parte e ao final do trabalho a conclusão geral.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Especiação química**

A especiação química é um tipo de análise que envolve a separação e a determinação das formas ou espécies químicas de um elemento. A IUPAC (INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY) define a especiação química de um elemento como um procedimento de avaliação da distribuição do metal entre várias formas ou espécies em uma determinada matriz.<sup>5</sup>

TEMPLETON et al. abordaram de forma sistemática, os níveis de estrutura em que as espécies podem ser consideradas distintas e essas compreendem a composição isotópica, o estado eletrônico ou de oxidação, os complexos inorgânicos, os complexos orgânicos, os compostos organometálicos e, finalmente, as macromoléculas.<sup>5</sup>

Quanto à especiação da composição isotópica, COSTAS-RODRÍGUEZ et al. investigaram um possível efeito da dieta sobre a composição isotópica de Zn no sangue a partir de populações com hábitos alimentares diferentes, após análise isotópica de Zn em alimentos. Isso porque as taxas de absorção de zinco sugerem estar relacionadas ao isótopo. Os resultados mostraram que a dieta deve influenciar na composição isotópica de zinco, uma vez que os valores mais baixos de  $\delta^{66}\text{Zn}$  encontrados em alimentos de origem animal parecem refletir no

baixo valor  $\delta^{66}\text{Zn}$  observada no sangue de uma população onívora comparada ao de uma população vegetariana. <sup>6</sup>

Quanto ao estado de oxidação, tanto o As (III), quanto o As(V) são considerados tóxicos, no entanto compostos de arsênio trivalente são geralmente 60 vezes mais tóxicos do que os compostos de arsênio pentavalente. <sup>7</sup> Por outro lado, o ferro é um elemento nutricional essencial para todas as formas de vida, no entanto, a sua absorção está correlacionada ao seu estado de oxidação, sendo que os sais de Fe(II) são melhor absorvidos do que o Fe(III), o que pode estar relacionado entre outras coisas à sua maior solubilidade. <sup>8</sup>

Quanto aos complexos inorgânicos, conhecendo a espécie inorgânica de U(VI) e por meio da técnica TRLIF (time-resolved laser-induced fluorescence) foi possível estudar a formação de complexos mistos ou ternários de U com substâncias húmicas (ácidos M-OH/CO<sub>3</sub><sup>-</sup> ácido húmico). Variando o pH e a concentração de urânio na ausência de íons carbonato e fixando a força iônica, foi possível, juntamente com UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> livre, identificar de forma espectral e temporal todos os complexos inorgânicos de urânio - OH, conhecidos como (UO<sub>2</sub>OH)<sup>+</sup>, UO<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>, [UO<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, [(UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, [(UO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(OH)<sub>5</sub>]<sup>+</sup> e [(UO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(OH)<sub>7</sub>]<sup>-</sup>. <sup>9</sup>

Complexos orgânicos de Cd-fitoquelatinas foram investigados em plantas hiperacumuladoras de Cd (*Brassica chinensis*). Os autores apontam não apenas que os complexos PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub>, PC<sub>4</sub>, PC<sub>5</sub> e desGlu-PC<sub>3</sub> foram induzidos a formação sob estresse de Cd, mas também que informações importantes sobre complexos Cd-PC *in vivo* foram obtidas. Como o Cd é um metal ávido por enxofre, existe uma forte tendência para a complexação de Cd com PCs, e isso reduz significativamente a toxicidade do Cd livre nos tecidos vegetais, pois os complexos Cd-PC são alocados no vacúolo da célula. <sup>10</sup>

Quanto aos compostos organometálicos, traços de MMA (monometilarsênio) e DMA (dimetilarsênio) foram encontrados em alguns tipos de plantas ou *habitats*. <sup>11</sup> Não se sabe ao certo se todos os tipos de plantas são

capazes de metilar espécies inorgânicas de arsênio, ou se estes compostos organometálicos são absorvidos a partir do solo por plantas, já sob a forma metilada.<sup>12,13</sup>

E finalmente, a especiação em nível macromolecular foi realizada empregando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) com detecção por UV e detecção off-line por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) para investigar a associação de cobre a espécies de alta massa molecular e baixa massa molecular presentes na polpa de açaí. O cobre foi encontrado associado às espécies de 28,7 kDa, 2,6 kDa e 0,43 kDa na amostra de polpa de açaí. Os níveis mais elevados de cobre foram encontrados associados às massas moleculares de 28,7 kDa (43,8% da soma total de cobre nas frações) e 2,6 kDa (41,5%).<sup>14</sup>

Independente do nível de especiação ao qual se dedica a investigar, pode-se perceber que todos agregam informações relevantes, as quais não seriam obtidas apenas com a determinação do teor total de um elemento, muito embora a mesma não deixe de ser importante.

## **2.2. O acoplamento HPLC-ICP-QMS**

Em procedimentos de especiação, geralmente faz-se uso do acoplamento de uma técnica de separação a uma técnica de detecção. Quando os analitos a serem estudados estão em concentrações em níveis traço é importante que ambas as ferramentas sejam bastante eficientes. A cromatografia é uma técnica de separação físico química constituído de duas fases, comumente chamadas de fase móvel e fase estacionária. A fase móvel, ao percorrer a fase estacionária, irá carregar os analitos em diferentes tempos a depender da afinidade dos mesmos por essa última. Dessa forma dá-se a separação dos analitos.<sup>15</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta adeptos nos mais diversos segmentos, embora existam outras técnicas de separação como

cromatografia gasosa (GC), cromatografia com fluido supercrítico (SFC), cromatografia iônica (IC) e eletroforese capilar (CE), isso porque são muitas as vantagens apresentadas pela HPLC.

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência é composto basicamente pelos seguintes componentes: fase móvel, bomba, válvula de injeção, coluna cromatográfica e detector e muitas são as possibilidades em análises por HPLC. Quanto à coluna ela pode ser catiônica ou aniônica, separando as espécies por carga; a eluição pode ser do modo isocrático, onde a composição da fase móvel é constante durante a eluição ou pode ser por gradiente, ou seja, a composição da fase móvel varia durante a eluição; podem ser utilizadas diferentes fases móveis e estacionárias, e isso é importante por permitir a alteração das características da fase móvel, ajustando-se à melhor separação das espécies. Algumas são: alta resolução, baixo tempo de análise, a fase estacionária pode ser utilizada mais de uma vez, automação e alta versatilidade quanto à introdução da amostra, uma vez que a única exigência é que a mesma seja solúvel na fase móvel. Como desvantagens tem-se o custo do equipamento e da sua manutenção.<sup>16</sup>

Detectores sensíveis são cada vez mais necessários, uma vez que a concentração do analito em amostras biológicas e ambientais são da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\text{ng L}^{-1}$ . A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é uma técnica que se adequa bem quando se busca a determinação de elementos traço nas mais distintas matrizes, uma vez que alia rapidez, alta sensibilidade e o caráter multielementar.<sup>17</sup>

A instrumentação ICP-MS apresenta seis compartimentos principais, sendo o primeiro o sistema de introdução da amostra e geração do aerossol; a ionização por uma fonte de plasma de argônio; a interface com os cones de amostragem e skimmer; o sistema de lentes iônicas; o analisador de massa e o detector. A ionização em fonte de plasma ocorre à pressão atmosférica, sendo que o plasma de argônio possui energia (15,7 eV) e temperaturas de até 10000



K, o suficiente para dessolvatar e ionizar os elementos em solução. Com exceção de alguns halogênios e semi-metals, a maioria dos elementos atinge grau de ionização superior a 90 %. O plasma gera, predominantemente, cátions monovalentes e, em menor proporção, cátions divalentes e íons moleculares. Os íons produzidos no plasma são transferidos para uma região de alto vácuo, que varia de  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  torr, por meio de uma interface contendo cones metálicos (cone de amostragem e skimmer) com orifícios diminutos, da ordem de 0,8-1,2 mm e 0,4-0,8 mm. Os íons são focalizados empregando-se lentes iônicas e devido à ação dos campos elétricos e magnéticos sobre os íons com distintas razões massa/carga, cada íon descreve uma trajetória, ocasionando a seleção do isótopo que atingirá o detector a cada momento, quando o sinal gerado é amplificado.<sup>17</sup>

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) tem sido amplamente empregada na análise de traços, no intuito de se obter alta sensibilidade, frequência analítica e resultados confiáveis. A técnica oferece vantagens atrativas, tais como o caráter multielementar, os baixos limites de detecção, a possibilidade de medidas de razão isotópica, análises por diluição isotópica, ampla faixa linear, alta sensibilidade e precisão, além do fácil acoplamento a técnicas de separação, como a cromatografia líquida.<sup>17,18</sup> No entanto, a exatidão na determinação de alguns isótopos pode ser comprometida pela ocorrência de interferências isobáricas, espectrais, matriciais e de transporte. Isso porque os espectrômetros equipados com analisador de massa quadrupolar não têm resolução suficiente para diferenciar o analito das muitas interferências espectrais formadas, na região do plasma e interface com razão  $m/z$  igual ao do analito, principalmente na faixa de massa/carga entre 40 e 80 u.m.a.

Devido à sua robustez enquanto método, o ICP-MS acoplado a técnicas de separação vem sendo largamente usado em especificação química de metais e semimetals, sendo um dos métodos de maior sensibilidade encontrado

atualmente. O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o ICP-MS na especiação de elementos químicos é empregado devido ao alto poder de separação do HPLC aliado ao fato de se poder trabalhar com analitos voláteis e não voláteis.<sup>3,19,20,21</sup>

Para a determinação e separação de oito espécies de arsênio em plantas cultivadas em solo contaminado, utilizou-se a cromatografia de íons acoplada ao ICP-MS, por ser uma instrumentação sensível e seletiva.<sup>22</sup> Em outro estudo com amostras de cogumelos, a técnica utilizada na determinação de As e comparação dos níveis do mesmo em espécies cultivadas em ambiente contaminado e sem contaminação, foi HPLC-ICP-MS, mostrando-se bastante eficaz.<sup>23</sup>

O trabalho de TAKATERA e WATANABE<sup>19</sup> mostrou que a hifenação HPLC-ICP-MS tem alto potencial na especiação de elementos traço como o cádmio ligado a proteínas em organismos vivos. SADI et al.<sup>4</sup> utilizaram coluna de fase reversa no acoplamento HPLC-ICP-MS a fim de promover a separação de espécies de Cd ligadas a fitoquelatinas (PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> e PC<sub>4</sub>) em amostras de *Arabidopsis thaliana*. LORETI et al.<sup>24</sup> também utilizaram a hifenação HPLC-ICP-MS para separação e determinação de compostos de Cd ligados a fitoquelatinas. Nesse trabalho os autores evidenciaram a dificuldade de se especiar Cd em plantas devido aos inúmeros compostos que podem ser sintetizados durante seus processos metabólicos e em função do reduzido número de padrões existentes.

Instrumentação sensível e de alta resolução, como a espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) tem sido empregada para a obtenção de informações sobre a ligação metal-molécula. As principais vantagens deste tipo de técnica são as informações moleculares obtidas devido a branda ionização empregada e o fato de não ser necessário o uso de padrões para todas as espécies, muitas vezes não existentes, devido à complexidade e variedade de compostos presentes em algumas matrizes. Compostos organoarsênicos e produtos da degradação do ácido o-arsanílico e ácido

fenilarsônico foram isolados e identificados em amostras de solo, utilizando os acoplamentos HPLC-ICP-MS, ESI-MS, ESI-MS/MS e ESI- TOF- MS.<sup>25</sup> Os complexos As(III)-S ou As-fitoquelatinas (As-PCs) e os mecanismos de tolerância de As em plantas terrestres, têm sido extensivamente investigados por HPLC-ICP-MS e ESI-MS sem o uso de padrões de fitoquelatinas<sup>26,27,28</sup>. Esses estudos geralmente destinam-se a compreender o mecanismo da formação dos complexos As-PC, buscando explicar a elevada tolerância de algumas plantas ao As, a taxa e a forma de acumulação do metal e a sua translocação ao longo do tecido vegetal.

Embora muitos métodos de separação tenham sido usados no passado, atualmente o acoplamento HPLC-ICP-MS ou LC-ICP-MS é sem dúvida o mais empregado. Para especiação de arsênio o mesmo tem sido usado em matrizes como cenouras<sup>29</sup>, mostarda<sup>30</sup>, arroz<sup>31,32</sup>, maçã<sup>33</sup>, grãos<sup>34</sup> e plantas terrestres em geral<sup>35,36,37</sup>.

O levantamento bibliográfico apresentado, bem como recomendações da IUPAC para especiação, evidenciam que o acoplamento HPLC-ICP-MS é uma excelente ferramenta de análise em estudos como os que foram realizados no presente trabalho, o que justifica a escolha da técnica para os elementos e matriz em questão.

### **2.3. Estratégias para corrigir interferências em ICP-QMS**

Apesar de suas inúmeras vantagens, a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) sofre severas interferências espectrais, isobáricas, matriciais e de transporte como foi citado anteriormente. A determinação de As, e de Cd em menor proporção, sofrem interferências espectrais: (causadas por espécies poliatômicas que possuem a razão m/z iguais a do analito de interesse) e não espectrais (causadas pela matriz da amostra). A

Tabela 4.1.1.1 apresenta os principais isótopos do As e Cd e seus respectivos interferentes poliatômicos.

Tabela 4.1.1.1 Principais isótopos do As e Cd, abundância isotópica e seus principais interferentes poliatômicos.

Isótopos	Interferentes
$^{75}\text{As}$ (100 %)	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ , $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$ , $^{12}\text{C}^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$ , $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$
$^{112}\text{Cd}$ (24,13 %)	$^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^+$ , $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^+$ , $^{94}\text{Mo}^{18}\text{O}^+$
$^{114}\text{Cd}$ (28,73 %)	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$

As propriedades físicas da amostra como viscosidade, tensão superficial e densidade podem interferir na introdução da amostra e ionização da mesma no plasma. Além disso, no que diz respeito a interferências matriciais qualquer concomitante presente em elevadas concentrações pode causar interferência. Portanto, as interferências são função do analito, da matriz, das condições de operação e das características do instrumento. Os efeitos de matriz parecem relacionados com as propriedades de ionização e efeitos de carga espacial na região da interface.<sup>17,18</sup>

Após o skimmer ocorre o fenômeno conhecido como efeito de carga espacial, devido a interações eletrostáticas entre os íons, influenciando suas trajetórias. A diminuição de pressão causa expansão do feixe de íons, fazendo com que os elétrons se movimentem para fora do feixe causando a separação de cargas. A transmissão de íons leves é menos eficiente do que a transmissão de íons pesados (repulsão e energia cinética). Os íons com maior energia cinética serão transmitidos preferencialmente do que os íons com baixa energia cinética. Ocorre uma discriminação de íons: a nuvem de íons no ICP é diferente da nuvem de íons após o skimmer. Ocorre uma depreciação da concentração de íons leves e erro na determinação de razão isotópica com efeito positivo sobre o

íon mais pesado, ou seja, supressão do sinal do analito pelo concomitante. Efeitos mais severos são causados pelos concomitantes mais pesados e, portanto analitos mais leves sofrem maior efeito de carga espacial.<sup>17,18</sup>

Interferências espectrais ou interferências isobáricas são aquelas causadas por íons ou espécies poliatômicas que têm massa atômica ou molar muito semelhante à massa do isótopo que se pretende determinar, mas o analisador de massa quadrupolar não tem resolução para diferenciar ambas. Para interferências isobáricas, em alguns casos é possível selecionar outro isótopo do mesmo elemento que não sofra sobreposição isobárica. No caso do arsênio por exemplo, essa não é uma opção já que o  $^{75}\text{As}^+$  apresenta 100% de abundância na razão massa/carga ( $m/z$ ) 75.<sup>18</sup>

Diferentes estratégias têm sido empregadas com o intuito de corrigir tais interferências, dentre estas se encontram o uso da interface de colisão e reação (CRI), por onde gases  $\text{H}_2$  ou  $\text{He}$  são introduzidos através dos cones de amostragem ou skimmer, a fim de promover a eliminação de íons interferentes por processos de colisão e reação<sup>38</sup>, a padronização interna<sup>39</sup>, a correção matemática<sup>40</sup>, o método do padrão de interferência (IFS)<sup>41,42</sup> e a cela dinâmica de reação (DRC), na qual processos de colisão e reação ocorrem em uma cela pressurizada com gases como  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  ou  $\text{H}_2/\text{He}$  promovendo a eliminação de interferências espectrais.<sup>43</sup> Outra alternativa é o emprego do ICP-MS de alta resolução equipado com analisador de massa de setor magnético (HR-SF), que pode operar no modo de alta e média resolução. No entanto, no modo de alta resolução a sensibilidade pode ser afetada, além do que, o custo do equipamento é significativamente superior ao de um ICP-MS quadrupolar.<sup>44</sup>

A interface de reação e colisão (CRI) é empregada para corrigir interferências poliatômicas com a introdução de gases reacionais e colisionais diretamente nas aberturas do cone de amostragem ou skimmer. Neste caso, não existe uma cela de reação onde os gases são aprisionados, a região de expansão dos gases do plasma é usada para promover colisões entre o interferente

poliatômico e gases como o He, onde os interferentes poliatômicos são dissociados, ou reações em que os interferentes reagem com gases como o H<sub>2</sub> para assim deixar o analito livre da sobreposição isobárica. Os processos reacionais e colisionais ocorrem em uma região de alta densidade eletrônica e elevada temperatura.<sup>38,45,46</sup>

Alternativa interessante para corrigir tais interferências foi recentemente proposta por DONATI et al.<sup>41</sup>. No método do padrão de interferência (IFS), espécies naturalmente presentes no plasma, tais como <sup>36</sup>Ar<sup>+</sup>, <sup>36</sup>ArH<sup>+</sup> e <sup>38</sup>Ar<sup>+</sup>, são monitoradas para corrigir as variações no sinal analítico causadas por interferentes poliatômicos, o que significativamente melhora a exatidão. O IFS é semelhante a uma padronização interna convencional, no entanto, como o próprio nome indica a espécie IFS comporta-se de forma semelhante ao interferente e não ao analito. Assim, diferente do método do padrão interno, o IFS é usado para corrigir interferências espectrais ao invés de não espectrais. Essa estratégia é simples e de baixo custo, uma vez que não requer etapas extras de preparo de amostra, nem a introdução de gases no sistema para eliminar espécies interferentes. Além disso, não promove a formação de espécies adicionais no plasma e pode melhorar a sensibilidade.<sup>47,41,48,49</sup>

A formação de íons poliatômicos é induzida por outros analitos presentes, pelos componentes do gás do plasma, do solvente e do ar, por reagentes e pelos próprios constituintes da matriz. O primeiro passo na tentativa de evitar esses interferentes é, se possível, não introduzi-los na amostra. Um exemplo é evitar o uso de HCl ao se trabalhar na determinação de <sup>75</sup>As<sup>+</sup>, já que o argônio estará presente certamente e com a introdução do Cl<sup>-</sup> haverá a formação do poliatômico <sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>. Além disso, isótopos com razão m/z entre 40 e 82 u.m.a. são os que mais sofrem interferências isobáricas de poliatômicos que contém C, N, O e H. Interferências matriciais podem ser minimizadas ou corrigidas através de compatibilização de matriz, método de adição de padrão e uso de padronização interna.<sup>17,18</sup>

Como foi exposto, existem várias alternativas para se contornar interferências em ICP-MS, sejam instrumentais ou correções matemáticas. A mais adequada provavelmente será função do analito, da configuração do instrumento empregado e da matriz.

#### 2.4. Especificação de As

O arsênio é um elemento abundante na crosta terrestre, principalmente como o mineral arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), sendo a ocorrência natural de arsênio associada a depósitos vulcânicos e ambiente geoquímico.<sup>50,51,52</sup> Por outro lado, as fontes antrópicas de contaminação são principalmente devido à atividade de mineração, queima de carvão, fundição de cobre e uso de fertilizantes e herbicidas.<sup>53,54,55,56</sup> As formas mais comuns de As na natureza são como arsenito ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) e arseniato ( $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  e  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ), ou seja, As(III) e As(V), respectivamente, o que leva à presença majoritária dessas espécies nos tecidos vegetais.<sup>57</sup> Consequentemente, a determinação de As em plantas terrestres desempenha um papel importante porque o As ocorre em algumas localidades em altas concentrações, seja naturalmente ou como consequência de atividades humanas.

A especificação química de arsênio nas mais distintas matrizes (peixe, sangue, planta, alimentos) é um tema bastante explorado atualmente, basicamente por dois aspectos: a alta toxicidade desse elemento e as diferentes formas que esse pode se apresentar. Dentre as formas que esse semimetal pode se encontrar temos; arsenoaçúcares, formas metiladas de As, formas redox, arsenobetaína, arsênio-peptídeos, arsênio-proteínas, sendo essas formas diretamente relacionadas com seu potencial de periculosidade.<sup>22,58,59,60</sup>

O arroz é o organismo vegetal mais estudado em termos de especificação de arsênio, devido ao seu alto consumo pelo homem e também a sua conhecida capacidade de acumular arsênio em quantidades superiores aos demais tipos de

grãos. Além disso, o solo usado para o cultivo do arroz também pode aumentar a concentração do mesmo na planta.<sup>61</sup>

As principais espécies monitoradas em especiação de arsênio em plantas são As(III), As(V), DMA e MMA<sup>62,35</sup>, embora existam estudos que monitoram as espécies orgânicas de TMA, TMAO, AsB, AsC e fenilarsênicos.<sup>22,63, 64, 65</sup> As principais espécies presentes em plantas são As(III) e As(V), no entanto, em alguns tipos de plantas ou *habitat* podem ser encontrados traços de MMA e DMA.<sup>11</sup>

Vários procedimentos de análise são empregados para a especiação de arsênio em plantas, diferindo quanto ao solvente extrator, dispositivos de extração e instrumentação analítica empregada.<sup>66, 67, 68</sup> Tais estudos de especiação de arsênio se tornam mais atraentes quando envolvem a investigação do mecanismo de translocação do analito pelas partes da planta, uma vez que agregam informações importantes.<sup>69</sup> A investigação de arsênio ligado a fitoquelatinas (As-PC) é feita principalmente nas raízes das plantas, uma vez que elas ocorrem, especialmente, nesta parte. A formação desse tripeptídeo é um mecanismo de defesa do organismo vegetal, de modo a evitar a intoxicação e translocação do metal para as partes aéreas da planta.<sup>70,71</sup> Outro ponto crucial na análise de especiação é a conservação das espécies, a fim de garantir que os analitos obtidos após a extração sejam o mais representativo possível das espécies originalmente presentes na amostra. Embora muitos estudos de especiação de arsênio sejam dedicados a amostras de tecidos marinhos, há um crescente número de trabalhos que avaliam as várias espécies desse elemento presentes em plantas cultivadas no solo.<sup>62, 72, 73, 74, 75</sup>

Ainda que o As seja encontrado principalmente como arsênio inorgânico nos tecidos vegetais, portanto uma forma tóxica, mais estudos são necessários para avaliar a resposta da matriz à diferentes procedimentos de extração.



## 2.5. Especificação de Cd

O cádmio é um metal que apresenta alta toxicidade, sendo largamente usado em soldas, pigmentos e equipamentos eletrônicos como baterias.<sup>76</sup> Além disso, o mesmo pode ser introduzido no meio ambiente por descartes de efluentes industriais e lodo de esgoto provenientes dos mais diversos segmentos como galvanoplastias, metalurgia, mineração, assim como pelo abuso de fertilizantes e herbicidas em atividades agrícolas.<sup>77,78,79</sup> A acumulação de cádmio no solo é um problema uma vez que o mesmo apresenta alta mobilidade translocando-se do solo para as plantas e alimentos, atingindo o homem. Portanto, a sua escolha entre os elementos a serem analisados, se deve entre outros fatores à facilidade em se transportar para organismos vegetais.<sup>80</sup>

O excesso de Cd no tecido vegetal pode prejudicar uma série de processos fisiológicos importantes como a fotossíntese.<sup>81</sup> A fim de diminuir os danos causados por metais nos seus tecidos, as plantas desenvolvem alguns mecanismos de defesa que envolvem a alocação em vacúolos e ligação a paredes celulares a fim de proteger metabolicamente compartimentos celulares ativos.<sup>82</sup>

Nesta tentativa de diminuir a toxicidade do Cd em tecidos vegetais e animais, o mesmo, geralmente está associado a metalotioninas em tecidos animais e a fitoquelatinas em tecidos vegetais e a especificação de cádmio tem sido principalmente realizada por HPLC-ICP-MS.<sup>3</sup> Basicamente as metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixa massa molar (6 - 7 kDa), que apresentam estrutura molecular composta por uma única cadeia de aminoácidos, dos quais 30% são cisteínas e com características de ácidos moles. Em alguns estudos a especificação de Cd em macromoléculas biológicas tem sido feita por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa acoplada ao ICP-MS (RP HPLC-ICP-MS). A técnica também foi utilizada para separação de cádmio em fitoquelatinas (PCs) em amostras de *Arapidosis thaliana*.<sup>4</sup>

A fitoquelatina é um tri-peptídeo formado a partir da glutathione reduzida (GSH), que por sua vez é formada pelos aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico. A formação dessas substâncias é um mecanismo de defesa que se dá quando o tecido vegetal é exposto a altas concentrações de metais, portanto a enzima fitoquelatina sintase promove essa síntese. A forma geral da fitoquelatina é  $(\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , sendo que o  $n$  pode variar de 2 a 11. No presente trabalho, as principais fitoquelatinas de interesse são de  $n = 2, 3$  e  $4$ , de acordo com trabalhos previamente descritos por SADI et al.<sup>4</sup>

Embora existam muitos trabalhos que envolvam a determinação da concentração total de Cd nas mais diferentes matrizes, são poucos os trabalhos que se propõem a realizar a especiação desse elemento. Isso se dá principalmente devido à baixa estabilidade dos compostos Cd-PC e a limitada disponibilidade ou alto custo dos padrões dos mesmos. O uso da espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) neste caso é bastante oportuno, uma vez que a mesma é capaz de identificar a massa molecular de todos os compostos de Cd presentes na matriz ou pelo menos boa parte destes, sem a necessidade de padrões analíticos para todas as espécies.

## **2.6. A forrageira *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu**

Há um grande potencial de produção de carne e leite em pastagens de clima tropical e subtropical como o Brasil. São muitos os gêneros de gramíneas forrageiras, tais como as dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon*, que, se bem manejadas, podem constituir o principal componente da dieta de ruminantes, com papel relevante na redução do custo de produção na pecuária.<sup>83</sup> As forrageiras do gênero *Brachiaria* tiveram papel importante no cenário da pecuária brasileira, uma vez que são gramíneas que em geral se adaptam bem a solos ácidos e de baixa fertilidade o que tornou viável a pecuária em regiões secas como o cerrado brasileiro.<sup>84</sup>

A forrageira da espécie *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é uma das mais cultivadas no Brasil nos últimos 20 anos e destaca-se principalmente pelo seu maior porte em relação às outras espécies de braquiária. Além disso, a elevada produção de matéria seca bem como boa resposta à adubação, boa produção de sementes e estabelecimento rápido, são outras vantagens da espécie. Dentre as desvantagens têm-se a baixa adaptação a solos mal drenados e essa espécie em particular apresenta pouca adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade, o que demanda um manejo mais cuidadoso.<sup>83</sup>

A capacidade de remoção ou extração de elementos tóxicos da solução do solo por plantas confere a elas potencial fitorremediador. A fitorremediação pode ser usada para remover tanto espécies orgânicas quanto inorgânicas presentes no solo. A ligação metal planta é favorecida pelos vários grupos funcionais que as mesmas apresentam, pelo alto conteúdo protéico, por estarem largamente presentes na natureza, sem falar que o seu uso como remediadoras de metais é relativamente de baixo custo comparado a outras técnicas. Se por um lado a capacidade em remediar metais é uma característica interessante e com aplicabilidade, por outro lado essa função pode se tornar um problema ao pensarmos em contaminação do solo por altas doses de metais e posterior consumo do material vegetal cultivado neste ambiente por animais ou pelo homem.

CARMO et al.<sup>85</sup> a fim de estudar o efeito da absorção de substâncias químicas por plantas, realizaram um estudo com 19 espécies vegetais com o objetivo de selecionar aquelas que apresentam maior tolerância à presença do herbicida picloram no solo. Das espécies estudadas as leguminosas mucuna-preta, feijão-de-porco e o cultivar forrageiro Marandu foram as plantas mais sensíveis quando semeadas em solo que recebeu 160 g ha<sup>-1</sup> de picloram. Em relação ao cultivar Marandu, a fitotoxicidade média final com a aplicação da dose de 640 g ha<sup>-1</sup> do herbicida ficou próxima de 90%, mostrando-se um capim braquiária bastante sensível.

Diante do exposto, justifica-se o estudo visando a especiação de As e Cd em forrageira da espécie *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, uma vez que essa forragem apresenta alta demanda no setor de alimentação animal pelos motivos já apresentados e que se cultivado em solo contaminado tem grande potencial em absorver elementos presentes nesse ambiente.

## 2.7. Preparo de amostra para especiação

Alguns autores como BLUEMLEIN et al.<sup>39</sup> defenderam a linha de análise da planta fresca, e quando não é possível apenas o congelamento (à -80 °C) deve preceder a análise pois observam maior eficiência de extração. SCHMIDT et al.<sup>22</sup> também concordaram com a maior eficiência de extração quando utilizada a planta fresca mas ressaltaram a dificuldade em validar esse tipo de procedimento em que não se pode garantir a homogeneidade das amostras. Outros como JEDYNAK et al.<sup>35</sup> observaram maior eficiência de extração e reprodutibilidade dos resultados quando as amostras foram secas antes da análise. Ainda existem autores que optaram por secar e moer as amostras de plantas e posteriormente estocá-las a -20 °C.<sup>86</sup>

A etapa de extração está dentro da fase de preparo da amostra, é uma das mais críticas pois nessa etapa assim como em outras, podem ocorrer mudanças nas características das espécies bem como uma extração ineficiente. Em se tratando de especiação de arsênio, geralmente são utilizados extratores orgânicos como metanol misturados à água ou ainda podem ser utilizadas puramente a água ou mesmo soluções tampão. Ainda a extração pode se dar por agitação mecânica, por ultrassom, extração com líquido pressurizado ou assistida por radiação micro-ondas.<sup>87, 88, 89, 74</sup>

SCHMIDT et al.<sup>87</sup> relataram que a quantidade extraída de DMA e As (V) não depende se a planta está fresca ou moída, embora a quantidade extraída de As(III) tenha aumentado com a moagem. Como esperado, desvio padrão mais

elevado foi obtido sem a moagem. Os autores ainda enfatizaram o quão difícil é validar procedimentos em que a homogeneidade da amostra não é garantida. ZHANG et al.<sup>90</sup> não tinham evidência da presença de complexos As-PC nos extratos quando as plantas foram liofilizadas e moídas, portanto, eles optaram por usar a planta fresca e empregar condições de extração mais brandas, uma vez que notaram a ocorrência de um sinal adicional no cromatograma. É evidente que, independentemente do tratamento que é dado a planta antes do procedimento de extração, as espécies devem ser preservadas em sua forma original, e os resultados devem apresentar boa repetibilidade e reprodutibilidade.

No trabalho de NARUKAWA et al.<sup>58</sup> foram realizados vários preparos de amostra para especiação de arsênio em farinha de arroz. Foram testadas diferentes formas de extração (extração mecânica por agitação, extração em banho ultrassom, extração com líquido pressurizado e extração assistida por radiação micro-ondas), bem como diferentes frações da mistura água/metanol (de 0 a 100 %  $\text{vv}^{-1}$  de cada um dos constituintes). Com a extração assistida por micro-ondas utilizando apenas a água como extrator foram obtidos bons resultados, sem alterações das características das espécies. A extração por líquido pressurizado ou extração acelerada por solventes, como também é conhecida, mostrou-se bastante dependente do extrator, sendo a concentração de metanol igual a 75%, a melhor opção.

Extratores que vem sendo utilizados são os ácidos ou uma mistura dos mesmos, concentrados ou diluídos. No trabalho de HUANG et al.<sup>91</sup> é testada uma nova forma de extração com o emprego de  $\text{HNO}_3$  0,28  $\text{mol L}^{-1}$  a 95 °C por 90 min. Os maiores problemas observados foram na preservação das espécies de As(III) e As(V) durante a extração, a qual foi permitida somente em uma faixa estreita de concentrações de  $\text{HNO}_3$ . Em função da complexidade da matriz em estudo, a extração levou a significativas reduções de As(V) e oxidação de As(III) quando trabalhou-se na faixa de concentração abaixo de 0,28  $\text{mol L}^{-1}$  e acima de 0,70  $\text{mol L}^{-1}$ . Este dado revela a extrema labilidade de transformação

entre As(III) e As(V) durante a extração de grãos de arroz. Em comparação, uma recuperação completa de MMA e DMA foi observada em todas as concentrações de HNO<sub>3</sub> testadas. Os resultados apontaram um predomínio do As(III) em grãos de arroz, reforçando a propriedade dos grãos em bioacumular a forma mais tóxica do arsênio, enfatizando a necessidade de estudos de especiação de As em grãos e plantas em geral.

Embora os solventes como metanol, acetonitrila e outros, sejam os mais utilizados na extração de compostos, solventes ácidos são recomendados para a extração do As(III) ligado a fitoquelatinas em tecidos vegetais, isso porque a estabilidade do complexo aumenta com a diminuição do pH segundo BLUEMLEIN et al.<sup>39</sup>. Segundo esses autores, um bom solvente com essas características é o ácido fórmico 1 % v v<sup>-1</sup>, pH 2,2 e extração sob baixa temperatura a fim de determinar complexos As-PCs.

É importante ressaltar que a mistura água/metanol é bastante eficiente na remoção de espécies orgânicas; para espécies inorgânicas essa eficiência diminui consideravelmente, por isso a sua aplicação em tecidos marinhos nos quais as formas orgânicas estão presentes em maior concentração. O As inorgânico em plantas terrestres está principalmente ligado as paredes celulares, lipídios, lignina e celulose. A fração orgânica como MMA, TMAO, DMA e outras encontra-se minoritariamente nesses tecidos apontando a necessidade de outros estudos em preparo de amostra para especiação em plantas terrestres.  
63,92,93,94

ZHENG et al.<sup>92</sup> observaram que menos de 10 % do As total foi extraído quando a mistura metanol/água (9:1 v v<sup>-1</sup>) foi utilizada como solvente, enfatizando que novos estudos são necessários na tentativa de se encontrar extratores apropriados para plantas cultivadas em ambientes terrestres. Nesse contexto, ZHENG E HINTELMANN<sup>95</sup> estudaram oito extratores diferentes para a extração de espécies orgânicas e inorgânicas de As. MIR et al.<sup>86</sup> examinaram a aplicabilidade da extração sequencial com a mistura

água/metanol, seguido da extração com HCl. A idéia básica desses autores foi extrair espécies orgânicas e inorgânicas de As, uma vez que estes solventes extratores parecem ser seletivos para estas espécies, respectivamente. Houve aumento na eficiência de extração utilizando o método de extração sequencial e predominância de As inorgânico.

Lixiviação contínua on-line foi empregada de forma a obter informações de bio-acessibilidade de espécies de As em arroz branco. Vantagens como o preparo de amostra mais rápido e mais fácil, um risco reduzido de contaminação e acesso em tempo real aos dados de lixiviação puderam ser obtidas a partir desse procedimento de extração. A eficácia do método de lixiviação contínua em linha foi comparada com um procedimento em batelada. Para isso, o pré-tratamento da amostra (arroz cozido; arroz cru moído e arroz cru inteiro) e procedimento de extração (lixiviação *on-line* e batelada) foram avaliados. A ordem de aumento da taxa de lixiviação foi a seguinte: suco intestinal < suco gástrico < saliva. No arroz cozido a ordem crescente de ocorrência de espécies de As foi: MMA < As(V) < As(III) < DMA, o que mostra que uma fração considerável de As presente no arroz é bio-acessível e na forma tóxica.<sup>96</sup>

É evidente o aumento do número de estudos dedicados ao preparo de amostra para a especiação de arsênio em plantas cultivadas em ambiente terrestre, principalmente devido ao seu efeito determinante na qualidade da análise de especiação e também porque não há procedimento padrão para a extração de espécies de arsênio em amostras de plantas. Estes estudos destacam que soluções ácidas diluídas são uma boa alternativa como extratores, pois apresentam baixa toxicidade, oferecem boa eficiência de extração, bem como preservam as espécies de arsênio.

Quanto ao preparo de amostra para especiação de Cd, não são encontrados muitos trabalhos principalmente pelo próprio elemento em si, o que acarreta a dificuldade, escassez ou inexistência de padrões. Em plantas, as espécies a

serem investigadas são as fitoquelatinas, que apresentam o inconveniente de serem espécies pouco estáveis.

Raízes e folhas de trigo expostas a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de Cd por 10 e 20 dias foram homogeneizadas em um almofariz sob baixa temperatura e extraídas com 5 % ( $\text{m v}^{-1}$ ) de ácido 5-sulfossalicílico, contendo  $6,3 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA). Após centrifugação durante 10 min a  $4^\circ \text{C}$ , a fração sobrenadante foi injetada em um HPLC contendo uma coluna de fase reversa. Os autores observaram que nas raízes, apesar da presença elevada de PCs e compostos tiol, o excesso de Cd provocou uma diminuição na proteção antioxidante do organismo vegetal, com a consequente geração de quantidades consideráveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um agente direto do estresse oxidativo.<sup>97</sup>

A uma amostra de alga foram misturados 60 mL de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A seguir a mistura foi centrifugada por 10 min e o sobrenadante reduzido. Finalmente, 90 mL de tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina TCEP (50 mM) foram adicionados a 10 mL do extrato de algas (30 min,  $20^\circ \text{C}$ ). A extração ácida levou a uma decomposição dos complexos de cádmio, assim, o extrato continha íons cádmio e apo-fitoquelatinas e S-peptídeos. Pela primeira vez foi possível a quantificação reprodutível de seis tiol-peptídeos (GSH, CysGSH, PC2, PC3, CysPC2 e CysPC3) em extratos brutos de *C. reinhardtii*.<sup>98</sup>

Amostra da planta *Arabidopsis thaliana* foi liofilizada e congelada em nitrogênio líquido ( $-196^\circ \text{C}$ ) para quebra das paredes celulares. O material foi moído em almofariz e pistilo até que um pó homogêneo foi formado. A amostra homogeneizada foi extraída sequencialmente com porções de 1 mL dos tampões na seguinte ordem: (1)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,4) dedicado aos complexos de cádmio solúveis em água situados no citosol e vacúolo, (2) 2% driselase em  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,4) para liberar da parede celular as espécies de cádmio durante a digestão enzimática, (3) 1 % de SDS em  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,4) dedicado a proteínas hidrofóbicas, (4)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH 4,6) para a extração de ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Cada



etapa da extração foi realizada durante 1 h. Com o emprego da cromatografia bidimensional foi possível correlacionar os complexos de metais separados por SEC com isoformas das fitoquelatinas separadas pela fase reversa-HPLC e confirmar a significativa acumulação do metal Cd ligado a fitoquelatinas.<sup>79</sup>

No momento da colheita, tanto o tipo selvagem quanto as plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* foram lavadas com água destilada, separadas em raízes e parte aérea e então liofilizadas. A amostra (50 mg) seca foi moída com nitrogênio líquido (-196 °C), a fim de romper as paredes celulares e, em seguida, triturada até a obtenção de uma mistura homogênea, utilizando almofariz e pistilo. Os complexos de cádmio solúveis em água foram extraídos empregando 1 ml de uma solução de Tris-HCl 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,5), seguido de ultrassom durante 1 h. Após a extração a solução foi centrifugada e filtrada. As raízes das plantas geneticamente modificadas acumularam cerca de duas vezes mais Cd-PC<sub>2</sub> do que o tipo selvagem da planta, podendo-se supor que a modificação genética seja um meio eficaz de alterar características de plantas para aumentar a fitoextração e fitorremediação de metais potencialmente tóxicos.<sup>4</sup>

O grande desafio da especiação de As, como tem sido destacado, é manter as características originais das espécies durante as etapas de extração e armazenamento. Além disso, a extração deve ser quantitativa, uma vez que uma extração incompleta prejudica a elucidação da distribuição de espécies de arsênio na matriz estudada.

## 2.8. Estabilidade das espécies

Durante o processo de amostragem e armazenamento da amostra, vários fatores podem promover ou impedir a interconversão das espécies, tais como a atividade microbiana, temperatura, recipiente de armazenamento, luz, pH e a solução extratora. Em amostras de plantas, as espécies de As mais sensíveis à

interconversão - As (III) e As (V) - são também os principais espécies. A maioria dos trabalhos sobre a estabilidade de espécies de As enfatizam amostras de água, sendo que não são encontrados na literatura muitos estudos dedicados a amostras de plantas.

ISERTE et al.<sup>99</sup> descreveram a interconversão entre o As(III) e As(V) e o processo de oxidação, que certamente ocorreu durante a etapa de secagem do ácido fosfórico utilizado como solvente extrator, no entanto, interconversões não foram observadas entre as espécies metiladas de As. ABEDIN et al.<sup>11</sup> relataram uma redução de As(V) a As(III) quando o TFA (ácido trifluoroacético) foi utilizado como solvente a 100 °C, no entanto, esses autores afirmaram que o TFA é um extrator mais eficiente do que a mistura MeOH: H<sub>2</sub>O 1:1 v v<sup>-1</sup>. Utilizando metanol, eles obtiveram uma baixa recuperação de cerca de 10-20 %, enquanto que com o extrator TFA a eficiência foi maior do que 80 %. Não se sabe o porquê dessa redução, mas ABEDIN et al.<sup>11</sup> supõem que seja devido ao baixo pH ou à extração de compostos orgânicos que tenham mudado o potencial redox do meio. WILLIAMS et al.<sup>100</sup> também observaram conversão de arseniato à arsenito quando o TFA foi empregado como solvente extrator para amostras de arroz.

Normalmente, os procedimentos empregados na determinação de traços envolvem a secagem e moagem das amostras. O preparo de amostras para a especiação é mais suave do que para a determinação do teor total, portanto, vale a pena discutir se os procedimentos preliminares também não deveriam ser mais brandos. Alguns autores recomendaram a análise da planta fresca, no entanto, esses procedimentos muitas vezes são difíceis, devido à umidade e heterogeneidade da amostra<sup>64</sup>, outros recomendaram a secagem da amostra, pois acredita-se que a umidade pode causar conversão de espécies.<sup>74</sup> Um artigo reportou que a moagem é importante para se ter acesso as espécies retidas na estrutura celular dos vegetais e também para proporcionar maior homogeneidade da amostra.<sup>90</sup> Além disso, sobre estudos voltados para a temperatura de

armazenamento, algumas divergências têm sido constantemente encontradas. Pesquisas recentes indicam que a planta deve ser mantida sob uma temperatura baixa, enquanto outras consideram que o processo de congelamento/descongelamento da amostra favoreceu a conversão de espécies e, por isso, a amostra deve ser mantida à temperatura ambiente.<sup>86,101</sup>

Outro ponto importante é o tempo que a amostra permanece em seu estado original. A maioria dos trabalhos sobre especiação química não avaliaram a estabilidade da amostra durante o armazenamento a longo prazo, o que é fundamental para determinar o tempo máximo de armazenamento em que as espécies são mantidas intactas. Amostras de algas *Cystoseira mediterranea Sauvageau* foram armazenados sob diferentes condições por 45 dias<sup>101</sup>; BLUEMLEIN et al.<sup>39</sup> analisaram amostras armazenadas a - 80 ° C e a concentração de As<sup>III</sup>PC<sub>3</sub> (espécie principal) manteve-se relativamente constante durante 21 dias, por outro lado, RAAB et al.<sup>102</sup> relataram que o armazenamento a longo prazo da planta, a - 20 ° C não é adequado para a conservação de complexos As-fitoquelatina.

Quanto ao cádmio, o fator que pode ocasionar a degradação de complexos de fitoquelatinas é o pH. SADI et al.<sup>4</sup> apontaram que geralmente as condições de separação utilizadas em fase reversa-HPLC, requerem um passo de acidificação em que os complexos de cádmio-fitoquelatina são dissociados e, portanto, são caracterizadas como apo-fitoquelatinas.

Complexos cádmio-fitoquelatina (Cd-PC) são fortemente hidrofílicos e de natureza aniônica e assim não serão retidos em uma coluna de fase reversa, mesmo na presença de modificadores orgânicos.<sup>4</sup> Além disso, o ácido trifluoroacético, ácido acético ou ácido fórmico (em concentrações  $\leq 0,1\% v v^{-1}$ ) utilizados na fase móvel de separação típica de fase reversa, pode dissociar os complexos Cd-PC que são instáveis em baixos valores de pH. Além disso, o pH fisiológico dentro do citoplasma de células de plantas superiores, onde os complexos Cd-PC são bio-sintetizados é aproximadamente 7,3.

### 3. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi separar e determinar as principais formas químicas das espécies de As e Cd em amostras de forrageira (*Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu) cultivada em um solo contaminado com esses elementos. O trabalho teve como principais metas:

- O cultivo da forrageira e adição dos contaminantes, a coleta de uma fração da amostra e a adequação do procedimento de preparo de amostra.
- A determinação dos teores totais de As e de Cd por ICP-MS.
- A otimização do preparo de amostra para especificação de As por HPLC-ICP-MS.
- A separação das espécies de As em coluna cromatográfica e aplicação do método em amostras.
- O estudo da estabilidade das espécies de As ao longo do tempo sob diferentes condições de armazenamento.
- A adequação do preparo de amostra para a extração das fitoquelatinas.
- A especificação de As e Cd ligados a fitoquelatinas por HPLC-ICP-MS e HPLC-ESI-MS.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Plantio e cultivo da forrageira, determinação do teor total de arsênio e cádmio e especiação de arsênio

#### 4.1.1. Plantio e cultivo das forrageiras

A forrageira (*Brachiaria brizantha* Stapf cv. Marandu), objeto do presente estudo, foi cultivada em casa de vegetação instalada na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos – SP. O solo, um latossolo vermelho amarelo distrófico, de textura média foi amostrado a partir da camada superficial do solo até uma profundidade de 20 cm nas dependências da Embrapa Pecuária Sudeste e empregado para o preenchimento dos vasos onde foi realizado o plantio. Uma alíquota desse solo foi seca ao ar e separada para a execução de determinações químicas e físicas para fins de fertilidade, no laboratório de solos da Embrapa Pecuária Sudeste. Em seguida, foram preenchidos 8 vasos, com 25 kg de solo cada e o solo foi corrigido com calcário e a mistura de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), antes do plantio. Essa etapa foi realizada em parceria com um trabalho de produção de material de referência que estava sendo realizado na Embrapa Pecuária Sudeste, no entanto os vasos eram independentes.<sup>103</sup>

Houve um estudo preliminar da melhor dose de As e Cd a ser adicionada ao solo, de tal forma que não ocasionasse a morte das plantas, mas que fosse absorvida pelas mesmas em concentrações suficientes para que pudesse ser feita a especiação química. Esse estudo preliminar foi realizado em 16 vasos, sendo avaliadas as doses 0, 12,5; 25 e 50 mmol por vaso. Foi possível observar que o Cd foi melhor absorvido pela planta do que o As, o que levou à decisão de se adicionar o dobro de As. Os elementos contaminantes Cd e As foram adicionados na forma de soluções preparadas a partir de seus sais  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , a partir do terceiro corte da planta. Portanto, foram

adicionados 1 mmol de Cd por kg de solo e 2 mmol de As por kg de solo. Antes da adição dos contaminantes foram realizados três cortes da parte aérea, realizados a 20 cm do solo, por ser esta a altura mínima de pastejo.

#### 4.1.2. Instrumentação

Todas as determinações foram realizadas em um espectrômetro de massa quadrupolar com plasma indutivamente acoplado (ICP-QMS, 820-MS, Varian, Mulgrave, Austrália). Esse instrumento apresenta uma interface de reação e colisão (CRI), por onde gases reacionais ou colisionais como H<sub>2</sub> e He podem ser introduzidos nos cones de amostragem e skimmer para promover a redução de interferências poliatômicas. Além disso, o analisador de massa quadrupolar está posicionado à 90 ° em relação ao sistema de introdução de amostra e interface. Três condições foram avaliadas nas determinações dos teores totais de As e Cd; modo padrão sem o uso da CRI, introdução de H<sub>2</sub> a uma vazão de 60 mL min<sup>-1</sup> e a 80 mL min<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub> introduzidos através do skimmer).<sup>38</sup> As condições operacionais do ICP-MS são apresentadas na Tabela 4.1.2.1.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (ProStar HPLC System, Varian) utilizado é composto de duas bombas, um injetor de amostra (model 9725i) e um detector UV-Vis. No entanto, o ICP-QMS foi utilizado como detector na determinação de espécies de As, uma vez que desejava-se fazer o monitoramento dos isótopos. O software do HPLC foi utilizado apenas para controlar o fluxo do solvente e pressão nas bombas. A fase móvel utilizada foi o tampão fosfato, 12,5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,6 e uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> no modo isocrático e injeção de 50 µL de amostra. Uma coluna de troca aniônica (IonoSpher A 250 x 4,6 mm, Varian) foi usada para promover a separação das espécies de As. O acoplamento HPLC-ICP-MS foi simples, uma vez que, a saída da coluna cromatográfica foi conectada diretamente ao nebulizador. O cuidado nesta etapa foi manter a vazão de saída da coluna cromatográfica igual a

vazão de entrada no ICP-QMS, para que não houvesse um acúmulo de solução na câmara de nebulização.

Tabela 4.1.2.1 Condições operacionais para ICP-QMS (820 MS Varian)

Potência de radiofrequência	1,4 kW
Vazão do gás do plasma	18,0 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás do nebulizador	1,0 L min <sup>-1</sup>
Vazão do gás auxiliar	1,8 L min <sup>-1</sup>
Vazão do sheath gás	0,13 L min <sup>-1</sup>
Profundidade de amostragem	5,5 mm
Pontos por pico	2
Escaneamentos por replicata	5
Replicatas por amostra	5
Nebulizador	Seaspray
Câmara de nebulização	Tipo Scott
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Isótopos (m/z) monitorados	<sup>75</sup> As <sup>+</sup> , <sup>83</sup> Kr <sup>+</sup> , <sup>112</sup> Cd <sup>+</sup> e <sup>114</sup> Cd <sup>+</sup>
Modo de Aquisição de sinal (ICP-MS)	Peak Hopping
Modo de Aquisição de sinal (HPLC-ICP-MS)	Time Resolved

No preparo de amostras foram empregados os seguintes equipamentos; um moinho criogênico (CryoMill, Retsch, Hann, Alemanha) e um liofilizador (E-C, MicroModulyo, Nova York, NY, USA) para secagem e moagem da amostra à baixa temperatura a fim de evitar perdas dos analitos por volatilização. A digestão das amostras e um dos procedimentos de extração foram realizados em um forno de micro-ondas fechado com cavidade (Ethos 1, Milestone-MLS, Sorisole, Itália). Para a extração das espécies de arsênio foram empregados banho com aquecimento e agitação (Novatecnica, Piracicaba, SP, Brasil), banho ultrassônico (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brasil) e centrífuga (Celm, Barueri, SP, Brasil).

#### 4.1.3. Reagentes e soluções padrão

Todos os materiais (vidrarias, ponteiras e frascos) utilizados para a realização dos experimentos foram imersos em banho de  $\text{HNO}_3$  10 % v v<sup>-1</sup> por no mínimo 24 h, posteriormente lavados com água desionizada e desmineralizada (resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm, Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) e secos em capela de fluxo laminar. Essa mesma água desionizada foi empregada no preparo de soluções e diluições das amostras. Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) de alta pureza, produzido por meio de um sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (Milestone) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m m<sup>-1</sup> (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram empregados na digestão total das amostras para posterior determinação de As e Cd. Soluções padrão usadas para construção da curva de calibração foram preparadas a partir da diluição de 1000 mg L<sup>-1</sup> de soluções estoque de As e Cd (Quimis, São Paulo, SP, Brasil) com água desionizada. O tampão fosfato utilizado como fase móvel na separação cromatográfica foi preparado a partir de seus respectivos sais,  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Labimpex, Diadema, SP, Brasil). Os padrões de espécies de arsênio utilizados foram  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil),  $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_4\text{AsNa}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$  (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Metanol de grau analítico (Tedia Company, Fairfield, OH, EUA) foi utilizado na limpeza da coluna cromatográfica e como um dos solventes extratores.

#### 4.1.4. Determinação total de arsênio e cádmio por ICP-QMS.

As amostras de oito vasos foram cortadas 10 cm acima do solo, desta forma, apenas as folhas foram analisadas. Alguns vasos foram cultivados sem adição de As e Cd, para que esse material vegetal fosse posteriormente utilizado nos experimentos de adição e recuperação. Após o corte das plantas, as mesmas foram lavadas com água destilada, para remover quaisquer resíduos do solo que tenham ficado nas folhas.



As amostras foram liofilizadas por 48 h e moídas em moinho criogênico, obtendo-se ao final um material com baixa granulometria. A digestão da amostra foi realizada em frasco fechado de PFA, com o aquecimento promovido por radiação micro-ondas em forno com cavidade. Foram adicionados 6 mL de  $\text{HNO}_3$  ( $7 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % ( $\text{m m}^{-1}$ ) à 200 mg de amostra. Um material de referência certificado de folha de tomateiro (NIST SRM 1573a, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA), foi utilizado para checar a exatidão do método. O valor certificado para As nesse material é  $0,112 \pm 0,004 \text{ mg kg}^{-1}$  e para cádmio  $1,52 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ . O programa de aquecimento utilizado é descrito na Tabela 4.1.4.1. Após atingir a temperatura ambiente, os frascos do micro-ondas foram abertos e os digeridos e brancos foram transferidos para frascos de polipropileno (tipo Falcon) previamente calibrados, sendo o volume final aferido para 15 mL com água desionizada. As amostras foram mantidas refrigeradas até a determinação, sendo que uma diluição antes da determinação foi realizada para que a concentração máxima de sólidos dissolvidos não ultrapassasse  $0,1 \text{ \% m v}^{-1}$ .

Tabela 4.1.4.1 Programa de aquecimento utilizado no forno micro-ondas Ethos 1 (Milestone) para digestão total da amostra e do material de referência certificado.

Etapa	Potência aplicada (W)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	1000	15	120
2	1000	20	200
3	1000	20	200
4	-	20	-

#### 4.1.5. Otimização das condições de separação de espécies de arsênio em coluna cromatográfica

A princípio adotou-se o procedimento cromatográfico descrito por GÓMEZ-ARIZA et al. <sup>104</sup>, embora os autores tenham usado uma coluna de

marca diferente (Hamilton PRP X-100 25 cm X 4.1 mm). A fase móvel utilizada pelos mesmos foi o tampão fosfato ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ), concentração igual a 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,8 e coluna de troca aniônica. No presente trabalho, uma coluna de troca aniônica IonoSpher A 250 x 4.6 mm (Varian) foi acoplada ao ICP OES (espectrômetro óptico de emissão com plasma acoplado indutivamente). Optou-se por fazer a separação inicial utilizando um ICP OES em função do teor de sólidos dissolvidos da fase móvel que, por ser elevado, não é indicado nas determinações por ICP-MS. Primeiro variou-se o pH da fase móvel (5,0; 5,4; 5,6; 5,8), mantendo-se a concentração do tampão fosfato em 25 mmol L<sup>-1</sup>. De acordo com os resultados obtidos, uma modificação na concentração da fase móvel foi adotada, sendo essa reduzida pela metade e o pH mantido em 5,6, por ser esse o valor de pH que promoveu a melhor separação. A vazão da fase móvel utilizada foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e a alça de amostragem de 50 µL.

Os compostos de arsênio separados foram os inorgânicos As(III) e As(V), bem como os orgânicos DMA (ácido dimetilarsênico) e MMA (ácido monometilarsênico). Primeiramente, uma solução de cada espécie era injetada na coluna cromatográfica separadamente obtendo-se o tempo de retenção de cada espécie, em seguida uma mistura das quatro espécies foi injetada e a separação monitorada.

#### 4.1.6. Procedimentos de extração das espécies de As em forrageira

Para a extração das espécies de arsênio, três solventes foram utilizados: água, ácido nítrico 2 % (v v<sup>-1</sup>) e a mistura água: metanol (1:1 v v<sup>-1</sup> e 1:3 v v<sup>-1</sup>). Para cada solvente foram avaliados dois procedimentos de extração, baseados em trabalhos da literatura, mas com pequenas alterações.<sup>91,58,95</sup> Variáveis como a razão extrator/amostra, temperatura de aquecimento e a ausência de rota evaporação do metanol após a extração, foram modificações feitas em relação à literatura seguida. Antes do procedimento de extração, um teste de adição e

recuperação das espécies foi realizado para se avaliar perdas e interconversão de espécies durante o preparo da amostra. As quatro espécies de As avaliadas (As(III), As(V), MMA e DMA) foram adicionadas à solução extratora contendo uma amostra de forrageira que não recebeu arsênio durante o seu cultivo. Soluções contendo  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de As(III), As(V), DMA e MMA foram preparadas para os experimentos de adição e recuperação. A curva analítica de calibração compreendeu o intervalo de  $5,0 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$  de As(V), além disso, foi avaliado o uso dos quatro padrões para calibração de cada espécie com o seu respectivo padrão, como não foram notadas diferenças no coeficiente angular ou linear das curvas de calibração optou-se por empregar o As(V) na calibração das quatro espécies. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e os extratos filtrados em filtro de nitrato de celulose com  $0,45\mu\text{m}$  de diâmetro de poro e mantidos à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até a determinação. Detalhes dos procedimentos são apresentados a seguir.

**Procedimento 1.** Extrator:  $\text{HNO}_3$  2 % v v<sup>-1</sup>. O volume de 10 mL do solvente foi adicionado à 200 mg da amostra. A extração foi realizada em um banho com agitação, sendo a temperatura mantida à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 90 min .

**Procedimento 2.** Extrator:  $\text{HNO}_3$  2 % v v<sup>-1</sup>. O procedimento foi similar ao procedimento 1, mas o banho foi mantido à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Procedimento 3.** Extrator: água. Um volume de 10 mL de água desionizada foi adicionado à 200 mg da amostra, sendo a seguir a mistura agitada mecanicamente por 16 h sob temperatura controlada ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os extratos foram então centrifugados a 3000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi coletado e a porção sólida separada para o passo posterior. A segunda etapa constituiu-se da extração assistida por ultrassom do resíduo remanescente. A esse foram adicionados 10 mL de água e a extração ocorreu durante 20 min à temperatura ambiente. Essa etapa de sonicação foi repetida por mais uma vez. Os sobrenadantes das três etapas foram misturados, resultando em um volume final de 30 mL.

**Procedimento 4.** Extrator: água. Massas de amostras de 400 mg e 8 mL de solvente foram submetidos a extração assistida por micro-ondas (MAE). O programa de aquecimento era composto por uma rampa de 5 min até atingir 80 °C, a temperatura foi mantida em 80 °C por 30 min e então resfriada por 20 min até a temperatura ambiente. Após retirada dos frascos reacionais do micro-ondas, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 min. Finalmente, o sobrenadante foi coletado e analisado.

**Procedimento 5.** Extrator: água:metanol 1:1 v v<sup>-1</sup>. O mesmo procedimento experimental descrito no Procedimento 3.

**Procedimento 6.** Extrator: água:metanol 1:3 v v<sup>-1</sup>. O mesmo procedimento experimental descrito no Procedimento 3.

#### **4.1.7. Estudo da estabilidade das espécies de arsênio à longo prazo, pré-tratamento da amostra e condições de armazenamento**

Um estudo sobre a estabilidade a longo prazo das espécies de arsênio foi realizado. Quantidade apreciável da amostra de forrageira recém cortada, foi homogeneizada e dividida em cinco porções. A porção A foi imediatamente extraída (Dia 0), sem qualquer processamento prévio; a porção B foi liofilizada durante 48 h e, em seguida, moída em um moinho criogênico e armazenada à temperatura ambiente; a porção C foi liofilizada durante 48 h e armazenada a 4 °C; a porção D foi armazenada à - 18 °C e a E à - 80 °C, as porções D e E foram armazenadas sem qualquer tratamento prévio. Apenas a porção A foi extraída uma única vez, porque correspondia à planta fresca. As demais porções foram submetidas à extração e determinação via HPLC-ICP-MS a cada 2 meses durante 12 meses. A extração das espécies de arsênio foi realizada seguindo o Procedimento 2 (HNO<sub>3</sub> 2 % v v<sup>-1</sup>, 90 min, 37 °C), descrito na seção anterior (4.1.6). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e os extratos filtrados em filtro de nitrato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro e

mantidos à -18 °C até a análise. Os parâmetros do acoplamento HPLC-ICP-MS e a fase móvel foram os mesmos descritos nas secções 4.1.2 e 4.1.5.

## 4.2. Determinação de As e Cd ligados a fitoquelatinas

### 4.2.1. Instrumentação

Parte das determinações desta etapa do trabalho foi feita utilizando o acoplamento HPLC-ICP-MS, de acordo com as condições operacionais descritas na seção 4.1.2. Por outro lado, as determinações dos complexos As-PC e fitoquelatinas livres foram realizadas em um ESI-MS, espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (LTQ Orbitrap Velos Thermo Fisher Scientific, Tóquio, Japão) acoplado a um HPLC (Thermo Scientific Accela 1250 Pump). As condições operacionais do acoplamento HPLC-ESI-MS são apresentadas na

Tabela 4.2.1.1.

Tabela 4.2.1.1 Condições operacionais do acoplamento HPLC-ESI-MS

HPLC	
Coluna cromatográfica	Fase reversa C18 (250 x 4,6 mm)
Volume de amostra injetado	10 µL
Fase móvel	Gradiente água:metanol
Vazão da amostra	1 mL min <sup>-1</sup>
Tempo total de corrida	40 min
ESI-MS	
Voltagem do eletrospray	3,7 kV
Pressão do nebulizador	75 psi
Temperatura do capilar	400 °C
Modo de ionização	Positivo
Intervalo de varredura	65 – 1400 m/z

A separação das espécies de fitoquelatinas ocorreu por emprego de um gradiente água:metanol na fase móvel. Este gradiente foi iniciado com 100 % de água, o metanol foi adicionado a uma taxa de 1 % por minuto durante os primeiros 20 min, foi então mantido em 20 % metanol por 10 min, sendo os 10 min restantes dedicados ao restabelecimento da fase móvel (100 % água), totalizando uma corrida de 40 min.

#### **4.2.2. Reagentes e padrões**

Todas as vidrarias, ponteiras e frascos utilizados foram descontaminados em banho ácido (10 % v v<sup>-1</sup>) e, posteriormente, lavados com água desionizada (resistividade de 18,2 MΩ cm, Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido fórmico (J. T. Baker, Xalostoc, Cidade do México, México) foi empregado no preparo de amostra para extração das fitoquelatinas e os padrões de glutathione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Fremont, CA, EUA) foram empregados na calibração do equipamento e na separação cromatográfica.

#### **4.2.3. Cultivo das amostras e procedimento de extração das fitoquelatinas**

Amostras de plantas armazenadas por 1 ano em freezer à -80 °C foram primeiramente extraídas sem nenhum procedimento prévio, bem como amostras mantidas à -20 °C. Como esta parte do trabalho não resultou em bons resultados, optou-se por um novo cultivo das plantas, uma vez que a primeira hipótese para as fitoquelatinas não terem sido encontradas seria o fato de a amostra estar armazenada por muito tempo e as espécies objeto de estudo terem sofrido degradação.<sup>39</sup>

Portanto, novas amostras foram cultivadas em dois vasos, em casa de vegetação. No primeiro vaso foi realizado o replantio de uma planta já com certo tempo de crescimento (com raízes desenvolvidas) e altura acima do solo de

aproximadamente 20 cm, a qual será aqui denominada como “planta desenvolvida”. No segundo vaso foram plantadas três mudas de aproximadamente 10 cm de comprimento, contendo raízes e folhas (Figura 4.2.3.1). Como as mudas produziram pouca massa de amostra, após o corte as mesmas foram misturadas e homogeneizadas, formando uma amostra única. Após 15 dias de cultivo, o solo onde as plantas se desenvolviam recebeu as mesmas doses de As e Cd descritas na seção 4.1.1, sendo que os contaminantes tiveram aproximadamente 7 dias de contato solo-planta. As amostras da “planta desenvolvida” (folhas e raízes) e das mudas (folhas, raízes e caule) foram cortadas no dia da análise e moídas manualmente em nitrogênio líquido, empregando almofariz e pistilo.



Figura 4.2.3.1 Foto da “planta desenvolvida” e das mudas no dia em que foi feito o corte.

Paralelamente, foi feito um experimento de germinação em papel da semente de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e posterior adição de As e Cd. As plantas foram germinadas em uma caixa de acrílico contendo 2 folhas de papel próprio para germinação (6 g) sendo acondicionadas em câmara de germinação (Stuls Scientific Engineering, Springfield, Illinois, USA), mantidas por 16 h à 20 °C (ausência de luz) e 8 h à 35 °C (com luz). Foram preparadas 24 caixas (3 para cada concentração) e adicionadas aproximadamente 60 sementes por caixa e 15 mL de água. Após 15 dias de germinação os brotos foram retirados e disponibilizados em uma bancada, até que as mudas pudessem receber os

contaminantes. As sementes que não brotaram foram retiradas, ficando apenas as plantas que já possuíam folhas. Após 4 dias, 4 mL das soluções contendo As e Cd 0; 0,1; 0,3; 0,5; 2,0; 5,0; 7,0 e 10 mg L<sup>-1</sup> foram adicionadas ao papel, permanecendo em contato com a amostra por 7 dias (Figura 4.2.3.2). Como em nenhum caso houve morte das plantas, decidiu-se por um novo experimento de germinação, portanto, foram preparadas 15 caixas, 5 para cada concentração, sendo as mesmas 0 (testemunha), 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>. Essas plantas foram usadas na determinação dos complexos de fitoquelatina. Após 7 dias em contato com o As e o Cd, as pequenas folhas e as raízes geradas foram cortadas, homogeneizadas, moídas e submetidas à extração para as determinações das fitoquelatinas (Figura 4.2.3.3).

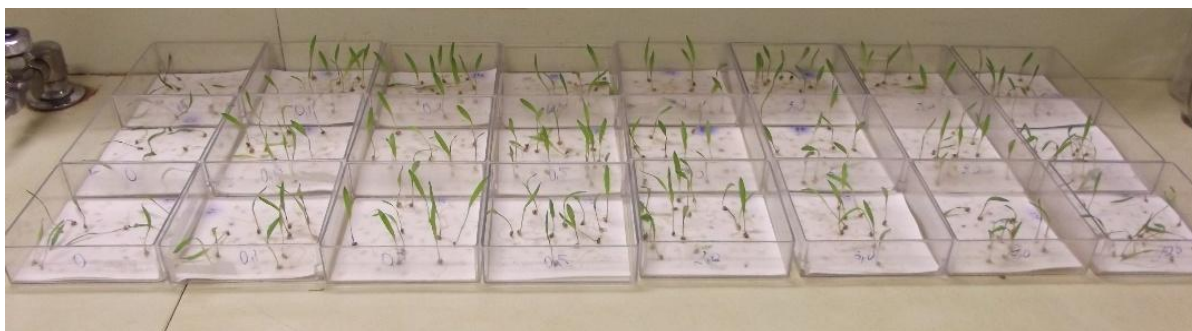


Figura 4.2.3.2 Caixas de germinação onde foram plantadas sementes de forrageira para avaliação dos teores de As e Cd a ser adicionados.



Figura 4.2.3.3 Amostras germinadas após receberem 20 mg L<sup>-1</sup> de As e de Cd e das folhas e raízes pré-moagem.



A extração das fitoquelatinas foi realizada de acordo com o trabalho de Zhang et al. <sup>27</sup>, sendo que à 1 g da amostra foram adicionados 5 mL de ácido fórmico 1 % v v<sup>-1</sup>. A mistura foi deixada em contato por 1 h e refrigerada à 4 °C, com intercalada agitação manual a cada 10 min. Após 1 h, a mistura foi filtrada com filtro de seringa de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro, acondicionadas em vials e submetidas à análise. Houve um cuidado para que o tempo entre o final da extração e a injeção na coluna cromatográfica não fosse superior a 6 h, para se evitar degradação dos compostos.

## **5. Resultados**

### **5.1. Plantio e cultivo da forrageira, determinação do teor total de arsênio e cádmio e especiação de arsênio**

#### **5.1.1. Plantio e cultivo das forrageiras**

De acordo com o estudo de BOSSU <sup>103</sup>, após sete dias da adição das doses 0; 12,5; 25 e 50 mmol/vaso de solução contendo As, Cd, Cr e Pb, pode-se observar que, nos vasos nos quais foi colocada a dose de 50 mmol/vaso foram observadas lesões na parte aérea da planta. Após 30 dias, as folhas ficaram mais danificadas e amareladas. Além disso, após a digestão e determinação dos analitos, foi possível observar que o cádmio foi absorvido pelas plantas em quantidades suficientes para o estudo quando adicionado 25 mmol de Cd por vaso. No entanto, o arsênio foi encontrado em baixas concentrações na parte aérea da forrageira nesta dosagem. Optou-se, portanto, pela adição 50 mmol/vaso de arsênio e a metade desta concentração de cádmio (25 mmol/vaso).

Essas doses foram adicionadas em oito vasos, os quais podem ser visualizados na Figura 5.1.1.1. As plantas se desenvolveram bem, apesar da

adição dos contaminantes ao solo, devendo ser enfatizado que foram feitas correções da acidez do solo para potencializar a absorção dos analitos pelo tecido vegetal e adição de nitrogênio, fósforo e potássio.



Figura 5.1.1.1 Foto das forrageiras cultivadas em vasos para estudo de especiação de arsênio e cádmio.

### 5.1.2. Determinação do teor total de As e Cd na forrageira

Os teores totais determinados para arsênio e cádmio nas amostras são apresentados na Tabela 5.1.2.1. Além disso, para avaliar a exatidão do procedimento desenvolvido os elementos As e Cd foram determinados em material de referência certificado de folha de tomate. Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo recomendação da IUPAC. A inclinação da curva de calibração e o desvio padrão de 10 medidas consecutivas da solução de branco foram usados. Dentre as condições operacionais avaliadas para determinação do teor total de As e Cd nas amostras, a que proporcionou melhor

exatidão do método foi a que envolveu a introdução de gás  $H_2$  através do skimmer a uma vazão de  $80 \text{ mL min}^{-1}$ . Nas demais condições, as recuperações para As foram muito superiores a 100%, indicando a provável presença do interferente  $^{40}\text{Ar}^{+35}\text{Cl}^+$ . Deve ser observado que quando do emprego das seguintes condições: sem CRI e com CRI ( $H_2$  a  $60 \text{ mL min}^{-1}$ ) as recuperações foram equivalentes a 2862% e 146%, respectivamente para o elemento arsênio. Para o  $^{112}\text{Cd}^+$  as recuperação nas condições sem CRI e com CRI ( $H_2$  a uma vazão de  $60 \text{ mL min}^{-1}$ ) foram 86,42 % e 130,88 %. Já para o  $^{114}\text{Cd}^+$  nas condições sem CRI e com CRI ( $H_2$  a  $60 \text{ mL min}^{-1}$  e  $H_2$  a  $80 \text{ mL min}^{-1}$ ) as recuperações foram 2129,8%, 120,89% e 116,53%, respectivamente. Os resultados indicam que para a amostra estudada, é inviável a determinação de As e Cd por ICP-MS sem nenhuma estratégia que minimize interferências espectrais, pela evidente presença de interferentes nas  $m/z$  75, 112 e 114.

Como pode ser observado, pouco do que foi adicionado ao solo foi transportado para a parte aérea da planta o que indica, provavelmente que o maior acúmulo tenha ocorrido na raiz. O fato do As e Cd não terem sido translocados indica provável formação de complexos As-PC e Cd-PC na raiz das plantas, um mecanismo de defesa do organismo vegetal na tentativa de minimizar a toxicidade causada pelo As e Cd livres no seu citosol.<sup>105</sup> Foram adicionados 50 mmol de As por vaso, logo a concentração no solo era de  $149,88 \text{ mg kg}^{-1}$ , se desconsiderarmos perdas por lixiviação e absorção pelas raízes e caule, apenas 1,5 % do que foi adicionada ao solo se encontra na parte aérea da forrageira. Como o cádmio apresenta maior potencial de translocação da solução do solo para a planta, fazendo o mesmo exercício podemos perceber que foram adicionados 25 mmol de Cd por vaso, encontrando-se no solo  $112,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , da mesma forma, sendo incorporado às folhas da forrageira 2,6 % do que foi adicionado ao solo. Embora os valores para a As e Cd encontrados na parte aérea da planta sejam baixos, deve ser lembrado que foi adicionado o dobro de

As (em quantidade de matéria), o que mostra maior facilidade de translocação de Cd.

Tabela 5.1.2.1 Determinação de As e Cd por ICP-QMS em amostra e em material de referência certificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ), valores de recuperação do CRM (%) e limites de detecção e quantificação ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) introduzindo  $80 \text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{H}_2$  na CRI.

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>*SRM</b>	<b>*Recuperação</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
<sup>75</sup> As	2,27 $\pm$ 0,27	0,118 $\pm$ 0,008	105 $\pm$ 7,05	0,003	0,011
<sup>112</sup> Cd	2,89 $\pm$ 0,07	1,62 $\pm$ 0,07	106 $\pm$ 4,97	0,078	0,261

\*Tomato leaves SRM 1573<sup>a</sup>, Valores de referência: As -  $0,112 \pm 0,004 \text{ mg kg}^{-1}$  e Cd -  $1,52 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ .

A Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 420, de 28 de dezembro de 2009<sup>106</sup> estabelece os valores orientadores para solos e águas subterrâneas, os quais são listados na Tabela 5.1.2.2. Apesar de o CONAMA estabelecer como valores máximos, quantidades consideravelmente inferiores ao que foi adicionado, esse excesso foi adicionado propositalmente para que se garantisse a ocorrência de As e Cd nas folhas da forrageira em quantidades mensuráveis, além de induzir a formação das fitoquelatinas que serão discutidas posteriormente. De acordo com RAAB et al.<sup>107</sup>, a formação de complexos As-PC é dependente da concentração de arsênio na solução em que a planta é cultivada. Os autores observaram que a concentração de complexos As-PC cresce exponencialmente acima de  $13,7 \text{ } \mu\text{mol de As L}^{-1}$ , em se tratando de um cultivo hidropônico. No entanto, no caso de cultivo em solo essa quantidade deve ser maior, uma vez que ocorre a retenção dos analitos pelo solo.

Tabela 5.1.2.2 Valores máximos permitidos de arsênio e cádmio para solos e águas subterrâneas.<sup>106</sup>

Elemento	Solo (mg kg <sup>-1</sup> de peso seco)			Água subterrânea (µg L <sup>-1</sup> )
	Agrícola	Residencial	Industrial	
Arsênio	35	55	150	10
Cádmio	3	8	20	5

### 5.1.3. Otimização das condições de separação de espécies de arsênio por cromatografia líquida de alta eficiência

Os cromatogramas obtidos para as espécies de arsênio em tampão a 25 mmol L<sup>-1</sup> são apresentados na Figura 5.1.3.1. Como pode-se observar, a separação entre as espécies MMA e DMA não foi eficiente em pH 5,8, que foi a condição adotada no trabalho de GÓMEZ-ARIZA et al.<sup>104</sup>, indicando a necessidade de serem realizados outros estudos.

A primeira modificação feita foi a redução do valor do pH, uma vez que estava-se trabalhando em um valor de pH próximo ao máximo permitido pela coluna (pH 2,5 - 6,5). Assim, avaliou-se o pH 5,0, o qual demonstrou uma boa separação entre os compostos orgânicos (DMA e MMA). No entanto, o tempo de retenção das espécies As(III) e As(V) é próximo. Os demais valores de pH avaliados foram o 5,4 e 5,6, os quais demonstraram uma melhora gradativa na separação das espécies (Figura 5.1.3.1).

Com a diminuição da concentração do tampão (12,5 mmol L<sup>-1</sup>) e pH mantido em 5,6 foi obtido um aumento da retenção dos compostos. Com a diminuição da concentração do tampão tem-se também uma redução da sua capacidade de tamponamento. Concentrações altas de solução tampão são mais eficientes, mas pode afetar de maneira indesejada a operação do sistema cromatográfico ou neste caso o detector empregado, devido ao teor de sólidos

dissolvidos. <sup>15</sup> Para essa nova condição adotada, pode-se observar uma boa separação dos picos no cromatograma (Figura 5.1.3.2).

Se forem considerados os valores de pka dos compostos de arsênio, bem como suas respectivas estruturas, a mudança nos tempos de retenção de acordo com o pH do tampão pode ser compreendida. O As(III) é uma espécie neutra nesses valores de pH e por isso não apresenta interação com a coluna de troca aniônica. Esse fato pode ser confirmado pelo fato de que o tempo de retenção do As(III) manteve-se constante mesmo com as variações de concentração e pH. <sup>108</sup>

Os demais compostos tratam-se de ânions, sendo, portanto bastante sensíveis às mudanças de pH. Basicamente, o que rege essa separação é a dissociação ou a protonação dos ácidos. Com o aumento do pH, aumenta a dissociação do ácido e ele interage mais com a coluna, trocadora de ânions. Com a diminuição do pH o ácido fica mais protonado, com maior afinidade com a fase móvel, elevando a velocidade de eluição. Nos compostos neutros, não há nenhuma afinidade pela coluna.

Em pH 5, o DMA e MMA apresentaram boa separação. Com a elevação dos valores de pH as formas orgânicas (DMA e MMA) se afastam do As(III) e As(V) respectivamente, de forma que o MMA diminui seu tempo de retenção na coluna e o DMA aumenta esse tempo. O As(V) quase não altera seu tempo de retenção com o aumento do pH. No estudo do pH, onde a concentração do tampão foi constante, os cromatogramas esclareceram que o pH 5,6 foi o que promoveu a melhor separação das espécies. A redução da concentração do tampão ( $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) neste mesmo valor de pH demonstrou ser a melhor alternativa na separação dos compostos de arsênio.

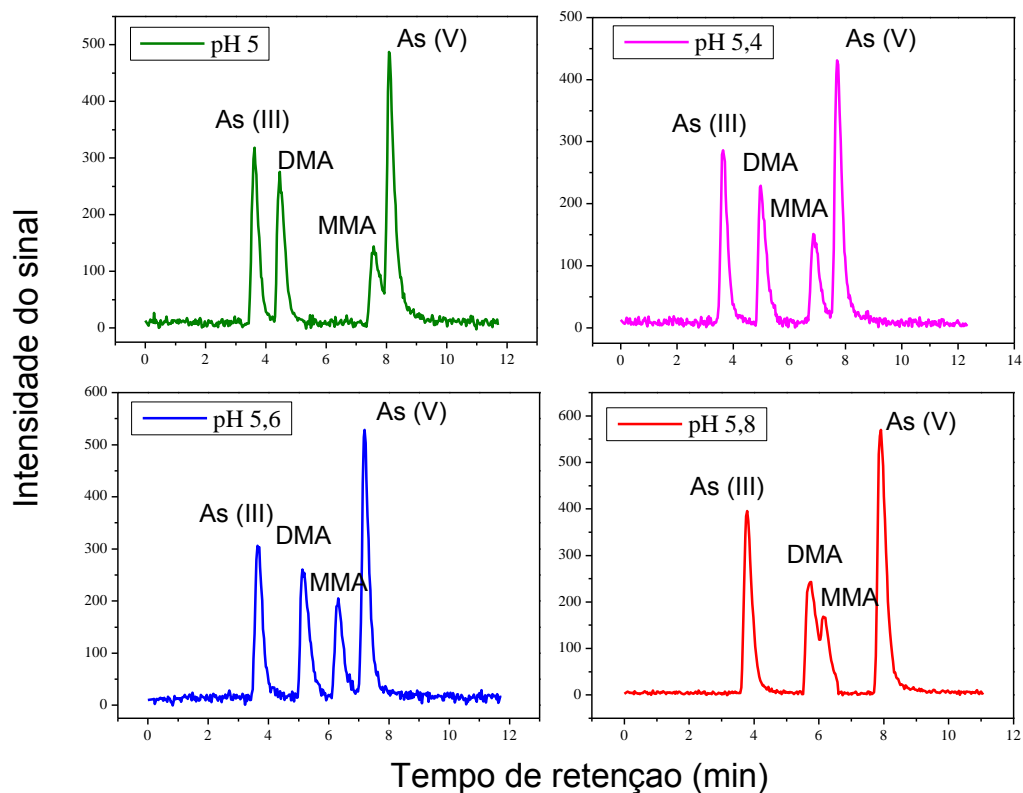


Figura 5.1.3.1 Cromatogramas das espécies de As obtidos por HPLC-ICP OES em diferentes valores de pH, fase móvel: tampão fosfato ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

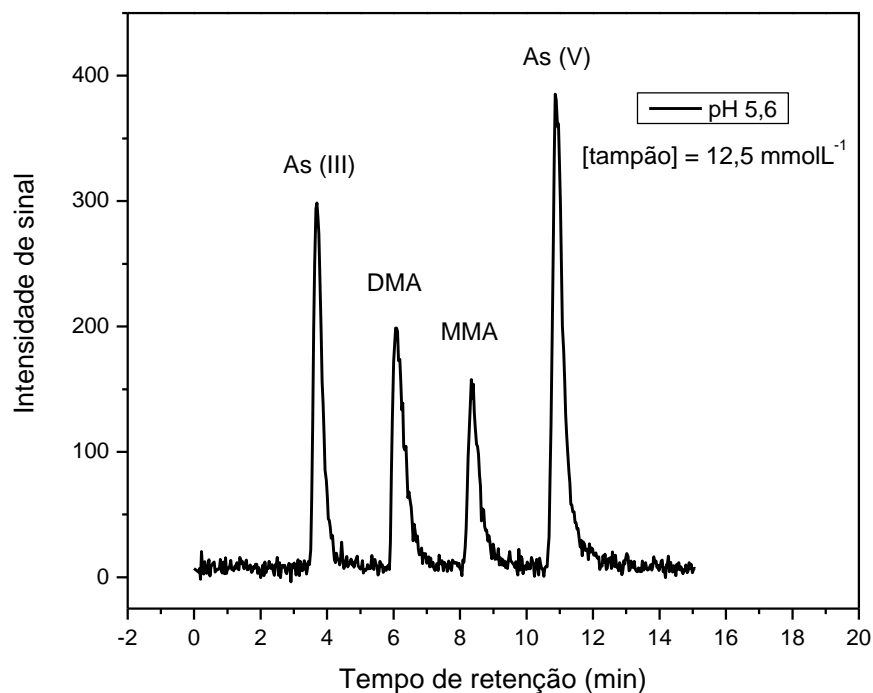


Figura 5.1.3.2 Cromatograma das espécies de As ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos por HPLC-ICP-MS, fase móvel: pH 5,6 e tampão fosfato ( $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

#### 5.1.4. Resultados obtidos para os procedimentos de extração empregados para especiação de As e avaliação do uso do método do padrão de interferência (IFS).

No presente trabalho foi utilizada uma estratégia recentemente desenvolvida para minimizar interferência espectral em ICP-MS. O padrão de interferência (IFS), como o próprio nome diz, é uma espécie que se assemelha ao interferente e não ao analito, como é o caso do padrão interno. Como dito anteriormente, o método do padrão de interferência é utilizado para corrigir interferências espectrais, trata-se de uma alternativa simples e de baixo custo pois não é necessária nenhuma etapa adicional no preparo da amostra e o uso dessa ferramenta não introduz nenhum custo à análise. Basicamente constitui-se de uma espécie naturalmente presente no plasma como os isótopos do  $^{40}\text{Ar}^+$  ou  $^{83}\text{Kr}^+$ . É uma alternativa que não promove a formação de espécies adicionais no plasma e pode melhorar a exatidão e a sensibilidade<sup>41,48</sup>. No presente trabalho o isótopo do  $^{83}\text{Kr}^+$  foi utilizado no tratamento dos dados afim de corrigir possíveis interferência espectrais. O Kr é um gás nobre de comportamento semelhante ao Ar, mas com menor potencial de ionização.

O uso da CRI não foi adotado durante a aquisição dos cromatogramas de As, pois como se sabe há uma grande redução do sinal analítico quando essa ferramenta é utilizada. Os gases introduzidos na tentativa de destruir o interferente acabam desviando o feixe de íons, o que reduz significativamente as contagens do analito.<sup>38</sup> Em se tratando de especiação isso se mostra um problema já que o elemento está distribuído entre espécies que apresentam baixa concentração. Assim, optou-se por uma alternativa que minimizasse a interferência espectral sem reduzir o sinal do analito. O uso do método do IFS foi avaliado no tratamento dos cromatogramas obtidos. Na utilização do método do IFS o tratamento dos dados foi feito pela divisão do sinal analítico pelo sinal do IFS, portanto a razão:  $^{75}\text{As}^+ / ^{83}\text{Kr}^+$ .



As soluções extratoras avaliadas apresentaram bom potencial de extração das espécies de As contidas na amostra frente ao valor total de arsênio encontrado,  $2,27 \pm 0,27 \text{ mg kg}^{-1}$ , como pode ser observado na Tabela 5.1.4.1. O extrator ácido foi o que apresentou melhor eficiência de extração, da ordem de 90 %, seguido do extrator água entre 60 % e 70 % e o que apresentou pior desempenho foi a mistura água/metanol que mostrou valores de extração da ordem de 56 %, com diminuição de aproximadamente 10 % dos teores extraídos à medida que se aumentou a fração orgânica.

No procedimento com ácido nítrico a diminuição da temperatura de 90 °C para 37 °C não ocasionou diminuição na eficiência de extração. Pelo contrário, ela sofreu um pequeno incremento, no entanto, a espécie de MMA não foi extraída. De acordo com SCHMIDT et al.<sup>22</sup>, a extração de espécies orgânicas de As como DMA requer maiores temperaturas. Considerando que, espécies metiladas não podem ser formadas durante o processo de extração, aparentemente o preparo a 90 °C foi o único que promoveu a extração das 4 espécies de As avaliadas.

O preparo de amostra que envolveu água como extrator apresentou eficiência de extração menor que o ácido, além disso, no preparo de amostra em que foi empregado o metanol como extrator apresentou menor eficiência de extração, em concordância com SCHMIDT et al.<sup>22</sup> e ZHENG et al.<sup>95</sup> uma vez que o As está principalmente na forma inorgânica em amostras de plantas terrestres, e o metanol é um bom extrator para formas orgânicas de As. No entanto, melhoria da extração das formas metiladas com o emprego do metanol não foi notada no presente trabalho.

Tabela 5.1.4.1 Concentração das espécies de As e soma das mesmas na amostra ( $\text{mg kg}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, n=3) para os diferentes procedimentos de extração empregados com e sem o uso do IFS.

Solvente	HNO <sub>3</sub> 2% (v v <sup>-1</sup> )		Água		Metanol:Água (1:1)	Metanol:Água (3:1)
	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3	Procedimento 4	Procedimento 5	Procedimento 6
Espécies	Sem o uso do IFS					
As (III)	0,632 $\pm$ 0,002	0,354 $\pm$ 0,013	0,159 $\pm$ 0,004	0,217 $\pm$ 0,053	0,384 $\pm$ 0,019	0,264 $\pm$ 0,012
DMA	0,135 $\pm$ 0,007	0,354 $\pm$ 0,005	nd	nd	nd	nd
MMA	0,129 $\pm$ 0,001	nd	nd	nd	nd	nd
As(V)	1,14 $\pm$ 0,003	1,36 $\pm$ 0,021	1,06 $\pm$ 0,017	1,08 $\pm$ 0,046	0,347 $\pm$ 0,008	0,151 $\pm$ 0,003
Soma das espécies	2,03 $\pm$ 0,01	2,07 $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,32	0,73 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,07
	Com o uso do IFS					
As (III)	0,288 $\pm$ 0,007	nd	0,350 $\pm$ 0,042	0,335 $\pm$ 0,019	0,924 $\pm$ 0,011	0,890 $\pm$ 0,012
DMA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
MMA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
As(V)	1,00 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,07	1,25 $\pm$ 0,037	1,10 $\pm$ 0,025	0,356 $\pm$ 0,036	0,212 $\pm$ 0,009
Soma das espécies	1,29 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,07	1,60 $\pm$ 0,10	1,44 $\pm$ 0,41	1,28 $\pm$ 0,13	1,10 $\pm$ 0,04

nd=não detectado

Pode-se observar na Tabela 5.1.4.2 que a exatidão melhorou com o uso do IFS. Pode-se observar um incremento na exatidão quando foram empregados os extratores água e metanol, já com o uso do ácido nítrico essa melhora não foi observada, o que provavelmente ocorreu devido à razão analito/interferente ser grande o suficiente para que o interferente não fosse representativo (Figura 5.1.4.1). Ainda na Figura 5.1.4.1 pode-se notar que o sinal  $m/z$  77 foi menos significativo para o extrator ácido, seguido da mistura metanol/água, sendo que para os extratos aquosos o sinal  $m/z$  77 foi o mais significativo, coincidindo com a linha de base do espectro do As.

Não se sabe exatamente o motivo, mas o uso do extrator água ocasionou um incremento na flutuação da linha de base dos cromatogramas de As. O uso do metanol como extrator, embora tenha proporcionado uma diminuição na porcentagem de extração, aumentou a sensibilidade do As nas medidas em ICP-MS. A maioria dos trabalhos que usa metanol no procedimento de extração realiza a rota-evaporação do solvente<sup>95,109</sup>, no entanto, esse tipo de procedimento pode causar instabilidade das espécies ou mesmo a perda das espécies apolares.<sup>110</sup> O fato do metanol não ter sido removido do extrato pode ser visto como uma vantagem pois embora a eficiência de extração tenha sido menor, o fato do metanol não ter sido rota-evaporado do extrato fez com que o analito fosse determinado com facilidade, pois o carbono aumenta a ionização do As durante a detecção por ICP-MS.<sup>38</sup> ZHENG et al.<sup>92</sup> mostraram que a extração de compostos de As com a mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1) pode revelar baixas recuperações (da ordem de 20 %), isso porque o As deve estar ligado a componentes da parede celular e lipídios. A promoção da quebra desse tipo de ligação exige procedimentos de extração mais agressivos, o que remete ao grande desafio da especiação, promover uma extração eficiente e ao mesmo tempo não favorecer a interconversão de espécies.

Tabela 5.1.4.2 Recuperações (% , média±desvio padrão, n=3) das espécies de arsênio adicionadas antes do procedimento de extração (10 µg L<sup>-1</sup> de cada espécie) com e sem uso de IFS.

Solvente	HNO <sub>3</sub> 2% (v v <sup>-1</sup> )		Água		Metanol:Água (1:1)	Metanol:Água (3:1)
	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3	Procedimento 4	Procedimento 5	Procedimento 6
Espécies	Sem o uso do IFS					
As (III)	63,1±1,4	68,0±0,5	34,4±0,9	43,2±0,7	95,8±1,4	135±1,7
DMA	105±1,1	105±0,8	80,1±1,1	106±0,9	81,9±1,0	76,5±1,2
MMA	90,7±0,9	92,8±0,6	88,7±1,2	90,3±0,6	82,2±0,6	94,0±0,9
As(V)	122±1,8	126±1,1	109±1,0	116±1,0	76,4±0,9	78,5±0,8
Soma das espécies	95,3±1,4	98,0±1,0	77,9±1,9	89,1±1,3	84,1±2,0	95,9±2,3
Com o uso do IFS						
As (III)	52,0±1,3	47,8±1,0	33,6±0,4	45,9±0,6	185±1,2	155±1,4
DMA	102±1,2	98,1±0,9	102±1,1	108±0,8	79,5±1,3	81,6±1,1
MMA	72,9±0,9	75,0±0,7	89,5±0,5	92,8±0,9	73,1±0,8	93,4±1,0
As(V)	127±0,8	132±0,9	154±0,7	128±1,1	70,3±1,0	68,2±0,9
Soma das espécies	88,6±1,4	88,2±1,3	94,8±1,2	93,9±1,0	102±1,0	99,5±1,7

Foi realizada a adição das quatro espécies de As antes de cada procedimento de extração em uma solução que continha o solvente extrator e a amostra de forrageira que não apresentava As. Em todos os procedimentos avaliados houve interconversão entre as espécies de As(III) e As(V), como pode ser observado na Tabela 5.1.4.2. As espécies metiladas apresentaram maior estabilidade, o que já era esperado de acordo com a literatura.<sup>95,86</sup> Nos procedimentos em que foram utilizados ácido e água houve conversão de As(III) para As(V) e para os extratos com metanol o inverso ocorreu. Embora existam vários trabalhos que avaliam o preparo de amostra para amostras de tecido vegetal nota-se a necessidade de um compromisso entre o extrator, o procedimento de preparo de amostra e a amostra. Uma vez que, embora o extrator esteja bem estabelecido, a amostra pode ocasionar mudanças no meio tais como pH, o que provavelmente favorece interconversões entre espécies pouco estáveis. Esses dados mostram a necessidade de novos estudos que envolvam amostras ainda não avaliadas. Aparentemente, no presente trabalho as interconversões estão relacionadas ao solvente utilizado e não ao procedimento de extração em si, já que para diferentes procedimentos o comportamento das espécies é próximo.

Como a adição das espécies foi feita antes do preparo de amostra pode-se verificar que não houve perdas de espécies de As durante o preparo. As recuperações do teor total variaram entre 93 e 102 %, mesmo com procedimento de extração envolvendo aquecimento à 90 °C. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 5.1.4.2. Como relatado por HUANG et al.<sup>91</sup> as interconversões entre As(III) e As(V) não estão somente relacionadas ao meio extrator mas também a matriz resultante do processo de extração.

Como pode ser observado na Figura 5.1.4.2, o IFS promoveu diminuição na flutuação da linha de base do espectro, melhorando consideravelmente a qualidade do cromatograma, o que pode aprimorar a sensibilidade do método.

Realmente, pequenos incrementos nos valores de LOD, LOQ e RSD ocorreram com o uso de IFS para todos os procedimentos de preparo de amostra avaliados (Tabela 5.1.4.3). De alguma forma, o IFS está promovendo a diminuição de interferência espectral formada por alguma espécie presente principalmente nos extratos que contém água e metanol.

O método do IFS apresenta relevante vantagem em relação ao uso da CRI, que é o fato de que quando o interferente está presente em quantidade consideravelmente superior ao analito a CRI não é efetiva, pois ela reduz também o sinal do analito o que dificulta a sua determinação. No entanto, o método do IFS não apresenta essa característica, pois mesmo que o interferente esteja presente em quantidades superiores ao analito, se a fonte de variação do analito é a mesma fonte de variação do interferente, o uso do IFS irá promover a correção da interferência espectral e consequente melhoria na precisão e na exatidão das medidas.

Pode-se observar na Figura 5.1.4.1 que o sinal de  $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$  sofre poucas variações durante a corrida cromatográfica e talvez por isso ocorra a correção utilizando o  $^{83}\text{Kr}^+$  como espécies IFS. Isso porque se o sinal de  $^{40}\text{Ar}^+$  sofre variações, o sinal de  $^{83}\text{Kr}^+$  também varia, mas o sinal de  $^{35}\text{Cl}^+$  não está sofrendo variações, caso ele estivesse é possível que o uso da espécie  $^{83}\text{Kr}^+$  como IFS não fosse efetiva. Esta é uma provável explicação para o bom funcionamento do  $^{83}\text{Kr}^+$  na correção de interferência espectral no sinal de  $^{75}\text{As}^+$  para o presente estudo.

Tabela 5.1.4.3 Comparação entre os parâmetros de desempenho com e sem o uso do IFS para os procedimentos de extração.

Solvente	Procedimento	Sem o uso do IFS			Com o uso do IFS		
		LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)
HNO <sub>3</sub> 2% (v v <sup>-1</sup> )	1	0,127	0,423	7,28	0,100	0,334	5,58
	2	0,072	0,240	1,66	0,038	0,128	1,04
Água	3	0,044	0,146	4,31	0,034	0,113	3,29
	4	0,071	0,237	6,52	0,060	0,199	5,48
Metanol:Água (1:1)	5	0,033	0,110	9,26	0,016	0,054	5,35
Metanol:Água (3:1)	6	0,045	0,149	11,0	0,012	0,041	3,99

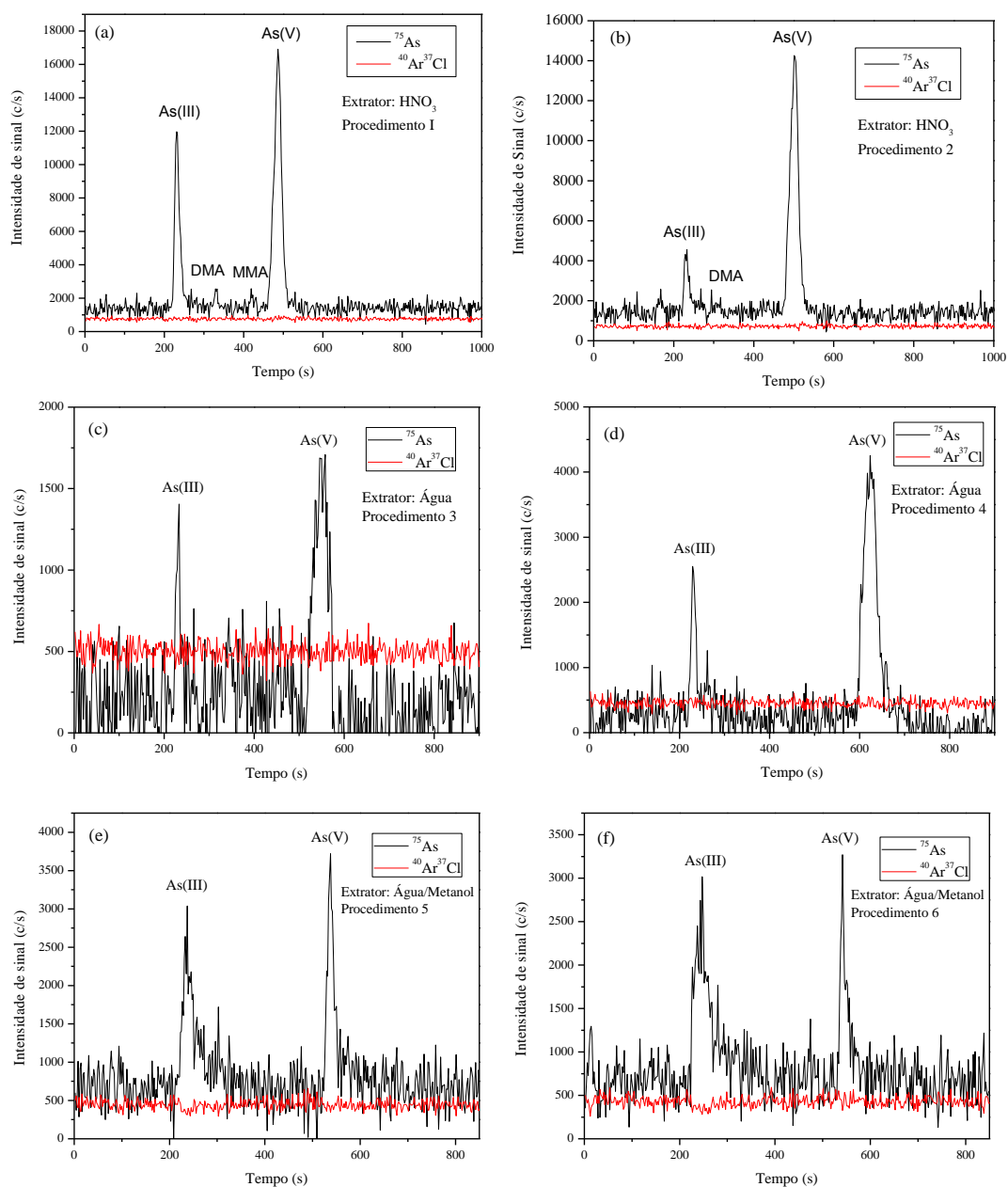


Figura 5.1.4.1 Cromatogramas (HPLC-ICP-QMS) obtidos para as espécies de As e para a possível interferência em  $m/z$  77 para os procedimentos 1 – 6, respectivamente (a) - (f).



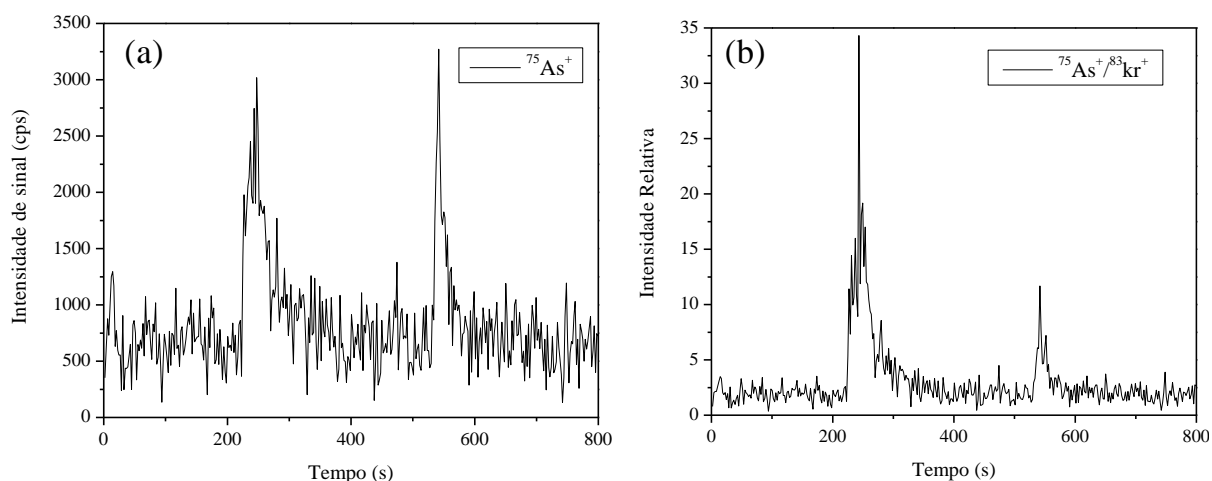


Figura 5.1.4.2 Comparação entre os cromatogramas (referentes ao extrato do Procedimento 3) obtidos por HPLC-ICP-QMS sem (a) e com a utilização do método do IFS (b).

### 5.1.5. Conclusões Parciais

- O extrator ácido foi o que apresentou melhor eficiência de extração, da ordem de 90 %, seguido do extrator água, entre 60 % e 70 %.
- O extrator que apresentou pior desempenho foi a mistura água-metanol que mostrou valores de extração da ordem de 56 %, com diminuição de aproximadamente 10 % dos teores extraídos à medida que se aumentou a fração orgânica.
- Os resultados mostraram que a exatidão melhorou com o uso do IFS. Pode-se observar um incremento da exatidão quando utilizados os extratores água e metanol, já com o uso do ácido nítrico essa melhora não foi observada o que provavelmente ocorreu, pois a razão analito/interferente era grande o suficiente para que o interferente não fosse sentido.
- O sinal analítico em  $m/z$  77 foi menos significativo para o extrator ácido, seguido da mistura metanol:água, sendo que para os extratos aquosos o

sinal m/z 77 foi o mais significativo coincidindo com a linha de base do espectro do As.

#### **5.1.6. Estudo da estabilidade de espécies de arsênio em plantas armazenadas sob diferentes condições e temperaturas ao longo de 12 meses**

O método do IFS não foi aplicado nesta parte do trabalho, uma vez que para o procedimento de amostra adotado (Procedimento 2), o IFS não foi eficiente. Apesar do Procedimento 1 ter sido o único que promoveu a extração das quatro espécies de arsênio, optou-se pela escolha do Procedimento 2 por ter sido o que promoveu a melhor eficiência de extração, considerando-se que nesta parte do trabalho algumas condições de armazenamento da amostra (umidade e tamanho de partícula) poderão levar a baixa eficiência de extração. De acordo com os resultados obtidos no subitem 5.1.2, o valor total de As na amostra adotado e empregado nos demais cálculos referentes à eficiência de extração foi  $2,30 \pm 0,27 \text{ mg kg}^{-1}$  na amostra liofilizada e moída. Na Figura 5.1.6.1 é possível ter um panorama dos processos ocorridos durante a extração de espécies de As nas amostras armazenadas sob diferentes condições ao longo de 12 meses.

A princípio nota-se que a extração foi mais eficiente nas amostras que foram liofilizadas e moídas (87 - 90 %) comparativamente as amostras apenas acondicionadas sob diferentes temperaturas (53 - 66 %), (Figura 5.1.6.1 e Tabela 5.1.6.1). Nota-se também que a razão As(III)/As(V) muda quando é comparada a planta fresca com a planta liofilizada e moída. A amostra liofilizada e moída apresentou teores mais elevados de As(V), já a amostra liofilizada e armazenada à 4 °C apresentou maiores teores de As(III). As amostras mantidas à -18 °C divergem um pouco. Nos meses 2 e 6 apresentam mais As(III) e nos demais meses mais As(V). As amostras acondicionadas à -80 °C voltam a apresentar mais As(V), mas menos do que a amostra liofilizada e moída, esta última é também a que mais se assemelha à amostra fresca. Neste momento do trabalho a

grande dúvida é se houve processos de conversão de espécies durante o processo de moagem e liofilização ou durante o congelamento/descongelamento da amostra. Apesar de a amostra ter sido analisada fresca, a baixa recuperação das espécies não permite uma afirmação sobre os processos ocorridos. Tal comportamento é difícil de ser explicado pois não se pode comprovar qual procedimento estaria gerando artefatos.

Como relatado por HUANG et al.<sup>91</sup> as interconversões entre As(III) e As(V) não estão somente relacionadas ao meio extrator mas também à matriz resultante do processo de extração, o organismo vegetal propriamente. HUANG e ILGEN<sup>111</sup> recomendaram a especiação de As em plantas frescas, pois supõem que a estocagem e a secagem causem modificações nas formas originais das espécies. No entanto, foi observada redução da quantidade extraída de As quando as amostras foram mantidas úmidas, e a relação As(III)/As(V) também mudou, assim como observado no presente trabalho.

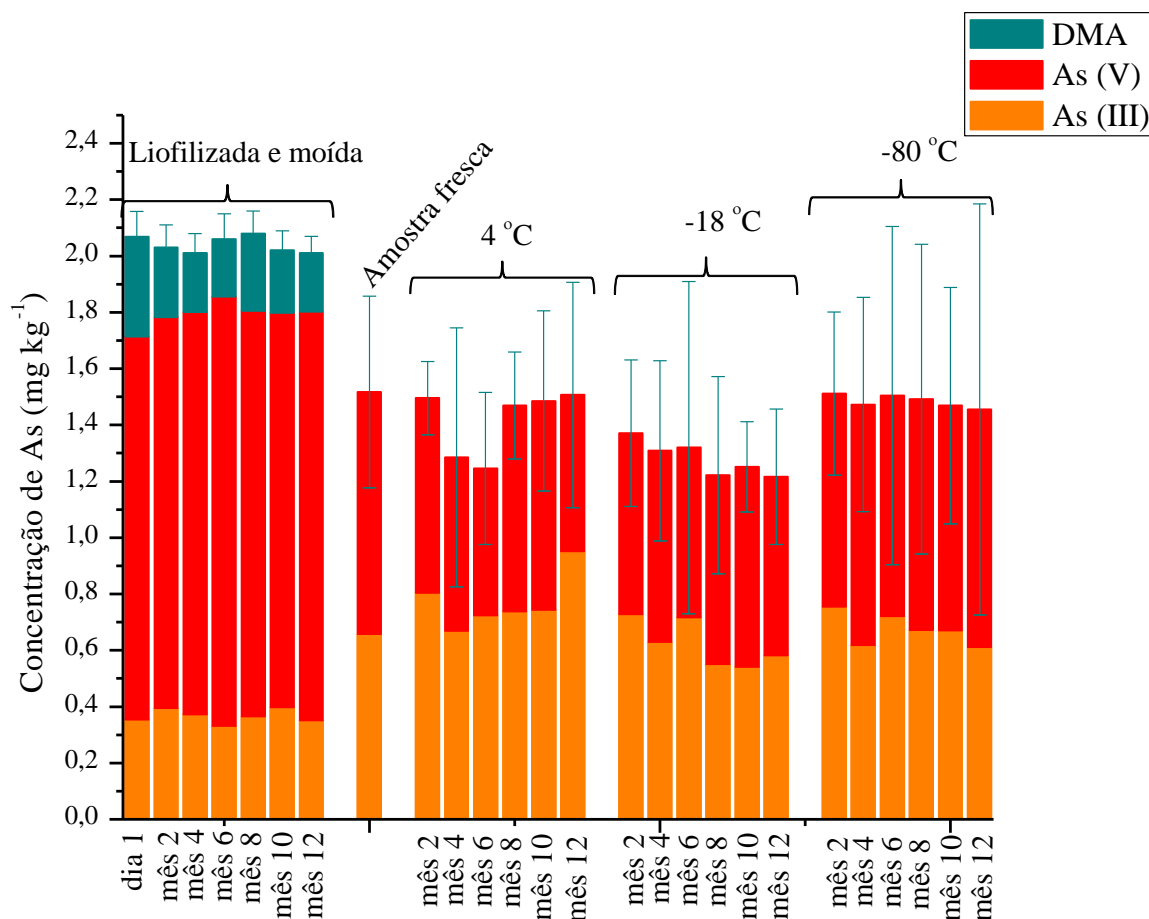


Figura 5.1.6.1 Concentração de espécies de As na amostra (mg kg<sup>-1</sup>; média±desvio padrão; n=3) em função do tempo e condições de armazenamento.

Em contrapartida, PELL et al. <sup>101</sup> observaram que as plantas que não foram moídas (apenas cortadas) apresentaram baixa recuperação das espécies, provavelmente devido à falta de acesso a espécies retidas na estrutura celular da planta. Os autores também observaram que as plantas que foram congeladas apresentaram em média uma recuperação 60 % menor do que as plantas que não foram acondicionadas sob baixas temperaturas, sendo que os autores atribuíram este fato a perdas de As durante o processo de congelamento/descongelamento e recomendam a liofilização da amostra, mas não o congelamento.

Tabela 5.1.6.1 Razão As(III)/As(V) extraída e porcentagem total de As extraída para as condições da amostra avaliadas.

<b>Porção</b>	<b>Tratamento preliminar e temperatura de armazenamento</b>	<b>Tempo de armazenamento</b>	<b>As(III)/As(V)</b>	<b>As extraído (%)</b>
<b>A</b>	Amostra fresca	0	0,77	66,0±14,8
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Dia 1	0,26	89,9±3,91
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 2	0,29	88,3±3,48
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 4	0,26	87,4±3,04
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 6	0,22	89,6±3,91
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 8	0,25	90,4±3,48
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 10	0,28	87,8±3,04
<b>B</b>	Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 12	0,24	87,4±2,61
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 2	1,16	65,0±2,65
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 4	1,09	55,9±20,0
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 6	1,39	54,2±11,7
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 8	1,01	63,9±8,26
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 10	1,00	64,6±13,9
<b>C</b>	Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 12	1,71	65,5±17,4

<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 2	1,13	59,6±11,3
<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 4	0,93	56,9±13,9
<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 6	1,19	57,4±25,6
<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 8	0,82	53,1±15,2
<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 10	0,76	54,4±6,96
<b>D</b>	Cortada <sup>c</sup>	Mês 12	0,92	52,9±10,4
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 2	1,00	65,7±12,6
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 4	0,72	64,0±16,5
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 6	0,92	65,4±26,1
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 8	0,82	64,8±23,9
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 10	0,84	63,9±18,3
<b>E</b>	Cortada <sup>d</sup>	Mês 12	0,73	63,3±31,7

<sup>a</sup> temperatura ambiente; <sup>b</sup> 4 °C; <sup>c</sup> -18 °C e <sup>d</sup> -80 °C

É possível observar que apenas nas amostras liofilizadas e moídas foi possível extrair a espécie DMA, forma metilada do As, menos tóxica que o As inorgânico. Uma explicação seria o fato de algumas espécies estarem ligadas a estruturas celulares das plantas, sendo que o fato da planta não ter sido moída dificulta o acesso a tais espécies. SCHMIDT et al.<sup>22</sup>, não observaram diferenças nas plantas frescas e moídas quanto as quantidades de As(V) e DMA extraídos. No entanto, a quantidade de As(III) extraída na planta moída foi quase o dobro em relação à fresca. Os autores ainda apontaram a importância da homogeneidade da amostra, pois como esperado, os desvios padrão para as determinações de As na planta fresca foram maiores, o que concorda com o presente trabalho em comparação à amostra liofilizada e moída.

Quanto ao tempo de armazenamento em diferentes temperaturas, não foram observadas diferenças significativas ou tendências, sendo que as espécies se mantiveram relativamente estáveis (Tabela 5.1.6.2). No entanto, é possível observar maior estabilidade entre os meses, para a amostra liofilizada e moída, se comparado às amostras apenas acondicionadas sob baixas temperaturas. O desvio entre as réplicas para as amostras que não foram liofilizadas e moídas foi maior, sendo este comportamento relacionado à heterogeneidade da amostra. JEDYNAK et al.<sup>74</sup> verificaram que maior eficiência de extração, reprodutibilidade e estabilidade das espécies de arsênio foram obtidas com a amostra de planta seca, homogeneizada e sem o uso do nitrogênio líquido na moagem.

Os resultados obtidos apontam que o tamanho de partícula exerce influência sob a eficiência de extração e a seletividade da extração, uma vez que apenas para a amostra liofilizada e moída foi possível extrair o dimetilarsênio (DMA). ALAVA et al.<sup>32</sup> apontaram que o tamanho da partícula tem uma importância crucial na especiação de As quanto à eficiência de extração. Mas, diferentemente do obtido no presente trabalho, os autores notaram que a

eficiência de extração para cada espécie é afetada pelo tamanho de partícula da mesma forma, exceto para o As(III), que foi extraído em menor quantidade nos grãos inteiros.

A melhor forma de se conservar as espécies de interesse está relacionada ao que se pretende analisar, pois em estudos de As ligado a peptídeos foi observado um comportamento diferente por BLUEMLEIN et al.<sup>39</sup>. Os autores notaram que, a liofilização não foi uma boa alternativa, uma vez que ocorreram perdas de glutatona e fitoquelatinas e degradação dos compostos, sendo a forma livre do elemento liberada. Quanto à temperatura de estocagem, os autores observaram boa conservação das espécies de As ligadas a peptídeos, principalmente As<sup>(III)</sup>PC3, durante 21 dias de armazenamento e conservação sob temperatura de -80 °C.

Pode-se perceber que existem algumas controvérsias na literatura a respeito do melhor procedimento de armazenamento da amostra, portanto, deve-se considerar o tipo de amostra, as espécies que se pretende determinar, o tempo entre a extração e a análise e a instrumentação analítica disponível. Pois enquanto alguns autores recomendaram a moagem e a secagem das amostras para se obter maior homogeneidade e acesso às espécies, outros sugeriram que tais procedimentos podem levar a perda ou conversão de espécies.<sup>112,113</sup>



Tabela 5.1.6.2 Concentração das espécies de arsênio ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) encontradas na planta armazenada sob diferentes condições.

<b>Tratamento preliminar e temperatura de armazenamento</b>	<b>Tempo de armazenamento</b>	<b>As(III)</b>	<b>As(V)</b>	<b>DMA</b>	<b>Soma das espécies</b>
Amostra fresca	0	0,658±0,051	0,859±0,049	-	1,52±0,34
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Dia 1	0,354±0,005	1,36±0,08	0,354±0,007	2,07±0,09
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 2	0,396±0,007	1,39±0,05	0,247±0,004	2,03±0,08
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 4	0,373±0,004	1,43±0,03	0,209±0,002	2,01±0,07
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 6	0,332±0,007	1,52±0,06	0,204±0,006	2,06±0,09
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 8	0,366±0,003	1,44±0,08	0,275±0,007	2,08±0,08
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 10	0,397±0,009	1,40±0,07	0,221±0,003	2,02±0,07
Liofilizada e moída <sup>a</sup>	Mês 12	0,351±0,005	1,45±0,04	0,207±0,005	2,01±0,06
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 2	0,804±0,064	0,692±0,017	-	1,50±0,13
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 4	0,670±0,085	0,616±0,074	-	1,29±0,46
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 6	0,724±0,025	0,521±0,035	-	1,25±0,27
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 8	0,739±0,019	0,731±0,029	-	1,47±0,19
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 10	0,744±0,064	0,741±0,070	-	1,48±0,32
Liofilizada e cortada <sup>b</sup>	Mês 12	0,952±0,050	0,555±0,055	-	1,51±0,40
Cortada <sup>c</sup>	Mês 2	0,729±0,076	0,642±0,029	-	1,37±0,26

Cortada <sup>c</sup>	Mês 4	0,630±0,081	0,679±0,024	-	1,31±0,32
Cortada <sup>c</sup>	Mês 6	0,717±0,043	0,602±0,010	-	1,32±0,59
Cortada <sup>c</sup>	Mês 8	0,552±0,053	0,670±0,085	-	1,22±0,35
Cortada <sup>c</sup>	Mês 10	0,542±0,019	0,710±0,030	-	1,25±0,16
Cortada <sup>c</sup>	Mês 12	0,582±0,012	0,634±0,081	-	1,22±0,24
Cortada <sup>d</sup>	Mês 2	0,755±0,044	0,757±0,039	-	1,51±0,29
Cortada <sup>d</sup>	Mês 4	0,619±0,029	0,854±0,015	-	1,47±0,38
Cortada <sup>d</sup>	Mês 6	0,721±0,023	0,783±0,012	-	1,50±0,60
Cortada <sup>d</sup>	Mês 8	0,672±0,014	0,819±0,043	-	1,49±0,55
Cortada <sup>d</sup>	Mês 10	0,671±0,012	0,798±0,056	-	1,47±0,42
Cortada <sup>d</sup>	Mês 12	0,612±0,033	0,843±0,017	-	1,46±0,73

<sup>a</sup> temperatura ambiente; <sup>b</sup> 4 °C; <sup>c</sup> -18 °C e <sup>d</sup> -80 °C

### 5.1.7. Conclusões Parciais

- Para as espécies de arsênio avaliadas, a liofilização e moagem criogênica foram os procedimentos de preparo que forneceram os melhores resultados.
- Apenas o armazenamento da amostra sob baixas temperaturas resultou em extração pouco eficiente. Além disso, em cada condição, ao longo dos meses as espécies de As mantiveram-se estáveis.
- A proporção de As (III)/As(V) mudou entre a planta fresca e a liofilizada e moída, indicando possível interconversão durante o processo de secagem e moagem.
- Devido à baixa eficiência da extração das espécies na amostra fresca, não é possível uma resposta conclusiva sobre os efeitos. O tamanho de partícula da amostra foi determinante na escolha do melhor procedimento de armazenamento.

## 5.2. Determinação de Cd e As ligados a fitoquelatinas

### 5.2.1. HPLC-ICP-QMS

Os primeiros resultados correspondem à injeção individual de padrões inorgânicos de As e o padrão de glutathiona (Figura 5.2.1.1). Pode ser observado que tanto os padrões inorgânicos como os padrões juntamente com a glutathiona (tripeptídeo) não interagiram com a coluna cromatográfica. O fato de todos apresentarem o mesmo tempo de retenção mostra que não houve interação e que os mesmos eluíram no volume morto da coluna. Para os padrões inorgânicos esse resultado seria esperado, uma vez que a coluna utilizada é uma coluna de fase reversa (C18), portanto uma fase apolar. No entanto, quando os padrões de

As e Cd foram adicionados ao padrão de glutathiona poderiam ocorrer interações entre os mesmos e a formação de compostos como fitoquelatinas ou mesmo a glutathiona ligada aos elementos pelas ligações S-As ou S-Cd, que provavelmente teriam interação com a fase estacionária. Mas tais interações não ocorreram, como pode ser observado na Figura 5.2.1.1, já que os três cromatogramas apresentaram o mesmo tempo de retenção.

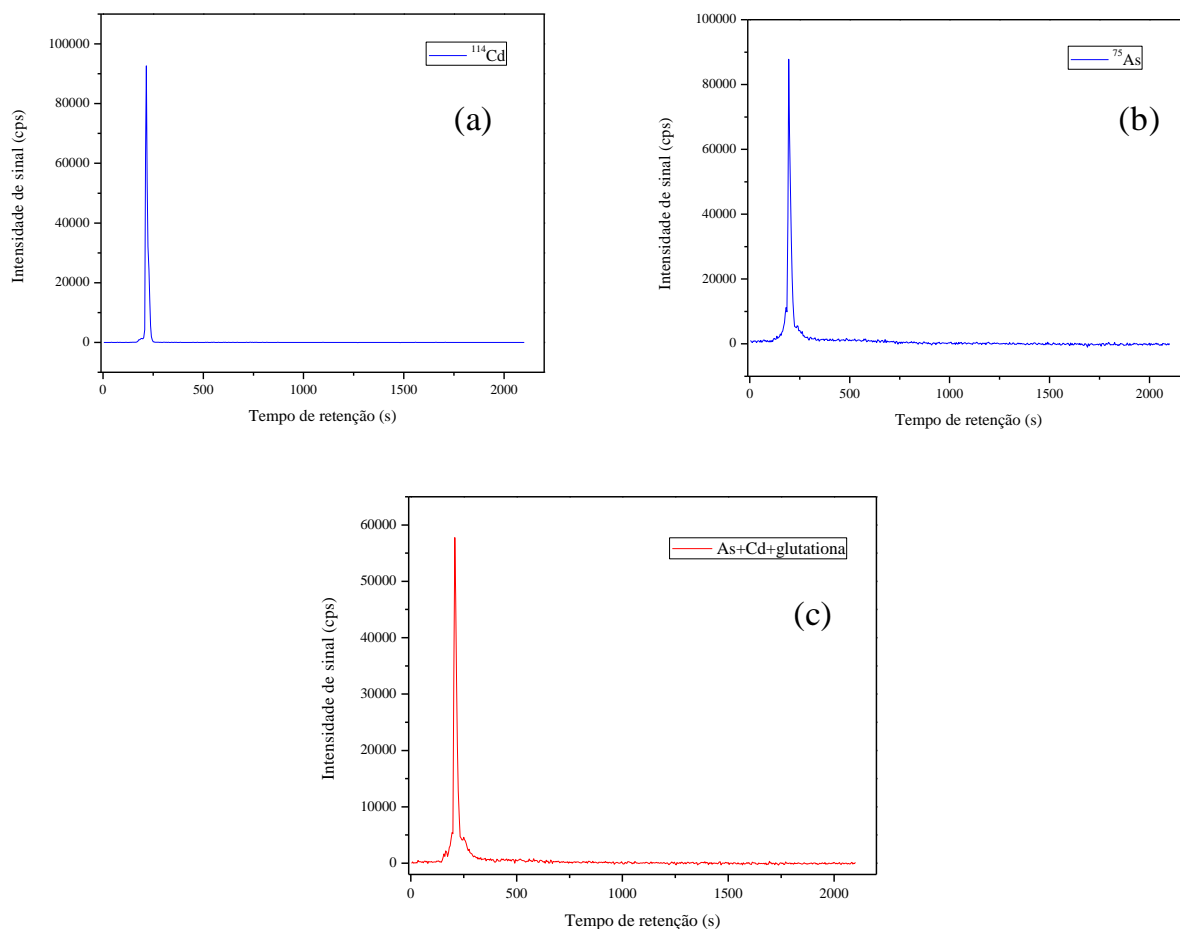


Figura 5.2.1.1 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS; (a) padrão inorgânico de As, (b) padrão inorgânico de Cd, (c) padrões inorgânicos de As, Cd e glutathiona.

A Figura 5.2.1.2 e Figura 5.2.1.3 mostram os resultados da injeção dos extratos das amostras na coluna cromatográfica, pois apesar dos padrões injetados não sofrerem interação com a coluna, as amostras poderiam apresentar os compostos de fitoquelatinas e, conseqüentemente, apresentam interação com

a coluna de fase reversa. Foram injetados extratos de amostras armazenadas por 1 ano à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sem qualquer procedimento prévio.

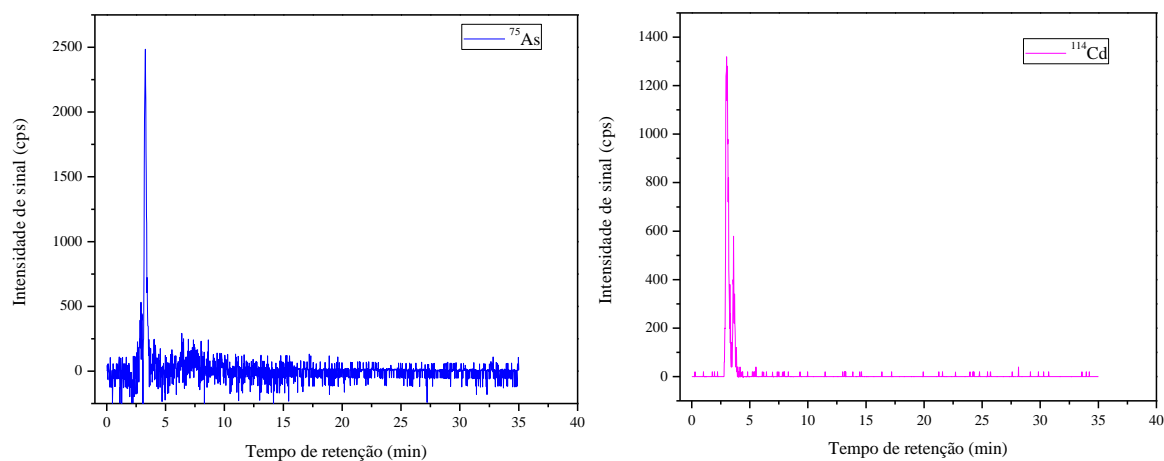


Figura 5.2.1.2 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS para Cd e As dos extratos das amostras armazenadas sob temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

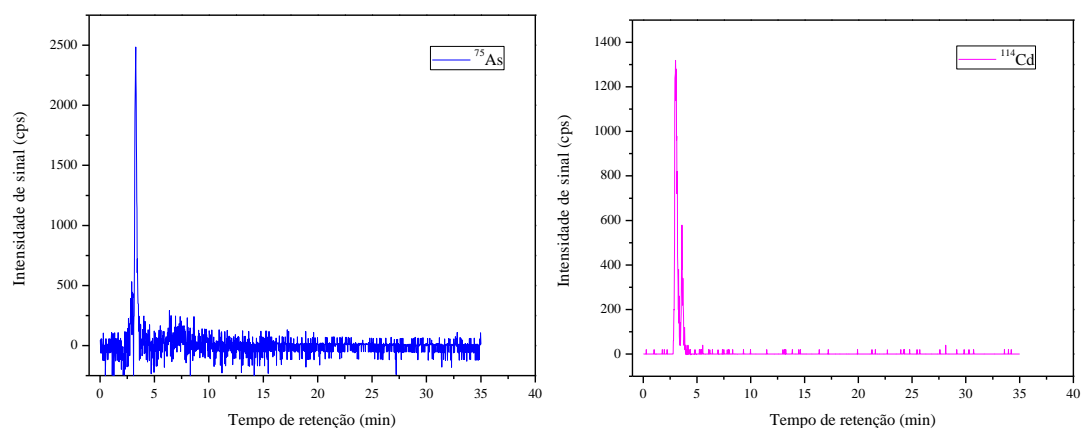


Figura 5.2.1.3 Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS para Cd e As dos extratos das amostras armazenadas sob temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

No entanto, como pode ser observado, tanto as amostras armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  como as armazenadas à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  não apresentaram compostos ligados a Cd e As que tenham interação com a coluna cromatográfica, novamente só foram observados os padrões inorgânicos de As e Cd. Três explicações para esses resultados podem ser apresentadas, uma é o fato dos compostos não terem sido

extraídos, uma vez que após a retirada dos freezers as amostras foram submetidas a extração sem moagem prévia, e trabalhos da literatura tem mostrado que é necessária a moagem para se ter acesso a compostos ligados à parede celular, lignina, lipídeos e celulose insolúvel de tecidos vegetais.<sup>92,93,94</sup> A segunda explicação diz respeito ao fato de terem sido analisadas a parte aérea das plantas e sabe-se que as fitoquelatinas são formadas principalmente nas raízes, a fim de diminuir o efeito tóxico do elemento sobre a planta e impedir o seu translocamento até a parte aérea<sup>70,71</sup>, portanto independente da manipulação das amostras ou da instrumentação analítica empregada pode ser que complexos As-PC ou Cd-PC simplesmente não existam nas folhas da forrageira analisada. A última explicação seria a degradação dos compostos já que as amostras foram armazenadas por longo período, embora o armazenamento tenha ocorrido sob baixas temperaturas. Apesar de BLUEMLEIN et al.<sup>39</sup> relatarem a conservação de espécies  $As^{III}PC_3$  em amostras de *Thunbergia alata* armazenadas por 21 dias à -80 °C, não se sabe por quanto tempo essas amostras permaneceriam estáveis. Os autores recomendaram que, nos casos em que a análise imediata da planta não seja possível, o armazenamento da planta fresca à -80 °C mostra-se uma boa alternativa. Sob estas condições, a integridade dos complexos de peptídeos, como  $As^{III}PC_3$ , foi assegurada por 21 dias. No entanto, compostos menos estáveis podem ser detectados segundo os autores até 9 dias depois de armazenados à -80 °C. Ainda enfatizaram que a liofilização, a fim de preservar complexos As-PC em material vegetal, mostrou-se uma estratégia inadequada no caso de *T. alata*, devido à quase total desintegração de peptídeos de arsênio.

### 5.2.2. HPLC-ESI-MS

Apesar dos resultados obtidos por HPLC-ICP-MS não terem sido elucidativos em relação à existência ou não de complexos As-PC e Cd-PC, optou-se pela análise dos extratos dessas amostras por HPLC-ESI-MS.

Novamente não foram observados compostos de fitoquelatinas, nem outros compostos como glutathiona ou compostos livres que contenham enxofre e sejam possíveis ligantes dos elementos estudados. Alguns problemas como uma diluição alta da amostra podem ter prejudicado os resultados, uma vez que foi realizada uma diluição pensando na sensibilidade do ICP-MS, no entanto sabe-se que o ESI-MS apresenta sensibilidade inferior, portanto os primeiros cromatogramas eram apenas o sinal de fundo correspondente à fase móvel e ao extrator utilizados. Porém, mesmo diminuindo a diluição em um experimento posterior, não foram encontrados os principais compostos procurados, correspondentes às razões  $m/z$  308, 540 e 772 relativos à glutathiona, à PC<sub>2</sub> e à PC<sub>3</sub>, respectivamente. Outro inconveniente durante o procedimento analítico foi o fato de que os primeiros padrões injetados, correspondentes a PC<sub>2</sub> ( $m/z$  540) e PC<sub>3</sub> ( $m/z$  772) encontravam-se degradados. Eram compostos sintetizados em laboratórios (não comerciais) e armazenados por longo período, o que pode ter ocasionado a degradação dos mesmos. O espectro de massa correspondente a essa injeção é apresentado na Figura 5.2.2.1, onde se pode observar o pico correspondente a cisteína ( $m/z$  122), unidade formadora das fitoquelatinas, e não à PC<sub>3</sub> ( $m/z$  772).

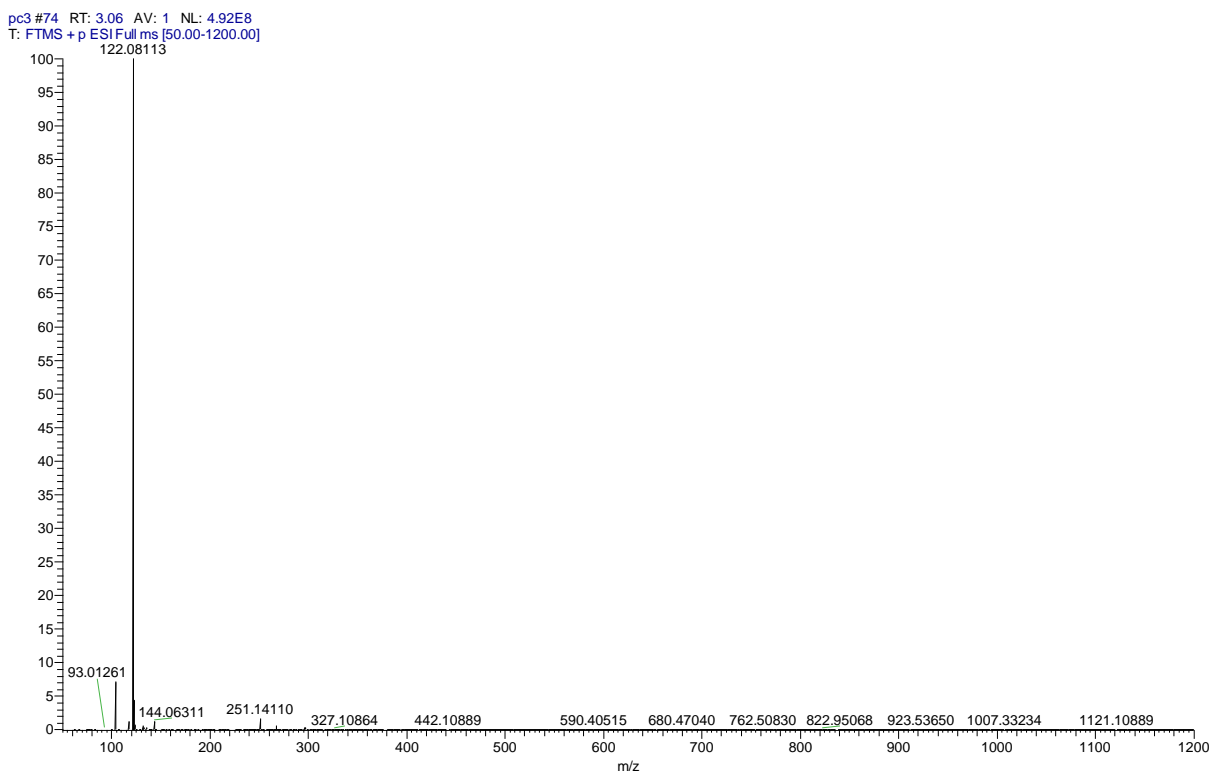


Figura 5.2.2.1 Espectro de massa do padrão de PC<sub>2</sub> degradado.

Diante dos problemas ocorridos, novos padrões de PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> foram adquiridos comercialmente e devidamente armazenados até a análise. O cromatograma referente a essa separação da glutathione, PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> é apresentado na Figura 5.2.2.2. Como pode ser observado, houve boa separação dos padrões, o que é uma vantagem no momento da injeção das amostras por se tratar de uma matriz complexa, e que, portanto, requer boa separação dos compostos de interesse. Além disso, o tempo de retenção das espécies foi similar ao trabalho de RAAB et al.<sup>114</sup>, apesar de terem sido usadas colunas de marcas diferentes. No trabalho dos autores supracitados os tempos de retenção da glutathione, PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> foram 5,2; 13,0 e 22,1 min, respectivamente. É possível notar que o composto PC<sub>3</sub> apresenta uma capacidade de ionização menor que os demais, pois embora tenham sido adicionadas quantidades iguais dos padrões, a sua concentração estimada foi menor.



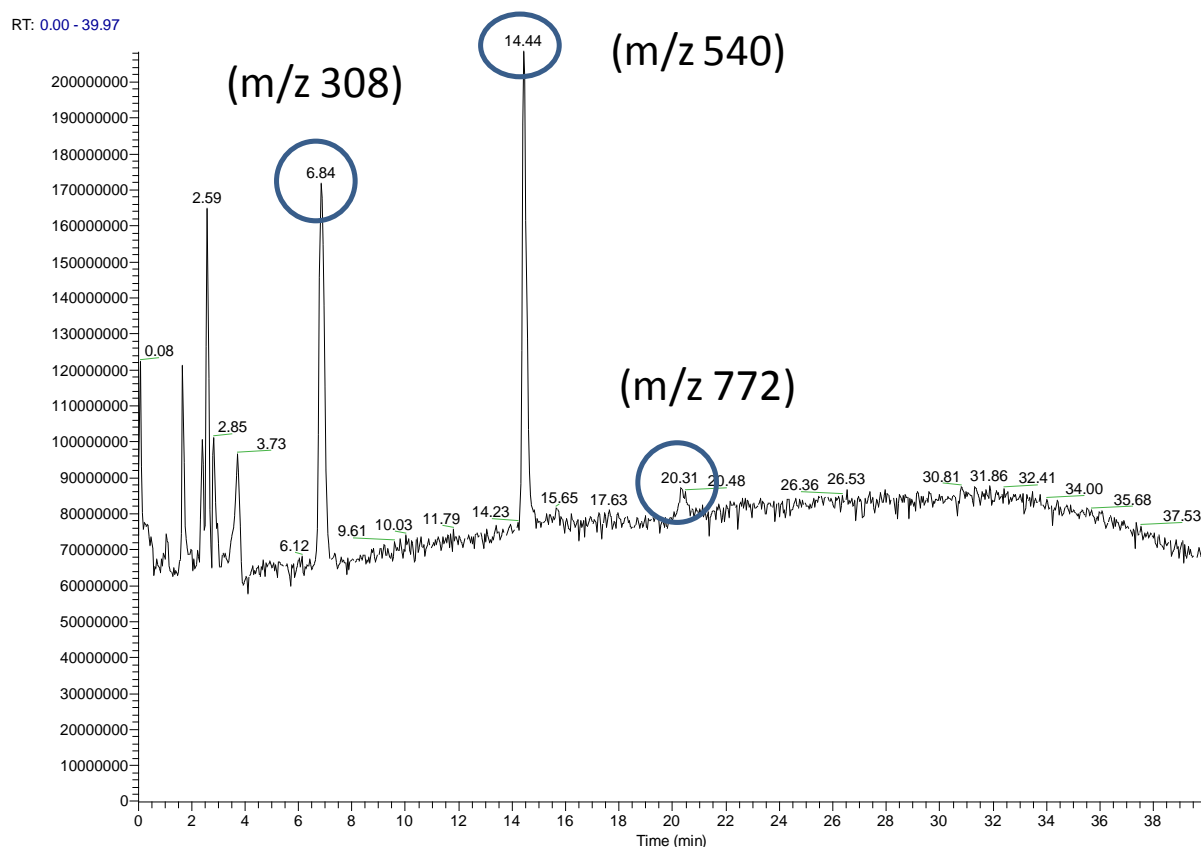


Figura 5.2.2.2 Separação dos padrões de glutathione (m/z 308); PC<sub>2</sub> (m/z 540) e PC<sub>3</sub> (m/z 772) através do acoplamento HPLC-ESI-MS.

Quando quantidades equimolares de As e Cd foram adicionadas aos padrões de glutathione (GSH), PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub>, os tempos de retenção dessa mistura de padrões não sofreu alteração significativa, os tempos para GSH, PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> foram 6,4; 13,6 e 20,4 respectivamente. Além disso, observou-se a formação em solução de dois compostos, a PC<sub>2</sub> oxidada (m/z 538) e a glutathione oxidada GSSG (m/z 613), Figura 5.2.2.3.

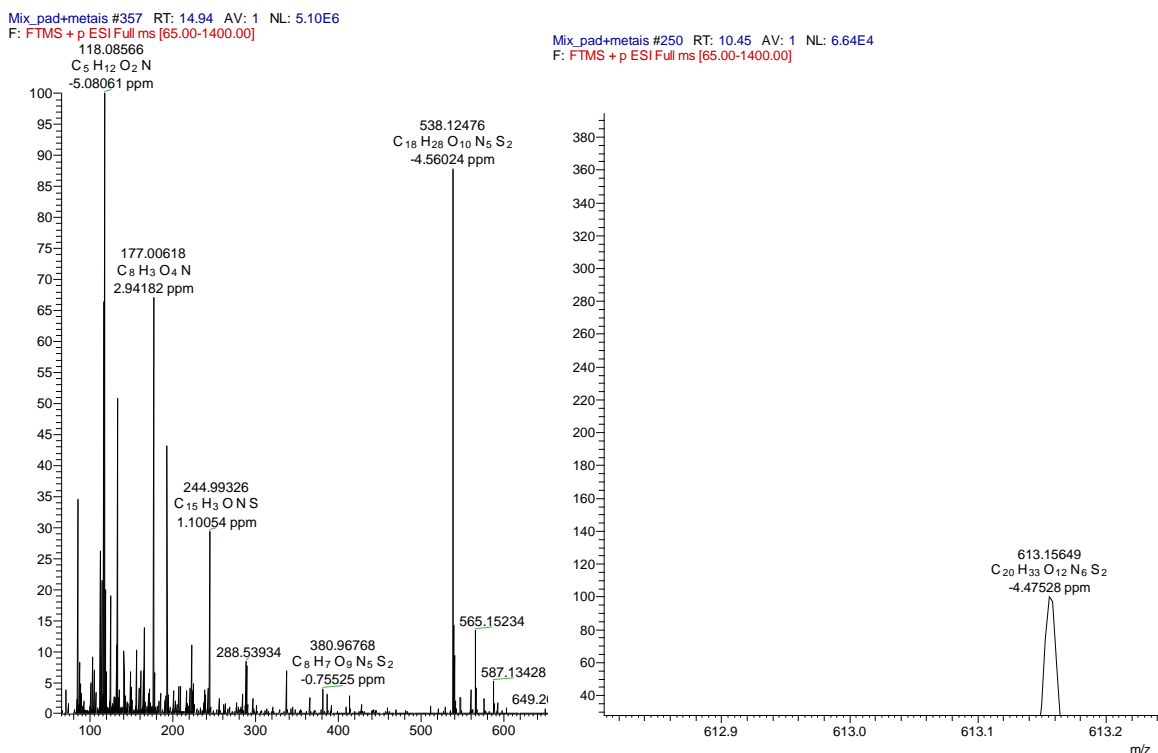


Figura 5.2.2.3 Espectro de massa dos compostos GSSG (m/z 538) e PC<sub>2</sub> oxidada (m/z 613) observados quando injetada uma mistura de GSH, PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub>, As e Cd.

Durante o preparo das amostras e injeção das mesmas, houve um cuidado para que o tempo entre a extração das espécies e determinação não fosse superior a 6 h e a fim de atender tais recomendações, as amostras foram cortadas e moídas no dia da extração e análise. A Tabela 5.2.2.1 apresenta os compostos encontrados, fórmula, razão massa/carga e tempo de retenção das amostras: mudas (raiz, caule e folha) e da “planta desenvolvida” (raiz e folha), além das amostras que receberam a dose 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd e As do experimento de germinação em papel. As amostras: folhas da “planta desenvolvida” e as amostras que não receberam As e Cd (folhas e raízes) do experimento de germinação não apresentaram os complexos com As, fitoquelatinas e glutatona.

Tabela 5.2.2.1 Glutationa (GSH), fitoquelatinas (PC2 e PC3), formas reduzidas dos complexos e complexos As-PC encontradas nas amostras de forrageira.

Amostra	Espécie química	Fórmula	Razão m/z	Tempo de retenção (min)
Raiz_muda	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	7,0
	PC <sub>2</sub> oxidada	$C_{18}H_{27}N_5O_{10}S_2$	538	15,8
	PC <sub>2</sub>	$C_{18}H_{29}N_5O_{10}S_2$	540	14,5
	PC <sub>3</sub> oxidada	$C_{26}H_{39}N_7O_{14}S_3$	770	21,0
	As <sup>(III)</sup> -PC <sub>3</sub>	$C_{26}H_{38}N_7O_{14}S_3As$	844	22,0
Caule_muda	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	7,0
	PC <sub>2</sub>	$C_{18}H_{29}N_5O_{10}S_2$	540	14,4
	PC <sub>3</sub>	$C_{26}H_{41}N_7O_{14}S_3$	772	21,5
	As <sup>(III)</sup> -PC <sub>3</sub>	$C_{26}H_{38}N_7O_{14}S_3As$	844	21,7
	GS-As <sup>(III)</sup> -PC <sub>2</sub>	$C_{28}H_{43}N_8O_{16}S_3As$	919	15,2
	As <sup>(III)</sup> -(GS) <sub>3</sub>	$C_{30}H_{47}N_9O_{18}S_3As$	993	7,3
Folha_muda	GSH oxidada	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	307	11,2
	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	7,1
	PC2 oxidada	$C_{18}H_{27}N_5O_{10}S_2$	538	15,7
	PC2	$C_{18}H_{29}N_5O_{10}S_2$	540	14,5
	PC3 oxidada	$C_{26}H_{39}N_7O_{14}S_3$	770	22,8
	As <sup>(III)</sup> -PC <sub>3</sub>	$C_{26}H_{38}N_7O_{14}S_3As$	844	21,5
Raiz_planta	GSH oxidada	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	307	11,2
	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	7,0
	PC2 oxidada	$C_{18}H_{27}N_5O_{10}S_2$	538	14,2
	GSSG	$C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	613	11,2
	PC3 oxidada	$C_{26}H_{39}N_7O_{14}S_3$	770	19,2
	GS-As(III)-PC3	$C_{36}H_{53}N_{10}O_{20}S_4As$	1149	27,9
Folha_germ_10	GSH oxidada	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	307	10,9
Raiz_germ_10	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	6,5
	PC <sub>2</sub> oxidada	$C_{18}H_{27}N_5O_{10}S_2$	538	15,4
	PC <sub>2</sub>	$C_{18}H_{29}N_5O_{10}S_2$	540	14,0
Folha_germ_20	GSH oxidada	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	307	10,9
	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	6,5
Raiz_germ_20	GSH oxidada	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	307	10,6
	GSH	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	308	6,5
	PC <sub>2</sub> oxidada	$C_{18}H_{27}N_5O_{10}S_2$	538	15,3
	PC <sub>2</sub>	$C_{18}H_{29}N_5O_{10}S_2$	540	13,8
	As <sup>(III)</sup> -PC <sub>3</sub>	$C_{26}H_{38}N_7O_{14}S_3As$	844	20,9

Exceto as amostras do experimento de germinação, as demais apresentaram pelo menos um complexo As-PC ou As-GS. Os compostos encontrados com maior frequência foram GSH (m/z 308) e PC<sub>2</sub> (m/z 540) e suas respectivas formas oxidadas (m/z 307 e 538). A glutationa oxidada GSSG m/z 613, com uma ponte de enxofre, foi encontrada apenas na raiz da “planta desenvolvida”. De acordo com RAAB et al.<sup>107</sup>, As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub> e GS-As<sup>(III)</sup>-PC<sub>2</sub> foram a espécies dominantes em todas as amostras de *Helianthus annuus* avaliadas, já a PC<sub>2</sub> oxidada era a forma livre de arsênio predominante em todas as partes da planta, assim como observado no presente trabalho.

A fitoquelatina PC<sub>3</sub> foi encontrada apenas no caule das mudas. Por outro lado, a sua forma oxidada ocorreu com maior frequência. O complexo As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub> (m/z 844) foi encontrado em várias partes das plantas estudadas, por se tratar de um complexo estável. O complexo GS-As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub> (m/z 1149) foi encontrado apenas nas raízes da planta desenvolvida, provavelmente por ser menos estável e necessitar de uma estrutura vegetal mais desenvolvida. No entanto, o GS-As<sup>(III)</sup>-PC<sub>2</sub> (m/z 919) e As<sup>(III)</sup>-(GS)<sub>3</sub> (m/z 993) que também são complexos pouco estáveis, foram encontrados no caule das mudas. ZHANG et al.<sup>27</sup> destacaram que apesar da abundante presença de GSH em amostras de lentilha, As<sup>(III)</sup>-GS<sub>3</sub> não foi detectado, provavelmente porque esse complexo é termodinamicamente menos estável do que os complexos As<sup>(III)</sup>-PC's. Ainda, os autores enfatizaram que em plantas que não são hiperacumuladoras de As, a tolerância ao mesmo está totalmente relacionada à síntese de glutationa e fitoquelatinas. Na Figura 5.2.2.4 são apresentados o cromatograma e os espectros de massa da amostra de caule das mudas. Optou-se por apresentar o cromatograma e espectros de massa apenas dessa amostra por ter sido a que mais apresentou complexos As-PC.

Cabe enfatizar que as mudas apresentaram complexos de arsênio nas três partes avaliadas (raiz, caule e folha), diferentemente da planta desenvolvida que só apresentou na sua raiz. Uma possível explicação seria o fato de que a planta em seu crescimento inicial, exige do seu mecanismo de defesa maior eficácia na

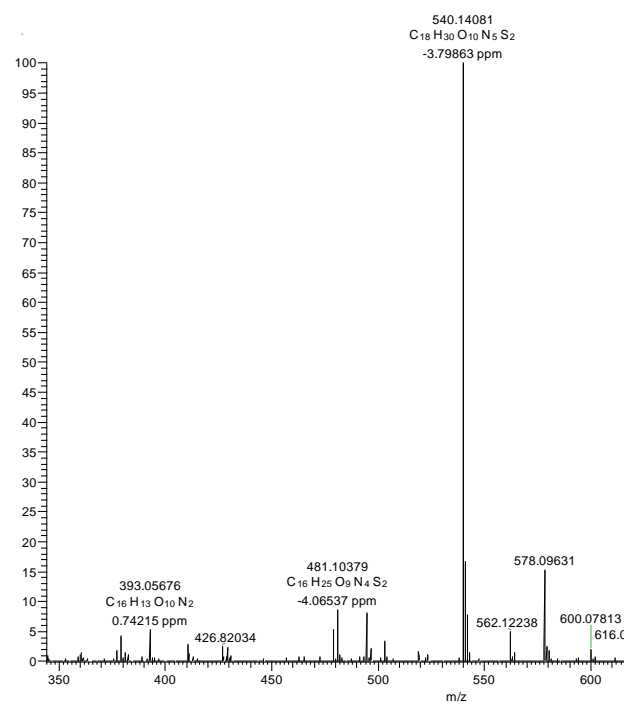
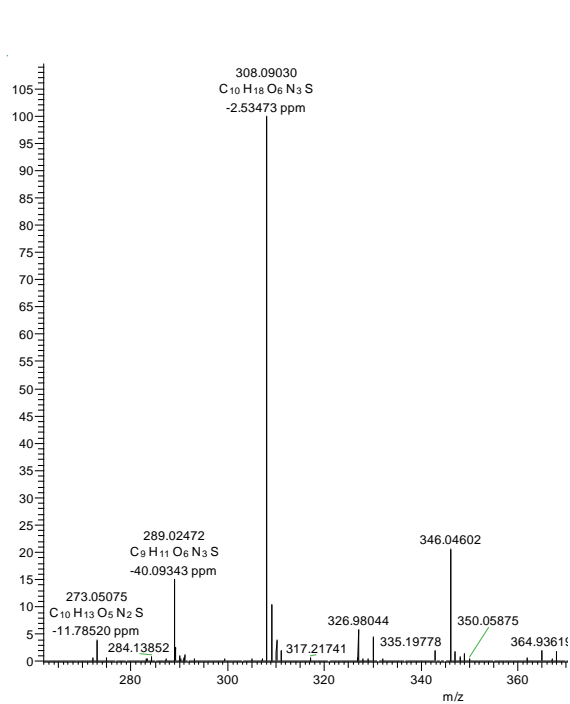
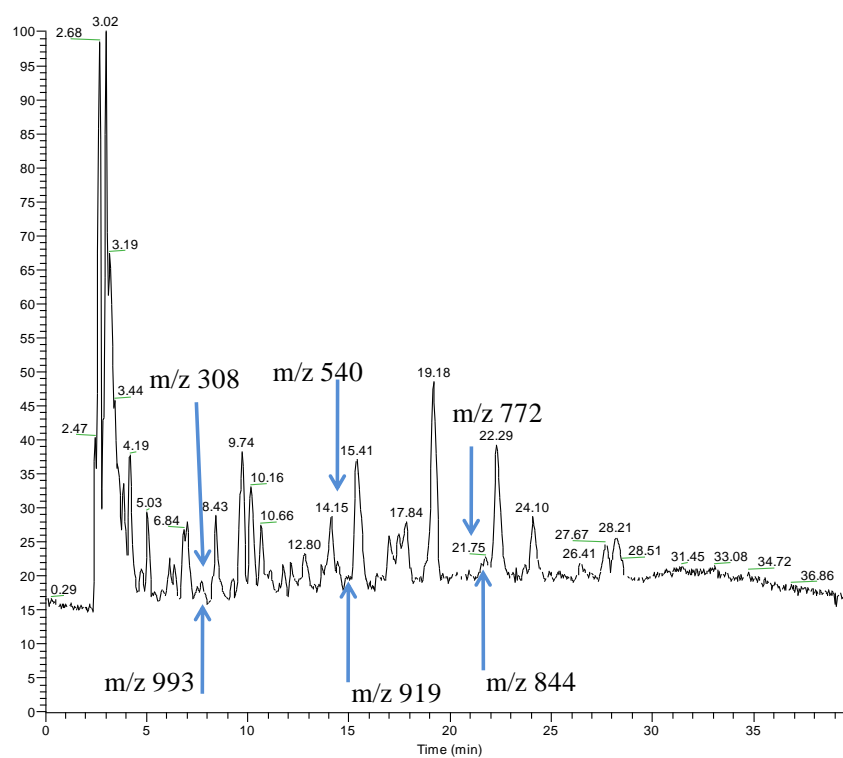
tentava de diminuir a toxicidade causada pelo elemento ao qual ela foi exposta. E essa tentativa se traduz na formação de complexos com As e fitoquelatinas. Por outro lado, a planta já desenvolvida e com o sistema radicular formado tende a se defender mantendo o As complexado nas raízes, impedindo sua translocação para a parte aérea. Outro aspecto que deve ser considerado é o tamanho do organismo vegetal, pois as mudas utilizadas tinham algo como 10 cm de comprimento total (raiz, caule e folha), já a “planta desenvolvida” apresentava no mínimo o dobro (20 cm) apenas de sistema radicular, portanto outra explicação para o fato de não terem sido encontrados complexos nas folhas da “planta desenvolvida”. Alguns autores acreditam que as fitoquelatinas formadas nas raízes tendem a se manter nesta parte da planta, como um estudo que demonstrou que a maioria do As em raízes de *Arabidopsis thaliana* é complexado por PCs e que a diminuição dos complexos  $\text{As}^{(\text{III})}$ -PC conduziu a um aumento de  $\text{As}^{(\text{III})}$  livre na parte aérea da planta.<sup>26</sup> Os autores reforçaram que além disso, melhorar a síntese de PCs nas raízes pode ser uma estratégia eficaz para diminuir o acúmulo de As em folhas ou grãos de alimentos. No entanto SADI et al.<sup>4</sup> encontraram mais complexos Cd-PC<sub>2</sub> nos brotos da planta do que nas raízes. Esses dados sugerem que fitoquelatinas podem contribuir para o acúmulo de cádmio na parte aérea das plantas. Como pode ser visto, algumas controvérsias em relação ao local característico de formação e alojamento das fitoquelatinas são encontradas na literatura.

A princípio, a formação das fitoquelatinas era vista apenas como um mecanismo detox da planta, sendo os complexos Cd-PCs alojados nos vacúolos das células. No entanto alguns trabalhos mostraram que em amostras de *Arabidopsis thaliana* as fitoquelatinas podem ser transportadas por longas distâncias, desde as raízes até as folhas e vice-versa.<sup>115,116</sup>

No presente trabalho, não foram encontrados complexos Cd-PC, o que não exclui a possibilidade de que eles existam e que durante o processo de ionização ou mesmo preparo da amostra o Cd tenha sido liberado.

Principalmente, porque dentre metais e semi-metais o Cd é um dos principais indutores da formação de fitoquelatinas.<sup>117</sup> Portanto, a existência das PC's livres pode ser vista como um indicativo de que existam complexos Cd-PC. CHASSAIGNE et al.<sup>118</sup> observaram que o ESI-MS/MS possibilitou a identificação de um ligante (PC) presente na fração que também continha cádmio em amostras de *Silene cucubalis*. Mas não existe qualquer prova da formação real de um complexo de Cd-PC. Ainda os autores destacaram que complexos Cd-PC não poderiam ser transferidos intactos para a fase gasosa, devido à extrema instabilidade dos mesmos.

Outro agravante é que a estabilidade de complexos Cd-PC é maior em meio neutro, no entanto os extratos foram obtidos em meio ácido (ácido fórmico 1 % v v<sup>-1</sup>). De acordo com SADI et al.<sup>4</sup> geralmente as condições de separação utilizadas em fase reversa-HPLC, bem como protocolos de derivação utilizados nestas técnicas, requerem uma acidificação, o que leva a dissociação de complexos de cádmio-fitoquelatina. E por isso os autores propuseram a especiação de Cd-PC por HPLC-ICP-MS, o extrator e fase móvel preparadas em pH próximo a 7 com os tampões tris e acetato como reagentes.



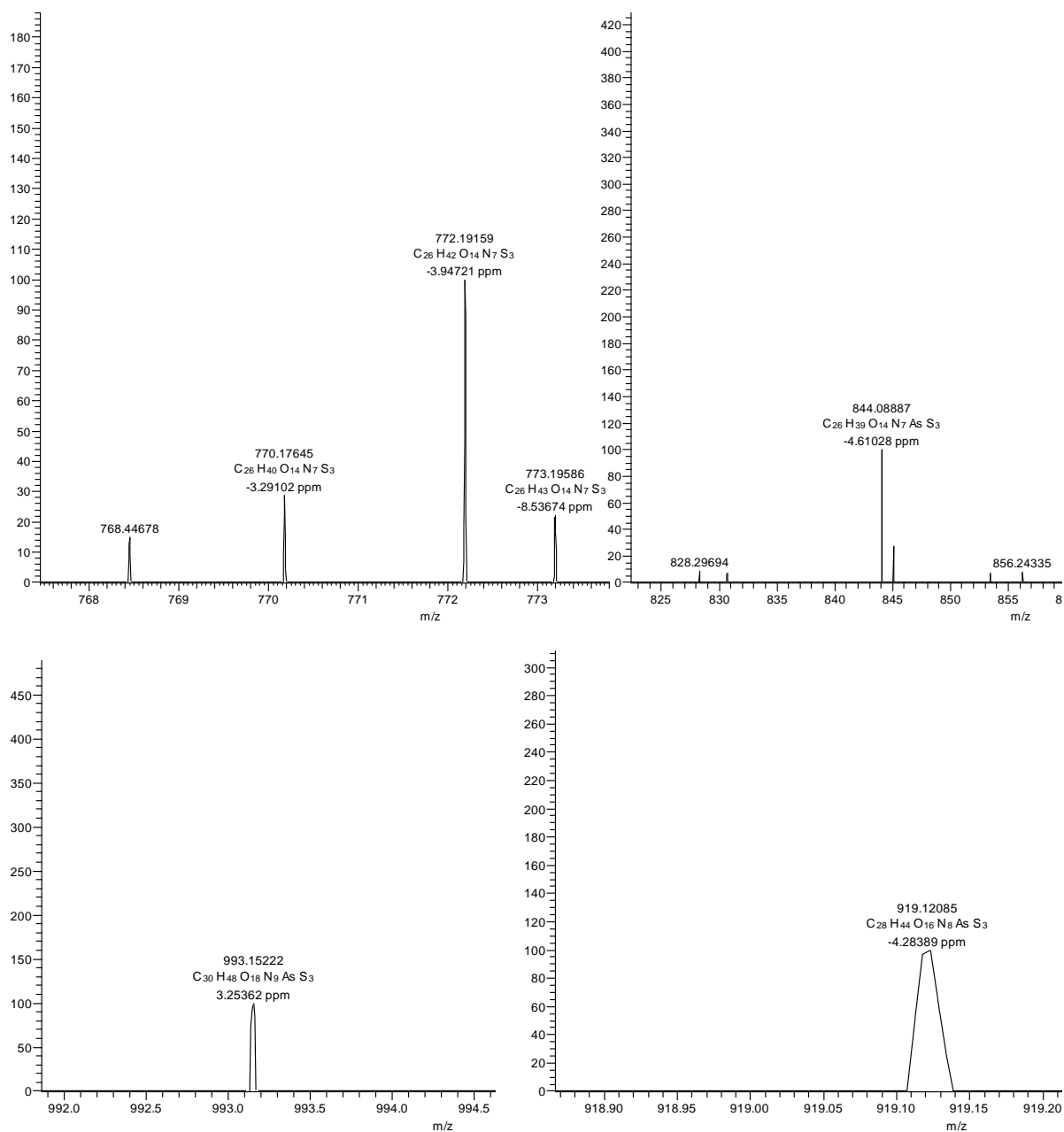


Figura 5.2.2.4 Cromatograma HPLC-ESI-MS da amostra de caule das mudas e espectros de massa dos compostos GSH (m/z 308); PC<sub>2</sub> (m/z 540); PC<sub>3</sub> (m/z 772); As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub> (m/z 844); GS-As<sup>(III)</sup>-PC<sub>2</sub> (m/z 919) e As<sup>(III)</sup>-(GS)<sub>3</sub> (m/z 993)

Diante dos resultados obtidos ficou claro que a especiação de Cd e As ligados a fitoquelatinas não deve ser realizada simultaneamente, pois enquanto um complexo requer meio ácido (As-PC), o outro (Cd-PC) é demasiadamente instável nessa faixa de pH.



### 5.2.3. Conclusões Parciais

- Compostos de fitoquelatinas só foram encontrados em amostras recém cortadas, extraídas e analisadas imediatamente.
- As fitoquelatinas de amostras armazenadas sem qualquer tratamento por longo período provavelmente sofreram degradação.
- Os principais compostos livres encontrados foram glutathiona, PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> e suas respectivas formas oxidadas. Já o complexo com maior ocorrência foi o As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub>.
- Os compostos Cd-fitoquelatinas são muito instáveis em meio ácido, portanto não foram encontrados, o que não exclui a possibilidade de que o Cd estivesse ligado às PC's antes da detecção.

## 6. Conclusões Gerais

Dentre as condições operacionais avaliadas para determinação do teor total de As e Cd nas amostras, a que proporcionou melhor exatidão do método foi a que envolveu a introdução de gás  $H_2$  através do skimmer sob uma vazão de  $80 \text{ mL min}^{-1}$ .

Os procedimentos de preparo de amostra avaliados para especificação de As mostraram que o extrator ácido ( $HNO_3$  2 % v v<sup>-1</sup>) foi o que apresentou melhor eficiência de extração, em relação ao teor total encontrado, o mesmo foi da ordem de 90 %, seguido do extrator água, entre 60 % e 70 %. O extrator que apresentou pior desempenho foi a mistura água-metanol que mostrou valores de extração da ordem de 56 %, com diminuição de aproximadamente 10 % dos teores extraídos à medida que se aumentou a concentração de metanol. Ainda que sejam numerosos os estudos dedicados a especificação de As, pode-se perceber que são necessários novas investigações que avaliem a resposta da matriz à diferentes procedimentos de extração.

Quanto ao emprego do método do padrão de interferência (IFS), foi observado que a exatidão melhorou com o uso do IFS. Pode-se observar um incremento na exatidão quando foram utilizados os extratores água e metanol, já com o uso do ácido nítrico essa melhora não foi observada o que provavelmente ocorreu, pois a razão analito/interferente foi grande o suficiente para que a interferência não se manifestasse.

No estudo da estabilidade de espécies de arsênio em plantas armazenadas sob diferentes condições, a liofilização seguida de moagem criogênica foi o procedimento de preparo que forneceu os melhores resultados. O armazenamento da amostra sob baixas temperaturas, sem tratamento prévio, resultou em extração pouco eficiente. Além disso, em cada condição, as espécies de As mantiveram-se estáveis ao longo de 12 meses. No entanto, a proporção de As (III)/As(V) mudou entre a planta fresca e a liofilizada e moída, indicando possível interconversão em alguma etapa do processo. Devido à baixa eficiência

de extração das espécies na amostra fresca, não é possível uma resposta conclusiva sobre os efeitos, mas cabe ressaltar que o tamanho de partícula da amostra foi determinante na escolha do melhor procedimento de armazenamento.

A etapa do trabalho onde foi investigada a existência de Cd e As ligados a fitoquelatinas mostrou que compostos de fitoquelatinas só foram encontrados em amostras recém cortadas, extraídas e analisadas imediatamente. As fitoquelatinas de amostras armazenadas por longo período provavelmente sofreram degradação. A partir dos resultados pode-se inferir que os principais compostos livres encontrados foram glutathiona, PC<sub>2</sub> e PC<sub>3</sub> e suas respectivas formas oxidadas. O principal complexo encontrado foi As<sup>(III)</sup>-PC<sub>3</sub>, provavelmente por ser mais estável que os demais. Os compostos Cd-PC's são instáveis em meio ácido, portanto não foram encontrados, o que não exclui a possibilidade de que o Cd estivesse ligado às fitoquelatinas na amostra original.

O desenvolvimento desta tese de doutorado levantou possibilidades de extensão e/ou investigação mais aprofundada de temas como a estabilidade de espécies de arsênio durante as etapas de amostragem, armazenamento e preparo de amostra. Além disso, a investigação de novas espécies IFS para a correção de interferências espectrais durante a especiação de arsênio e outros elementos como selênio e cromo mostra-se como uma nova frente de pesquisa. E finalmente, deve-se destacar o quão desafiadoras e inovadoras são as pesquisas que buscam compreender os processos químicos e bioquímicos que ocorrem entre metais, semi-metais e os tecidos vegetais e animais, como a formação das fitoquelatinas e metalotioneínas.

## 7. Referências Bibliográficas

1. WU, B.; ANDERSCH, F.; WESCHKE, W.; WEBER, H. & BECKER, J. S. "Diverse accumulation and distribution of nutrient elements in developing wheat grain studied by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging". *Metallomics* **5**: 1276, 2013.
2. DALCORSO, G.; MANARA, A. & FURINI, A. "An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots". *Metallomics* **5**: 1117, 2013.
3. CHASSAIGNE, H. & LOBINSKI, R. "Speciation of metal complexes with biomolecules by reversed-phase HPLC with ion-spray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection". *Fresenius J. Anal. Chem.* **361**: 267, 1998.
4. SADI, B. B. M.; VONDERHEIDE, A. P.; GONG, J.-M.; SCHROEDER, J. I.; SHANN, J. R. & CARUSO, J. A. "An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatins in genetically modified *Arabidopsis thaliana*". *J. Chromatogr. B* **861**: 123, 2008.
5. TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P. & ŁOBINSKI, R. "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)". *Pure Appl. Chem.* **72**: 1453, 2000.
6. COSTAS-RODRÍGUEZ, M.; HEGHE, L. V. & VANHAECKE, F. "Evidence for a possible dietary effect on the isotopic composition of Zn in blood via isotopic analysis of food products by multi-collector ICP-mass spectrometry". *Metallomics* **6**: 139, 2014.
7. FERGUSON, J. F. & J., GAVIS "A review of the arsenic cycle in natural waters". *Water Res.* **6**: 1259, 1972.
8. YAMAN, M. & KAYA, G. "Speciation of iron (II) and (III) by using solvent extraction and flame atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta* **540**: 77, 2005.
9. MOULIN, C.; LASZAK, I.; MOULIN, V. & TONDRE, C. "Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation". *Appl. Spectrosc.* **52**: 528, 1998.
10. CHEN, L.; GUO, Y.; YANG, L. & WANG, Q. "SEC-ICP-MS and ESI-MS/MS for analyzing in vitro and in vivo Cd-phytochelatin complexes in a Cd-hyperaccumulator *Brassica chinensis*". *J. Anal. At. Spectrom.* **22**: 1403, 2007.
11. ABEDIN, M. J.; CRESSER, M. S.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J. & COTTER-HOWELLS, J. "Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.)". *Environ. Sci. Technol.* **36**: 962, 2002.

12. ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. & MEHARG, A. A. "Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies". *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 535, 2010.
13. ZHAO, R.; ZHAO, M.; WANG, H.; TANEIKE, Y. & ZHANG, X.. "Arsenic speciation in moso bamboo shoot a terrestrial plant that contains organoarsenic species". *Sci. Total Environ.* **371**: 293, 2006.
14. TRINDADE, S. L.; NUNES, P. O. & FERNANDES, K. G. "Avaliação da distribuição de cobre associado a compostos de diferentes massas moleculares na polpa de açaí". *Acta Amaz.* **42**: 287, 2012.
15. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. 2º ed., Campinas, Editora da Unicamp, 2006, p. 456.
16. MEYER, V. R. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 4º ed., Nova Iorque, John WILEY & Sons, 2004.
17. THOMAS, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*. 2º ed., Boca Raton, CRC Press. 2008.
18. MONTASER, A. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. 1º ed., Nova Iorque, Wiley-VCH, 1998.
19. TAKATERA, K. & WATANABE, T. "Application of High-Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry to the Speciation of Cadmium-Binding Metallothionein-like Protein in a Cyanobacterium". *Anal. Sci.* **8**: 469, 1992.
20. TERISAHDE, P.; PANTSAR-KALLIO, M. & MANNINEN, P. K. G. "Simultaneous determination of arsenic species by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* **750**: 83, 1996.
21. B'HYMER, C. & CARUSO, J. A. "Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry" *J. Chromatogr. A* **1114**: 1, 2006.
22. SCHMIDT, A. C.; REISSER, W.; MATTUSCH, J.; POPP, P. & WENNRICH, R. "Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials". *J. Chromatogr. A* **889**: 83, 2000.
23. LARSEN, E. H.; HANSEN, M. & GÖSSLER, W. "Speciation and Health Risk Considerations of Arsenic in the Edible Mushroom *Laccaria Amethystina* Collected from Contaminated and Uncontaminated Locations". *Appl. Organomet. Chem.* **12**: 285, 1998.
24. LORETI, V.; TONCELLI, D.; MORELLI, E.; SCARANO, G. & BETTMER, J. "Biosynthesis of Cd-bound phytochelatin by *Phaeodactylum tricornutum* and their speciation by size-exclusion chromatography and ion-pair chromatography coupled to ICP-MS". *J. Anal. Bioanal. Chem.* **383**: 398, 2005.
25. ARROYO-ABAD, U.; MATTUSCH, J.; MODER, M.; ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P. & MATYSIK, F.-M. "Identification of degradation

- products of phenylarsonic acid and o-arsanilic acid in contact with suspensions of soils of volcanic origin". *Talanta* **99**: 310, 2012.
26. LIU, W. J.; WOOD, B. A.; RAAB, A.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. & FELDMANN, J. "Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* **152**: 2211, 2010.
  27. ZHANG, X.; UROIC, M. K.; XIE, W. Y.; ZHU, Y. G.; CHEN, B. D.; MCGRATH, S. P.; FELDMANN, J. & ZHAO, F. J. "Phytochelatins play a key role in arsenic accumulation and tolerance in the aquatic macrophyte *Wolffia globosa*". *Environ. Pollut.* **165**: 18, 2012.
  28. BLUEMLEIN, K.; KRUPP, E. M. & FELDMANN, J. "Advantages and limitations of a desolvation system coupled online to HPLC-ICPqMS/ES-MS for the quantitative determination of sulfur and arsenic in arseno-peptide complexes". *J. Anal. At. Spectrom.* **24**: 108, 2009.
  29. YATHAVAKILLA, S. K.; FRICKE, M.; CREED, P. A.; HEITKEMPER, D. T.; SHOCKEY, N. V.; SCHWEGEL, C.; CARUSO, J. A. & CREED, J. T. "Arsenic Speciation and Identification of Monomethylarsonous Acid and Monomethylthioarsonic Acid in a Complex Matrix". *Anal. Chem.* **80**: 775, 2008.
  30. JEDYNAK, L. & KOWALSKA, J. "Stability of arsenic species in hydroponic media and its influence on arsenic uptake and distribution in White mustard (*Sinapis alba* L.)". *Microchem. J.* **98**: 163, 2011.
  31. LOMAX, C.; LIU, W. J.; WU, L.; XUE, K.; XIONG, J.; ZHOU, J.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A.; MILLER, A. J. & ZHAO, F. J. "Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms". *New Phytol.* **193**: 665, 2012.
  32. ALAVA, P.; WIELE, T. V.; TACK, F. & LAING, G. D. "Extensive grinding and pressurized extraction with water are key points for effective and species preserving extraction of arsenic from rice". *Anal. Methods* **4**: 1237, 2012.
  33. NAM, S.-H.; CHENG, J.; MINDAK, W. R. & CAPAR, S. G. "Preliminary Results of Extraction, Separation and Quantitation of Arsenic Species in Food and Dietary Supplements by HPLC-ICP-MS". *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**: 903, 2006.
  34. ZHAO, F.-J.; STROUD, J. L.; EAGLING, T.; DUNHAM, S. J.; MCGRATH, S. P. & SHEWRY, P. R. "Accumulation, Distribution and Speciation of Arsenic in Wheat Grain". *Environ. Sci. Technol.* **44**: 5464, 2010.
  35. JEDYNAK, L.; KOWALSKA, J.; HARASIMOWICZ, J. & GOLIMOWSKI, J. "Speciation analysis of arsenic in terrestrial plants from arsenic contaminated area". *Sci. Total Environ.* **407**: 945, 2009.
  36. LARIOS, R.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; LEHECHO, I. & RUCANDIO, I. "A methodological approach to evaluate arsenic

- speciation and bioaccumulation in different plant species from two highly polluted mining areas". *Sci. Total Environ.* **414**: 600, 2012.
37. CHEN, R.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D.; TU, M. S.; KERTULIS, G. & MA, L. Q. "Arsenic speciation in Chinese brake fern by ion-pair high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectroscopy". *Anal. Chim. Acta* **504**: 199, 2004.
  38. PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E.; SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface". *J. Anal. At. Spectrom.* **25**: 1763, 2010)
  39. BLUEMLEIN, K.; RAAB, A. & FELDMANN, J. "Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation". *Anal. Bioanal. Chem.* **393**: 357, 2009.
  40. COLON, M.; HIDALGO, M. & IGLESIAS, M. "Correction strategies over spectral interferences for arsenic determination in aqueous samples with complex matrices by quadrupole ICP-MS". *J. Anal. At. Spectrom.* **24**: 518, 2009.
  41. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. & NÓBREGA, J. A. "Interference standard: a new approach to minimizing spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.* **26**: 1827, 2011.
  42. AMARAL, C. D. B.; DIONÍSIO, A. G. G.; SANTOS, M. C.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. & NOGUEIRA, A. R. A. "Evaluation of sample preparation procedures and krypton as an interference standard probe for arsenic speciation by HPLC-ICP-QMS". *J. Anal. At. Spectrom.* **28**: 1303, 2013.
  43. WOLF, R. E.; MORMAN, S. A.; HAGEMAN, P. L.; HOEFEN, T. M. & PLUMLEE, G. S. "Simultaneous speciation of arsenic, selenium and chromium: species stability, sample preservation, and analysis of ash and soil leachates". *Anal. Bioanal. Chem.* **401**: 2733, 2011.
  44. D'ILIO, S.; VIOLANTE, N.; MAJORANI, C. & PETRUCCI, F. "Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review". *Anal. Chim. Acta* **698**: 6, 2011.
  45. WANG, X. D. & KALINITCHENKO, I. "Principles and performance of the Collision Reaction Interface for the Varian 820-MS". Advantage Note 1, Varian-Inc. 2005.
  46. ELLIOTT, S.; KALINITCHENKO, I. & HOSS, H. "Innovative High Sensitivity 90-degree Reflecting ICP-MS Ion Optics for Routine Sample Analysis". Advantage Note 1, Varian-Inc. 2005.
  47. AMAIS, R. S.; DONATI, G. L. & NÓBREGA, J. A. "Application of the interference standard method for the determination of sulfur,

- manganese and iron in foods by inductively coupled plasma mass spectrometry". *Anal. Chim. Acta* **706**: 223, 2011.
48. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. & NÓBREGA, J. A. "Improving accuracy in inductively couple plasma-quadrupole mass spectrometry: the interference standard method". *Spectroscopy* **27**: 44, 2012.
  49. DONATI, G. L.; AMAIS, R. S. & NÓBREGA, J. A. "Interference standard and oxide ion detection as strategies to determine phosphorus and sulfur in fuel samples by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.* **27**: 1274, 2012.
  50. KOCH, I.; MORIARTY, M.; HOUSE, K.; SUI, J.; CULLEN, W. R.; SAPER, R. B. & REIMER, K. J. "Bioaccessibility of lead and arsenic in traditional Indian medicines". *Sci. Total Environ.* **409**: 4545, 2011.
  51. MESTROT, A.; FELDMANN, J.; KRUPP, E. M.; HOSSAIN, M. S.; ROMAN-ROSS, G. & MEHARG, A. A. "Field Fluxes and Speciation of Arsines Emanating from Soils". *Environ. Sci. Technol.* **45**: 1798, 2011.
  52. LÓPEZ, D. L.; BUNDSCHUH, J.; BIRKLE, P.; ARMIENTA, M. A.; CUMBAL, L.; SRACEK, O.; CORNEJO, L. & ORMACHEA, M. "Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America". *Sci. Total Environ.* **429**: 57, 2012.
  53. CASADO, M.; ANAWAR, H. M.; GARCIA-SANCHEZ, A. & SANTA REGINA, I. "Arsenic bioavailability in polluted mining soils and uptake by tolerant plants (El Cabaco mine, Spain)". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **79**: 29, 2007.
  54. JIAO, W.; CHEN, W.; CHANG, A. C. & PAGE, A. L. "Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review". *Environ. Pollut.* **168**: 44, 2012.
  55. JHA, B. R.; WAIDBACHER, H.; SHARMA, S. & STRAIF, M. "Study of agricultural impacts through fish base variables in different rivers". *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **7**: 609, 2010.
  56. MAHZUZ, H. M. A.; ALAM, R.; ALAM, N. M.; BASAK, R. & ISLAM, S. M. "Use of arsenic contaminated sludge in making ornamental bricks". *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **6**: 291, 2009.
  57. ALI, W.; ISAYENKOV, S. V.; ZHAO, F.-J. & MAATHUIS, F. J. M. "Arsenite transport in plants". *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2329, 2009.
  58. NARUKAWA, T.; INAGAKI, K.; KUROIWA, T. & CHIBA, K. "The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS". *Talanta* **77**: 427, 2008.
  59. GENG, W.; KOMINE, R.; OHTA, T.; NAKAJIMA, T.; TAKANASHI, H. & OHKI, A. "Arsenic speciation in marine product samples: Comparison of extraction-HPLC method and digestion-cryogenic trap method". *Talanta* **79**: 369, 2009.
  60. TUZEN, M.; SAYGI, K. O.; KARAMAN, I.; SOYLAK, M. "Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples". *Food Chem. Toxicol.* **48**: 41, 2010.



61. MEHARG, A. A.; WILLIAMS, P. N.; ADOMAKO, E.; LAWGALI, Y.; DEACON, C.; VILLADA, A.; CAMBELL, R. C. J.; SUN, G.; ZHU, Y.-G.; FELDMANN, J.; RAAB, A.; ZHAO, F.-J.; ISLAM, R.; HOSSAIN, S. & YANAI, J. "Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice". *Environ. Sci. Technol.* **43**: 1612, 2009.
62. BERGQVIST, C. & GREGER, M. "Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats". *Appl. Geochem.* **27**: 615, 2012.
63. GEISZINGER, A.; GOESSLER, W. & KOSMUS, W. "Organoarsenic compounds in plant and soil on top of an ore vein". *Appl. Organomet. Chem.* **16**: 245, 2002.
64. SCHMIDT, A. C.; KUTSCHERA, K.; MATTUSCH, J. & OTTO, M. "Analysis of accumulation, extractability, and metabolization of five different phenylarsenic compounds in plants by ion chromatography with mass spectrometric detection and by atomic emission spectroscopy". *Chemosphere* **73**: 1781, 2008.
65. HANSEN, H. R.; RAAB, A.; PRICE, A. H.; DUAN, G.; ZHU, Y.; NORTON, G. J.; FELDMANN, J. & MEHARG, A. A. "Identification of tetramethylarsonium in rice grains with elevated arsenic content". *J. Environ. Monit.* **13**: 32, 2011.
66. MAR, J. L. G.; REYES, L. H.; RAHMAN, G. M. M. & KINGSTON, H. M. S. "Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* **57**: 3005, 2009.
67. PAIK, M.-K.; KIM, M.-J.; KIM, W.-I.; YOO, J.-H.; PARK, B.-J.; IM, G.-J.; PARK, J.-E. & HONG, M.-K. "Determination of Arsenic Species in Polished Rice Using a Methanol-water Digestion Method". *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 634, 2010.
68. CASTILLO-MICHEL, H.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J.; DOKKEN, K. M.; MARCUS, M. A.; PERALTA-VIDEA, J. R. & GARDEA-TORRESDEY, J. L. "Localization and Speciation of Arsenic in Soil and Desert Plant *Parkinsonia florida* Using  $\mu$ XRF and  $\mu$ XANES". *Environ. Sci. Technol.* **45**: 7848, 2011.
69. ZHAO, F.-J.; STROUD, J. L.; KHAN, M. A. & MCGRATH, S. P. "Arsenic translocation in rice investigated using radioactive  $^{73}\text{As}$  tracer". *Plant Soil* **350**: 413, 2012.
70. GUO, J.; XU, W. & MA, M. "The assembly of metals chelation by thiols and vacuolar compartmentalization conferred increased tolerance to and accumulation of cadmium and arsenic in transgenic *Arabidopsis thaliana*". *J. Hazard. Mater.* **199**: 309, 2012.
71. BLUM, R.; MEYER, K. C.; WÜNSCHMANN, J.; LENDZIAN, K. J. & GRILL, E. "Cytosolic Action of Phytochelatin Synthase". *Plant Physiol.* **153**: 159, 2010.

72. VAN HULLE, M.; ZHANG, C.; ZHANG, X. & CORNELIS, R. "Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS". *Analyst* **127**: 634, 2002.
73. WHALEY-MARTIN, K. J.; KOCH, I. & REIMER, K. J. "Arsenic species extraction of biological marine samples (Periwinkles, *Littorina littorea*) from a highly contaminated site". *Talanta* **88**: 187, 2012.
74. JEDYNAK, L.; KOWALSKA, J.; KOSSYKOWSKA, M. & GOLIMOWSKI, J. "Studies on the uptake of different arsenic forms and the influence of sample pretreatment on arsenic speciation in White mustard (*Sinapis alba*)". *Microchem. J.* **94**: 125, 2010.
75. RUIZ-CHANCHO, M. J.; LOPEZ-SANCHEZ, J. F.; SCHMEISSER, E.; GOESSLER, W.; FRANCESCONI, K. A. & RUBIO, R. "Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites". *Chemosphere* **71**: 1522, 2008.
76. CARUSO, J. A.; SUTTON, K. L. & ACKLEY, K. L. *Elemental speciation: new approaches for trace element analysis*, 1<sup>o</sup> ed. Amsterdam, Elsevier Science B V, 2000.
77. SUN, Y.; ZHOU, Q.; WANG, L. & LIU, W. "Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator". *J. Hazard. Mater.* **161**: 808, 2009.
78. ZHANG, X.; ZHANG, S.; XU, X.; LI, T.; GONG, G.; JIA, Y.; LI, Y. & L. DENG. "Tolerance and accumulation characteristics of cadmium in *Amaranthus hybridus* L". *J. Hazard. Mater.* **180**: 303, 2010.
79. POŁEC-PAWLAK, K.; RUZIK, R.; ABRAMSKI, K.; CIURZYNSKA, M. & GAWRONSKA, H. "Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants". *Anal. Chim. Acta* **540**: 61, 2005.
80. ALLOWAY, B. J. *Heavy metals in soils*, 1<sup>o</sup> ed. Nova Iorque, John Wiley, 1990.
81. VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N. & NAIDU, R.. "Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review". *Adv. Environ. Res.* **8**: 121, 2003.
82. FU, X.; DOU, C.; CHEN, Y.; CHEN, X.; SHI, J.; YU, M. & XU, J. "Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L". *J. Hazard. Mater.* **186**: 103, 2011.
83. CORRÊA, L. A. & SANTOS, P. M. Manejo e utilização de plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon*., São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste, Documentos 34, 2003.
84. VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B. & MACEDO, M. C. M. "Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*". *Anais do Simpósio sobre manejo de pastagem*. Piracicaba-SP, 2000. vol. 17, p. 21-24.
85. CARMO, M. L.; PROCOPIO, S. O.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BARROSO, A. L. L.; SILVA, G. P.; CARMO, E. L.; BRAZ,

- G. B. P.; SILVA, W. F. P.; BRAZ, A. J. B. P. & PACHECO, L. P. "Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com plicoram". *Planta Daninha* **26**: 301, 2008.
86. MIR, K. A.; RUTTER, A.; KOCH, I.; SMITH, P.; REIMER, K. J. & POLAND, J. S. "Extraction and speciation of arsenic in plants grown on arsenic contaminated soils". *Talanta* **72**: 1507, 2007.
87. SCHMIDT, A. C.; REISSER, W.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R. & JUNG, K. "Analysis of arsenic species accumulation by plants and the influence on their nitrogen uptake". *J. Anal. At. Spectrom.* **19**: 172, 2004.
88. HEITKEMPER, D. T.; VELA, N. P.; STEWART, K. R. & WESTPHAL, C. S. "Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.* **16**: 299, 2001.
89. ZHANG, W.; CAI, Y.; TU, C. & MA, L. Q. "Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant". *Sci. Total Environ.* **300**: 167, 2002.
90. ZHANG, W.; CAI, Y.; DOWNUM, K. R. & MA, L. Q. "Arsenic complexes in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* (Chinese brake fern)". *J. Chromatogr. A* **1043**: 249, 2004.
91. HUANG, J. H.; ILGEN, G. & FECHER, P. "Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains". *J. Anal. At. Spectrom.* **25**: 800, 2010.
92. ZHENG, J.; HINTELMANN, H.; DIMOCK, B. & DZURKO, M. S. "Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS". *Anal. Bioanal. Chem.* **377**: 14, 2003.
93. MUÑOZ, O.; VÉLEZ, D. & MONTORO, R. "Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III)+As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry", *Analyst* **124**: 601, 1999.
94. STYBLO, M.; HUGHES, M. & THOMAS, D. "Liberation and analysis of protein-bound arsenicals". *J. Chromatogr. B* **677**: 161, 1996.
95. ZHENG, J. & HINTELMANN, H. "HPLC-ICP-MS for a comparative study on the extraction approaches for arsenic speciation in terrestrial plant, *Ceratophyllum demersum*". *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **280**: 171, 2009.
96. HORNER, N. S. & BEAUCHEMIN, D. "A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice". *Anal. Chim. Acta* **717**: 1, 2012.
97. RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; SCEBBA, F.; CARERI, M.; ZAGNONI, I.; PREDIERI, G.; PAGLIARI, M. & TOPPI, L. S.

- "Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess". *Plant Physiol. Bioc.* **43**: 45, 2005.
98. BRÄUTIGAM, A.; WESENBERG, D.; PREUD'HOMME, H. & SCHAUMLÖFFEL, D. "Rapid and simple UPLC-MS/MS method for precise phytochelatin quantification in alga extracts" *Anal. Bioanal. Chem.* **398**: 877, 2010.
99. ISERTE, L. O.; ROIG-NAVARRO, A. F. & HERNÁNDEZ, F. "Simultaneous determination of arsenic and selenium species in phosphoric acid extracts of sediment samples by HPLC-ICP-MS". *Anal. Chim. Acta* **527**: 97, 2004.
100. WILLIAMS, P. N.; PRICE, A. H.; RAAB, A.; HOSSAIN, S. A.; FELDMANN, J. & MEHARG, A. A. "Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure". *Environ. Sci. Technol.* **39**: 5531, 2005.
101. PELL, A.; MÁRQUEZ, A.; RUBIO, R. & LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F. "Effects of sample processing on arsenic speciation in marine macroalgae". *Anal. Methods* **5**: 2543, 2013.
102. RAAB, A.; MEHARG, A. A.; JASPARS, M.; GENNEY, D. R. & FELDMANN, J. "Arsenic-glutathione complexes-their stability in solution and during separation by different HPLC modes". *J. Anal. At. Spectrom.* **19**: 183, 2004.
103. BOSSU, C. M. Produção e caracterização de material de referência de forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de doutorado, 119 p.
104. GÓMEZ-ARIZA, J. L.; SÁNCHEZ-RODAS, D.; GIRÁLDEZ, I. & MORALES, E. "A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples". *Talanta* **51**: 257, 2000.
105. RAAB, A.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A. & FELDMANN, J. "Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations". *New Phytol.* **168**: 551, 2005.
106. CONAMA, Resolução Conama nº 420, de 28 de dezembro de 2009 Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/> acessado em 16 de novembro de 2013.
107. RAAB, A.; FERREIRA, K.; MEHARG, A. A. & FELDMANN, J. "Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*?". *J. Exp. Bot.* **58**: 1333, 2007.
108. BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J. & GUARDIÃ, M. "Especiação de arsênio uma revisão". *Quim. Nova* **23**: 58, 2000.
109. TUKAI, R.; MAHER, W. A.; MCNAUGHT, I. J. & ELLWOOD, M. "Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-

- inductively coupled plasma mass spectrometry" *J. Anal. Chim. Acta* **457**: 173, 2002.
110. FRANCESCONI, K. A. & KUEHNELT, D. "Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003" *Analyst* **129**: 373, 2004.
  111. HUANG, J. H. & ILGEN, G. "Factors affecting arsenic speciation in environmental samples: sample drying and storage". *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **20**: 347, 2006.
  112. LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; DE GIETER, M.; SMEDTS, B.; MEERT, C.; DE BISSCHOP, H. C.; MORABITO, R. & QUEVAUVILLER, P. "Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation". *TRAC-Trend Anal. Chem.* **25**: 1, 2006.
  113. RUBIO, R.; RUIZ-CHANCHO, M. J. & LOPEZ-SANCHEZ, J. F. "Sample pretreatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants". *TRAC-Trend Anal. Chem.* **29**: 53, 2010.
  114. RAAB, A.; FELDMANN, J. & MEHARG, A. A. "The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*". *Plant Physiol.* **134**: 1113, 2004.
  115. CHEN, A.; KOMIVES, E. A. & SCHROEDER, J. I. "An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatins in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* **141**: 108, 2006.
  116. GONG, J. M.; LEE, D. A. & SCHROEDER, J. I. "Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**: 10118, 2003.
  117. WESENBERG, D.; KRAUSS, G. J. & SCHAUMLOFFEL, D. "Metallothiolomics: Investigation of thiol peptide regulated metal homeostasis in plants and fungi by liquid chromatography-mass spectrometry". *Int. J. Mass Spectrom.* **307**: 46, 2011.
  118. CHASSAIGNE, H.; VACCHINA, V. & LOBINSKI, R. "Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry". *TRAC-Trend Anal. Chem.* **19**: 300, 2000.