



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM MOLUSCOS BIVALVES
DETERMINADAS POR LC-ICP-MS E LC-CVG-ICP-MS APÓS
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

Tese de Doutorado

Clarissa Marques Moreira

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM MOLUSCOS BIVALVES
DETERMINADAS POR LC-ICP-MS E LC-CVG-ICP-MS APÓS
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

por

Clarissa Marques Moreira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa
Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor
em Química**

Santa Maria, RS

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

**ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM MOLUSCOS BIVALVES DETERMINADAS POR
LC-ICP-MS E LC-CVG-ICP-MS APÓS EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-
ONDAS**

Elaborada por

Clarissa Marques Moreira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Valderi Luiz Dressler – Orientador (UFSM-RS)

Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges (UFSC-SC)

Dr. Diogo Pompéu de Moraes (UFRGS-RS)

Dr^a. Fabiana E. Barcellos da Silva (UNIPAMPA-RS)

Dr^a. Márcia Foster Mesko (UFPEL-RS)

Santa Maria, 05 de março de 2013.

Dedico este trabalho, em especial, à minha mãe, Dalana, fonte de inspiração e de vida e, irmãos (Marcos e Júnior), pela compreensão e incentivo em todos os momentos, principalmente, durante a minha ausência para dedicação deste trabalho.

Ao meu pai, Édison (*in memoriam*), pelos ensinamentos, valores e uma educação exemplar e, ao meu irmão Guilherme (*in memoriam*), pois eu não poderia deixar de lembrá-los com carinho nesta realização profissional.

Ao meu esposo, Marcos, agradeço pelo carinho, compreensão e, por acreditar tanto em meus ideais. Sua presença e incentivo foram fundamentais para a realização desta conquista.

“Lembra que o que importa é tudo que semeares, colherás.

Por isso, marca a tua passagem, deixa algo de ti, do teu minuto, da tua hora, do teu dia, da tua vida que possa contribuir para a humanidade”. (Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM e ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) pela possibilidade de execução deste trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, pela orientação e, também, pelo exemplo de profissionalismo, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Érico M. M. Flores, pela co-orientação nos trabalhos desenvolvidos no LAQIA que oportunizou o aprendizado em diversas áreas e crescimento profissional e, também, pela amizade.

À Prof^a. Maria das Graças A. Korn por conceder as amostras e informações relevantes a este trabalho.

Aos professores Diogo P. Moraes, Fabiana E. Barcellos da Silva e Márcia F. Mesko, pelas contribuições que deram à tese, como membros da comissão examinadora e, pelo aperfeiçoamento deste trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Daniel L. G. Borges, pela participação como banca examinadora e pelas sugestões feitas pelo aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos e professores do LAQIA, Cezar A. Bizzi, Fábio A. Duarte, Edson I. Muller, José Neri G. Paniz e Paola A. Mello pela colaboração nas atividades de pesquisa e amizade.

A todos os integrantes do LAQIA, em especial, ao Matheus A. G. Nunes, pela colaboração direta na execução deste trabalho e à Aline L. H. Müller, Camila D. L. Knorr, Cristiano C. Müller, Liange O. Diehl, Letícia S. F. Pereira, Lisarb O. Diehl, Michele S. P. Enders, Suelem Kaczala e Tielle Moraes pelo auxílio nas atividades de laboratório e pela amizade. E aos ex-integrantes do LAQIA, em especial, Fabiane G. Antes e Juliana S. F. Pereira pela amizade e convívio.

Ao Ademir e à Valéria da secretária do PPGQ pela atenção e disposição.

Em especial, agradeço a toda minha família pelo incentivo desta realização profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Arsênio na água do mar.....	5
2.1.1 Arsênio em organismos marinhos comestíveis.....	7
2.1.2 Toxicidade do arsênio	8
2.2 Moluscos bivalves como bioindicadores	10
2.2.1 Moluscos bivalves na baía de Todos os Santos (Bahia).....	11
2.3 Análise de especiação	14
2.3.1 Análise de especiação de As em organismos marinhos	16
2.3.1.1 Procedimentos para extração de espécies de As de organismos marinhos.....	17
2.3.2.2 Extração assistida por ultrassom.....	18
2.3.2.3 Extração assistida por micro-ondas.....	20
2.4 Técnicas para determinação de espécies de As em organismos marinhos.....	22
2.4.1 Cromatografia a líquido acoplado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	23
2.4.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	24
2.4.3 Geração química de vapor	26
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Instrumentação.....	34

4.2	Reagentes	37
4.3	Materiais diversos	38
4.4	Preparo das amostras.....	39
4.5	Procedimento para determinação de As total.....	41
4.6	Determinação de cloreto por IC	42
4.7	Otimização dos parâmetros de extração de espécies de As	42
4.7.1	Procedimento usado para extração das espécies de As assistida por ultrassom.....	43
4.7.2	Procedimento usado para a extração das espécies de As assistida por micro-ondas.....	43
4.7.3	Avaliação dos procedimentos de extração estudados.....	44
4.8	Estudo de estabilidade de espécies de As por extração assistida por micro-ondas.....	44
4.9	Especiação de As por LC-ICP-MS	45
4.9.1	Avaliação dos parâmetros que influenciam na separação das espécies de As	45
4.10	Análise de especiação de As por LC-CVG-ICP-MS.....	46
5	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	49
5.1	Determinação de As total.....	50
5.2	Determinação de cloreto nas amostras.....	51
5.3	Avaliação de procedimentos de extração das espécies de As	53
5.3.1	Tipo de solução extratora e concentração.....	53
5.3.2	Efeito da massa de amostra.....	55
5.3.3	Efeito do tempo de sonicação por UAE.....	57
5.3.4	Avaliação da extração por MAE	59
5.3.4.1	Efeito do tempo de extração por MAE.....	60
5.3.4.2	Efeito da temperatura de extração por MAE.....	62
5.4	Estudo de estabilidade de espécies de As.....	63
5.5	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS.....	65
5.5.1	Ajuste do instrumento ICP-MS	65
5.5.2	Especiação de As por LC-ICP-MS	65

5.5.2.1 Escolha da coluna de troca de íons	69
5.5.2.2 Escolha do tipo e concentração da fase móvel	70
5.5.2.3 Influência do pH e vazão da fase móvel.....	71
5.5.2.4 Separação e identificação das espécies de As	73
5.5.2.5 Condicionamento da coluna cromatográfica	73
5.5.2.6 Determinação de espécies de As por LC-ICP-MS.....	75
5.5.2.7 Estudo de interferências espectrais na determinação de As por LC-ICP-MS.....	81
5.6 Especificação de As por LC-CVG-ICP-MS	82
5.6.1 Escolha da concentração de NaBH ₄	83
5.6.2 Escolha da concentração de HCl	85
5.6.3 Escolha da vazão do gás de arraste	86
5.6.4 Estudo de AsB por LC-CVG-ICP-MS	87
5.7 Características analíticas da metodologia.....	104
6 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Espécies de As comumente presentes em sistemas ambientais e biológicos.....	5
Tabela 2.	Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves.....	29
Tabela 2.	Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves. (Continuação).....	30
Tabela 2.	Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves. (Continuação).....	31
Tabela 3.	Parâmetros instrumentais para a determinação de As total e análise de especiação de As.....	36
Tabela 4.	Concentração de As total em moluscos bivalves. Determinação por ICP OES após digestão por micro-ondas. (média \pm sd, $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3).....	50
Tabela 5.	Concentração de cloreto em moluscos bivalves coletadas em diferentes locais da BTS. Determinação por IC após MAE ($\% \pm$ sd, n = 3).....	52
Tabela 6.	Resultados obtidos da recuperação de As total após extração com MAE e UAE usando diferentes soluções extratoras. Resultados (%) representam a média e o desvio-padrão de 3 replicatas de cada amostra. Determinação de As total por ICP OES.....	54
Tabela 7.	Concentrações das espécies de As por LC-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada	

	amostra.....	95
Tabela 8.	Concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	96
Tabela 9.	Concentrações das espécies de As LC-CVG-ICP-MS em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	98
Tabela 10.	Concentrações das espécies de As LC-CVG-ICP-MS em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	99
Tabela 11.	Concentrações das espécies de As determinadas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	100
Tabela 12.	Concentrações das espécies de As determinadas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	101
Tabela 13.	Comparação dos resultados obtidos por LC-ICP-MS e a soma dos resultados de LC-CVG com os valores da diferença entre as duas técnicas e as concentrações de As total (extratos e digeridos) por ICP OES em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	102
Tabela 14.	Comparação estatística dos resultados obtidos por LC-ICP-MS e a soma dos resultados de LC-CVG com os valores da diferença entre as duas técnicas e as concentrações de As total (extratos e digeridos) por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.....	103
Tabela 15.	Características analíticas obtidas da metodologia aplicada para	

	LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS na determinação de espécies de As em moluscos bivalves.....	105
Tabela 16.	Resultados obtidos para As total e espécies de As por LC-ICP-MS nos CRMs ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{sd}$, $n = 3$).....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Moluscos bivalves (adaptado de Amaral <i>et al.</i>) ⁷⁵	10
Figura 2.	Mapa da baía de Todos os Santos (adaptado de Hatje <i>et al.</i>) ¹	12
Figura 3.	(a) <i>Macoma constricta</i> sp. (b) <i>Anomalocardia brasiliiana</i> sp.(c) <i>Iphigenia brasiliiana</i> sp. (d) <i>Trachycardium muricatum</i> sp. (adaptado de Amaral <i>et al.</i>) ⁷⁵	13
Figura 4.	Baía de Todos os Santos. (a) Tanheiros, (b) Ilha de Maré, (c) Bom Jesus dos Pobres, (d) Acupe e (e) Suape.....	40
Figura 5.	Coleta de moluscos bivalves. (a) indicativo de presença de molusco no manguezal apresentado na areia com formato de “pé-de-galinha” (b) modo de coleta “tradicional” dos moluscos pelos marisqueiros (c) acondicionamento dos moluscos em saco plástico (d) moluscos bivalves abertos com o tecido mole exposto.....	41
Figura 6.	Sistema LC-ICP-MS. 1- fase móvel; 2- degaseificador a vácuo; 3- bomba de LC; 4- injetor e alça de amostragem; 5- coluna guarda (troca aniônica); 6- coluna de troca aniônica; 7- nebulizador; 8- câmara de nebulização; 9 e 10- ICP.....	45
Figura 7.	Sistema LC-CVG-ICP-MS. Para LC-ICP-MS ver legenda da Figura 6 para o significado das letras e números. Para o sistema CVG: R ₁ - ácido clorídrico; R ₂ - NaBH ₄ ; B- bomba peristáltica; D- descarte; B ₁ - 30 cm; B ₂ - 10 cm; x e y- confluências; Ar- gás de arraste (argônio); G/L- separador gás/líquido. As setas indicam o sentido das soluções.....	47
Figura 8.	Desenvolvimento de metodologia para determinação de espécies de As em moluscos bivalves por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS.....	48

Figura 9.	Efeito da massa de amostra sobre a extração de As.....	56
Figura 10.	Efeito do tempo de sonicação na extração de As.....	58
Figura 11.	Amostras de moluscos bivalves liofilizadas (a) e amostras de moluscos bivalves após extração com micro-ondas (b).....	60
Figura 12.	Efeito do tempo de extração por MAE na extração de As.....	61
Figura 13.	Efeito da temperatura de extração por MAE na extração de As.....	62
Figura 14.	Estudo de estabilidade de espécies de As na amostra <i>Anomalocardia brasiliiana</i> sp. com adição equivalente a 20 µg L ⁻¹ de cada espécie de As após extração com água por MAE.....	64
Figura 15.	Cromatograma por LC-ICP-MS. Condição de eluição: (a) 30,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ , (b) 20,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ , (c) 15,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ e (d) 10,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH 8,5 e vazão de 1,25 mL min ⁻¹ . Coluna de troca aniônica PRP-X100.....	66
Figura 16.	Cromatograma por LC-ICP-MS. Condição de eluição: (a) 12,5 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ – 0 a 2 min, (b) 50,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ – 3 a 6 min, (c) 15,0 mmol L ⁻¹ – 8 a 10 min (NH ₄) ₂ CO ₃ e (d) 10,0 mmol L ⁻¹ (NH ₄) ₂ CO ₃ – 10 a 12 min. Coluna de troca aniônica PRP-X100. Fase móvel: pH 8,5, vazão: 1,10 mL min ⁻¹	67
Figura 17.	Cromatograma por LC-ICP-MS. Coluna de troca aniônica PRP-X100. Fase móvel: pH 6,5, vazão: 1,25 mL min ⁻¹ . Condição de eluição (a): fosfato de amônio 5 mmol L ⁻¹ – 0 a 1,7 min e 15 mmol L ⁻¹ – 1,7 a 5 min. Condição (b): fosfato de amônio 5 mmol L ⁻¹ com metanol a 1% – 0 a 1,8 min e 15 mmol L ⁻¹ com metanol a 1% – 1,8 a 4 min.....	68
Figura 18.	Cromatograma obtido a partir de uma solução mista de solução de referência de cada espécie de As na concentração de 10 µg L ⁻¹ por LC-ICP-MS. Injeção de 200 µL.....	71

Figura 19.	Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de As em solução de referência de cada espécie de As.....	72
Figura 20.	Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As em moluscos após extração com água por MAE. (a) Solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com NIST 1566b – “em preto”. (b) Sobreposição de solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco <i>Anomalocardia brasiliana sp.</i> – “em preto”.....	75
Figura 21.	Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As após extração com água por MAE. (a) Solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de <i>Anomalocardia brasiliana sp.</i> diluída 2 vezes e com adição de 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em preto”. (b) Solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco <i>Macoma constricta sp.</i> – “em preto”.....	77
Figura 22.	Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As após extração com água por MAE. (a) Solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de <i>Trachycardium muricatum sp.</i> – “em preto”. (b) Solução de referência a 10 µg L ⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, <i>p</i> -ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco <i>Iphigenia brasiliana sp.</i> – “em preto”.....	79
Figura 23.	Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de (a) solução de referência de cloreto a 500 mg L ⁻¹ por LC-ICP-MS. (b) água ultrapurificada.....	82
Figura 24.	Influência da concentração de NaBH ₄ sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.....	84

Figura 25.	Influência da concentração do HCl como meio reacional sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.....	85
Figura 26.	Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.....	86
Figura 27.	Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo $600 \mu\text{g L}^{-1}$ de AsB por LC-CVG-ICP-MS.....	87
Figura 28.	Cromatogramas obtidos após a injeção de $200 \mu\text{L}$ de solução referência e NIST 1566b. (a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma “a” ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS. Extração em água por MAE. UK(1): espécie desconhecida.....	89
Figura 29.	Cromatogramas obtidos após a injeção de $200 \mu\text{L}$ de solução referência e solução obtida da <i>Anomalocardia brasiliiana sp.</i> após extração com água sob MAE. (a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma “a” ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS. Extração em água por MAE. UK(1): espécie desconhecida.....	91
Figura 30.	Cromatogramas obtidos após a injeção de $200 \mu\text{L}$ de solução referência e <i>Macoma constricta sp.</i> (a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma “a” ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS. Extração em água por MAE. UK(1): espécie desconhecida.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*

AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *atomic fluorescence spectrometry*

ASE, extração acelerada com solvente, do inglês *accelerated solvent extraction*

C 18, grupos octadecil imobilizados sobre sílica

CE, eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

cps, contagens s⁻¹

CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*

CVG, geração química de vapor, do inglês *chemical vapor generation*

CZE, eletroforese capilar de zona, do inglês *capillary zone electrophoresis*

d.i., diâmetro interno

ES-MS, espectrometria de massa com ionização por *electrospray*, do inglês *electrospray mass spectrometry*

FI, injeção em fluxo, do inglês *flow injection*

GC-MS, espectrometria de massa acoplada à cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*

HG AFS, espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation-atomic fluorescence spectrometry*

HPLC, cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

HPLC-CVG-AAS, cromatografia a líquido de alta eficiência com geração química de vapor acoplado a espectrometria de absorção atômica, do inglês *high performance liquid chromatography-chemical vapor generation-atomic absorption spectrometry*

HPLC-CVG-AFS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de fluorescência atômica com geração química de vapor, do

inglês *high-performance liquid chromatography-chemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometry*

HPLC-UV-CVG-AFS, cromatografia a líquido de alta eficiência com ultravioleta acoplada a espectrometria de fluorescência atômica com geração química de vapor, do inglês *high-performance liquid chromatography-ultraviolet-chemical vapor generation-atomic absorption spectrometry*

IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada do inglês *international union of pure and applied chemistry*

LC-ES-MS, cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray, do inglês *liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*

m/z, razão massa/carga

MS, espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

PLE, extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized liquid extraction*

RF, radiofrequência, do inglês *radiofrequency*

rpm, rotações por minuto

SFC, cromatografia com fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid chromatography*

SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*

USEH, ultrassom com hidrólise enzimática assistida, do inglês *ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis*

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o preparo da amostra e o uso da cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) e LC acoplado ao sistema de geração química de vapor (CVG) e ICP-MS para a identificação e quantificação das espécies de As presentes em tecidos de moluscos bivalves. Condições relacionadas à extração das espécies de As foram avaliadas com o emprego de extração assistida por micro-ondas (MAE) e ultrassom (UAE). A influência dos principais parâmetros envolvidos na extração das espécies de As, como o tipo e concentração da solução extratora, massa de amostra, temperatura e o tempo de extração por MAE e o tempo de sonicação por US foram avaliados. Extração de As foi possível usando água a 80 °C (0,2 g de amostra e 6 mL de água) durante 6 min com MAE. Para a separação cromatográfica foram avaliados o tipo de fase móvel [(NH₄)₂CO₃ e (NH₄)₂HPO₄], a concentração (1 a 20 mmol L⁻¹), o pH (5,0 a 9,0), a vazão (1,05 a 1,45 mL min⁻¹) e o modo de eluição (isocrático e gradiente). O volume de amostra injetada no cromatógrafo foi fixado em 200 µL. Para a separação das espécies de As foi utilizada uma coluna de troca aniônica (Hamilton PRP-X100, 250 x 4,1 mm). Foram detectadas seis espécies de As nos moluscos, sendo identificadas somente a arsenobetaína (AsB), o As(III), o dimetilarsênio (DMA) e o ácido *p*-arsanílico (*p*-ASA). A melhor separação das espécies de As foi obtida por eluição gradiente utilizando as seguintes condições: 0 a 1,4 min empregando 6 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄, 1,4 a 2,7 min empregando 20 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂CO₃ e 2,7 a 15 min utilizando 6 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄. A vazão da fase móvel foi fixada em 1,25 mL min⁻¹. Os parâmetros de CVG avaliados foram a concentração de NaBH₄ e HCl e a vazão do gás de arraste, as quais foram fixadas em 1,0 % (m/v), 1,0 mol L⁻¹ e 1,15 L min⁻¹, respectivamente. Os procedimentos de extração e determinação de As total foram avaliados utilizando os materiais de referência certificados BCR 627 (*Tuna Fish Tissue*), DORM-2 (*Dogfish Muscle*) e NIST 1566b (*Oyster tissue*). A concordância entre os resultados obtidos foi de 95 ± 3 a 101 ± 5%, respectivamente. Os valores entre a soma das concentrações das espécies de As obtidos por LC-ICP-MS e As total nos digeridos e extratos obtidos, determinado por ICP OES também foram concordantes em um nível de confiança de 95% (Teste *t-Student*). Desta forma, o método desenvolvido empregando LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS foi considerado adequado para determinação de espécies de As em moluscos bivalves.

ABSTRACT

In this work, the aim of this study is to evaluate sample preparation procedures and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS) and LC coupled to chemical vapor generation (CVG) and ICP-MS (LC-CVG-ICP-MS) for identification and quantification of As species in mollusks collected in BTS. Conditions related to As species extraction were assessed with the use of microwave assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE). The influence of the main parameters involved in extraction of As species such as the type and concentration of extraction solution, sample mass, temperature and extraction time were evaluated. The extraction was possible by using water at 80 °C (0.2 g sample and 6 mL of water) for 6 min using MAE. For the chromatographic separation the type of mobile phase [(NH₄)₂CO₃ and (NH₄)₂HPO₄] concentration (1 to 20 mmol L⁻¹), pH (5.0 to 9.0), flow rate (1.05 to 1.45 mL min⁻¹) and elution mode (isocratic and gradient) were evaluated. The volume of sample injected into the chromatograph was fixed to 200 µL. For the separation of As species an anion exchange column (Hamilton PRP-X100, 250 x 4.1 mm) was used. Six As species were detected in the mollusks being identified arsenobetaine (AsB), As(III), dimethylarsenic acid (DMA) and *p*-arsanilic acid (*p*-ASA). The best separation of the As species was obtained by gradient elution mode and using the following program: 0 to 1.4 min using 6 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ to 1.4 to 2.7 min using 20 mmol L⁻¹ (NH₄)₂CO₃ and 2.7 to 15 min using 6 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄. The mobile phase flow rate was set at 1.25 mL min⁻¹. CVG parameters were evaluated and the concentrations of NaBH₄ and HCl, and carrier gas flow rate were set to 1.0% (m/v) 1.0 mol L⁻¹ and 1.15 L min⁻¹, respectively. The extraction procedures and determination of total As were evaluated using certified reference materials BCR 627 (Tuna Fish Tissue), DORM-2 (Dogfish Muscle) and NIST 1566b (Oyster tissue). The agreement of the results obtained was 95 ± 3 to 101 ± 5%, respectively. The sum of the concentrations of As species determined by LC-ICP-MS and the total As concentration in digested samples and extracts measured, determined by ICP OES were also in good agreement on a confidence level of 95% (Student t-Test). The developed methods by employing the LC-ICP-MS and LC-CVG-ICP-MS for As speciation analyses in bivalves mollusks are considered suitable.

1 INTRODUÇÃO

A baía de Todos os Santos (BTS), na Bahia, tem uma das mais importantes comunidades pesqueiras do Brasil, devido a uma imensa área de manguezais com enorme potencial para o cultivo de moluscos bivalves.¹ Os moluscos são capturados para o sustento próprio e complementação de renda das populações de marisqueiros.² Moluscos bivalves são considerados bioindicadores, pois apresentam a capacidade de filtrar em torno de 10 L h⁻¹ de água, acumulando com isso pequenas partículas e micro-organismos no seu organismo.³ Dessa forma, estes organismos podem ser utilizados diretamente no biomonitoramento dos impactos ambientais e na avaliação dos riscos para a saúde humana. Os moluscos bivalves mais estudados, considerando aspectos de toxicidade e contaminação, são mexilhões e ostras, uma vez que estes são muito utilizados para consumo humano, geralmente, *in natura* e representam uma fonte importante de nutrientes (minerais essenciais) e de baixo custo.⁴ No entanto, não há regulamentação pelos órgãos ambientais em relação a sua captura e nem mesmo legislação para avaliação dos mesmos quanto à presença de contaminantes. Neste contexto, moluscos bivalves são associados a casos de intoxicação alimentar, provavelmente pelo aumento de contaminação ambiental, quanto às atividades industriais e centros urbanos nas margens da BTS.⁵ Com o aumento das pesquisas sobre os efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos, muitos estudos apontam a utilidade de moluscos bivalves para estudos de biomonitoramento de As orgânico e inorgânico, uma vez que apresentam mobilidade reduzida e refletem condições específicas do lugar.⁶ Informações sobre espécies de As são importantes para avaliar implicações toxicológicas, bem como para elucidar o ciclo biogeoquímico deste elemento no ambiente marinho.⁷ Além disso, moluscos bioacumulam As inorgânico (mais tóxico) e o transformam em compostos metilados tóxicos (como o monometilarsênio, MMA) ou não tóxicos (como a arsenobetaína, AsB). Contudo, a quantificação do As total em organismos marinhos tem sido rotineiramente realizada, mas os seus efeitos tóxicos e biológicos não podem somente ser determinados pela informação do As

total, pois estes efeitos dependem das formas químicas do As.⁸ Assim, a especiação química elementar (a quantificação de diferentes formas químicas de um elemento) é de grande importância, uma vez que as espécies de um elemento diferem principalmente no estado de oxidação, das formas inorgânicas e/ou orgânicas.⁹ A espécie de As predominante em bivalves é a AsB e seus níveis de concentração geralmente são de 1 a 100 mg kg⁻¹. Porém, além desta espécie, monometilarsênio (MMA), dimetilarsênio (DMA) e tetrametilarsênio (TMA) têm sido relatados, mas em menor concentração.²

Uma etapa crucial na análise de especiação química é o preparo da amostra. Embora tenham sido propostos vários métodos de preparo de amostra para a determinação de espécies de As, a etapa de extração ainda requer desenvolvimento de métodos direcionados para a redução de volumes de solvente, tempo de extração e aumento da eficiência de extração, sem interconverter as espécies químicas.¹⁰ Em tecidos biológicos, a princípio, deve ser desenvolvida metodologia de extração para cada matriz em estudo, uma vez que a matriz da amostra tem características específicas, e pode influenciar no processo de extração.¹¹ O uso da extração assistida por micro-ondas (MAE) e ultrassom (UAE) para o preparo de amostras para análise de especiação tem sido avaliado para diferentes matrizes biológicas.¹² O uso da MAE e UAE tem por finalidade acelerar o processo de extração sem perdas ou conversão das espécies de As, o que depende do tempo de irradiação, temperatura e características da amostra e dos meios extratores usados. No entanto, a MAE tem sido a técnica mais utilizada para extração de espécies químicas em amostras biológicas.¹³

Vários métodos de especiação de As têm sido relatados na literatura, destacando-se uma crescente preocupação no desenvolvimento de novos métodos analíticos em virtude do número expressivo de espécies de As ainda não identificadas, uma vez que muitos organismos marinhos são capazes de acumular As e biotransformá-lo em espécies orgânicas.¹⁰ A maioria dos métodos empregados combina a cromatografia a líquido acoplada com a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS).¹³ A escolha do método de separação adequado depende, principalmente, de propriedades físico-químicas, como volatilidade, carga e polaridade das diferentes espécies, sendo que às vezes faz-se necessária a utilização de dois ou mais métodos de separação.¹⁴ A escolha de uma

técnica adequada de detecção dependerá, principalmente, da concentração das espécies presentes na amostra e da seletividade. Dentre as técnicas descritas na literatura, a LC hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado é uma das mais utilizadas para análise de especiação de As porque a detecção por ICP-MS proporciona alta especificidade/seletividade e baixos limites de detecção (LOD). Adicionalmente, a geração química de vapor (CVG) pode ser usada com a LC-ICP-MS, aumentando significativamente os limites de detecção.¹⁵

No entanto, o desenvolvimento de metodologias para a análise de especiação de As ainda apresenta dificuldades, tais como (i) a integridade das espécies de As deve ser mantida durante o preparo da amostra, extração e armazenamento, (ii) existem poucos materiais de referência certificados (CRM) disponíveis para as diversas espécies de As e (iii) não há um método satisfatório para extrair todas as espécies de As em organismos marinhos. Embora diversos procedimentos tenham sido propostos para especiação de As em amostras biológicas, especialmente em organismos marinhos, pouco se conhece sobre as espécies de As em moluscos bivalves.

Dessa forma, o conhecimento sobre as espécies de As presentes em moluscos bivalves é fundamental para a compreensão da biodisponibilidade, potencial de toxicidade de As ao organismo humano e dos impactos ambientais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura está subdividida em três itens, sendo tratados os seguintes assuntos: (i) As na água do mar, toxicidade de espécies de As, moluscos bivalves como bioindicadores e na baía de Todos os Santos; (ii) análise de especiação de As em organismos marinhos; e (iii) breve discussão de técnicas para análise de especiação de As em organismos marinhos.

2.1 Arsênio na água do mar

Arsênio é um metalóide com ampla distribuição no ambiente, sendo encontrado sob diferentes formas químicas, cada uma com características toxicológicas próprias.¹⁶ A exposição humana ao As pode ocorrer de forma ocupacional ou ambiental. A exposição ocupacional ocorre na produção e/ou transformação de muitos produtos, como, por exemplo, em fundições de metais não-ferrosos, na produção de vidro artístico, no uso do carvão mineral, na fabricação de semicondutores, na produção e uso de agrotóxicos e conservantes de madeira. A exposição ambiental se dá a partir de várias fontes, tais como alimentos, água, ar e solo, sendo que os alimentos de origem marinha são a principal fonte de As nos seres humanos.⁶ De acordo com a *U.S. Food and Drug Administration* (USA - FDA), os peixes e outros organismos marinhos representam 90% do total de exposição do ser humano ao As.¹⁷ No ambiente, o As pode causar danos aos seres vivos, uma vez que existem vários estados de oxidação de As, sendo os mais comuns, As(V) (arsenato), As(III) (arsenito) e As(0) e, com diferentes características toxicológicas.^{7,18-19} Na Tabela 1 estão mostradas as abreviaturas, nomes e estruturas químicas de espécies de As de maior relevância biológica e ambiental.

Tabela 1. Espécies de As comumente presentes em sistemas ambientais e biológicos.

Nome	Abreviatura	Fórmula química
Arsenito	As(III)	As(OH) ₃
Arsenato	As(V)	AsO(OH) ₃
Ácido monometilarsênico	MMA(V)	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido monometilarsonoso	MMA(III)	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido dimetilarsênico	DMA(V)	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Ácido dimetilarsenoso	DMA(III)	(CH ₃) ₂ AsOH
Trimetilarsina	TMAO	(CH ₃) ₃ AsO
Arsenobetaina	AsB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COO ⁻
Arsenocolina	AsC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
Ácido <i>p</i> -arsanílico	<i>p</i> -ASA	C ₆ H ₈ AsNO ₃

Além de As(III), As(V) e os seus derivados metilados, também há os compostos biotransformados (AsB, AsC e arseoaçúcares, AsS) por organismos marinhos. Na água do mar, geralmente, o As está representado na forma de arsenato $[H_2AsO_4]^-$ e está presente em concentrações da ordem de $1 \mu g L^{-1}$.^{8,20} A presença de As é mais constante em águas profundas, enquanto que os níveis em águas superficiais mostram uma variação sazonal.¹⁶ A atividade biológica de micro-organismos podem reduzir o As(V) para As(III). Estas formas inorgânicas são transformadas em metiladas por micro-organismos e excretadas através de um mecanismo de desintoxicação ou bioacumuladas nos tecidos dos organismos marinhos. As duas principais espécies organoarsênicas, que podem ocasionalmente ser encontradas na água do mar como resultado da biotransformação no plâncton e/ou interações bacterianas são o dimetilarsinato [DMA(III)] ou monometilarsinato [MMA(V)].²¹⁻²² Além de DMA e MMA, as principais espécies metiladas organoarsênicas encontradas em tecidos de organismos marinhos incluem o TMAO, tetrametilarsônio (TETRA), AsB, AsC e os compostos moleculares grandes, chamados coletivamente de arseno-carboidratos ou AsS. O sedimento pode conter elevadas concentrações de As, mas o As ligado ao sedimento geralmente é considerado "não disponível" para os organismos marinhos e está presente, principalmente, nas formas de TMAO e AsC.²³

A química do As nos compartimentos ambientais, principalmente na água, sedimento e solo, é complexa, em virtude das grandes diferenças entre as propriedades dos seus compostos de origem natural ou antropogênica. O aspecto bioquímico mais observado no meio ambiente é a metilação.⁶ Mesmo que compostos metilados de As não sejam usados na agricultura, o As inorgânico pode ser convertido em formas metiladas no meio ambiente, que são liberadas no meio aquoso, tornando-se disponível para aumentar os níveis de As na cadeia alimentar. Como a biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos/toxicológicos do As dependem de sua forma química, a especiação e suas transformações no meio ambiente tornam-se muito importantes, necessitando de métodos adequados para a separação e determinação das espécies de As.²³⁻²⁵

2.1.1 Arsênio em organismos marinhos comestíveis

Arsênio presente na água pode ser facilmente bioacumulado em algas, peixes e moluscos por diferentes vias tróficas e, conseqüentemente, na cadeia alimentar humana.²⁶ O risco de contaminação dos humanos pela cadeia alimentar recebeu recentemente a atenção do público em virtude do perigo potencial para a saúde humana.⁷ O homem pode ser exposto à diversas fontes (como alimentos, água e ar), mas a exposição através da ingestão de peixes e organismos marinhos é uma das mais significativas.²⁷ Geralmente, os compostos orgânicos de As são considerados menos tóxicos que as espécies inorgânicas de As, dos quais os trivalentes são as formas mais tóxicas. Assim, a especiação de As é muito importante em alimentos provenientes de organismos marinhos.²⁸

O ciclo biogeoquímico marinho do As é bastante complexo e apresenta importantes implicações na toxicidade para organismos marinhos e seus consumidores, incluindo humanos.²⁹ As formas químicas de As em tecidos de espécies marinhas podem refletir na posição trófica, na capacidade inerente de biotransformação, e outras peculiaridades específicas das espécies de As e seu metabolismo.²⁹⁻³³

A flora e fauna marinhas contêm uma grande quantidade de compostos de nitrogênio e fósforo, sendo que este pode ser substituído por outros elementos do seu grupo devido às semelhanças químicas, principalmente, As nas rotas metabólicas dos organismos vivos.²⁹ Tais compostos incluem a AsB, AsC e AsS presentes nas algas.²⁷ Na água do mar em condições normais (pH próximo de 8,1) o As está presente como arsenato, ou, mais precisamente, como o oxo-ânion desprotonado $[H_2AsO_4]^-$ ($pK_a = 6,8$). No entanto, na água do mar o principal nutriente é o fosfato que também existe como o oxo-ânion desprotonado $[H_2PO_4]^-$ ($pK_a = 7,2$) neste pH.³⁴ As algas marinhas têm sistemas de transporte através das membranas celulares para absorver o fosfato da água do mar, mas esses sistemas não são suficientemente seletivos para discriminar as espécies estruturalmente semelhantes ao fosfato, como é o caso do arsenato.³⁵ Assim, facilita o acesso do As às células dos organismos

marinhos, podendo causar interferências nos processos metabólicos que necessitam da participação do fósforo, a exemplo a fosforilação oxidativa, resultando em efeitos tóxicos.³⁶

Organismos marinhos acumulam quantidades substanciais de As e de modo mais eficiente que os organismos terrestres.³⁷⁻³⁹ Algas marinhas absorvem arsenatos (forma predominante de As na água do mar), e o transformam em diferentes ribosídeos e AsB *via* MMA e DMA. A AsB é um composto orgânico de As formado pela desintoxicação do arsenato fitotóxico.⁴⁰⁻

⁴⁴ No entanto, a AsB é muito pouco tóxica para humanos, sendo a principal espécie química de As encontrado nos organismos marinhos.³³ Já, no organismo humano, a AsB é biodisponível, sendo absorvido a partir do intestino e, após é excretada na urina com pouca ou nenhuma biometilação.⁴⁵

2.1.2 Toxicidade do As

O nível de toxicidade de As depende, em parte, do nível de exposição.⁴⁶ No Brasil, a concentração máxima de As em peixes e produtos de peixe têm sido regulamentada desde 1965 pelo decreto 55.871-65, publicado em 27/3/1965 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).⁴⁷ O limite máximo de As estabelecido por este decreto foi de 1 mg kg⁻¹, no entanto, para o USA-FDA (1993)⁴⁸ e para a *World Health Organization* (WHO), o valor preconizado de ingestão semanal máxima tolerável de As é de 0,015 mg kg⁻¹ por peso corpóreo.^{20,49}

De acordo, com a *Agency for Research on Cancer* (IARC, USA, 1987), o As é considerado carcinogênico humano, podendo causar lesões na pele, câncer de cérebro, fígado, rins e estômago. Além disso, o mesmo pode atravessar a barreira hematoencefálica produzindo má formação humana e até morte fetal.⁵⁰ Os compostos solúveis de As inorgânico, depois de absorvidos, são distribuídos para praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo.⁵¹ Estudos realizados em autópsias de pessoas sujeitas à exposição não-ocupacional, mas que tenham ingerido alimentos contaminados ou água contaminada por As, mostraram que existe uma tendência a altas concentrações em tecidos de queratina, como cabelo e

unhas e pouca deposição e acúmulo em vísceras.⁵² A hierarquia de depósito de As nos órgãos pode ser definida na seguinte ordem: fígado > rins > músculos > coração > baço > pâncreas > pulmões > cérebro (cerebelo-tecido encefálico) > pele > sangue.⁵³ A LD₅₀ oral (a dose letal para 50% de uma população) para As inorgânico é de 15 a 293 mg kg⁻¹ (As) e 11 a 150 mg kg⁻¹ (As) de peso corpóreo em ratos e outros animais de laboratório, respectivamente. A exposição ao trióxido de As por ingestão de 70 a 80 mg tem sido reportado como dose letal para humanos. A ordem de toxicidade dos compostos de As é As(III) > As(V) > DMA > MMA > As(0) > AsB. A LD₅₀ para humanos do As(III) se situa em 35 mg kg⁻¹ e a do As(V) em 41 mg kg⁻¹. O DMA e o MMA, muito menos tóxicos do que o As(III) e As(V), tem LD₅₀ de 1200 mg kg⁻¹ e 1800 mg kg⁻¹, respectivamente.⁵⁴ No entanto, a AsB apresenta uma toxicidade muito mais baixa e sua LD₅₀ não pode ser determinada com exatidão, embora tenha sido estimada superior a 10000 mg kg⁻¹. Recentes estudos demonstraram que MMA(III) e DMA(III) são mais genotóxicos entre as espécies orgânicas de As. No ambiente aquático, As inorgânico está predominantemente presente como As(III) e As(V), os quais são interconvertidos através de reações redox e metilações.⁵⁵⁻⁵⁶ Bioquimicamente, o As atua coagulando proteínas, formando complexos com coenzimas e inibindo a produção de adenosina trifosfato em processos metabólicos que envolvam utilização de energia.⁵⁷ Uma vez inserido na célula, o As(III) liga-se a grupos sulfidrilas das proteínas e enzimas, enquanto o arsenato compete e interfere nas reações de fosforilação.⁵⁸⁻⁵⁹ No entanto, como os organismos marinhos estão expostos ao As, muitos desenvolvem mecanismos para biotransformação de As em formas menos tóxicas, as quais são posteriormente excretadas.⁶⁰⁻
⁶⁴ Além disso, os compostos de As não são uniformemente distribuídos nos diferentes tecidos e órgãos de animais marinhos.⁶⁵⁻⁶⁸ Nos peixes, por exemplo, compostos inorgânicos de As e DMA foram encontrados quase exclusivamente no estômago, intestino, fígado, coração e guelras, enquanto que o As presente nos músculos, está quase todo sob a forma de AsB.⁶⁹⁻⁷⁰ Diferenças na distribuição de espécies de As em tecidos de músculo e órgãos foram documentadas numa variedade de peixes, crustáceos e gastrópodes carnívoros.⁷¹⁻⁷³

2.2 Moluscos bivalves como bioindicadores

Moluscos bivalves são organismos invertebrados aquáticos que possuem corpo mole protegido por uma concha de duas valvas que se mantêm unidas devido à presença dos músculos adutores⁷⁴⁻⁷⁶ conforme mostrado na Figura 1.

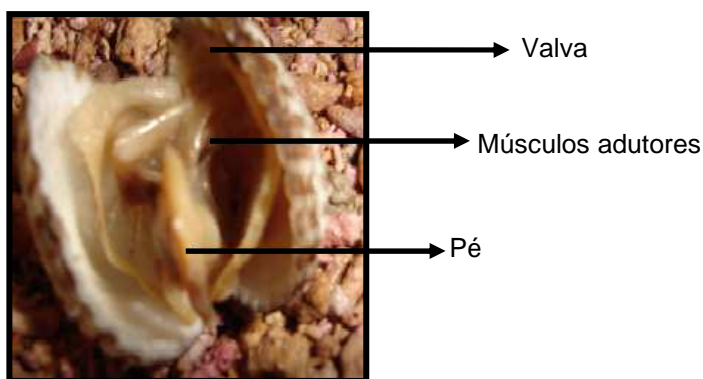


Figura 1. Moluscos bivalves (adaptado de Amaral *et al.*).⁷⁵

Nos moluscos bivalves não é possível distinguir a cabeça e o seu corpo, que é constituído principalmente por um pé e um conjunto de lâminas branquiais, podendo ter ou não a presença de sifões.⁷⁵

A classe bivalve, também conhecida como *Pelecypoda*, inclui formas muito populares como mexilhões, mariscos e ostras. Os moluscos bivalves alimentam-se de fitoplâncton, bactérias e partículas de matéria orgânica, que obtêm através da filtração de grandes volumes de água pelo movimento ciliar de células das brânquias para obter nutrientes e oxigênio. Além disso, os bivalves são considerados “filtradores” e denominados bioindicadores em virtude da sua resposta a um contaminante ambiental.⁷⁷⁻

⁷⁹ Desta forma, metais pesados, toxinas e outras substâncias nocivas aos seres vivos ficam incorporadas nos tecidos destes moluscos, tornando-se bons indicadores biológicos, sendo importantes aliados no monitoramento e controle da qualidade da água dos oceanos e outros mananciais hídricos em que estejam presentes.⁸⁰⁻⁸³

Com o aumento das necessidades de pesquisa sobre os efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos, muitos estudos apontam a utilidade de bivalves para estudos de biomonitoramento de contaminantes de As orgânico e inorgânico, uma vez que apresentam mobilidade reduzida, refletem condições específicas do lugar, além de serem naturalmente adaptados a ambientes dinâmicos, como os costões e os estuários.⁸⁴⁻⁸⁶ Dessa forma, o conhecimento das espécies de As presentes em moluscos bivalves é fundamental para a compreensão da biodisponibilidade, potencial de toxicidade e como indicador de contaminação ambiental.

2.2.1 Moluscos bivalves na baía de Todos os Santos (Bahia)

A baía de Todos os Santos (BTS) tem 1233 km² e 184 km de costa. As águas da BTS banham 13 municípios da região metropolitana de Salvador/Bahia e do Recôncavo Baiano são eles: Salvador, Madre de Deus, Candeias, São Francisco do Conde, Santo Amaro, Saubara, Cachoeira, São Félix, Maragogipe, Salinas da Margarida, Itaparica, Vera Cruz, Simões Filho, Jaguaripe.¹

O Recôncavo Baiano, denominação dada ao conjunto de municípios em torno da BTS, é uma das regiões onde comunidades de pescadores artesanais estão concentradas, pois nesta baía existe um grande número de estuários, originando um complexo de manguezais de enorme potencial para o cultivo de organismos aquáticos. Esta atividade serve para o sustento das populações de pescadores e marisqueiros que vivem nas comunidades pesqueiras. Nas margens dos rios e do mar existe uma vasta área de floresta de manguezal, correspondendo a 21.230 hectares, segundo dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA). Esta área apresenta variadas espécies de crustáceos, moluscos e bivalves, que possibilitam o desenvolvimento da culinária típica da região.⁵ Na Figura 2 está mostrado o mapa da BTS.

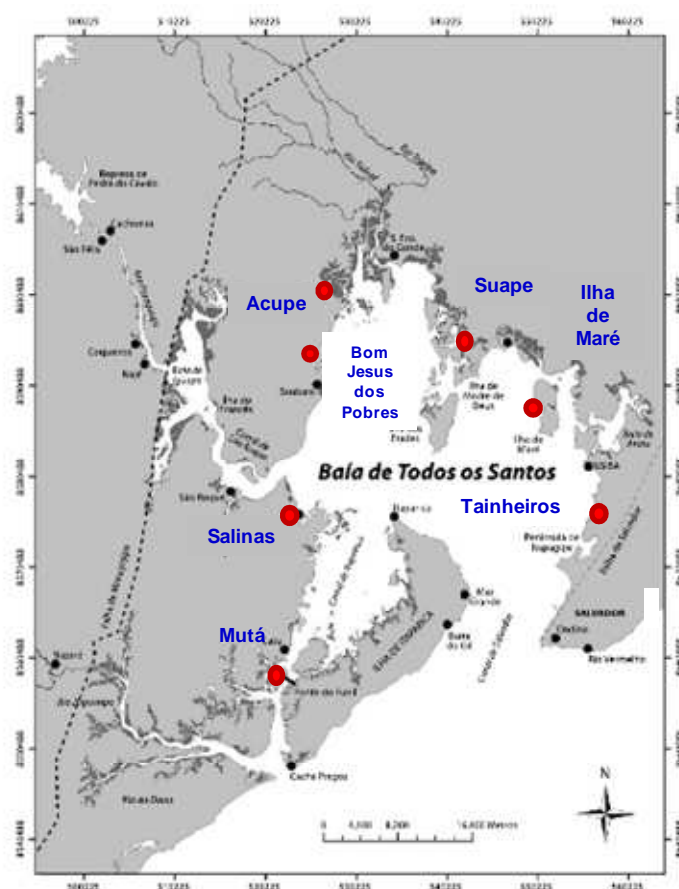


Figura 2. Mapa da baía de Todos os Santos (adaptado de Hatje *et al.*)¹

Segundo, dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, cujo último levantamento da produção pesqueira nacional foi feito em 2008 e 2009, atualmente cerca de 60% da pesca no país tem caráter artesanal, produzindo mais de 500 mil toneladas de pescado por ano e garantindo renda para mais de 600 mil pescadores.¹

Inserida na região mais industrializada e povoada da Bahia, a BTS recebe grande volume de dejetos residenciais e industriais da região metropolitana de Salvador. Os despejos industriais são provenientes, principalmente, do centro industrial de Aratu, das indústrias na bacia do rio Subaé, do complexo petroquímico de Camaçari e das unidades da Petrobrás, como a Refinaria Landulpho Alves. Uma série de impactos de contaminação, tais como vazamentos de óleo ou efluentes, despejos químicos, esgotamento sanitário e carcinicultura (atividade que visa a

criação racional de camarões em cativeiro) são observadas. Concentrações altas de As foram encontradas em toda a BTS, principalmente na foz do rio Subaé, no Porto de Aratu e em Itapagipe. Os impactos ambientais estão relacionados com a saúde do ambiente, a biota, a paisagem submarina, as atividades recreacionais, o comércio e, com isso, podem acarretar perdas sociais, ambientais, culturais e econômicas para o Estado.¹

No litoral brasileiro, diversas espécies de moluscos bivalves de regiões estuarinas são exploradas de forma bastante rudimentar pelas comunidades tradicionais, sem utilizar medidas de manejo que garantam um uso sustentável dos recursos.² Dentre essas espécies, existem aquelas associadas às estruturas aéreas da vegetação do mangue e espécies que habitam os sedimentos de planícies de maré adjacentes a manguezais,⁸⁷ tais como *Anomalocardia brasiliiana sp.*, *Iphigenia brasiliiana sp.*, *Macoma constricta sp.* e *Trachycardium muricatum sp.*, as quais estão mostradas na Figura 3. Cabe ressaltar, que cada espécie pode acumular concentrações diferentes de contaminantes.²

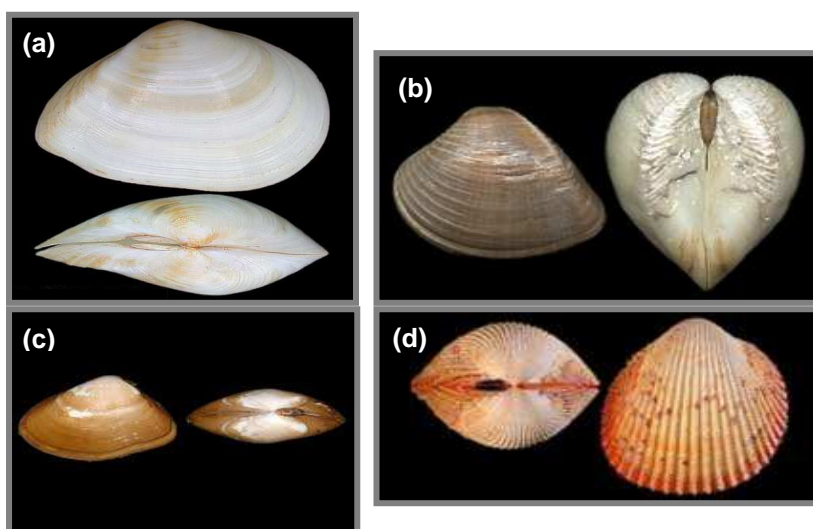


Figura 3. (a) *Macoma constricta sp.* (b) *Anomalocardia brasiliiana sp.* (c) *Iphigenia brasiliiana sp.* (d) *Trachycardium muricatum sp.* (adaptado de Amaral et al.).⁷⁵

2.3 Análise de especiação

O consumo, acúmulo, armazenamento, transporte e interação de diferentes metais e metalóides na natureza são fortemente influenciados pela sua forma química específica. Assim, a caracterização completa de um elemento num sistema bioquímico requer a elucidação de propriedades, como o seu estado de oxidação e associação e organocompostos orgânicos.⁹ Tendo em vista estes pontos, há um crescente interesse de elucidar as diferentes formas químicas dos elementos presentes em sistemas biológicos, ambientais etc.

Para normatizar os termos, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) estabeleceu uma série de termos, entre eles a análise de especiação química, que foi definida como a “atividade analítica de identificação e/ou medida da quantidade de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra”.⁹

As aplicações atuais de análise de especiação produzem informações relevantes nas áreas de química dos alimentos, química ambiental, saúde e higiene e geologia.^{31,33,41} Especiação é, além disso, uma importante ferramenta na investigação da toxicidade e da disponibilidade dos elementos, onde a informação da concentração total de elementos pode ser insuficiente.

Em função de diferentes estudos realizados nas últimas décadas sobre toxicidade, biodisponibilidade e ciclos biogeoquímicos dos elementos, a IUPAC delineou algumas definições⁹, entre as quais se podem destacar:

- i.* Espécies químicas: forma específica de um elemento quanto à composição isotópica, o estado de oxidação ou eletrônico e/ou estrutura molecular ou complexo.
- ii.* Análise de especiação: atividade analítica de identificação e/ou medição da concentração de uma ou mais espécies químicas numa amostra.

- iii. Especificação de um elemento: distribuição das espécies químicas de um elemento num sistema.
- iv. Fracionamento: processo de classificação de um elemento ou grupo de elementos a partir de uma determinada amostra de acordo com as propriedades físicas (por exemplo, tamanho, solubilidade), ou químicas (por exemplo, a reatividade de ligação).

As investigações bioquímicas e toxicológicas têm mostrado que, para os organismos vivos em geral, é muito importante conhecer a forma química de um elemento específico, ou o estado de oxidação em que a espécie química é introduzida no ambiente ou organismo.⁸⁸⁻⁸⁹ Tal entendimento requer informações sobre a espécie e sua concentração. A análise de especificação bem sucedida depende de dois fatores: a seletividade e a sensibilidade. O avanço em relação a estas duas questões foi obtido pelo acoplamento de técnicas de separação, principalmente as cromatográficas e eletroforéticas, com um detector seletivo. Entre as técnicas (detectores) mais utilizadas no acoplamento com as técnicas de separação estão a AAS, ICP-MS e a ICP OES. Quando a técnica é mais sensível, ICP-MS é utilizada como sistema de detecção em técnicas cromatográficas e o LOD obtido está na faixa de nanograma (ng) à picograma (pg).⁹⁰ A evolução e vantagens (principalmente um elevado grau de automatização, uma boa reprodutibilidade e uma análise rápida) das técnicas combinadas tornaram-á como o método de escolha.⁹¹

Até há pouco tempo, a determinação da concentração total de alguns elementos foi considerada suficiente para as considerações ambientais e toxicológicas. Embora a concentração total de elementos seja útil em muitas áreas, o conhecimento da especificação é de importância primordial, porque a toxicidade, a mobilidade, a biodisponibilidade e a bioacumulação dependem das espécies químicas.⁹² Além disso, os estudos de especificação são de enorme interesse na identificação de espécies químicas que têm efeitos adversos sobre os organismos vivos. A interação destas espécies com a biota é altamente dependente das suas formas químicas, sendo o impacto fortemente relacionado com o seu estado de oxidação e/ou a estrutura orgânica ou inorgânica.⁹³

2.3.1 Análise de especiação de As em organismos marinhos

Os organismos marinhos desempenham atividade importante no ciclo global do As. Em geral, os organismos marinhos podem acumular As inorgânico a partir da água do mar e convertê-lo em compostos orgânicos de As.⁹⁴ Diferentes técnicas de separação e determinação de espécies de As, como a LC e MS, respectivamente, tem sido utilizado para caracterizar os compostos de As, e também para avaliar as possíveis vias de biotransformação do As.⁹⁵

Assim como avaliações são feitas quanto ao risco da concentração total de um elemento químico à saúde humana, a especiação de As também pode responder com mais certeza as questões relevantes sobre os processos metabólicos e toxicológicos de organismos marinhos. As biotransformações metabólicas de As são conhecidas por originar uma grande variedade de compostos organoarsênicos.⁹⁶ A identificação destes organoarsenais pode ajudar na elucidação das vias metabólicas e de detoxificação e a interação do As nos seres vivos. Dessa forma, as avaliações obtidas na análise de especiação química podem ser importantes para estabelecer limites de concentração considerados seguros, tanto relacionados com aspectos alimentares como ambientais.⁹⁵ Durante muitos anos, várias técnicas⁹⁷⁻¹⁰⁰ de análise de especiação são desenvolvidas, porém, a especiação de As ainda é um desafio por várias razões, tais como, *i*) manter a integridade das espécies de As durante a extração das espécies do elemento da amostra, preparo e armazenamento, *ii*) há poucos materiais de referência certificados (CRMs) disponíveis para espécies de As para avaliar a exatidão da análise e *iii*) não há ainda um método universal para extrair todas as espécies de As de materiais biológicos.⁹⁷

2.3.1.1 Procedimentos para extração de espécies de As de organismos marinhos

De acordo com dados da literatura, não há um procedimento universal de extração de espécies de As de matrizes biológicas, sendo que, geralmente, para cada aplicação, as espécies de As devem ser avaliadas e desenvolvidas metodologias adequadas.¹⁰¹ O procedimento de extração de espécies químicas é uma etapa crítica nos procedimentos de preparo de amostra, uma vez que o método deve ser eficiente para extrair as espécies presentes na amostra de forma quantitativa, sem interconvertê-las e, também, assegurar à compatibilidade do meio extrator (solvente) com a técnica de separação e detecção.¹⁰² Neste caso, o procedimento de extração a ser usado deve manter o equilíbrio estabelecido entre as formas químicas do elemento nas amostras. Também, preferencialmente as amostras devem ser analisadas o mais rapidamente possível, sem uso de preservantes, como, por exemplo, a acidificação de água, que pode modificar o equilíbrio das espécies presentes. De maneira geral, pode-se afirmar que a análise de especiação química ainda é um desafio, devido à complexidade da matriz, principalmente amostras biológicas e, também, devido às baixas concentrações, o procedimento de extração é uma etapa crítica no processo de qualquer análise de especiação.¹⁰¹⁻¹⁰²

Além dos problemas inerentes à extração, a redução do volume de solventes (extrator), tempo de extração e aumento da eficiência de extração tem recebido atenção especial.⁹⁵ As metodologias mais usadas para extração de espécies de As são auxiliadas por aquecimento, agitação mecânica e Soxhlet.¹⁰³⁻¹⁰⁶ No entanto, em muitos processos de extração são requeridos grandes volumes de solventes e várias horas para completar a extração, tornando os métodos demorados e tediosos.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Por outro lado, técnicas relativamente novas como, extração assistida por ultrassom (UAE),¹⁰⁹⁻¹¹² extração assistida por micro-ondas (MAE),¹¹¹⁻¹¹⁵ extração acelerada por solvente (ASE)¹⁰⁹ e extração por fluido supercrítico (SFE)¹¹⁶ requerem menor volume de solvente, diminuem o tempo de extração e podem ser

automatizadas. Dentre estas técnicas de extração mais utilizadas para extração de espécies de As em organismos marinhos são a UAE e a MAE.^{8,116-120} A extração de espécies de As difere de acordo o tipo de material biológico havendo a necessidade de extração tanto com solventes polares, quanto apolares. A grande maioria dos métodos indicados para a extração de espécies de As utilizam como meio extrator a água ou água/metanol associados com a MAE¹²¹⁻¹²⁸ ou UAE.¹²⁹

Como uma das maiores dificuldade encontradas na análise de especiação é preservar a integridade das espécies de interesse durante o armazenamento, a amostragem e o pré-tratamento, o preparo da amostra requer processos de extração menos agressivos do que os utilizados na determinação da concentração total de um elemento.¹²⁰⁻¹²¹

2.3.2.2 Extração assistida por ultrassom

A US é um processo que utiliza à energia das ondas sonoras, as quais provocam variações de pressão do líquido gerando a cavitação. Existem dois dispositivos distintos para a aplicação de ondas ultrassônicas para fins analíticos: o banho e a sonda. O banho é um recipiente metálico onde um gerador de US é preso diretamente no fundo deste recipiente e a energia ultrassônica é transmitida através do líquido. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassônica e, portanto, menor eficiência na extração. A aplicação da sonda é mais eficiente na extração, pois, a energia ultrasônica é aplicada diretamente ao meio.¹²⁰ O emprego do US, seja por sonda ou banho, foi primeiramente empregada para a extração e posterior determinação de teores totais de elementos químicos. No entanto, nos últimos anos ocorreu um aumento no número de aplicações empregando esta fonte de energia em estudos de especiação química. A aplicação do US permite uma melhor homogeneização do meio solvente/soluto das amostras.¹²²

A classificação quanto a potência do US pode ser dividida em baixa ou alta. O US de alta potência pode causar permanente mudança física e química, pois produz cavitação nos líquidos, aquecimento, ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-

gás. As ondas sonoras de baixa potência com frequência maior que 20 kHz são usadas na engenharia e medicina para testes e diagnósticos.¹²¹ O US é transmitido para qualquer substância sólida, líquida ou um gás por meio de propriedades elásticas, que é característica das ondas mecânicas.¹²³ Essa transmissão produz ciclos de expansão e compressão nas moléculas da solução, caracterizados pela formação de bolhas ou cavidades, que crescem e implodem, num fenômeno conhecido como “cavitação”.¹²⁰ Durante esse processo, as moléculas voláteis, que estão dentro das bolhas de cavitação contidas numa solução, podem ser oxidadas por mecanismos térmicos, enquanto que as moléculas hidrofílicas podem ser decompostas em radicais livres.¹²⁴ O colapso das bolhas de cavitação, geradas pela ação do US forma microjatos e ainda ondas de choque. Quando em contato com um material sólido, estes microjatos causam erosão na superfície da amostra e sua fragmentação, com o consequente aumento da transferência de massa e eficiência da extração.¹²⁰

Em alguns casos, a UAE é uma alternativa rápida, econômica e eficiente, quando relacionada às técnicas convencionais de extração, como a extração com Soxhlet.¹²⁵ Apresenta ainda como vantagens o uso de uma menor quantidade de solventes e a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de massa de amostra.¹²⁶ No entanto, há relatos em que as recuperações são baixas para As inorgânico extraído em amostras biológicas.¹²⁷⁻¹⁴⁰

Lai *et al.*¹⁰⁰ utilizaram LC-ICP-MS para determinação de espécies de As em músculos e gônadas de moluscos bivalves após extração com sonicação por 10 minutos em meio extrator metanol/água (1:1, v/v). As espécies de As encontradas foram AsB, DMA e MMA. Não foram detectadas espécies inorgânicas nestas amostras, indicando baixo risco toxicológico a humanos.

Rosemond *et al.*¹²⁹ determinaram espécies de As no músculo, fígado e trato-gastrointestinal de cinco espécies diferentes de peixes da baía de Back, do Canadá. As amostras de tecidos foram extraídas com metanol/água (1:1, v/v) sob UAE por 30 minutos. Após extração foram centrifugadas a 4000 rpm. O solvente orgânico foi evaporado por 4 h à temperatura ambiente e a solução restante foi aferida a 5 mL com água e centrifugada novamente para ser posteriormente injetada no sistema LC-ICP-MS. As espécies de As

determinadas nos três órgãos dos peixes foram AsB, As(III), DMA, MMA, As(V). Foram detectadas outras espécies de As, mas não foram identificadas.

2.3.2.3 Extração assistida por micro-ondas

O uso da energia de micro-ondas tem sido outra técnica promissora para auxiliar na extração de espécies químicas de amostras biológicas em análise de especiação.¹³⁰ As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, cuja frequência é de 10,0 MHz a 3,0 GHz e que causam movimento molecular e rotação de dipolos, porém não altera a estrutura molecular dos compostos, o que a caracteriza como uma radiação não ionizante. Dessa forma, a radiação micro-ondas utilizada em altas frequências (geralmente 2,45 GHz) é fortemente absorvida por moléculas polares, como a água e os ácidos minerais, interagindo fracamente com os compostos não polares ou fracamente polares. O aquecimento promovido por este tipo de irradiação, diferentemente do calor proveniente de outras fontes, se dá através da interação entre a onda eletromagnética e o dipolo elétrico presente em algumas moléculas. Desta forma, este método possui certas características peculiares, como promover aquecimentos uniformes em menores intervalos de tempo, além de poder aquecer de forma seletiva, dependendo de certas propriedades físico-químicas do material. Outra vantagem é a possibilidade da não utilização de solventes orgânicos ambientalmente agressivos.¹³¹ Em decorrência dessas propriedades, esta técnica tem ampla aplicação no tratamento de amostras para análise de especiação de As em amostras biológicas.¹⁴¹

A MAE encontra-se amplamente difundida em função da eficiência e rapidez no preparo de amostras quando comparada com procedimentos tradicionais. Além disso, pode ser feita em sistemas abertos ou fechados. O emprego de baixas potências, na faixa de 20 a 90 W, torna possível a extração de espécies químicas sem afetar a estrutura molecular de interesse em amostras biológicas e ambientais.¹⁴² Dessa forma, a solução extratora, a potência, a temperatura e o tempo de irradiação com as micro-ondas são parâmetros importantes que devem ser avaliados para se obter resultados quantitativos, sem que ocorra interconversão das espécies. Entre esses

parâmetros, o ajuste da potência e o tempo de exposição podem evitar os efeitos indesejáveis da alta temperatura às micro-ondas sobre a extração das espécies de As.¹⁴³

Assim, Vilanó and Rubio¹³² desenvolveram um método para a determinação das espécies de As de tecidos de ostras. A extração de espécies de As foi realizada usando baixa potência de micro-ondas. Extração quantitativa foi obtida a uma potência de 40 W e exposição por 5 minutos, utilizando como solução extratora mistura água/metanol (1:1, v/v). A separação das espécies de As foi feita utilizando cromatografia a líquido acoplada à geração de hidretos e irradiação UV para a mineralização dos compostos orgânicos de As. A detecção foi feita por fluorescência atômica (LC-UV-CVG-AFS). Três espécies de As foram detectadas em tecido de ostra: AsB, AsS e DMA.

Larsen *et al.*¹³³ utilizaram a MAE com dissolução alcalina da amostra e determinação de espécies de As por LC-ICP-MS em amostras de salmão, peixe solha e peixe carapau. A separação das espécies de As foi feita com coluna de troca aniônica. A recuperação das espécies de As(III) e As(V) foi quantitativa para peixe solha e salmão, no entanto, para o peixe carapau, a recuperação de As(III) não foi quantitativa, o que foi atribuído ao seu elevado teor (15%, m/m) de lipídios. A metodologia foi assim relatada para ser restringida a peixe com pouco teor de lipídeos.

Sloth *et al.*¹³⁴ investigaram a extração de espécies de As em amostras de crustáceos, peixes e moluscos bivalves com o emprego de MAE e dissolução alcalina com a finalidade de oxidar As(III) em As(V). Para a determinação das espécies de As inorgânicas foi usada a LC-ICP-MS com coluna de troca aniônica e, como fase móvel, o carbonato de amônio em solução de metanol 3% (v/v) e pH 10,3. As concentrações obtidas para as espécies de As foram de até 0.060 mg Kg⁻¹ constituindo menos de 1% (m/m) de As total nas amostras.

Nam *et al.*¹³⁵ avaliaram vários procedimentos de extração utilizando como solução extratora metanol/água em diferentes proporções com o emprego de MAE, sonicação com sonda e banho para posterior determinação de espécies de As por LC-ICP-MS em diferentes organismos marinhos. De

acordo, com os resultados obtidos, as três técnicas usadas para extração das espécies de As foram adequadas para as amostras em estudo. No entanto, a MAE foi escolhida devido ao menor tempo (5 min) necessário para a extração quantitativa (81 a 87%), quando comparado a sonda (120 min) e banho (60 min).

Sloth e Julshamn¹³⁶ utilizaram a MAE para extração das espécies de As com solução extratora alcalina/alcoólica (0,9 mol L⁻¹ de NaOH/50% de etanol (v/v)). Para a determinação das espécies de As foi empregada a LC-ICP-MS com coluna de troca aniônica e carbonato de amônio com metanol a 3% (v/v) em pH to 10,3 como fase móvel. As espécies determinadas de As foram somente As(III) e As(V).

2.4 Técnicas para determinação de espécies de As em organismos marinhos

O desenvolvimento de estratégias analíticas para obter informações qualitativas, quantitativas e as interações, transformações e funções de espécies de As em sistemas biológicos é de grande importância.¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ Há uma crescente preocupação no desenvolvimento de novos métodos analíticos em virtude do número expressivo de espécies de As ainda não identificadas, uma vez que muitos organismos marinhos são capazes de acumular As e biotransformar em espécies orgânicas de diferentes toxicidades.¹⁵⁰ Por isso, é importante desenvolver métodos e/ou técnicas que permitam determinar diferentes espécies de As, uma vez que estas informações podem ser relevantes para entender o metabolismo de certas espécies de As organismos marinhos.¹⁵¹⁻¹⁵²

A maioria dos métodos empregados combina a cromatografia a líquido com espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado para determinar as formas químicas de As, oferecendo vantagens como a seletividade elementar e baixos limites de detecção.¹⁵³⁻¹⁵⁷

2.4.1 Cromatografia a líquido acoplado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

As técnicas de separação são fundamentais na análise de especiação, sendo desejável uma boa resolução entre as espécies. Entre as técnicas mais empregadas para a separação na análise de especiação estão a cromatografia a gás (GC), LC, eletroforese capilar (CE) e cromatografia com fluido supercrítico (SFC).¹⁵⁵ Entretanto a LC é uma das técnicas mais utilizadas para análise de especiação, principalmente devido ao bom poder de separação das espécies de muitos dos elementos de interesse e devido à possibilidade de separar espécies pouco voláteis e compostos termolábeis.^{154,156-161}

A LC pode se valer de diferentes mecanismos de separação e os mais utilizados para separação de espécies de As em organismos marinhos são a fase reversa, pareamento de íons, troca catiônica ou, mais comumente a troca aniônica. O mecanismo de separação de troca iônica é usado para a separação de íons e substâncias facilmente ionizáveis, pois utiliza o mecanismo de equilíbrio de troca e interação eletrostática entre uma fase estacionária que contém cargas na superfície e íons de carga opostas presentes na fase móvel. A cromatografia de troca iônica pode ser usada em modo catiônico ou aniônico. A força iônica da fase estacionária, o pH da fase móvel e a concentração da fase móvel, geralmente um tampão, influenciam na separação das espécies. A separação por troca catiônica é aplicada para a determinação de espécies de As em organismos marinhos, quando AsB e compostos orgânicos catiônicos estão presentes. No entanto, o mecanismo de separação de troca aniônica é o mais empregado para a grande maioria das espécies de As em organismos marinhos.¹⁶¹⁻¹⁸⁸

Neste sentido, McSheehy *et al.*¹⁵⁷ investigaram método para a determinação de espécies de As em material de referência certificado (NIST 1566b) de tecido de ostra empregando separação multidimensional (troca catiônica - aniônica - exclusão molecular) com LC-ICP-MS e ES-MS-MS e mecanismo único com LC-ICP-MS. Desta forma, foi possível a quantificação de

AsB, DMA, AsC, As(V) e AsS por ES-MS-MS e com o uso de coluna de troca aniônica por LC-ICP-MS foi determinado AsB.

Reyes *et al.*¹⁷⁶ desenvolveram uma metodologia com o uso de extração enzimática e assistida por radiação micro-ondas para espécies de As em tecidos de peixes. A extração enzimática foi feita com o uso de mistura de enzimas pronase/lípase e as recuperações obtidas pela avaliação do material de referência certificado de fígado de peixe (DOLT-3 do *National Research Council Canada* - NRCC) foram satisfatórias, sem interconversão das espécies. O tempo de extração foi de 30 minutos, utilizando 0,2 g de amostra, 20 mg de pronase e 5 mg de lípase em 10 mL de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,25 a 37 °C. A determinação das espécies foi feita por LC-ICP-MS e AsB foi a principal espécie detectada nos tecidos dos peixes.

A GC-ICP-MS é aplicada para determinação de espécies volatilizáveis nas condições da cromatografia a gás, apresentando alta resolução e boa sensibilidade, a qual é essencial para a análise de amostras ambientais e biológicas.¹⁵⁴ No entanto, muitos compostos de As presentes em amostras biológicas não são voláteis ou não podem ser transformados em substâncias voláteis sem perda de informações, como é o caso da AsC e As-lipídeos. Dessa forma, a LC-ICP-MS é a técnica mais comumente aplicada para separação de espécies de As em amostras biológicas.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹

2.4.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

O instrumento de ICP-MS é constituído por um sistema de introdução de amostra, o plasma indutivamente acoplado (ICP), que opera a temperaturas de 6000 a 9000 K e é mantido por um gerador de radiofrequência de 27 ou 40 MHz, a interface, o separador de massas, o detector e um sistema de aquisição de dados. O plasma é capaz de gerar íons positivamente carregados (M⁺), os quais são amostrados pela interface e separados no espectrômetro de massa. A amostra, que geralmente está na forma líquida, é introduzida no plasma por um sistema de nebulização pneumática. No espectrômetro de massa, os íons M⁺ são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e conduzidos até o detector.¹⁶⁰ Entre as características da técnica de ICP-MS estão a

capacidade multielementar de análise, possibilidade de determinação isotópica, relativamente poucas interferências espectrais e obtenção de baixos LOD (na faixa de ng g^{-1} ou pg g^{-1}).¹⁷⁷⁻¹⁷⁸ Os limites de detecção podem ainda ser melhorados pela inserção de um sistema de derivatização como geração de hidretos.¹⁸⁷ Além disso, esta técnica permite o fácil acoplamento com diferentes técnicas de separação, principalmente LC e GC. O acoplamento da LC com ICP-MS é relativamente fácil sem grandes modificações do sistema de introdução de amostras no ICP. No entanto, deve ser considerada a compatibilidade da vazão da fase móvel com a vazão do nebulizador pneumático. Assim a saída da coluna pode ser diretamente introduzida na entrada do nebulizador pneumático e a composição da fase móvel, cuja concentração de sais e de solvente orgânico deve ser tão baixa quanto possível para a introdução no plasma. Caso, estes fatores não sejam considerados, alguns problemas podem acontecer, como a instabilidade do sinal do analito, diminuição da sensibilidade e perdas em resolução cromatográfica. No entanto, mesmo utilizando ICP-MS como detector, muitas vezes o LOD obtido não é baixo o suficiente para determinação de espécies de As em amostras biológicas. Por esse motivo, a CVG pode ser acoplada à LC-ICP-MS e as espécies formadoras de hidretos podem ser introduzidas diretamente no plasma.¹⁸⁶ O acoplamento do sistema CVG ao LC-ICP-MS pode contornar os possíveis problemas de introdução de amostra, como as perdas na nebulização e as interferências devido a fase móvel. Com a CVG a eficiência do transporte dos analitos pode ser próxima de 100%. Além disso, a CVG apresenta vantagens quando da presença de cloro nas amostras em estudo, pois a interferência espectral do $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ sobre o ^{75}As é evitada.^{184,186,188-190}

A GC acoplada à ICP-MS também apresenta vantagens em relação à eficiência de transporte da amostra para o ICP-MS, a qual chega a aproximadamente 100%, e é observada menos interferência espectral. Além disso, a GC apresenta boa resolução e são obtidos bons LODs e, dessa forma, é empregada para análise de especiação, podendo ser utilizada para especiação de compostos organometálicos e organometalóides, desde que eles sejam suficientemente voláteis, ou podem ser derivatizados para produzir espécies voláteis. No entanto, diferentemente da LC-ICP-MS, a GC-ICP-MS

apresenta algumas particularidades na hifenação que devem ser consideradas, pois a interface necessita ser totalmente aquecida para o acoplamento do GC ao ICP. O motivo para tal aquecimento homogêneo da interface do GC-ICP-MS é para que os analitos volatilizados no cromatógrafo permaneçam na fase gasosa durante o transporte da coluna cromatográfica até o ICP. Ou seja, a condensação dos analitos em qualquer parte do sistema GC-ICP deve ser evitada para assegurar, não só o transporte quantitativo do analito, mas também uma boa resolução. Isto geralmente é conseguido por aquecimento constante de toda a linha de transferência.¹⁹¹⁻¹⁹⁴

2.4.3 Geração química de vapor

A CVG é uma técnica que permite reduzir as interferências e melhorar os limites de detecção, onde os analitos são vaporizados na forma atômica ou molecular através de uma reação química, geralmente feita a temperatura ambiente, com posterior transporte desses vapores para o local onde ocorre a detecção/quantificação.¹⁸⁸⁻¹⁹⁴ A CVG apresenta algumas características como:¹⁸¹

- ✓ separação do analito da matriz da amostra,
- ✓ relativamente livre de interferências, em virtude da separação do analito da amostra,
- ✓ permite a determinação seletiva de espécies de um elemento pelo controle de pH,
- ✓ elevada eficiência de introdução da amostra, podendo chegar a 100%, conseqüentemente, podem ser alcançados LODs cerca de 100 vezes melhores aos obtidos em técnicas que empregam a nebulização pneumática,
- ✓ pode ser acoplada a diferentes técnicas de detecção como AAS, ICP OES e ICP-MS,
- ✓ quando acoplado à ICP-MS propicia menor desgaste dos cones de amostragem, já que a matriz orgânica e sais são eliminados, diminuindo com isso depósitos destes materiais na interface.¹⁸⁵

Para a determinação de As por CVG, geralmente, é utilizado borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Entretanto, a utilização deste redutor tem diversas desvantagens: a pureza pode não ser suficiente para ser empregado quando as espécies de As estão presentes em baixas concentrações e soluções aquosas são pouco estáveis e devem ser preparadas para uso imediato. A estabilidade desta solução pode ser aumentada em pH mais elevado, geralmente feita pela adição de hidróxido de potássio ou de sódio. A transferência das espécies de As até o sistema de detecção é feita pela conversão dos compostos contendo As até o hidreto volátil correspondente, por reação com NaBH_4 .¹⁸⁶ Apesar da geração de hidretos facilitar o transporte do As até o detector, o número de compostos de As que podem formar hidretos voláteis é pequeno. Arsenito e arsenato formam AsH_3 , MMA forma CH_3AsH_2 e DMA forma $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, todos voláteis pela reação com NaBH_4 , sendo que a formação destes hidretos é dependente do pH de cada espécie individual.¹⁸⁶ No entanto, a reação de formação de hidretos para espécies orgânicas é um pouco mais lenta que para as espécies inorgânicas e, para as espécies AsB, AsC, AsS e outros compostos organoarsênicos não ocorre a formação de hidretos.¹⁸⁶⁻²⁰² Porém, com a introdução de sistemas de mineralização pós-coluna, como oxidações empregando radiação UV associado a reagentes específicos, também torna possível a determinação destas espécies. Desta forma, mesmo que a AsB seja a principal forma do As em organismos marinhos, a aplicação da CVG pode ser usada. Dessa forma, a determinação quantitativa de uma mistura de espécies de As, normalmente requer o uso de técnicas apropriadas para quantificação e avaliação das espécies de As.²⁰³⁻²⁰⁹

Assim, Pétursdóttir *et al.*¹⁸⁴ desenvolveram uma metodologia para a determinação de espécies de As em organismos marinhos com o uso da LC combinada CVG-ICP-MS. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a técnica empregada para especificação de As melhorou significativamente os LODs e a quantificação de As inorgânico, sendo de 0,4 e 1,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A CVG como uma etapa adicional à LC melhorou a seletividade da determinação das espécies inorgânicas de As e melhorou o

LOD e LOQ dos arsênios inorgânicos ($< 2 \mu\text{g kg}^{-1}$), em amostras com matrizes complexas.

Gómez-Ariza *et al.*¹⁹⁴ avaliaram metodologias de extração e determinação de espécies de As por LC-CVG-ICP-MS em amostras marinhas (ostra, mexilhão, molusco bivalve e alga) e materiais de referência certificados TORT-1 e CRM 627. Extração com Soxhlet foi comparado com sonicação e MAE para as espécies As(III), As(V), DMA, MMA e AsB utilizando como solventes metanol e metanol:água. As determinações foram realizadas utilizando LC-CVG-ICP-MS. Os melhores resultados foram obtidos por extração com Soxhlet, utilizando 150 mL de mistura metanol:água (1:1) durante 16 h, US (20 mL de metanol ou misturas de metanol:água (1:3), (1:1) e (3:1) durante 20 min e micro-ondas (20 mL de metanol ou misturas de metanol-água (1:3), (1:1) e (3:1) durante 10 min a 150 W). Recuperações superiores a 71% foram obtidos de acordo com o tipo de amostra. Um composto desconhecido foi detectado, sendo a principal espécie de As nas amostras.

Na Tabela 2, estão resumidas as principais aplicações de técnicas de extração e determinação de espécies de As em moluscos bivalves.

Tabela 2. Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves.

Espécies	Preparo da amostra	Técnicas de separação/detecção	Ref.
AsB, DMA e MMA	Agitação mecânica	HPLC-CVG-AAS Troca aniônica	198
AsB, DMA e AsS	UAE	HPLC-ICP-MS Troca aniônica Troca catiônica	199
As(III), As(V), DMA e MMA	Banho de ultrassom	HPLC-CVG-AFS Troca aniônica Troca catiônica	139
AsB, As(III), As(V), DMA e MMA	MAE	HPLC-ICP-MS Fase reversa	201
AsB, DMA e MMA	Extração convencional	HPLC-CVG AAS Troca aniônica HPLC-CVG-AFS Troca catiônica	202
AsB, As(V), DMA e MMA	Extração convencional e UAE	HPLC-ICP-MS Troca aniônica	115
As(III), As(V), DMA e MMA	Soxhlet e clean-up	HPLC-CVG AAS Troca aniônica	203
AsB, DMA e MMA	Extração convencional	HPLC-ICP-MS Troca aniônica	204

(Continua)

Tabela 2. Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves. (Continuação)

Espécies	Preparo da amostra	Técnicas de separação/detecção	Ref.
AsB e DMA	MAE	LC–UV–CVG–AFS Troca aniônica	132
AsB, As(III), DMA, MMA e AsC	Ultrassom com hidrólise enzimática assistida (USEH) e clean-up	HPLC–Orbitrap MS Troca aniônica Fase reversa	205
As(V), DMA e AsS	Sonicação	HPLC–ICP–MS Fase reversa C18	206
As(III) e As(V)	MAE	HPLC–ICP–MS Troca aniônica	134
AsB, As(III), DMA, MMA, AsC e TMAO+TMAP	MAE	HPLC–ICP–MS Troca aniônica	207
AsB, As(III), As(V), DMA, MMA, AsC e AsS	Extração convencional	HPLC–ICP–MS Troca aniônica	208
AsB, As(III), As(V), DMA, MMA, AsC, TMAO e AsS	MAE	HPLC–ICP–MS Troca catiônica Troca aniônica	209
As [As(III) + As(V)] como As(V)	Extração convencional	HPLC–ICP–MS Troca aniônica	210

(Continua)

Tabela 2. Métodos propostos para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves. (Continuação)

Espécies	Preparo da amostra	Técnicas de separação/detecção	Ref.
AsB, DMA, AsC e TETRA	MAE	HPLC-ICP-MS Troca aniônica Troca catiônica	211
AsB, Me ₄ As	Sonicação	HPLC-ICP-MS Troca catiônica Fase reversa	212

3 OBJETIVOS

Conforme exposto anteriormente, moluscos bivalves podem acumular As proveniente do ambiente natural ou, maior extensão, de ambientes impactados pela ação antropogênica. Neste sentido, os moluscos bivalves, considerados bioindicadores, podem ser importantes para avaliar aspectos toxicológicos, bem como para ajudar a elucidar o ciclo biogeoquímico deste elemento no ambiente marinho. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver métodos para a determinação de espécies de As nos moluscos bivalves *Macoma constricta sp.*, *Anomalocardia brasiliana sp.*, *Iphigenia brasiliana sp.* e *Trachycardium muricatum sp.* Para tal, foi avaliada a extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom com diferentes extratores. A LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS foram empregadas para separação e quantificação de espécies de arsênio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos de extração das espécies de As em tecidos de moluscos bivalves, assim como os procedimentos utilizados para análise de especiação de As usando LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS. Também são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

4.1 Instrumentação

Para a separação das espécies de As foi utilizado um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para LC (modelo Series 200, PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>, EUA) equipada com uma válvula injetora Rheodyne (modelo 7725i, <http://www.rheodyne.com>, EUA), uma alça de amostragem de poli(éter-cetona) (PEEK), com capacidade de 200 µL, um degaseificador a vácuo (modelo Series 200 Vacuum Degasser, PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>, EUA) e uma coluna de troca aniônica (Hamilton, PRP-X100, 250 x 4,1 mm d.i., 10 µm de diâmetro de partícula, <http://www.hamiltoncompany.com>, EUA). O material da coluna de troca aniônica é composto de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB) com grupos funcionais trimetilamônio. A injeção das soluções na alça de amostragem do cromatógrafo foi feita com uma seringa (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha) com capacidade para 1,0 mL. Foram utilizados tubos de PEEK (Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>, EUA) com 254 µm de diâmetro interno para conectar a coluna cromatográfica à bomba do LC. A saída da coluna cromatográfica foi acoplada diretamente ao nebulizador pneumático do ICP-MS, sendo denominado de LC-ICP-MS. Experimentos também foram feitos utilizando à CVG inserido entre a coluna cromatográfica e o ICP, este sistema CVG é constituído de uma bomba peristáltica de oito canais Gilson (modelo Minipuls 3, <http://www.gilson.com>, França), utilizada para a propulsão das soluções, munida com tubos de Tygon vermelho/vermelho (1,14 mm de diâmetro interno, <http://www.tygon.com>, França), para bombear as soluções de HCl (solução para acidificar o meio reacional) e de NaBH₄ (reduzora), e de tubos de polietileno (0,8 mm de diâmetro interno), utilizados para conduzir as soluções até separador gás-líquido. O separador gás-líquido é do tipo em “U” e confeccionado de vidro borosilicato. Para interconectar as tubulações foram utilizados conectores construídos em acrílico. O vapor das espécies de As gerado foi introduzido diretamente no equipamento de ICP-MS com o auxílio de um fluxo (gás de arraste) de argônio (99,998% de pureza, White Martins, <http://www.praxair.com>, Brasil). O argônio utilizado como gás de arraste é proveniente do próprio instrumento de ICP-MS (gás de nebulização pneumática, quando o sistema de nebulização convencional é utilizado), cuja vazão é controlada através do seu programa. A detecção das

espécies de As foi feita em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado da PerkinElmer SCIEX (modelo ELAN DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, Canadá), equipado com uma tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno e cones de platina. A avaliação e os ajustes das principais condições de operação do equipamento de ICP-MS foram feitos diariamente, de modo a se obter a maior razão sinal/ruído para ^{75}As . As condições operacionais do sistema LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS são mostradas na Tabela 3.

Arsênio total foi determinado utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha). Argônio com pureza de 99,996% (White Martins - Praxair) foi utilizado como gás do plasma, auxiliar e de nebulização. O comprimento de onda escolhido para As e os parâmetros operacionais estão listados na Tabela 3. Condições instrumentais foram ajustados conforme recomendado pelo fabricante do instrumento.

A decomposição das amostras foi feita em forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000 Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, www.anton-paar.com, Áustria), equipado com oito frascos de quartzo, com temperatura e pressão de operação máximas de 280 °C e de 80 bar, respectivamente. As extrações de espécies de As foram feitas em equipamento de ultrassom, operando a frequência de 20 kHz na potência nominal de 130 W (modelo VCX 130 PB, Sonics and Materials, Inc., www.sonics.com, Newton, EUA), equipado com uma sonda de liga de titânio (Ti-6-Al-4V) com 3 mm de diâmetro e 113 mm (número de ordem 630-0435), sendo imerso diretamente na mistura de extração e forno de micro-ondas Anton Paar.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais para a determinação de As total e análise de especiação de As.

As total por ICP OES	
Potência RF	1500 W
Vazão do gás do plasma	14 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,70 L min ⁻¹
Câmara de nebulização	Duplo passo (tipo Scott)
Nebulizador	Fluxo cruzado (cross flow)
Vista do plasma	Axial
Linha de emissão	189,042 nm
Especiação de As por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS	
LC	
Fase móvel A	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (20 mmol L ⁻¹), pH 6,0
Fase móvel B	(NH ₄) ₂ CO ₃ (20 mmol L ⁻¹), pH 9,0
Vazão da fase móvel	1,25 mL min ⁻¹
Volume de amostra	200 µL
Programa do LC	
Fase móvel A	30% 0-1,4 min
Fase móvel B	100% 1,4-2,7 min
Fase móvel A	30% 2,7-15 min
CVG	
NaBH ₄	1% (m/v)
NaOH	0,1% (m/v)
HCl	1% (v/v)
ICP-MS	
Potência RF	1400 W
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	1,10 L min ⁻¹
Cones de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
Modo de coleta de dados	Monitoramento do sinal ⁷⁵ As
Tempo de permanência	500 ms

Determinações de cloreto foram feitas em cromatógrafo de íons, utilizando um cromatógrafo com detector por condutividade (modelo 819 IC detector, Metrohm, <http://www.metrohm.com>, Suíça). O cromatógrafo é equipado com sistema de supressão química (modelo 850 Supressor unit, Metrohm) e alça de amostragem de 200 μL . Foi utilizada uma coluna de troca aniônica com grupos amônio quartenário suportados em poli(álcool vinílico), modelo Metrosep A Supp (250 x 4 mm d.i., 10 μm de diâmetro de partícula, Metrohm). A vazão da bomba cromatográfica foi fixada em 0,7 mL min^{-1} .

4.2 Reagentes

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em uma coluna de troca iônica convencional (condutividade máxima de 0,6 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e, posteriormente, purificada (Milli-Q Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore, www.millipore.com, Estados Unidos) com resistividade final de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$. O ácido nítrico (HNO_3 , 65% m/m, 1,4 kg L^{-1} , p.a, Merck, Alemanha, www.merck.de), utilizado para a decomposição das amostras assistida por radiação micro-ondas e ácido clorídrico (HCl , 36% m/m, Merck) foi bidestilado à baixa temperatura, em sistema de destilação de quartzo (modelo duoPUR, Subboiling Distillation System, Milestone, www.milestonesci.com, Itália).

Soluções estoque contendo 1000 mg L^{-1} de As na forma de ácido dimetilarsênio (DMA – $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsO}_2\text{Na}$, Sigma Aldrich, USA), arsenito [As(III) – NaAsO_2 da Merck], arsenato [As(V)- $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ da Riedel-de Haën, Alemanha] e ácido monometilarsênio (MMA – CH_5AsO_3 , doado pelo Dr. J. Feldmann da Universidade Aberdeen, Aberdeen, UK) foram dissolvidos em água. Soluções estoque de 1000 mg L^{-1} de As na forma de ácido ρ -arsanílico (ρ -ASA – $\text{C}_6\text{H}_8\text{AsNO}_3$, Sigma) e arsenobetaina (AsB – $\text{C}_3\text{H}_6\text{AsCH}_2\text{COOH}$, doado pelo Dr. Walter Goessler da Universidade de Karl-Franzens, Graz, Áustria) foram preparados em hidróxido de amônio (Merck) 10% (v/v). Para preparar as soluções de calibração de espécies de As foram feitas diluições adequadas das soluções estoque de DMA e AsB, sendo estas preparadas diariamente. A concentração de As em cada solução contendo as espécies de As foram medidas por ICP-MS. As soluções de calibração foram diluídas em HNO_3 5% (v/v) a partir da solução estoque SCP 33MS (SCP Science,

contendo 10 mg L^{-1} of As, PlasmaCAL, Canadá) em concentrações de $0,1$ a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ As para as medições por ICP-MS e de 10 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ As para as medições por ICP OES.

Solução estoque de cloreto a 1000 mg L^{-1} foi preparada a partir da dissolução de NaCl (Merck) em água. Para a determinação de cloreto, soluções de 100 a $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cl foram preparadas em água a partir da solução estoque. A fase móvel utilizada na determinação de Cl por IC foi Na_2CO_3 $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (Merck) e NaHCO_3 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Merck) em água. A fase móvel utilizado para a separação das espécies de As por LC foi preparada a partir da dissolução de carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$, Merck e fosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4]$, Merck] em água. O pH da fase móvel foi ajustado com HCl bidestilado (Merck) ou hidróxido de amônio a 25% m/m (Merck, p.a). O pH das soluções foi medido através de potenciometria, utilizando soluções tampão (CertiPUR, Merck) com $\text{pH } 4,00 \pm 0,02$ ($20 \text{ } ^\circ\text{C}$) e $7,00 \pm 0,02$ ($20 \text{ } ^\circ\text{C}$) para a calibração do potenciômetro.

Solução de metanol grau HPLC (pureza mínima de 99,9%, Carlo Erba, <http://www.carloerbareagenti.com>, Itália) foi utilizada como modificador da fase móvel. A concentração de metanol na fase móvel foi de 1% (v/v).

Solução de tetraidroborato de sódio 0,1% (m/v) (Vetec, <http://www.vetecquimica.com.br>, Brasil) foi preparada diariamente em solução de hidróxido de sódio 0,01% (m/v) (Vetec, Brasil).

Os materiais de referência certificados (CRM) DORM-2 (*Dogfish muscle*, do *National Research Council of Canada*, NRCC, Ontário, Canadá), BCR627 (*Tuna fish muscle*, NRCC) e SRM 1566b (*Oyster tissue*, do *National Institute of Standards and Technology*, NIST, Gaithersburg, MD, USA) foram usados para avaliar a exatidão do método.

4.3 Materiais diversos

O separador gás/líquido (G/L) utilizado foi construído no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

Toda vidraria utilizada foi descontaminada por imersão em HNO_3 20% (v/v) por 48 h e, posteriormente, enxaguada com água.

Para a diluição e armazenamento das soluções das amostras foram utilizados frascos de polipropileno (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha) com capacidade máxima de 50 mL.

Uma centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Brasil) com capacidade para 16 frascos de 15 mL ou 4 frascos de 50 mL foi utilizada para a centrifugação das soluções das amostras após as extrações.

A secagem e a cominuição das amostras de moluscos foram feitas em liofilizador (modelo Alpha 2-4 LDplus, Crist) e moinho de bolas (Spex SamplePrep, 8000M mixer/Mill) equipado com frascos e bolas de carbeto de tungstênio. Após a cominuição, as amostras foram peneiradas em peneira com malha de 100 µm de diâmetro.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança digital Shimadzu, com resolução de 0,0001 g e capacidade de 220 g (modelo AY 220, <http://www.shimadzu.com>, Japão).

Para o processamento dos sinais cromatográficos foram consideradas as áreas integradas através do software WINFAAS (EUA).

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Graph Pad Software*, Inc. (*Instatt 2.1*).

4.4 Preparo das amostras

Moluscos bivalves de quatro espécies (*Macoma constricta sp.*, *Anomalocardia brasiliiana sp.*, *Iphigenia brasiliiana sp.* e *Trachycardium muricatum sp.*) foram selecionados para este trabalho de acordo com a disponibilidade das mesmas na região de coleta. As amostras dos moluscos bivalves foram coletadas em diversos locais (Acupe, Bom Jesus dos Pobres, Ilha da Maré, Mutá, Salinas, Suape e Tainheiros) da BTS conforme mostrado na Figura 4. Estas amostras foram fornecidas pelo Laboratório de Malacologia e Ecologia de Bentos – LAMEB/UFBA.



Figura 4. Baía de Todos os Santos. (a) Tanheiros, (b) Ilha de Maré, (c) Bom Jesus dos Pobres, (d) Acupe e (e) Suape.

Após a coleta dos moluscos com espátula de plástico, estes foram lavados em água corrente e removidos os resíduos, acondicionados em sacos de polietileno previamente descontaminados (Figura 5), armazenados sob refrigeração e conduzidos ao laboratório. Dos moluscos bivalves coletados foram selecionados, aleatoriamente, indivíduos de cada espécie que tiveram o seu comprimento medido com o auxílio de um paquímetro manual de precisão 0,005 mm a partir da base ao ápice da concha. Em seguida, o tecido mole foi retirado com uma colher de plástico e lavado com água ultrapura, sendo o tecido mole transferido para um frasco de

polietileno e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a análise de especificação de As, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas, liofilizadas e moídas até o tamanho de partícula inferior a $100\text{ }\mu\text{m}$. As amostras assim preparadas foram conservadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos de polietileno. Análise de especificação de As foi feita usando as amostras liofilizadas.

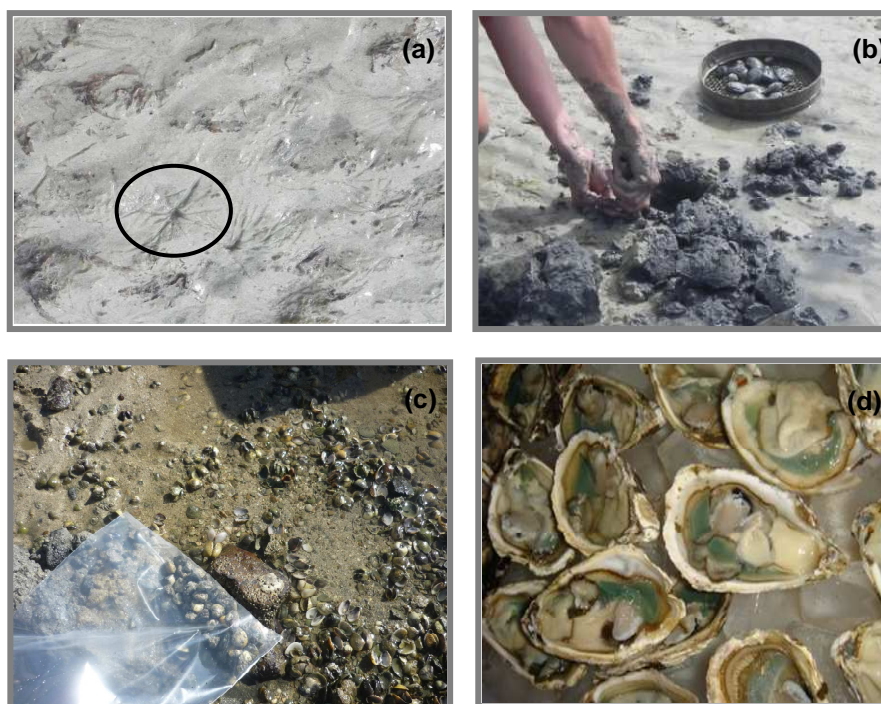


Figura 5. Coleta de moluscos bivalves. (a) indicativo de presença de molusco no manguezal apresentado na areia com formato de “pé-de-galinha” (b) modo de coleta “tradicional” dos moluscos pelos marisqueiros (c) acondicionamento dos moluscos em saco plástico (d) moluscos bivalves abertos com o tecido mole exposto.

4.5 Procedimento para determinação de As total

As amostras de moluscos bivalves foram decompostas em forno de micro-ondas para a determinação de As total por ICP OES. Cerca de 400 mg de amostra seca (liofilizadas e moídas) foram transferidas aos frascos de quartzo do forno micro-ondas e adicionados 6 mL de $\text{HNO}_3\ 14\text{ mol L}^{-1}$. Para a verificação da eficiência deste método de decomposição, 200 mg de amostras de CRM DORM-2 (*Dogfish muscle*), BCR627 (*Tuna fish muscle*) e SRM 1566b (*Oyster tissue*) foram decompostas nas

mesmas condições reacionais acima descritas para a decomposição dos moluscos bivalves.

Todas as misturas foram submetidas a radiação micro-ondas com o seguinte programa de aquecimento: *i*) 1400 W durante 10 min (rampa), *ii*) 1400 W durante 15 min e *iii*) 0 W durante 20 minutos (etapa de arrefecimento). Temperatura e pressão máximas foram limitadas a 280 °C e 80 bar, respectivamente, recomendadas pelo fabricante. Após o arrefecimento dos frascos, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL e foi aferido o volume a 30 mL com água e armazenadas a 4 °C até a determinação de As total por ICP OES.

4.6 Determinação de cloreto por IC

Para a determinação de cloreto nas soluções amostras, após extração por MAE, as mesmas foram diluídas 100 vezes e foram injetados 200 µL da solução amostra no cromatógrafo de íons. Foi preparada curva de calibração a partir da solução estoque de cloreto a 1000 mg L⁻¹ na faixa de concentração de 100 a 1000 µg L⁻¹ de Cl em água. A fase móvel utilizada na determinação de Cl por IC foi Na₂CO₃ 3,2 mmol L⁻¹ e NaHCO₃ 1,0 mmol L⁻¹ em água.

4.7 Otimização dos parâmetros de extração de espécies de As

Foram avaliados alguns dois principais parâmetros que podem influenciar na extração das espécies de As. Dentre estes foram avaliados o tipo de solução extratora, a concentração da solução extratora, o tempo de extração e a massa de amostra. O volume da solução extratora foi mantido em 6 mL (volume mínimo recomendado pelo fabricante do forno de micro-ondas) e utilizado a espécie de molusco *Anomalocardia brasiliiana sp.*

Soluções de água e metanol (1:1, 2:1 e 3:1) foram estudadas como meios extratores das espécies de As. Cabe mencionar que apenas esses reagentes foram utilizados por serem comumente usados para extração de As, devido ao baixo custo, boa eficiência de extração e são gerados poucos resíduos.

4.7.1 Procedimento usado para extração das espécies de As assistida por ultrassom

Para avaliar o efeito da UAE para a extração de espécies de As a partir de tecidos de moluscos, cerca de 200 mg de amostra de molusco *Anomalocardia brasiliana* sp. foram transferidas para um recipiente de polipropileno de 50 mL e adicionados 6 mL de água ou misturas de metanol e água (1:1, 2:1 e 3:1). As amostras foram sonicadas utilizando a sonda de ultrassom de 20 kHz e 130 W por 6 min. O extrato foi diluído com água até 30 mL no próprio frasco de polipropileno, centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos e filtrado através de filtro membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Chromafil PTFE). A solução assim obtida foi utilizada para a análise de especiação de As por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS de acordo com as condições descritas na Tabela 1. A eficácia da extração de cada procedimento foi avaliada por determinação de As em materiais de referência certificados SRM 1566b (Oyster tissue) e BCR627 (*Tuna fish muscle*).

4.7.2 Procedimento usado para a extração das espécies de As assistida por micro-ondas

Para avaliar o efeito da energia das micro-ondas na extração das espécies de As, cerca de 200 mg de amostra foram transferidas para os frascos de quartzo do forno de micro-ondas e 6 mL de água ou misturas de metanol e água (1:1, 2:1 e 3:1) foram adicionados. O programa de aquecimento utilizado foi: i) 500 W durante 5 min (rampa de 10 min), ii) 1400 W durante 6 min (rampa de 10 min) e iii) 0 W durante 20 minutos (de arrefecimento). A temperatura máxima atingida foi de 80 °C. Após o arrefecimento, os extratos foram diluídos com água até 30 mL e centrifugado a 3000 rpm durante 5 min antes da análise. O sobrenadante foi filtrado através de membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Chromafil PTFE) e assim injetados no sistema LC-ICP-MS ou LC-CVG-ICP-MS. As condições usadas para a análise de especiação de As por LC-ICP-MS ou LC-CVG-ICP-MS são descritas na Tabela 3.

4.7.3 Avaliação dos procedimentos de extração estudados

A eficiência dos métodos de extração foi avaliada através de balanço de massa para a concentração de espécies de As. Para tal, o somatório da concentração de todas as espécies de As foi comparado com a concentração de As total obtida após a decomposição da amostra e no extrato usado para análise de especiação. Os materiais de referência certificados SRM 1566b e CRM 627 também foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos.

4.8 Estudo da estabilidade de espécies de As por extração assistida por micro-ondas

O efeito da energia das micro-ondas na estabilidade da espécie de As foi estudada usando cerca de 200 mg de *Anomalocardia brasiliiana sp.* e transferido para o recipiente de quartzo do forno de micro-ondas e adicionados 20 µg L⁻¹ de cada solução referência de espécies de As disponíveis [As(III), AsB, DMA, MMA, p-ASA e As(V)], sendo avaliada sob refrigeração (em torno de 4 °C) e a temperatura ambiente. A extração foi feita com água e MAE, e a estabilidade foi avaliada durante 3 meses através da recuperação das espécies de As.

4.9 Especificação de As por LC-ICP-MS

O sistema LC-ICP-MS empregado pode ser visualizado na Figura 6.

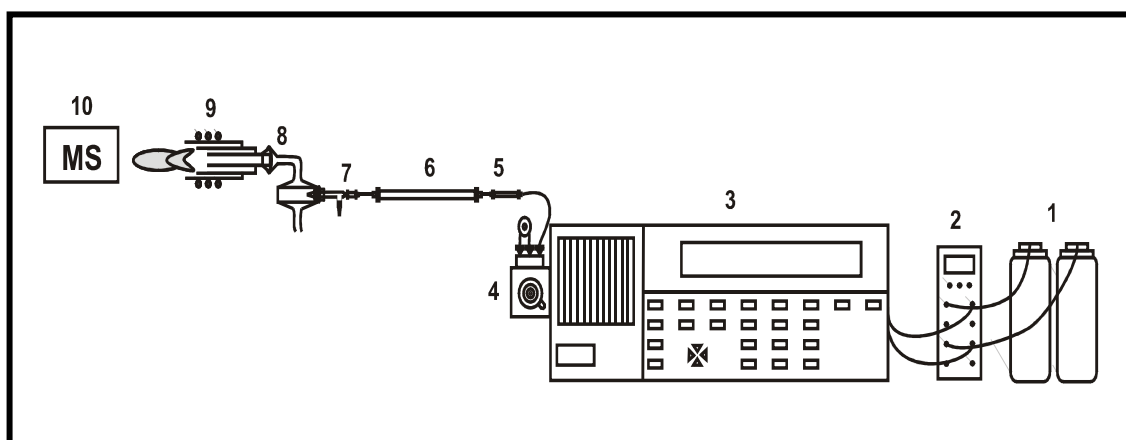


Figura 6. Sistema LC-ICP-MS. 1- fase móvel; 2- degaseificador a vácuo; 3- bomba de LC; 4- injetor e alça de amostragem; 5- coluna guarda (troca aniônica); 6- coluna de troca aniônica; 7- nebulizador; 8- câmara de nebulização; 9 e 10- ICP.

4.9.1 Avaliação dos parâmetros que influenciam na separação das espécies de As

A LC-ICP-MS e a LC-CVG-ICP-MS foram utilizadas para a análise de especificação de As nas amostras de moluscos bivalves e CRMs. A quantificação de cada uma das espécies de As presentes nas amostras foi feita através de calibração externa obtida a partir de solução de referência de As (conforme item 4.2). As curvas de calibração para a determinação de espécies de As (como As) foram feitas a partir de duas soluções de referência de espécie de As, uma na forma de DMA, sendo esta escolhida aleatoriamente, uma vez que foi constatado que todas as espécies de As possuem a mesma sensibilidade. A outra curva de calibração foi feita a partir de AsB, devido a discrepância do pico do AsB comparando com as outras espécies de As. Sendo assim, as concentrações para a curva com a solução referência de AsB foi de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ em água. Para As(III), As(V), DMA, MMA e *p*-ASA a curva de calibração foi de $0,5$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em água, a partir da solução de referência de DMA, expressa também como As. A concentração de As nas soluções feitas para obter as curvas de calibração para análise de especificação foi de $0,1$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$

preparadas em água. As condições instrumentais adotadas para a determinação de As estão listados na Tabela 3, que foram ajustadas a fim de conseguir o menor LOD estimado pelo critério 3σ (onde σ é o desvio padrão de 10 determinações consecutivas do branco).

Para a separação das espécies de As foi utilizada coluna de troca aniônica (Hamilton PRP-X100), sendo esta estável em uma ampla faixa de pH (1-13). Para a obtenção do melhor desempenho do sistema LC-ICP-MS, foram utilizadas soluções de referência de As(III), As(V), AsB, DMA, MMA *p*-ASA e soluções amostra de moluscos bivalves. Nos estudos foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo, concentração, pH, vazão e condição (isocrática ou gradiente) de eluição.

Foram testados dois tipos de fases móveis (fosfato de amônio e carbonato de amônio) para avaliar o efeito da separação das espécies de As. Após a escolha da fase móvel, foi avaliada a influência da concentração, vazão e pH da fase móvel com a finalidade de avaliar a influência na separação cromatográfica e tempo de retenção das espécies de As. Com a finalidade de se obter melhor separação e tempo de eluição menor, a eluição foi avaliada no modo isocrático e gradiente.

4.10 Análise de especificação de As por LC-CVG-ICP-MS

O sistema LC-CVG-ICP-MS foi otimizado, tendo-se em vista a obtenção da melhor razão sinal/ruído para ^{75}As . A concentração da solução NaBH_4 foi variada entre 0,5 e 1,5% (m/v), mantendo-se a concentração de NaOH em 0,01% (m/v). A concentração de HCl (carregador) foi avaliada entre 0,5 e 2,0 mol L⁻¹ (v/v). A influência da vazão de Ar (gás de arraste) sobre o sinal do ^{75}As foi avaliada entre 0,80 e 1,20 L min⁻¹. O sistema LC-CVG-ICP-MS proposto neste trabalho está representado na Figura 7.

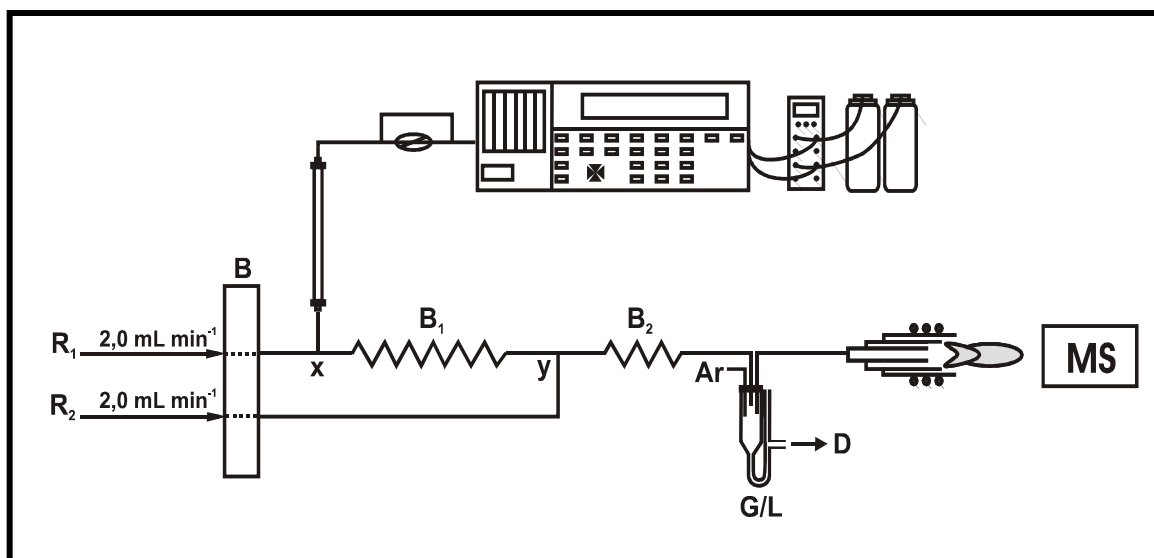
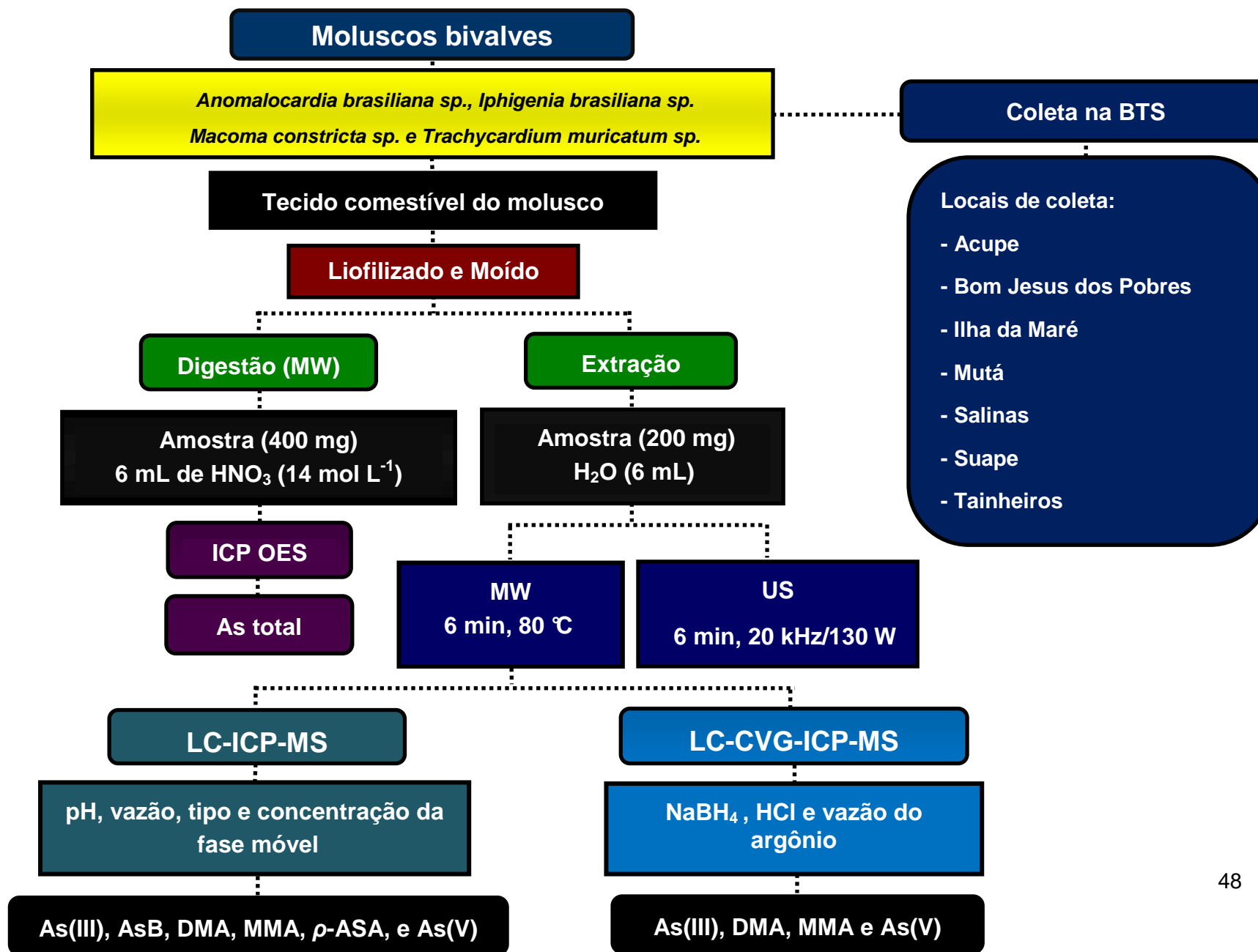


Figura 7. Sistema LC-CVG-ICP-MS. Para LC-ICP-MS ver legenda da Figura 6. Para o sistema CVG: R₁- ácido clorídrico; R₂- NaBH₄; B- bomba peristáltica; D- descarte; B₁- 30 cm; B₂- 10 cm; x e y- confluências; Ar- gás de arraste (argônio); G/L- separador gás/líquido. As setas indicam o sentido das soluções.

O fluxograma da Figura 8 mostra um esquema geral do desenvolvimento de metodologia para determinação de espécies de As em moluscos bivalves por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS.

Figura 8. Desenvolvimento de metodologia para determinação de espécies de As em moluscos bivalves por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS.



5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos após as avaliações feitas no presente trabalho, tais como (i) procedimentos de preparo de amostra para especiação química de As por ultrassom e micro-ondas, (ii) ajuste dos procedimentos de determinação de espécies de As por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS e (iii) avaliação da eficiência do preparo de amostra e técnicas de especiação de As desenvolvidas neste trabalho e aplicadas para moluscos bivalves e materiais de referência.

5.1 Determinação de As total

As amostras de moluscos bivalves foram decompostas em forno de micro-ondas para determinação de As total, juntamente com material de referência certificado (DORM-2, BCR-627 e NIST 1566b), conforme descrito no item 4.5 (“Procedimento para determinação de As total em moluscos bivalves”). Os valores obtidos para As total nessas amostras foram adotados como referência, e estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de As total em moluscos bivalves. Determinação por ICP OES após digestão por micro-ondas. (média \pm sd, $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3).

Molusco	Local da coleta	As total
	Tainheiros	10,9 \pm 0,3
<i>Anomalocardia brasiliana sp.</i>	Acupe	17,1 \pm 0,8
	Ilha de Maré	9,9 \pm 0,7
	Mutá	17,1 \pm 0,2
<i>Iphigenia brasiliana sp.</i>	Salinas	16,8 \pm 0,5
	Suape	11,7 \pm 0,6
<i>Macoma constricta sp.</i>	Bom Jesus	100 \pm 2
	Suape	33,0 \pm 3,0
	Mutá	14,5 \pm 0,6
<i>Trachycardium muricatum sp.</i>	Tainheiros	12,6 \pm 0,3
	Bom Jesus	12,9 \pm 0,2
	Suape	11,9 \pm 0,3
*DORM-2	-	18,1 \pm 0,4
*BCR-627	-	4,56 \pm 0,04
*NIST 1566b	-	7,2 \pm 0,3

*Valores certificados - BCR-627: 4,80 \pm 0,3; DORM-2: 18,0 \pm 1,1 e NIST 1566b: 7,6 \pm 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Conforme os resultados mostrados na Tabela 4 para As total em moluscos bivalves, em geral, as concentrações de As nas espécies de moluscos são semelhantes. Somente a concentração de As na *Macoma constricta sp.* é cerca de uma ordem de grandeza maior que as outras espécies de moluscos, mesmo sendo coletada em locais semelhantes. No entanto, a concentração de As nos tecidos dos moluscos expressa uma concentração

média por período de tempo, enquanto que se compararmos com os valores observados na água, sendo estes muito variáveis.²⁰⁷ Existe uma diversidade na origem dos moluscos bivalves que pode resultar numa variabilidade de níveis de contaminação, o que pode explicar as diferenças de concentração de As entre espécies de moluscos analisadas. Entre os fatores estão incluídos a variabilidade sazonal e o tamanho do molusco.²⁰⁸ Esta variabilidade também é dependente de fatores físico-químicos e interações biológicas. Além disso, variações de salinidade em sistemas estuarinos têm uma forte influência sobre os padrões temporais como variações diárias e anuais.²⁰⁹ Organismos marinhos são conhecidos por acumular grandes quantidades de As, com concentrações tipicamente na faixa de 1 a 100 mg kg⁻¹,²¹² sendo estes valores semelhantes aos apresentados na Tabela 4 para As total nas espécies de moluscos coletados em diferentes locais da BTS. Os valores obtidos para materiais de referência certificados DORM-2, BCR-627 e NIST 1566b, com decomposição por sistema fechado em micro-ondas e determinação por ICP OES, foram concordantes com os valores certificados, o que atesta a exatidão da metodologia utilizada.

O limite máximo de As em peixes e produtos de peixe para o consumo humano foi estabelecido pelo decreto 55.871-65, publicado em 27/3/1965 pela ANVISA.⁴⁷ Considerando este limite, todas as espécies de moluscos, independente do local, não podem ser consumidas, uma vez que a ordem de grandeza, acima do permitido, é de 4 a 100 vezes, o que é um fato preocupante para a população de BTS que se alimenta desses animais. Tal fato pode estar relacionado diretamente com contribuições antrópicas (descargas de efluentes industriais e domésticos, extração de petróleo, processos de geração de energia, emissão veicular e atividades portuárias), para a elevação dos níveis de contaminantes encontrados atualmente na BTS.

5.2 Determinação de cloreto nas amostras

O ICP-MS é um equipamento ideal para a determinação de elementos traço numa grande variedade de matrizes.²¹³ Porém, algumas matrizes apresentam dificuldades analíticas específicas inerentes à sua

composição, resultando na formação de íons poliatômicos. Por exemplo, águas estuarinas e de oceano contêm altos níveis de elementos alcalinos, alcalinos-terrosos e íons cloreto. Estes elementos químicos formam íons poliatômicos como ArCl^+ , ArNa^+ , OCl^+ , $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^{2+}$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$ e etc.²¹⁴⁻²¹⁵

A determinação de As por ICP-MS, assim como outros elementos, pode ser prejudicada por interferências espectrais causadas por íons poliatômicos. Esse tipo de interferência pode ocorrer em função da matriz da amostra, de reagentes utilizados no preparo da amostra ou de espécies geradas no plasma por combinação com os gases atmosféricos.²¹⁴ Dentre os interferentes que são comuns na determinação de As, o cloreto é um dos mais severos, devido à formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ (m/z 75).²¹³⁻²¹⁶

Para tanto, foi determinada a concentração de cloreto nas amostras de moluscos após extração com água (massa de amostra de aproximadamente 200 mg em 6 mL de água) e uso da MAE na mesma condição utilizada para análise de especiação de As. As quatro espécies de moluscos em estudo e os locais de coleta na BTS foram avaliados.

Tabela 5. Concentração de cloreto em moluscos bivalves coletadas em diferentes locais da BTS. Determinação por IC após MAE (% , n = 3).

Molusco	Local de coleta	Cloreto
<i>Anomalocardia brasiliiana</i> sp.	Acupe	4,1
	Ilha da maré	0,2
	Tainheiros	7,3
<i>Iphigenia brasiliiana</i> sp.	Salinas	2,5
<i>Macoma constricta</i> sp.	Bom Jesus dos Pobres	3,2
<i>Trachycardium muricatum</i> sp.	Suape	3,2
	Mutá	4,3

Conforme, mostrado na Tabela 5, foi observado que as concentrações de íons cloreto nas amostras após extração com MAE apresentaram resultados variáveis de acordo com o local de coleta, no entanto, estes valores estão abaixo dos valores que poderiam acarretar em interferência significativa de cloreto na determinação de espécies de As por LC-ICP-MS. Para a

determinação de As total por ICP-MS, certamente estes níveis de concentração de cloreto formam íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ e, conseqüentemente, resultados errôneos podem ser obtidos.

5.3 Avaliação de procedimentos de extração das espécies de As

A extração de As em amostras de organismos marinhos é uma das etapas críticas na sequência de operações analíticas em análise de especiação devido à possibilidade de perda de analito, extração insuficiente e interconversão de espécies.²¹⁷⁻²¹⁹ Dessa forma, para garantir a qualidade da análise de especiação de As, a composição da solução extratora é considerada importante, assim como a concentração da mesma. A solução extratora deve ser capaz de extrair quantitativamente as espécies de As, sem perda e interconversão de espécies.

5.3.1 Tipo de solução extratora e concentração

Métodos de extração em condições de operação simples são desejáveis para a extração quantitativa do analito. As metodologias de extração propostas para estudos de especiação devem estar de acordo com o tipo de amostra e características físico-químicas das espécies.²¹⁷

O tipo de solução extratora é um dos fatores que influencia na extração, sendo que para as espécies de As presentes em amostras biológicas, metanol e água são os extratores mais utilizados. Resultados obtidos de soluções extratoras para As total em materiais de referência certificados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos para As total após extração com MAE e UAE usando diferentes soluções extratoras. Resultados (%) representam a média e o desvio-padrão de 3 replicatas de cada amostra. Determinação de As total por ICP OES.

Soluções extratoras	SRM 1566b		BCR 627	
	MAE	UAE	MAE	UAE
Água	99 ± 2	91 ± 3	101 ± 5	93 ± 2
Metanol - Água (1:1)	97 ± 4	89 ± 5	99 ± 7	86 ± 3
Metanol - Água (2:1)	92 ± 2	83 ± 3	94 ± 4	81 ± 7
Metanol - Água (3:1)	89 ± 2	77 ± 8	91 ± 2	72 ± 6

Apesar de vários estudos de procedimentos de extração de espécies de As relatados na literatura,^{127, 144-145, 210-212, 215-227} neste trabalho foi avaliada a extração com MAE e UAE com diferentes solventes nos materiais de referência certificados SRM 1566b e BCR 627. Para este estudo, o volume do extrator foi fixado em 6 mL de amostra e a massa em 200 mg. Foi avaliado o tipo de extrator e proporção dos mesmos utilizando misturas de água e metanol na proporção de 1:1, 1:2 e 1:3. De acordo, com os resultados mostrados na Tabela 6, a melhor recuperação de As total foi quando as amostras foram submetidas a radiação micro-ondas, utilizando água ou uma mistura de 1:1 de metanol:água, salientando que com o aumento da concentração de metanol diminuiu a extração de As. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos.^{94,180,219,228-229,231-232} A extração dos compostos de As pode ser explicada através da maior solubilidade dos mesmos nos solventes avaliados e o tipo de matriz. A água é um solvente altamente polar, que é capaz de solubilizar compostos iônicos (inorgânicos e orgânicos) e não-iônicos. Além disso, as espécies de As, na grande maioria, são naturalmente polar ou iônica e, muito solúvel em água.²³³⁻²³⁴ A recuperação quantitativa de As na água indica também que quantidades significativas de compostos polares inorgânicos estão presentes.²²⁹ Por este motivo e devido a melhor recuperação do analito, foi escolhida a água como meio extrator. Estes dados estão de acordo com McSheehy *et al.*¹⁵⁷, que compararam os efeitos da água, metanol e água-metanol (1:1), tanto para a extração das espécies, quanto da quantidade total de As extraído. Entretanto, a eficiência de extração de espécies de As

pode variar de um laboratório para outro, conforme resultados obtidos de estudo interlaboratorial para o material de referência certificado DOLT-4 (*Dogfish liver*).²³⁵ Dessa forma, os dados reportados não mostraram diferença entre os vários sistemas de solventes e a água foi utilizada como meio extrator no presente trabalho para todas as extrações por MAE e UAE.

Diferentes procedimentos de extração foram avaliados por diversos autores,^{95,101, 117,157, 211} sendo utilizados água e diferentes misturas de água-metanol como agentes de extração. Porém, praticamente todas as espécies de As presentes em organismos marinhos foram extraídos somente com água.

5.3.2 Efeito da massa de amostra

Diferentes massas de amostra foram avaliadas, utilizando-se água auxiliada por radiação MW, que foi a melhor condição, de acordo com os resultados mostrados anteriormente. Para este estudo, foi utilizado material de referência e amostra. Foram avaliadas massas de amostra na faixa de 50 a 300 mg, mostrados na Figura 9. Após a extração, o sobrenadante foi separado da fase sólida por centrifugação a 3000 rpm durante 5 min. Foi preparado um branco para cada condição.

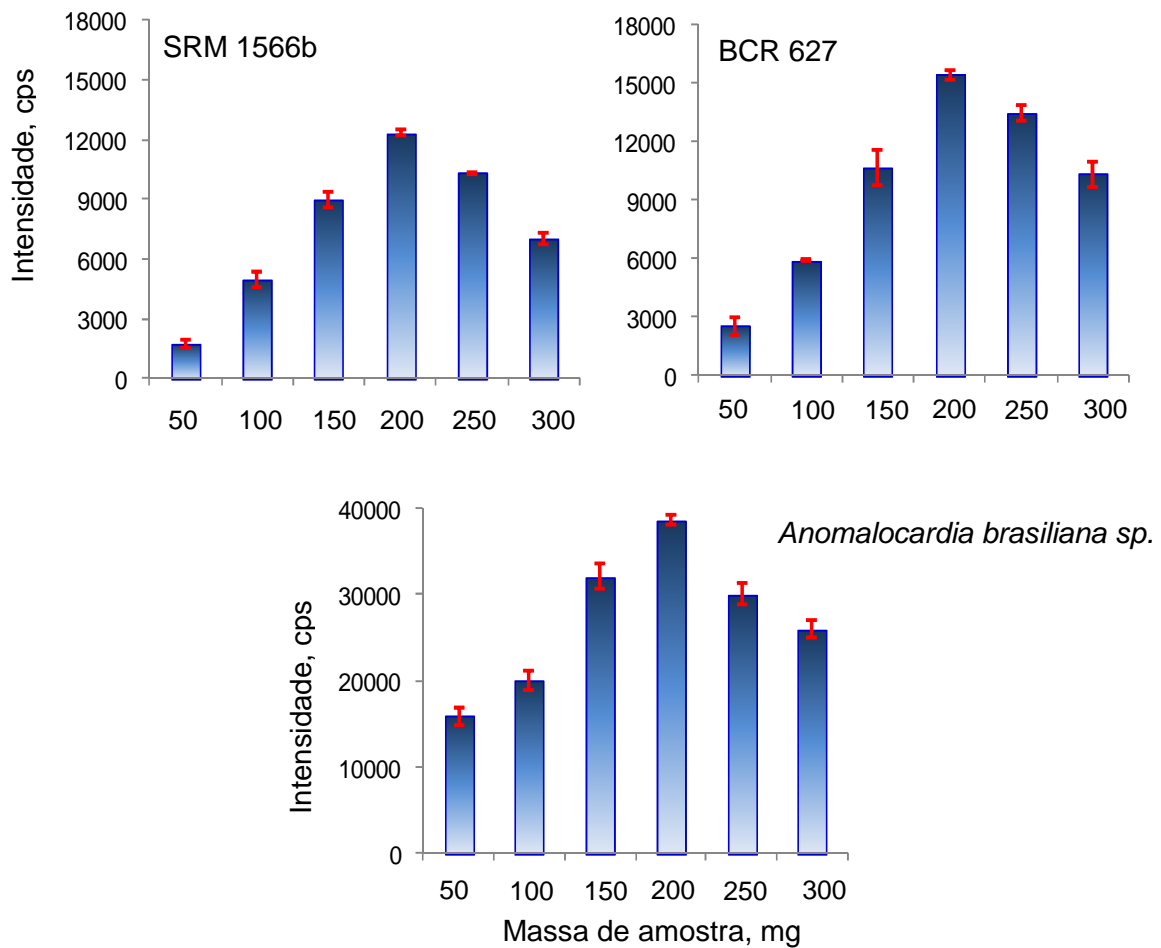


Figura 9. Efeito da massa de amostra sobre a extração de As.

Conforme, os resultados apresentados na Figura 9, observa-se que melhores extrações foram obtidas com massa de amostra de 200 mg para os materiais de referência e amostra de molusco. Condições semelhantes foram observadas por Cao *et al.*¹¹⁵ Sendo assim, esta foi a massa de amostra selecionada para determinar espécies de As nos estudos posteriores, uma vez que massa superior a 200 mg foi observado um decréscimo no sinal pela dificuldade de extração satisfatória das espécies de As.

Massas acima de 300 mg não foram testadas para extração de espécies, pois foi verificado que ocorre um aumento na pressão da coluna cromatográfica, provavelmente devido a presença de partículas, maior viscosidade ou dificuldade de solubilização da matriz da amostra no extrator. O uso de massas menores do que 200 mg não é recomendado, pois algumas das espécies estão em baixas concentrações, podendo não serem detectadas.

5.3.3 Efeito do tempo de sonicação por UAE

A interação entre as espécies de As depende do tempo de extração, da matriz, da composição do meio extrator, e também, do dispositivo de ultrassom (banho ou sonda, bem como a amplitude e frequência) utilizado. Para este estudo, a massa de amostra utilizada foi de 200 mg, sendo esta escolhida anteriormente como a massa de amostra com intensidade favorável e extração quantitativa das espécies de As. As amostras foram sonicadas em 6 mL de água, utilizando-se uma sonda de ultrassom. Foi preparado um branco para cada condição. Após sonicação, o sobrenadante foi separado da fase sólida por centrifugação a 3000 rpm durante 5 min. A influência do tempo de sonicação sobre a eficiência da extração pode ser visto na Figura 10. As recuperações obtidas para As total nas soluções de referência e amostra mostram que a extração por sonicação é rápida e foi observada recuperação quantitativa dos analitos somente em 6 min de sonicação em 6 mL de água. Cabe destacar, que o aumento do tempo de sonicação, pode facilitar o contato da superfície das partículas da amostra com o extrator, o que é também influenciado pela alta velocidade de jatos gerados pelo ultrassom. A Figura 10 mostra as recuperações obtidas para As total por ICP OES.

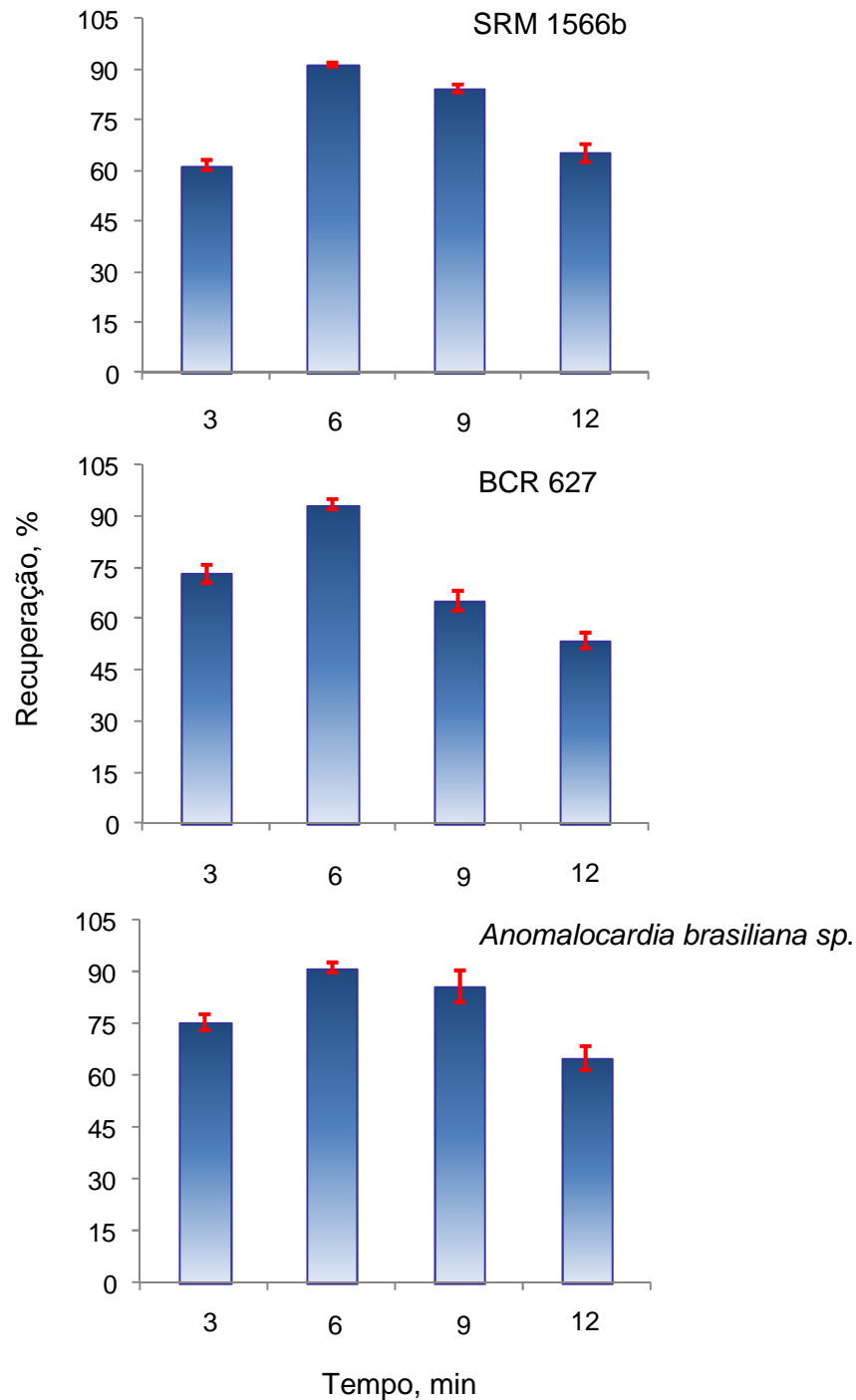


Figura 10. Efeito do tempo de sonicação na extração de As.

De acordo com a Figura 10, a eficiência de extração de As total com o uso de UAE foram inferiores quando comparadas com a eficiência de extração obtidas por MAE (Tabela 6 – item 5.3.1). Além disso, foi feita avaliação da possível interconversão das espécies de As, onde ficou demonstrado que há

interconversão de espécies As, principalmente do estado de oxidação +5 para +3 e possível degradação de espécies orgânicas. Isso pode estar associado à mineralização do composto dentro da zona gasosa ou da zona quente das bolhas de cavitação, onde, além da elevada temperatura, há a geração de radicais, consequência da energia da radiação US. É importante mencionar que as interconversões de espécies de As estão de acordo com outros trabalhos.^{104,116} Por conseguinte, a extração com UAE não foi utilizada para estudos subsequentes.

5.3.4 Avaliação da extração por MAE

Uma das principais vantagens do uso da radiação MW é o rápido aquecimento da mistura de amostra e solvente de extração. Além disso, podem ser utilizados recipientes fechados, pouco volume de solvente, geralmente de 6 a 10 mL, e o tempo de procedimento de extração é de aproximadamente 15 a 30 minutos. De maneira geral, a reprodutibilidade e as recuperações das espécies são melhores em comparação com as técnicas convencionais de extração²¹⁷, como a extração por Soxhlet,^{208,210} líquido-sólido ou líquido-líquido^{203, 205, 224} e sonicação^{145, 147, 166, 168}. Entretanto, estes recursos são utilizados para extrair uma variedade de espécies de As a partir de vários tipos de organismos marinhos. Desta forma, optou-se por testar a extração por MAE. Na Figura 11 são mostrados os aspectos das amostras de moluscos bivalves após extração com MAE.

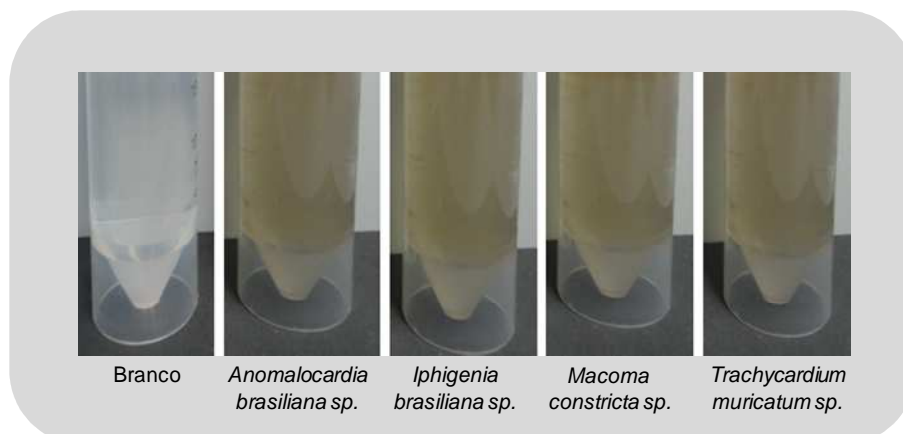


Figura 11. Amostras de moluscos bivalves após extração com micro-ondas.

Cabe destacar, que as soluções das amostras de moluscos, mostradas na Figura 11, foram obtidas após extração por MAE. O aspecto das soluções foi semelhante e considerado adequado para análise por cromatografia.

5.3.4.1 Efeito do tempo de extração por MAE

Para a avaliação do tempo de extração por MAE foram utilizados 200 mg de amostra, conforme otimização descrita no item 4.7.2 (“Procedimento usado para a extração das espécies de As assistida por micro-ondas”- Materiais e Métodos). Tempos de contato da amostra com a solução extratora foram avaliados entre 3 a 12 min. Conforme Figura 12, pode ser observado que em 6 min obtiveram-se melhores recuperações para a amostra e soluções de referência.

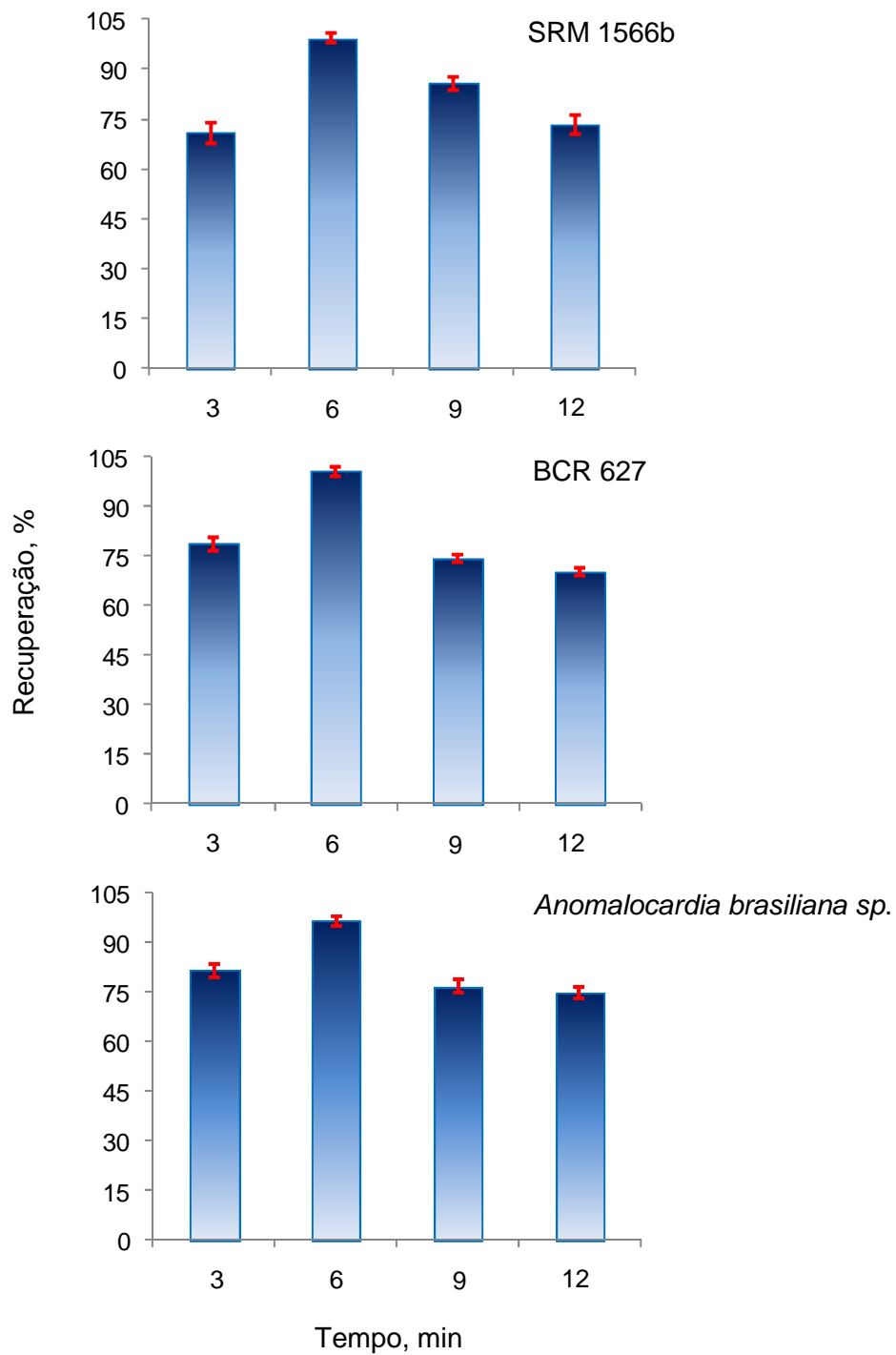


Figura 12. Efeito do tempo de extração por MAE na extração de As.

Pode-se observar na Figura 12, que a eficiência de extração de As na amostra utilizando MAE são melhores em relação ao uso de UAE, onde a eficiência máxima de extração foi de 93% (Tabela 6 – item 5.3.1). Dessa forma, pode-se afirmar que o procedimento de MAE é apropriado para a determinação de espécies de As em moluscos bivalves, já que a eficiência de extração foi sempre melhor (97 ± 3 a $101 \pm 5\%$) na amostra e soluções de referência. Sendo assim, foi fixado em 6 min o tempo de extração por MAE. O emprego de potência relativamente baixa (500 W) das micro-ondas permite uma extração relativamente rápida das espécies de As, sem alterar as ligações carbono-As das espécies orgânicas de As presentes em organismos marinhos.

5.3.4.2 Efeito da temperatura de extração por MAE

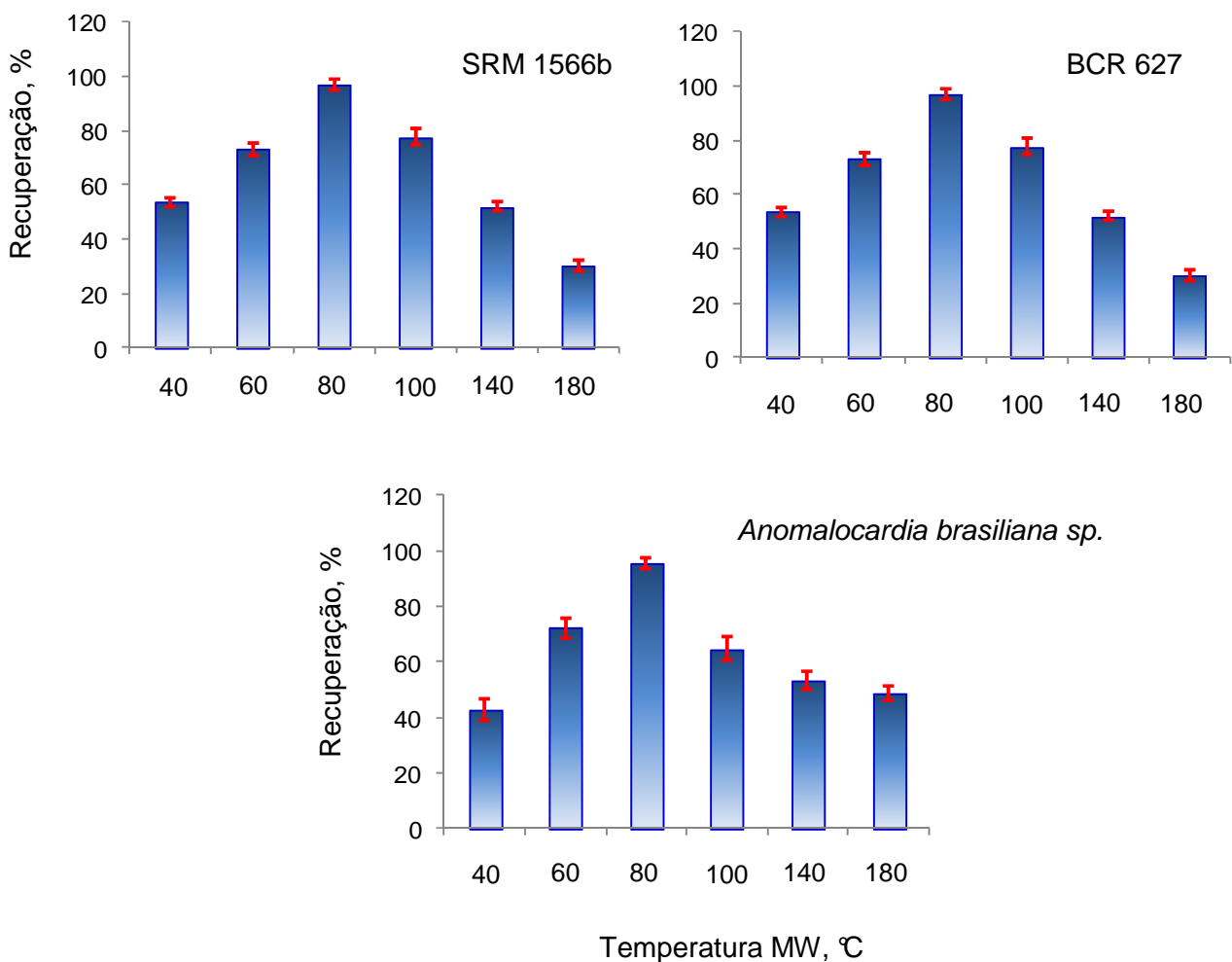


Figura 13. Efeito da temperatura de extração por MAE na extração de As.

Considerando os resultados mostrados na Figura 13, a recuperação obtida para as amostras foi acima de $97 \pm 3\%$. Dessa forma, foi fixada a temperatura em $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com tempo de irradiação de 6 min, escolhido anteriormente. Esta condição levou à melhores resultados, com recuperações satisfatórias para As total, sendo concordante com as condições estabelecidas por Narukawa *et al.*²¹⁹ No entanto, ao contrário do que foi observado no presente trabalho, estes utilizaram 30 min para extração, o que também está de acordo com o trabalho de Yeh *et al.*²²⁰

O uso de MAE com água como solvente extrator é relatado por vários autores como o método mais adequado para extração de espécies de As, uma vez que a água favorece a extração de espécies inorgânicas e orgânicas de As presentes na grande maioria dos organismos marinhos.^{207,209,225}

5.4 Estudo de estabilidade de espécies de As

Uma das principais dificuldades na análise de especiação é prevenir a interconversão das espécies químicas no procedimento de extração, armazenagem das soluções e no processo de separação.²¹⁷ No caso do As, apesar da maioria das espécies serem relativamente estáveis, pode haver interconversão. A temperatura é bastante crítica neste aspecto e deve ser considerada no processo de extração. Espécies de As podem ser convertidas de uma forma para outra, ou haver perdas de espécies. As condições adequadas de armazenamento e extração das espécies de As evita a interconversão.²²²

A estabilidade das espécies de As foi estudada através da comparação do armazenamento do extrato das amostras (*Anomalocardia brasiliiana sp.*) sob refrigeração (cerca de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a temperatura ambiente (cerca de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) com a adição de $20\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de soluções de referência de As(III), AsB, DMA, MMA, *p*-ASA e As(V). A extração foi feita com água e MAE, e a estabilidade das espécies de As foi avaliada durante um período de 3 meses, sendo o efeito mostrado na Figura 14.

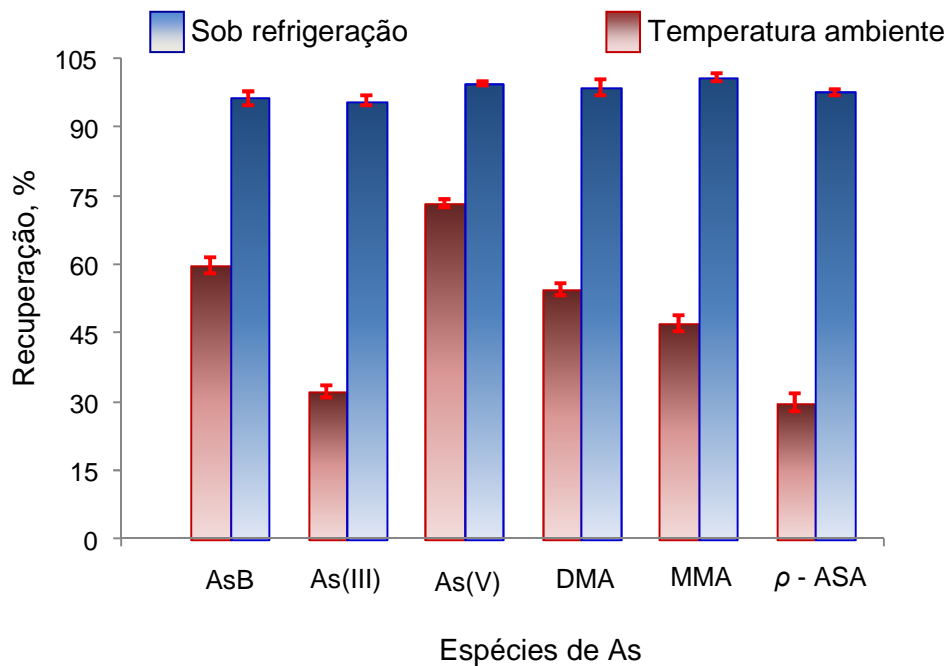


Figura 14. Estudo de estabilidade de espécies de As na amostra *Anomalocardia brasiliiana* sp. com adição equivalente a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As após extração com água por MAE.

Pode-se observar na Figura 14 que as espécies de As, armazenadas sob temperatura ambiente, apresentaram valores baixos de recuperação, sendo de $29,8 \pm 2,1$ a $60,0 \pm 1,7\%$ para p-ASA e As(III), respectivamente. Além disso, foi observado que as espécies orgânicas DMA, MMA e AsB submetidas à temperatura ambiente foram mais estáveis que as espécies inorgânicas. No entanto, quando armazenadas sob refrigeração, as recuperações obtidas para As(III) e MMA foram de $95,9 \pm 1,2$ a $101 \pm 1\%$, respectivamente. Dessa forma, podemos concluir que espécies inorgânicas são menos estáveis à temperatura ambiente. Sendo assim, é imprescindível o armazenamento adequado dos extratos de moluscos sob refrigeração, pois se evita a perda de espécies de As, interconversão das espécies ou degradação da amostra, uma vez que a matriz é biológica e pode ocorrer biotransformações microbiológicas que podem levar à biometilação de espécies inorgânicas de As.²²⁶⁻²²⁸ Como podemos observar na Figura 14, recuperações satisfatórias foram obtidas para as espécies de As sob refrigeração por aproximadamente 3 meses, o que está de acordo com dados reportados na literatura.^{25,135, 236-240}

Cabe destacar, que a flora microbiana que prolifera após a morte do organismo marinho, persiste durante o armazenamento, mesmo em condições sob refrigeração pode ser responsável por processos de conversão das espécies de As.²³⁷ É possível que a alteração das condições de manuseio (por exemplo, a temperatura de refrigeração, a armazenagem, o tempo entre a captura e análise) aplicada aos organismos marinhos após a captura pode ter um efeito sobre a microflora bacteriana e, conseqüentemente, sobre a degradação das espécies de As em organismos marinhos.²³⁹ Neste estudo, para prevenir a degradação e/ou perda da espécie de As, todos os extratos foram analisados no mesmo dia do procedimento de extração.

5.5 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-ICP-MS

5.5.1 Ajuste do instrumento ICP-MS

Para a determinação de espécies de As por ICP-MS foi feito monitoramento do isótopo m/z 75, sendo que o instrumento de ICP-MS foi inicialmente ajustado no modo convencional de introdução de soluções (nebulização pneumática) com a finalidade de obter máxima sensibilidade para As, conforme descrito no item 4.1 (“Instrumentação” – Materiais e Métodos). Quando o sistema LC foi acoplado ao instrumento ICP-MS foi feita a otimização de cada parâmetro separadamente, alguns parâmetros foram fixados e utilizados para o sistema LC-CVG-ICP-MS, já outros parâmetros que influenciam no emprego da CVG acoplada à técnica de ICP-MS foram avaliados.

5.5.2 Análise de especiação de As por LC-ICP-MS

O acoplamento LC-ICP-MS foi feito diretamente, ou seja, a saída da coluna de troca aniônica foi conectada ao nebulizador pneumático do instrumento. O tipo, concentração, pH, vazão e condição da eluição (isocrática ou gradiente) da fase móvel foram avaliados de forma a obter o melhor

desempenho na separação e quantificação das espécies de As. Estes parâmetros foram estudados de forma univariada com a utilização de soluções contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As de cada espécie de As em água e amostra de molusco bivalve (*Anomalocardia brasiliiana sp.*), extraídas com água e MAE. O perfil do sinal cromatográfico, quando em água ou fase móvel são semelhantes. O volume injetado foi de $200 \mu\text{L}$ para todos os testes realizados.

Os testes iniciais para a separação dos compostos de As(III), AsB, DMA, MMA *p*-ASA e As(V) foram feitos tomando-se, como referência, as condições empregadas por Leufroy *et al.*¹¹⁶ Para o primeiro parâmetro avaliado, o tipo de fase móvel, foi observada a compatibilidade do tipo de fase móvel com o instrumento de ICP-MS, uma vez que altos teores de solventes orgânicos ou sais podem causar instabilidade do plasma ou extinguir o mesmo e formar depósitos de carbono ou sais na interface do instrumento. Além disso, o carbono pode causar aumento na intensidade do sinal do As, possivelmente pelas recombinações (íons e elétrons) que acontecem no plasma para os elementos não totalmente ionizados, como o As ($9,81 \text{ eV}$).¹⁴⁸ A condição de separação cromatográfica inicialmente testada foi adaptada de Brisbin *et al.*²²⁶. Na Figura 15 é mostrado o cromatograma obtido de acordo com as condições citadas abaixo.

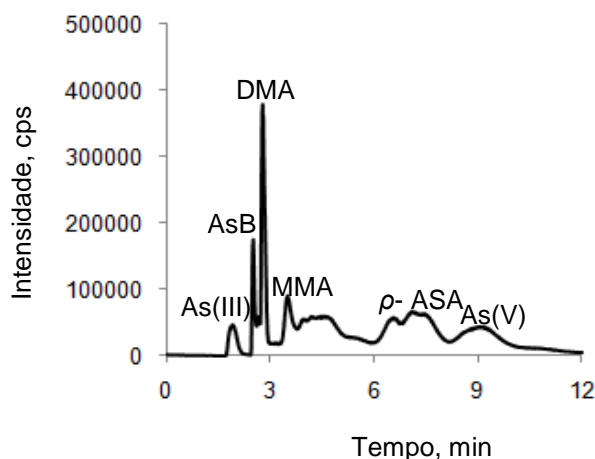


Figura 15. Cromatograma obtido por LC-ICP-MS. Condição de eluição: (a) $30,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, (b) $20,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, (c) $15,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e (d) $10,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 8,5 e vazão de $1,25 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna de troca aniônica PRP-X100.

Conforme mostrado na Figura 15, pode-se observar que a condição adaptada da literatura não levou à separação adequada das espécies de As, principalmente entre os picos AsB e DMA, além de pouca resolução entre as outras espécies de As e instabilidade da linha de base.

Outra condição avaliada foi adaptada de B'Hymer e Caruso²²⁵ que utilizaram coluna de troca aniônica para a separação das espécies de As em solução de referência de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As. O cromatograma está mostrado na Figura 16.

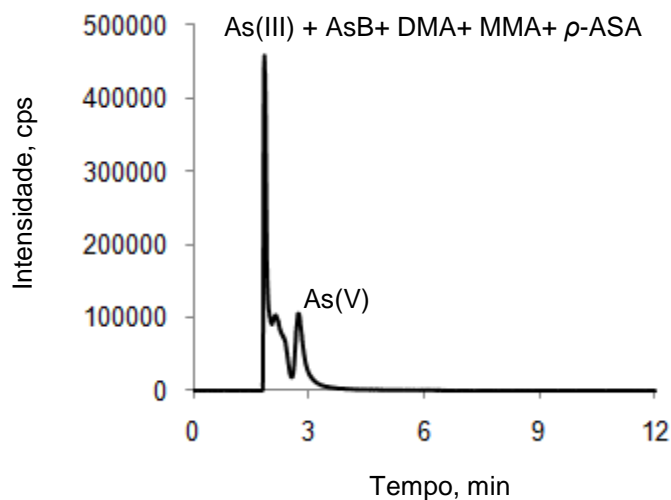


Figura 16. Cromatograma obtido por LC-ICP-MS. Condição de eluição: (a) $12,5 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 0 a 2 min, (b) $50,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 3 a 6 min, (c) $15,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 8 a 10 min, (d) $10,0 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 10 a 12 min. Coluna de troca aniônica PRP-X100. Fase móvel: pH 8,5, vazão: $1,10 \text{ mL min}^{-1}$.

De acordo com a Figura 16, pode-se observar que as espécies de As, utilizando esta fase móvel e nas condições empregadas apresentaram resolução ruim. Mesmo com alteração na concentração da fase móvel não foi possível melhorar a separação das espécies.

Comparando-se os cromatogramas das Figuras 15 e 16, percebe-se que os dois cromatogramas foram utilizados no modo de eluição gradiente. Este modo de eluição favorece a separação de espécies catiônicas e neutras das espécies inorgânicas e orgânicas de As.²⁴¹ Além disso, o modo de eluição por gradiente com hidróxido de amônio requer menos tempo para separar As(III)

inorgânico e orgânico em diferentes amostras,²⁴² mas a eluição com $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ requer longo tempo para eluir As(V) nesta coluna, não sendo favorável para esta espécie de As. Dessa forma, é recomendado a combinação de carbonato e hidróxido de amônio como fase móvel nas concentrações de 5 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1} , respectivamente, para separação das espécies catiônicas e neutras, sendo as primeiras espécies de As a eluir nestas condições.²⁴³ Dessa forma, o modo de eluição isocrático não será testado nos experimentos subsequentes. Outras formas de eluição são recomendadas, entre elas o fosfato de amônio e metanol como modificador químico. Usando estas fases móveis, foi avaliada somente o seu efeito na separação de As (III) e AsB de uma solução de referência contendo $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie, sendo que estas possuem tempo de retenção muito próximo. Na Figura 17 estão mostrados os cromatogramas (a) e (b) com estas espécies.

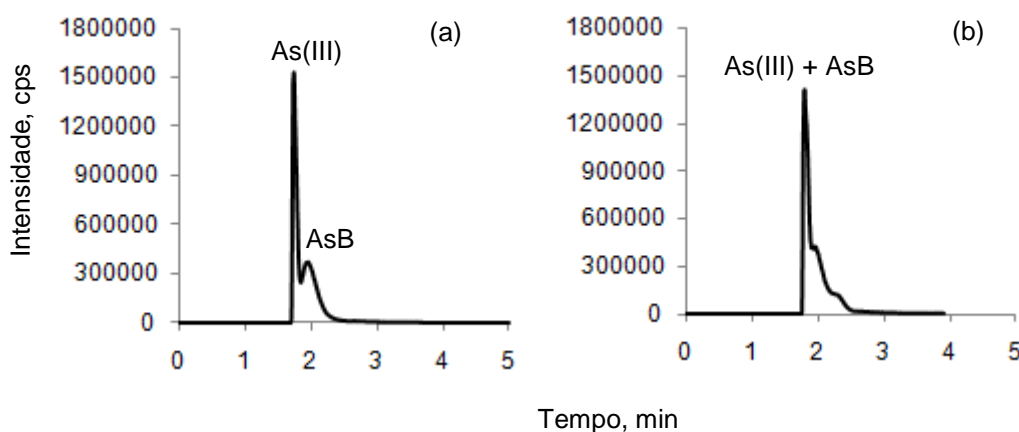


Figura 17. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS. Coluna de troca aniônica PRP-X100. Fase móvel: pH 6,5, vazão: $1,25 \text{ mL min}^{-1}$. Condição de eluição (a): fosfato de amônio 5 mmol L^{-1} – 0 a 1,7 min e 15 mmol L^{-1} – 1,7 a 5 min. Condição (b): fosfato de amônio 5 mmol L^{-1} com metanol a 1% – 0 a 1,8 min e 15 mmol L^{-1} com metanol a 1% – 1,8 a 4 min.

Conforme mostrado na Figura 17, os cromatogramas (a) e (b) obtidos da solução referência de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) e AsB, pode-se perceber que com a fase móvel fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} (a) e (b) fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} com metanol a 1% (v/v) como modificador químico não foi possível obter uma boa separação das espécies de As. Após, os estudos feitos com

diferentes fases móveis, foi observado que a afinidade de um analito com um trocador de ânions depende da densidade da carga e da polarizabilidade das duas cargas opostas. Para um material trocador de ânions, a densidade de íons é determinada pelo número de sítios trocadores de ânions, da capacidade de massa do material da coluna e a polarizabilidade é semelhante entre as colunas funcionalizadas pelos mesmos grupos iônicos. Até o momento, R_4N^+ , SO_3^- , $RCOO^-$ foram os trocadores de íons frequentemente usados.²⁴³ A densidade de carga e polarizabilidade dos analitos depende do tamanho da molécula e a carga é muitas vezes controlada pelo equilíbrio de dissociação. O pK_a de espécies de As estão distribuídos numa ampla faixa, mas muitos deles são > 8 .²⁴⁴⁻²⁴⁶ Por isso, a sua dissociação, com formação de espécies com carga negativa, depende do pH e o mesmo é válido para vários sítios da coluna de troca iônica, protonada ou desprotonada. Todas estas variáveis são controladas pelo pH do eluente, sendo esta uma das principais variáveis, no entanto, infelizmente, o pH dos eluentes frequentemente utilizados não podem ser ajustados para cada pK_a da espécie de As e, sim, ajusta-se de acordo com o comportamento de retenção e seletividade do método.²⁴³

5.5.2.1 Escolha da coluna de troca de íons

Na cromatografia a líquido com o uso de coluna de troca de íons (aniônica ou catiônica), a separação é dependente da afinidade das espécies da fase estacionária de acordo com as características da mesma, como a estrutura molecular, polaridade, carga e características do analito e da fase móvel. A coluna de troca aniônica é uma das fases estacionárias mais empregadas em análise de especiação de As com técnicas cromatográficas. Neste trabalho todas as separações foram efetuadas usando uma coluna de troca aniônica (PRP-X100, Hamilton), uma vez que esta separa a grande maioria das espécies de As presentes em organismos marinhos.^{127,145, 210-212, 214-217, 219-223} A coluna de troca catiônica é usada para separar melhor a AsB, sendo que esta somente separa os cátions, pouco comuns em organismos marinhos, porque dificulta a separação das outras espécies de As neste tipo de amostra.¹¹¹

5.5.2.2 Escolha do tipo e concentração da fase móvel

Na análise de especiação de As em organismos marinhos, pode haver a presença de diversas espécies de As, como catiônicas, aniônicas e neutras e, devido a isto, os problemas surgem na escolha e concentração da fase móvel favorável à separação de todas as espécies de As presentes. Por exemplo, se a AsC está presente, esta normalmente co-elui com a AsB, assim como e TMAO.²⁴¹ A coluna de troca catiônica pode ser usada para separar as espécies AsB, AsC e TMAO.²³⁶ No entanto, as espécies aniônicas de As(III), As(V), DMA e MMA geralmente co-eluem.²²⁹ Alternativamente, o pareamento de íons com coluna de fase reversa, geralmente de sílica recoberta com grupos C8 ou C18, pode ser utilizada para a separação de AsB das espécies orgânicas²¹³ e inorgânicas de As. Carbonato de amônio como fase móvel em coluna de troca aniônica não é muito usual, embora alguns autores têm explorado o seu uso para a especiação de As.²²⁹ Porém, comparado a outras fases móveis, como solução contendo fosfato, carbonatos produzem muito pouco resíduo na interface do ICP-MS.

Baseando-se nas diferentes propriedades químicas dos compostos de As, complexidade da matriz de moluscos e diversidade de espécies de As presentes na amostra, foram estudadas as condições da fase móvel de acordo com as citações na literatura, usando fosfato ou carbonato de amônio.²⁴¹⁻²⁴³ Inicialmente foi avaliado o fosfato dibásico de amônio, onde foi observado que as espécies de As(III) e AsB eluem facilmente da coluna de troca aniônica. No entanto, apresentaram sobreposição e, dessa forma foi avaliada a concentração desta fase móvel de 1 a 20 mmol L⁻¹. Porém, foi obtida separação cromatográfica satisfatória, somente para as outras espécies de As [DMA, MMA, *p*-ASA e As(V)]. Após estes resultados, foi avaliado o carbonato de amônio como fase móvel, sendo testadas concentrações de 1 a 20 mmol L⁻¹. Foi observada que na concentração de 6 mmol L⁻¹ ocorreu melhor separação das espécies de As(III) e AsB, no entanto para DMA, MMA, *p*-ASA e As(V), a separação não foi satisfatória, pois houve sobreposição de DMA e MMA. Sendo assim, foi avaliado o modo por eluição gradiente, utilizando fosfato dibásico de amônio e carbonato de amônio com diferentes concentrações.

Após, o estudo da influência da fase móvel e concentração da mesma, o modo de eluição gradiente de fase móvel foi a melhor condição de separação de As(III), AsB, DMA, MMA, ρ -ASA e As(V) presentes em soluções referências e para amostra de moluscos. Assim, o programa para a separação das espécies de As foi de: 0 a 1,4 min empregando 6 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,4 a 2,7 min empregando 20 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e 2,7 a 15 min utilizando 6 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. O cromatograma obtido empregando estas condições é mostrado na Figura 18.

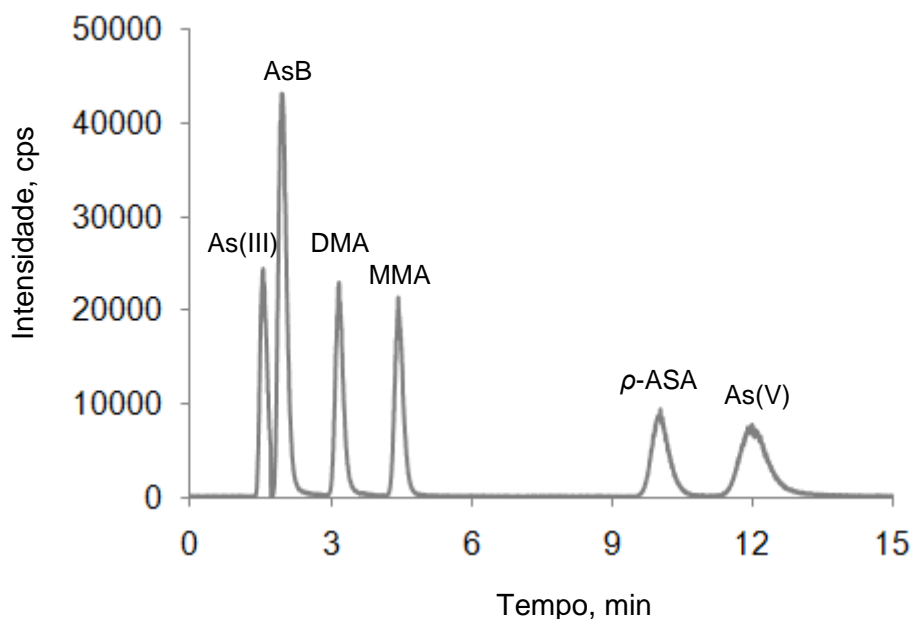


Figura 18. Cromatograma obtido a partir de uma solução mista de solução de referência de cada espécie de As na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ por LC-ICP-MS. Injeção de $200 \mu\text{L}$.

5.5.2.3 Influência do pH e vazão da fase móvel

Na cromatografia de troca de íons, o pH é um dos parâmetros que exerce influência na separação das espécies de As, uma vez que estas podem ser catiônicas, aniônicas ou neutras,²⁴⁷ que torna possível a separação por troca de ânions, pareamento de íons e troca de cátions, em menor escala. Nas aplicações de cromatografia por troca aniônica, uma boa resolução obtida foi na faixa de pH 5 a 11. A ordem de eluição mais comum é a As(III), AsB, DMA,

MMA e As(V), a qual pode mudar em função do pH e da condição de eluição, na maioria das vezes, gradiente. Além do pH, a concentração (força) da fase móvel também é importante no processo de separação, tendo em vista que concentrações superiores a 10 mmol L^{-1} de fosfato, algumas espécies de As co-eluem, ao contrário foi observado para o carbonato que é necessário 20 mmol L^{-1} para separar outras espécies de As. Dessa forma, há uma melhor separação das espécies de As com fosfato, com exceção das espécies de As com maior interação com o sítio da coluna, favorecendo, neste caso, o uso de carbonato como fase móvel. O pH da fase móvel de fosfato de amônio foi avaliado de 5,0 a $9,0 \text{ mL min}^{-1}$, cujo efeito na separação das espécies de As é mostrado na Figura 19.

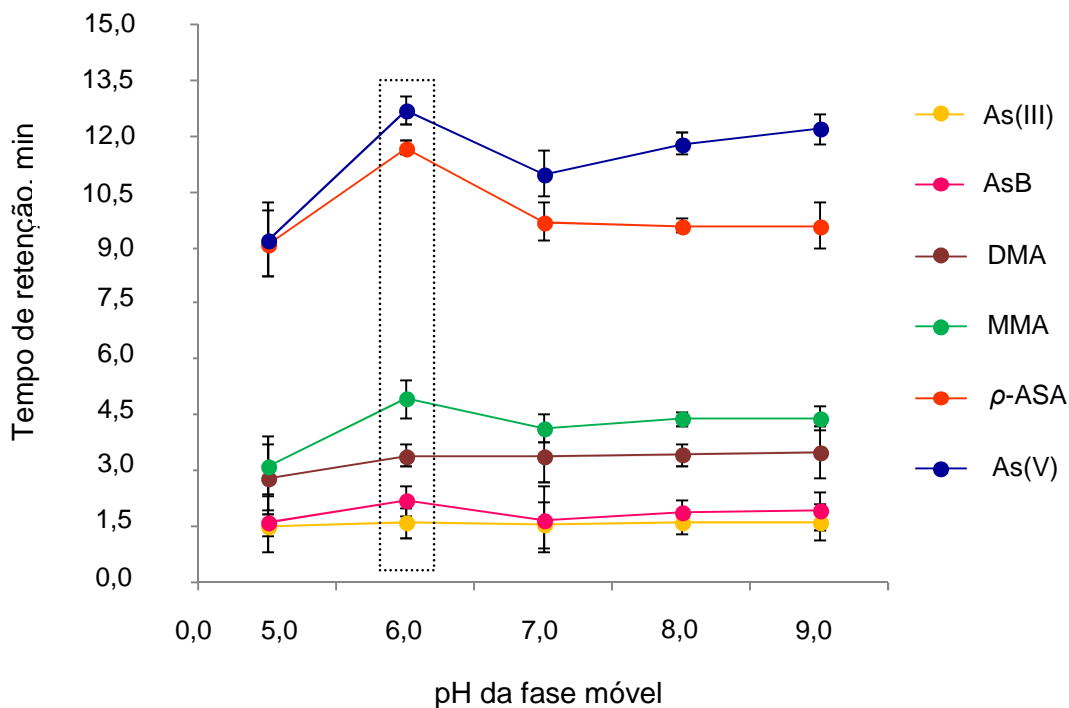


Figura 19. Influência do pH da fase móvel fosfato de amônio na separação das espécies de As em solução de referência de cada espécie de As.

Conforme exposto na Figura 19, o pH 6,0 da fase móvel de fosfato de amônio foi satisfatório para a separação de cada espécie de As na solução referência. Para pH inferior a 5,5, a separação das espécies de As é prejudicada, pois o tempo de retenção para todas as espécies de As foram

muito próximos e em pH acima de 7,0 o tempo de retenção do ρ -ASA e As(V) aumenta. Para carbonato de amônio também foi avaliado o efeito do pH, mesmo que o uso deste seja somente 1,3 min do total de 15 min. Dessa forma, o pH da fase móvel onde ocorreu a melhor separação das espécies de As foi 9,0. Este valor está de acordo com o observado por Guérin *et al.*²³⁶ e Choi *et al.*²⁴⁰, que verificaram boa separação de espécies de As na faixa de pH entre 5,0 e 9,0 utilizando carbonato e fosfato de amônio como fase móvel. Após o estudo do efeito do pH e da concentração da fase móvel, a influência da vazão da fase móvel foi avaliada de maneira a obter um cromatograma com uma boa resolução entre as espécies de As e com o menor tempo. A vazão da fase móvel foi avaliada de 1,05 até 1,45 mL min⁻¹. A vazão de 1,25 mL min⁻¹ foi escolhida por proporcionar menores tempos de retenção. Vazões inferiores a esta não são favoráveis pelo perfil cromatográfico (picos mais alargados) e vazões superiores a esta resultam na sobreposição parcial dos picos de As(III) e AsB, assim como de ρ -ASA e As(V).

5.5.2.4 Separação e identificação das espécies de As

As espécies de As(III), AsB, DMA, MMA, ρ -ASA e As(V) foram identificadas de acordo com os tempos de retenção de cada espécie separadamente empregando soluções de referência das espécies de As individualmente e soluções contendo as seis espécies de As.

5.5.2.5 Condicionamento da coluna cromatográfica

Etapa de condicionamento da coluna cromatográfica foi necessária ao final de cada eluição cromatográfica, uma vez que foi observado que a separação não era reprodutível quando não era feito o condicionamento da coluna. Isso, provavelmente, é devido à condição gradiente empregada para a eluição das espécies de As, onde a fase móvel possui diferença de concentração inicial e final da fase móvel e para tal, o tempo de condicionamento foi avaliado passando-se a fase móvel pela coluna em diferentes intervalos de tempo (até no máximo 20 min).

Após a avaliação dos parâmetros de separação de As por LC-ICP-MS e obtida as condições de separação adequadas para as espécies presentes nas amostras de moluscos, nas Figuras 20, 21 e 22 são mostrados os cromatogramas para amostras de moluscos e solução referência de espécies de As.

5.5.2.6 Determinação de espécies de As por LC-ICP-MS

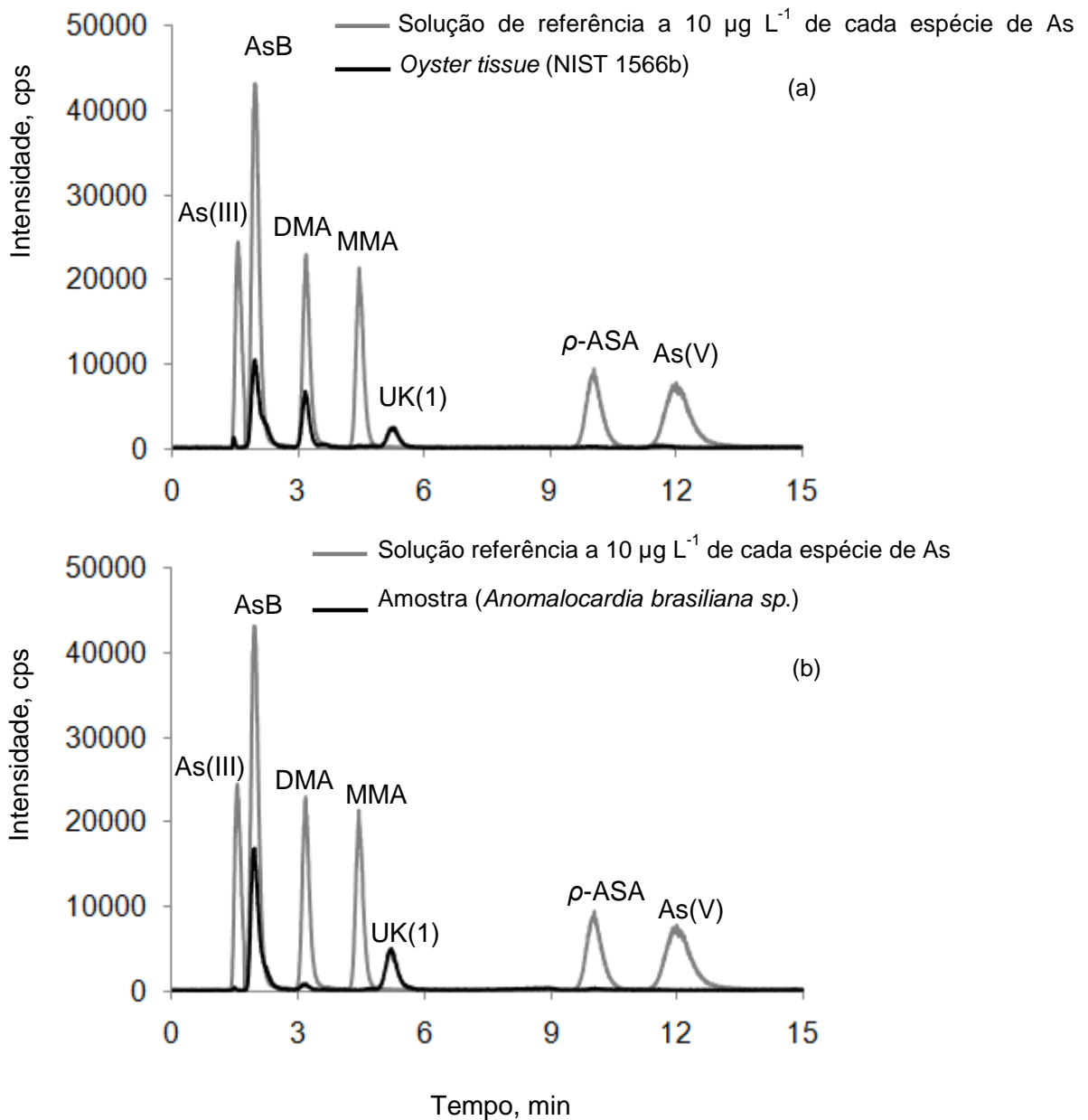


Figura 20. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As em moluscos após extração com água por MAE. (a) Sobreposição de solução de referência a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com NIST 1566b – “em preto”. (b) Sobreposição de solução de referência a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco *Anomalocardia brasiliana sp.* – “em preto”.

De acordo com a Figura 20, o cromatograma (a) obtido das espécies de As do extrato aquoso do material de referência NIST 1566b sobreposto ao cromatograma da solução de referência de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As, mostra que as espécies presentes no NIST 1566b apresentaram o mesmo tempo de retenção para As(III), AsB e DMA. No entanto, não foram detectadas as espécies de *p*-ASA e As(V) no NIST 1566b, o que está de acordo com a literatura.¹⁷¹ A espécie desconhecida UK(1) (UK: desconhecido) foi detectada no material de referência, não podendo ser identificada devido a falta de composto de As de referência com o mesmo tempo de retenção desta espécie de As. De acordo com McSheehy *et al.*¹⁷¹, espécies de As desconhecidas no NIST 1566b podem ser atribuídos a AsS mais comuns, como derivados de glicerol, fosfato, sulfato ou sulfonato de ribose. No entanto, pela dificuldade de obtenção comercial de solução referência de AsS de metabólitos de organismos marinhos, não foi possível a obtenção deste para ser identificada com a técnica LC-ICP-MS. Porém, para a quantificação deste composto foi feita a curva de calibração com outra solução referência de As, como o DMA. O fato da quantificação ser feita desta forma é devido as respostas iguais por ICP-MS, de AsS e DMA, como As, ou seja, não há diferença na resposta do ICP-MS utilizando qualquer solução referência de As para a quantificação das espécies de AsS.¹⁷⁰⁻¹⁷²

No cromatograma da Figura 20(b) é observado que pela sobreposição do cromatograma da solução de referência de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As com o cromatograma obtido da amostra *Anomalocardia brasiliiana sp.*, as espécies de As(III), AsB e DMA foram identificadas de acordo com o tempo de retenção. No entanto, nesta amostra de molusco também foi detectada a espécie não identificada UK(1). Na Figura 21(a) é mostrado o cromatograma obtido desta espécie de molusco com adição de solução referência de cada espécie de As e no cromatograma 21(b) é mostrada a espécie *Macoma constricta sp.*, também com a adição de solução referência de cada espécie de As.

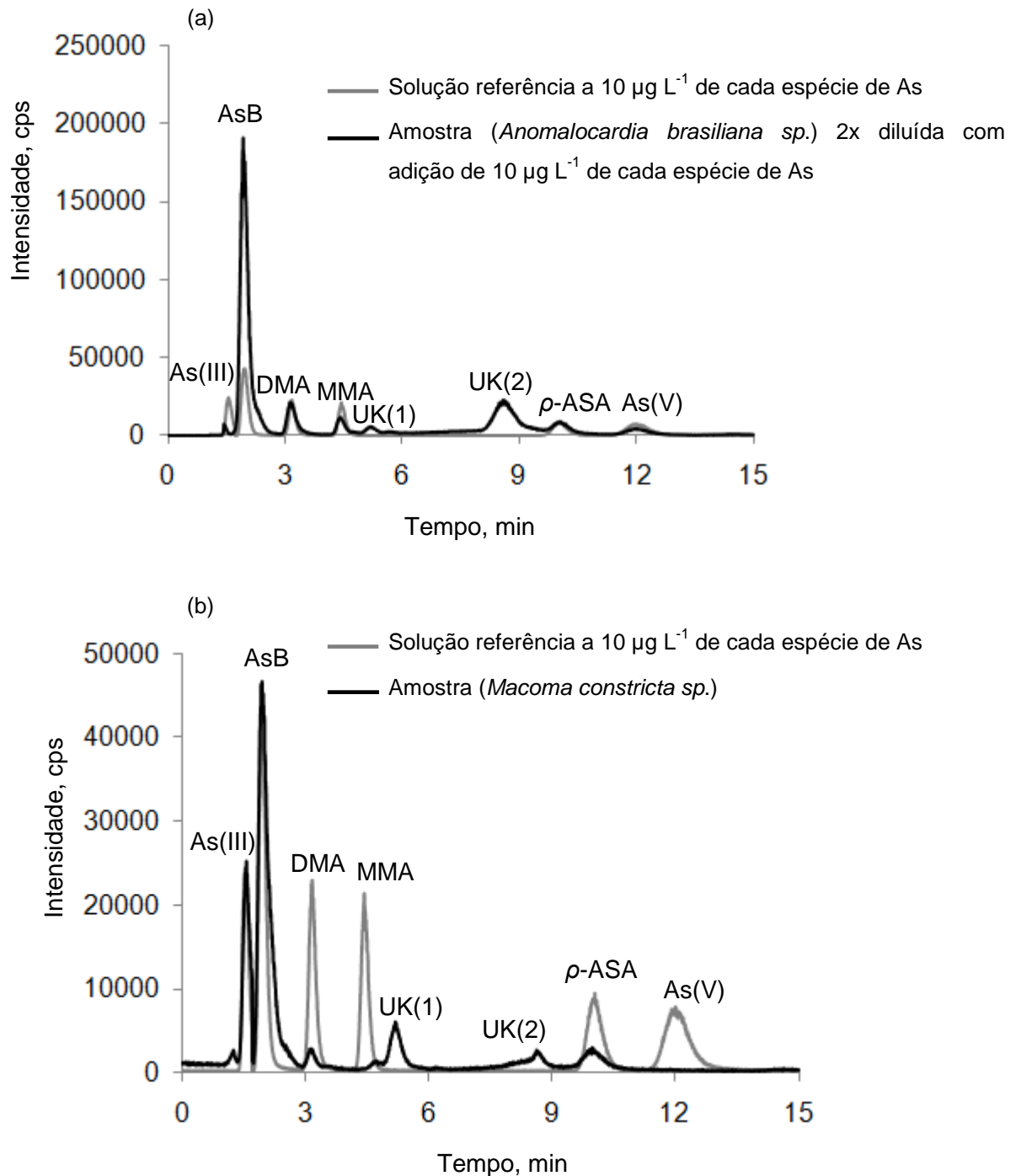


Figura 21. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As após extração com água por MAE. (a) Solução de referência a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de *Anomalocardia brasiliana* sp. diluída 2 vezes e com adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em preto”. (b) Solução de referência a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco *Macoma constricta* sp. – “em preto”.

Conforme exposto na Figura 21(a), é possível identificar, por comparação do tempo de retenção das espécies de As em *Anomalocardia brasiliiana* sp. e solução referência de As(III), AsB, DMA, MMA, *p*-ASA e As(V). No entanto, as espécies UK(1) e UK(2) foram detectadas, mas não identificadas. A espécie UK(2) somente foi detectada com adição de solução referência das espécies de As, entretanto, o tempo de retenção desta espécie não foi semelhante de nenhuma das soluções de referência adicionadas. Este fato, não pôde ser explicado, uma vez que quando adicionado separadamente as soluções de referência de espécies de As são adicionadas separadamente não foi detectada esta espécie. Ou seja, a espécie UK(2) somente é detectada quando são adicionadas todas as soluções de referência com as espécies de As.

De acordo com os resultados obtidos por Le *et al.*²⁴² os organismos marinhos não produzem AsB diretamente do arsenato presente na água do mar, mas podem ser originados da sequência de metabolizações e se acumulam ao longo da cadeia alimentar. Além disso, tem sido sugerido que os arsenoaçúcares, principais espécies encontrados em algas marinhas, são intermediários da produção de AsB em alguma fase da cadeia alimentar de moluscos. Porém, a origem da AsB ainda não é totalmente elucidada, mas sabe-se que é a espécie de maior concentração, principalmente, em moluscos bivalves. No cromatograma (b) da Figura 21, pode-se observar a presença das mesmas espécies de As na *Macoma constricta* sp. e *Anomalocardia brasiliiana* sp. Na Figura 22, são mostradas as espécies de As detectadas por LC-ICP-MS nos moluscos *Trachycardium muricatum* sp. e *Iphigenia brasiliiana* sp.

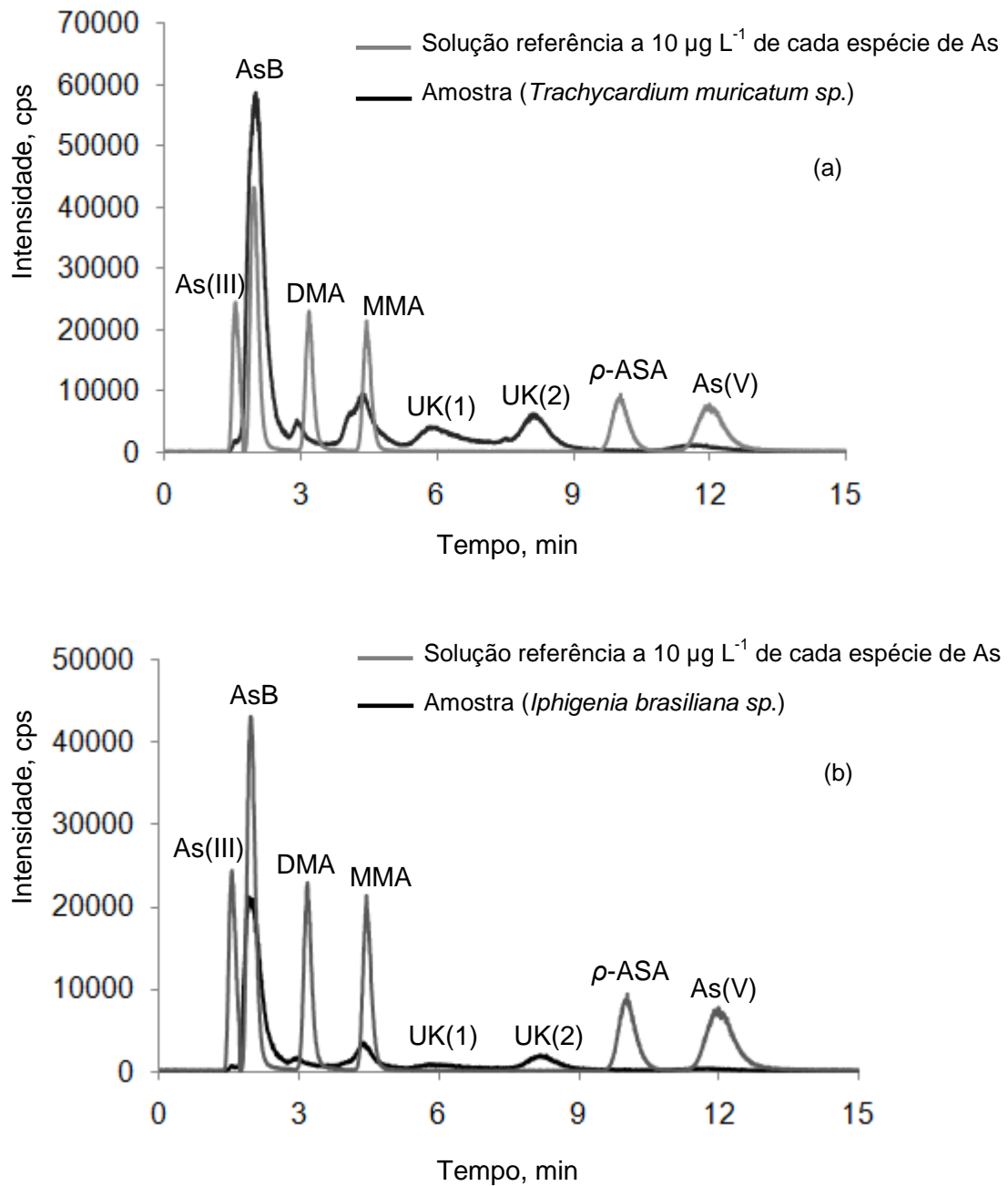


Figura 22. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de espécies de As após extração com água por MAE. (a) Solução de referência a 10 µg L⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de *Trachycardium muricatum sp.* – “em preto”. (b) Solução de referência a 10 µg L⁻¹ de cada espécie de As [As (III), AsB, DMA, MMA, p-ASA and As(V)] – “em cinza” com amostra de molusco *Iphigenia brasiliana sp.* – “em preto”.

De acordo com a Figura 22(a), o tempo de retenção de algumas das espécies de As detectadas em *Trachycardium muricatum sp.* são os mesmos das soluções de referência de As. Entretanto, duas espécies de As UK(1) e UK(2) não puderam ser identificadas e as espécies *p*-ASA e As(III) não foram detectadas. O As(V), DMA e MMA apresentaram picos com o perfil do sinal cromatográfico diferente ao das espécies nas soluções de referência, o que pode estar relacionado com algum efeito da matriz nesta espécie de molusco. De acordo com o cromatograma (b) da Figura 22, as espécies de As identificadas no *Iphigenia brasiliana sp.* foram As(III), AsB e MMA. Novamente, as duas espécies, UK(1) e UK(2) não foram identificadas. Cabe destacar, que as espécies de As detectadas nas amostras de moluscos apresentaram semelhanças nos perfis cromatográficos, mesmo sendo moluscos diferentes (*Anomalocardia brasiliana sp.*, *Macoma constricta sp.*, *Trachycardium muricatum sp.* e *Iphigenia brasiliana sp.*) e locais de coleta diferentes. De acordo com Larsen *et al.*²⁴³ o MMA e DMA presentes em organismos marinhos provavelmente são provenientes da degradação da AsB. Estas evidências são importantes para avaliar o potencial de toxicidade de organismos marinhos comestíveis para os seres humanos, uma vez que MMA e DMA são mais tóxicos do que a AsB.

Sabe-se que a distribuição das espécies de As em águas naturais depende principalmente do potencial redox e das condições de pH. Em águas de superfície, a espécie predominante é As(V), enquanto que sob condições moderadamente redutoras (por exemplo, águas subterrâneas, anóxicas) o As(III) é a forma termodinamicamente estável. O MMA e o DMA estão presentes em organismos marinhos provenientes de estuários, estando em concentrações variáveis, o que depende da salinidade, turbidez, temperatura e fitoplâncton. Além disso, os organismos marinhos, especialmente os bivalves acumulam, As na sua estrutura, sendo muitas vezes metabolizado para compostos orgânicos de As. Destes, AsC e, principalmente, AsB são as predominantes e os seus níveis geralmente podem variar de 1 a 100 mg kg⁻¹. Os moluscos bivalves mais estudados, sob aspectos de toxicidade e contaminação são as ostras, e quando consumidos cruas, todas as espécies de As presentes são ingeridas.²⁵ Entretanto, sendo a AsB, a espécie de As mais abundante na fauna marítima e até recentemente, na literatura, era

considerado desnecessário o desenvolvimento de metodologia para a determinação de AsB em organismos marinhos comestíveis, uma vez que esta espécie de As é considerada inócua à saúde humana.²⁴⁴ No entanto, os seres humanos são capazes de converter a AsB em DMA e TMAO,^{242,162} sendo atribuído a estas espécies potencial carcinógeno humano.²⁴⁴ Além disso, como mostrado no presente trabalho, há outras espécies de As presentes, as quais podem ser potencialmente tóxicas nos moluscos analisados. Cabe destacar, a importância de identificar e quantificar as espécies de As da fauna marítima para um melhor entendimento do metabolismo de As e de avaliação do risco associado ao seu consumo.

5.5.2.7 Estudo de interferências espectrais na determinação de As por LC-ICP-MS.

Para a determinação do As por ICP-MS, o cloreto é um dos principais interferentes devido a formação de uma espécie poliatômica ArCl^+ ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, m/z 75), resultante, a partir da combinação de argônio (do plasma) e cloreto da amostra. Isto deverá resultar no aparecimento de um pico adicional no cromatograma correspondente à eluição de cloreto e, conseqüentemente, podendo interferir na identificação e/ou quantificação de alguma espécie de As, no caso de ocorrer co-eluição de cloreto com um composto de As. Desta forma, foi estudada a possível interferência do cloreto na determinação das espécies de As, avaliando-se solução de 500 mg L^{-1} de Cl^- , sendo esta concentração superior das obtidas (ordem de 7 até 290 mg L^{-1}) nas soluções das amostras de moluscos. O estudo foi feito injetando $200 \mu\text{L}$ desta solução de Cl^- na ausência de As, cujos cromatogramas estão mostrados na Figura 23.

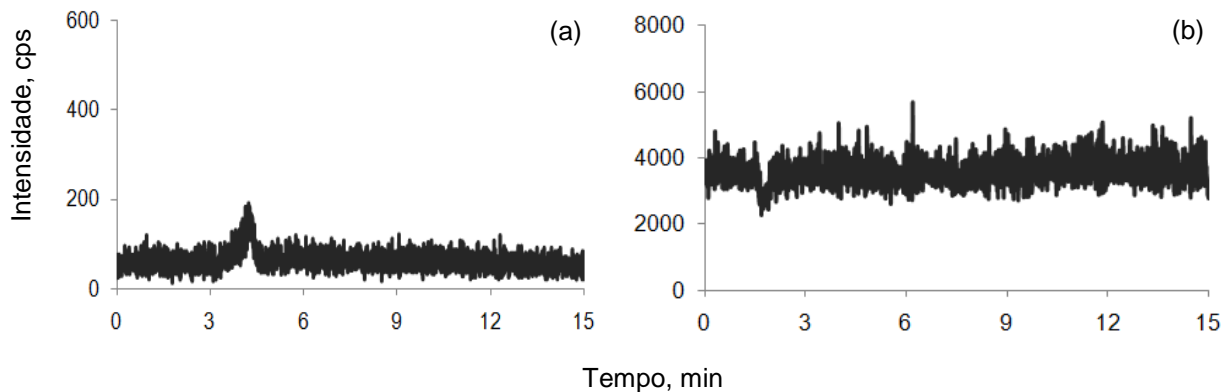


Figura 23. Cromatogramas obtidos por LC-ICP-MS de (a) solução de referência de cloreto a 500 mg L^{-1} e (b) água ultrapurificada.

Pode-se observar na Figura 23(a) que o cloreto eluiu em 4,5 min (m/z 75), próximo do tempo de retenção do DMA. No entanto, como a concentração de Cl^- nas soluções obtidas das amostras de moluscos é da ordem de 7 até 290 mg L^{-1} , a interferência causada na determinação das espécies de As é desprezível. Além disso, a interferência por cloreto pode ser contornada adotando condições de eluição do cloreto antes ou após das espécies de As de interesse. Ritsema *et al.*²⁴⁵ relataram que a eluição de modo gradiente com troca aniônica usando tampão de carbonato pode favorecer a eluição de cloreto após a eluição das espécies de As.¹⁵³

5.6 Especificação de As por LC-CVG-ICP-MS

A combinação do uso de LC acoplado à CVG para análise de especificação de As melhora eficiência de introdução da amostra no plasma e melhora os limites de detecção na faixa de 10 a 100 vezes comparado com ao uso da nebulização pneumática. A CVG quando utilizado o NaBH_4 em condições ácidas, favorece a formação de espécies quantitativas de arsina a partir da maioria das espécies de As, com exceção de AsB, AsC e AsS. Estas espécies não formam hidretos a partir da reação com NaBH_4 .¹⁰⁹

Portanto, com o intuito de complementar os estudos empregando a LC-ICP-MS, foi empregado um sistema para CVG, o qual foi introduzido logo após

a coluna cromatográfica. A finalidade do uso da CVG foi de avaliar as espécies de As não identificadas por LC-ICP-MS, visto a possibilidade destas espécies pertencerem a classe dos AsS, AsC e AsB, as quais podem ser confirmadas com LC-CVG-ICP-MS, uma vez que estas espécies não reagem com o NaBH_4 . Dessa forma, somente as espécies de As que reagem com NaBH_4 serão introduzidas no plasma e detectadas, enquanto que a AsB, AsC e os AsS não serão detectados. Além disso, isto melhora o LOD das espécies de As geradoras de hidretos voláteis e, principalmente, favorece a seletividade.

Para tal estudo foram avaliados parâmetros que influenciam na formação de hidretos voláteis e, posterior determinação dos mesmos nas amostras de moluscos.

5.6.1. Escolha da concentração de NaBH_4

A concentração de NaBH_4 é um dos parâmetros importantes na CVG de As, influenciando, principalmente, na cinética da reação de formação de hidretos. Além disso, como a geração de arsina depende do estado de oxidação de As e da forma como o mesmo está na solução (espécies inorgânicas, orgânicas ou complexos), a concentração do redutor poderá influenciar na formação da arsina. Para verificar a influência da concentração do NaBH_4 na geração de compostos voláteis de As a partir de soluções de referência de As(III) e DMA (estas foram selecionadas para os estudos porque reagem com NaBH_4 , formando hidretos voláteis) serão introduzidas pelo sistema LC-CVG, foi feito um estudo com concentrações na faixa de 0,25 a 1,50% (m/v) de NaBH_4 com o objetivo de alcançar a máxima sensibilidade no sistema CVG, sendo mostrado na Figura 24.

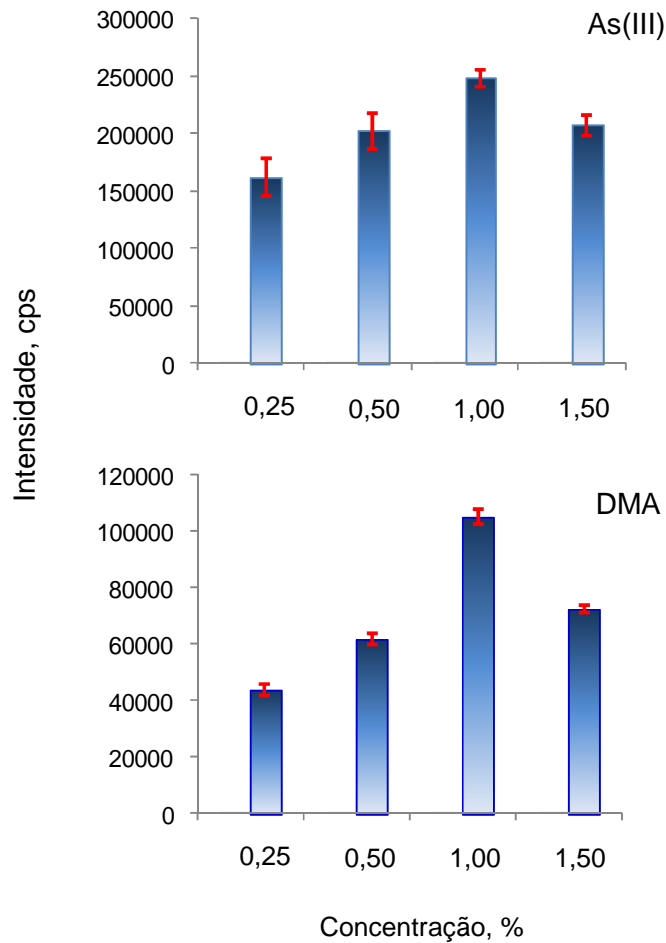


Figura 24. Influência da concentração de NaBH_4 sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.

Conforme mostrado na Figura 24, pode-se observar que nestas condições, a concentração que apresentou boa reprodutibilidade e eficiência na redução das espécies de As foi a concentração de 1,0% (m/v) de NaBH_4 para as duas espécies de As, mostrando que tanto para a espécie inorgânica quanto para orgânica a formação de hidreto volátil foi favorecida nesta concentração, a qual foi escolhida.

5.6.2. Escolha da concentração de HCl

A concentração de HCl foi avaliada de 0,50 a 2,0 mol L⁻¹, utilizando soluções de referência de As(III) e DMA. Da mesma forma do que no caso do NaBH₄, este estudo foi feito com o objetivo de alcançar a máxima sensibilidade para as espécies voláteis no sistema CVG, mostrado na Figura 25.

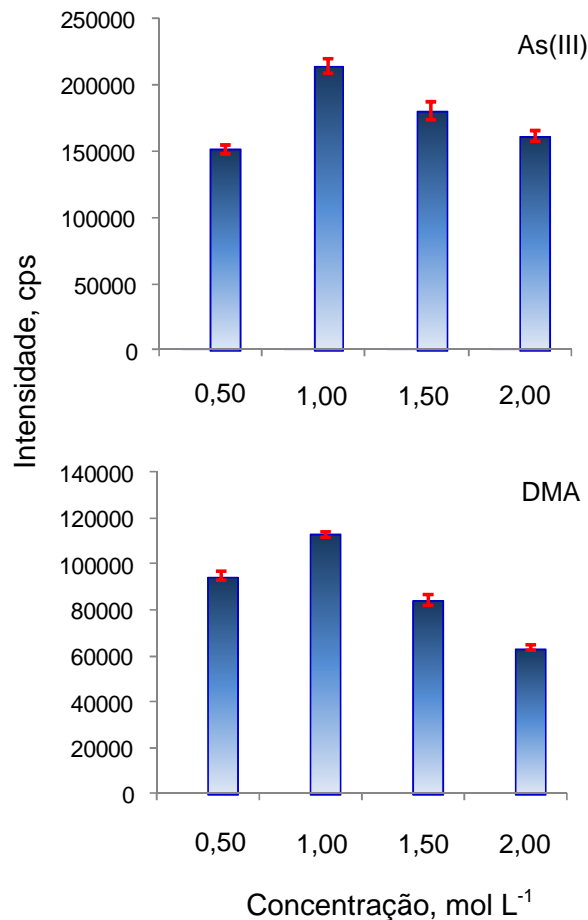


Figura 25. Influência da concentração do HCl como meio reacional sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.

De acordo com a Figura 25, máxima intensidade obtida para as espécies de As(III) e DMA foi em 1,0 mol L⁻¹ de HCl, sendo determinada esta concentração como meio reacional ácido, sendo este o mais indicado para a redução de As(III) com NaBH₄.

5.6.3 Escolha da vazão do gás de arraste

Na CVG, a fração gasosa é separada da parte líquida com auxílio de um gás de arraste no separador G/L. Este deve ser avaliado uma vez que influencia no transporte do hidreto até o detector e nas condições do plasma. O gás utilizado para esta finalidade foi o argônio. Para este estudo, vazões na faixa de 0,80 a 1,20 L min⁻¹ foram avaliadas usando soluções de referência de As(III) e DMA. Na Figura 26 está mostrada a influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade dos sinais das espécies de As(III) e DMA.

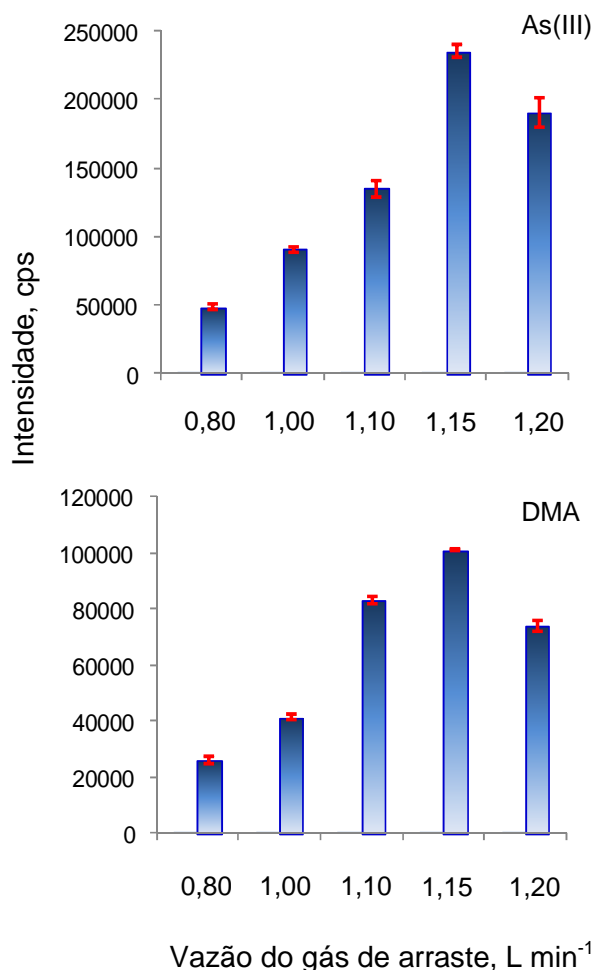


Figura 26. Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade do sinal de As(III) e DMA obtido por LC-CVG-ICP-MS.

Conforme pode ser visto na Figura 26, a maior intensidade do sinal obtida para as espécies de As(III) e DMA foi de $1,15 \text{ L min}^{-1}$, após este valor a intensidade começa a diminuir. Sendo assim, a vazão de gás argônio de $1,15 \text{ L min}^{-1}$ foi selecionada como condição de trabalho. As vazões menores que $1,15 \text{ L min}^{-1}$ o perfil dos sinais é menos reprodutível.

5.6.4. Estudo do comportamento da AsB por LC-CVG-ICP-MS

Como os organismos marinhos possuem elevada concentração de AsB, no entanto quando a geração de hidretos é empregada para especiação de As, observa-se que algumas espécies de As com elevado interesse ambiental e toxicológico, tais como AsB, AsC e AsS não geram hidretos.²⁴⁶ Nestas espécies, o As está ligado a cadeias de carbono, que não permitem produzir hidretos voláteis. Portanto, antes da análise, é necessária a quebra da ligação As-C e obter a conversão destas espécies de As em espécies formadoras de hidretos voláteis. No entanto, para a análise de especiação não podem ser utilizados procedimentos de decomposição ou qualquer procedimento que possa acarretar em modificação das espécies químicas.²⁴⁷⁻²⁵⁰ Dessa forma, foi avaliada a AsB por LC-CVG-ICP-MS, utilizando uma solução de referência de $600 \mu\text{g L}^{-1}$ de AsB preparada em água e submetida as condições de extração por MAE já otimizado. O perfil cromatográfico de AsB por LC-CVG-ICP-MS obtido está mostrado na Figura 27.

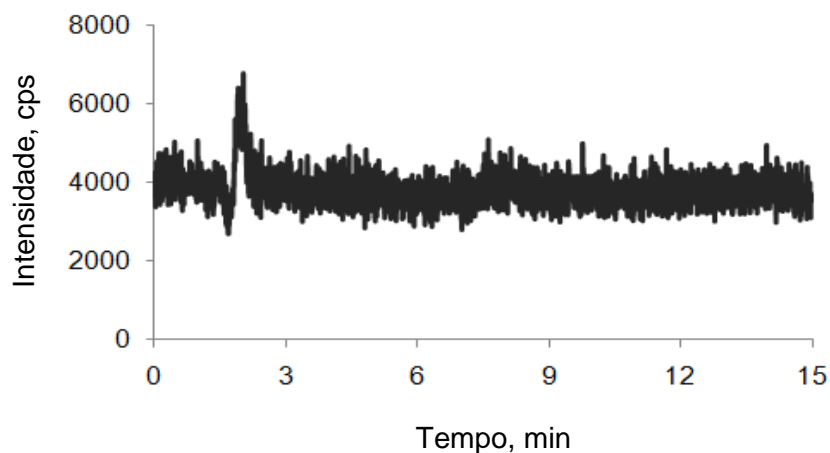


Figura 27. Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo $600 \mu\text{g L}^{-1}$ de AsB por LC-CVG-ICP-MS.

De acordo com o exposto na Figura 27, observa-se que não houve formação de hidreto volátil a partir da AsB por LC-CVG-ICP-MS, este fato é justificado porque a molécula de AsB está ligada a 3 grupos de metila, dificultando ainda mais a liberação de AsB para formação de arsina na geração de hidretos.²⁵¹ Dessa forma, podemos confirmar a presença de AsB e outros compostos que não formam hidretos voláteis nas amostras em estudo, sendo mostrados nos cromatogramas 28 a 30 utilizando o sistema LC-CVG-ICP-MS e comparando os mesmos com os cromatogramas obtidos a partir de LC-ICP-MS. As condições cromatográficas estão citadas na Tabela 3 (item 4.1 - Instrumentação).

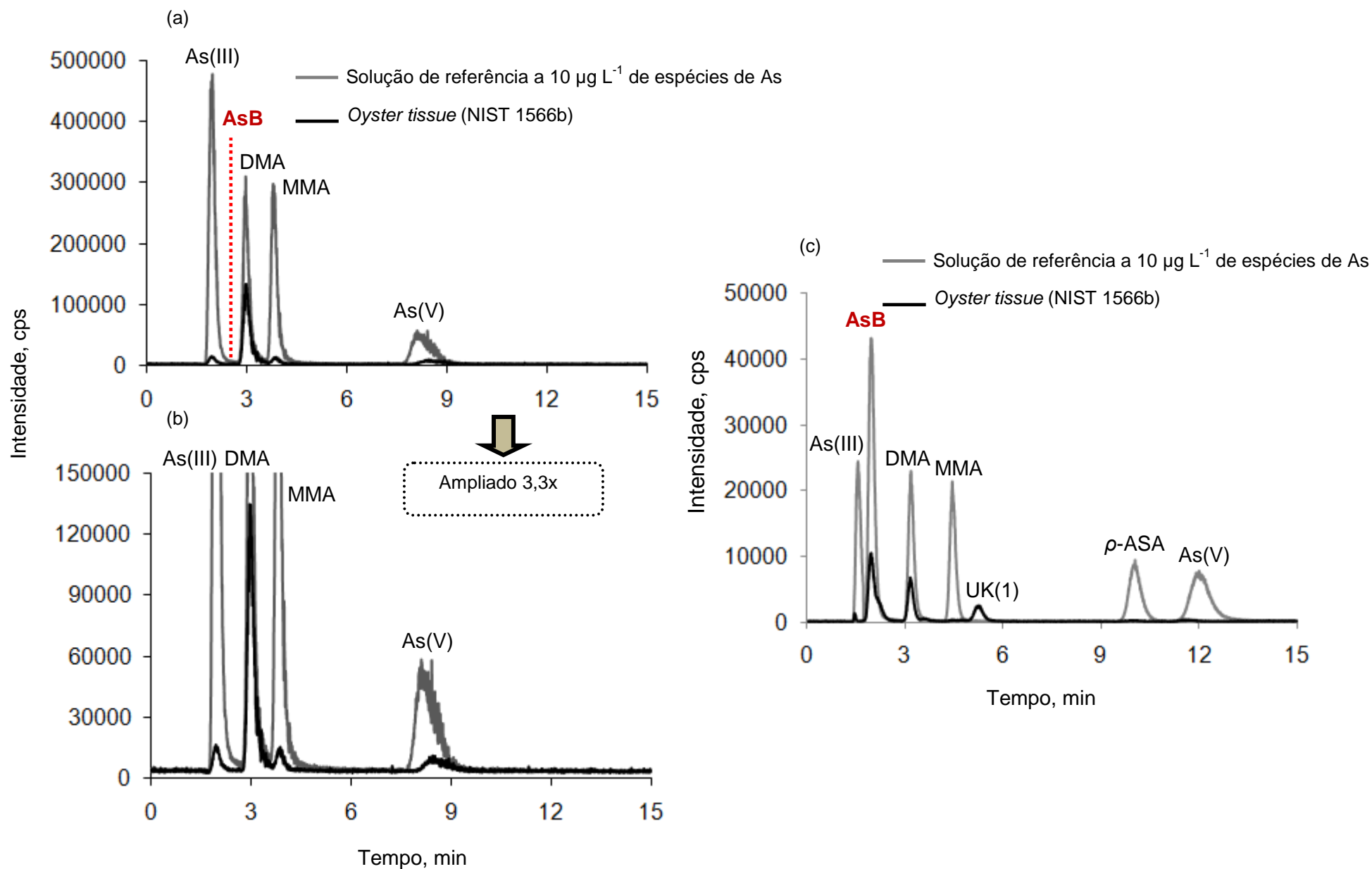


Figura 28. Cromatogramas obtidos após a injeção de 200 µL de solução referência e NIST 1566b. (a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma “a” ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS. Extração em água por MAE. UK(1): espécie desconhecida.

De acordo com os cromatogramas mostrados na Figura 28, observa-se que no cromatograma (a), as espécies de As formadoras de hidretos foram As(III), DMA, MMA e As(V) apresentando o mesmo tempo de retenção de soluções de referência de cada espécie de As. A AsB não formou hidreto conforme mostrado no perfil cromatográfico, no entanto, esta mesma espécie foi identificada quando usada a LC-ICP-MS mostrada no cromatograma (b) e sabe-se que está presente no NIST 1466b conforme o certificado. No cromatograma (a) foi salientado o provável tempo de retenção de AsB na CVG, se esta formasse hidreto e no cromatograma (b) foi mostrado o mesmo cromatograma (a) mas ampliado 3,3 vezes para melhor visualização dos picos obtidos a partir das espécies de As. Deve-se destacar que o uso do CRM é necessário para a confiabilidade dos resultados analíticos. No entanto, a maioria dos CRMs é apenas certificado para a concentração total de As e, quando há espécies de As nos materiais de referência certificados, as informações sobre a identidade e a concentração de espécies de As são limitadas somente para algumas espécies de As, dificultando o estudo em amostras com diversas espécies de As.²⁵²⁻²⁵³

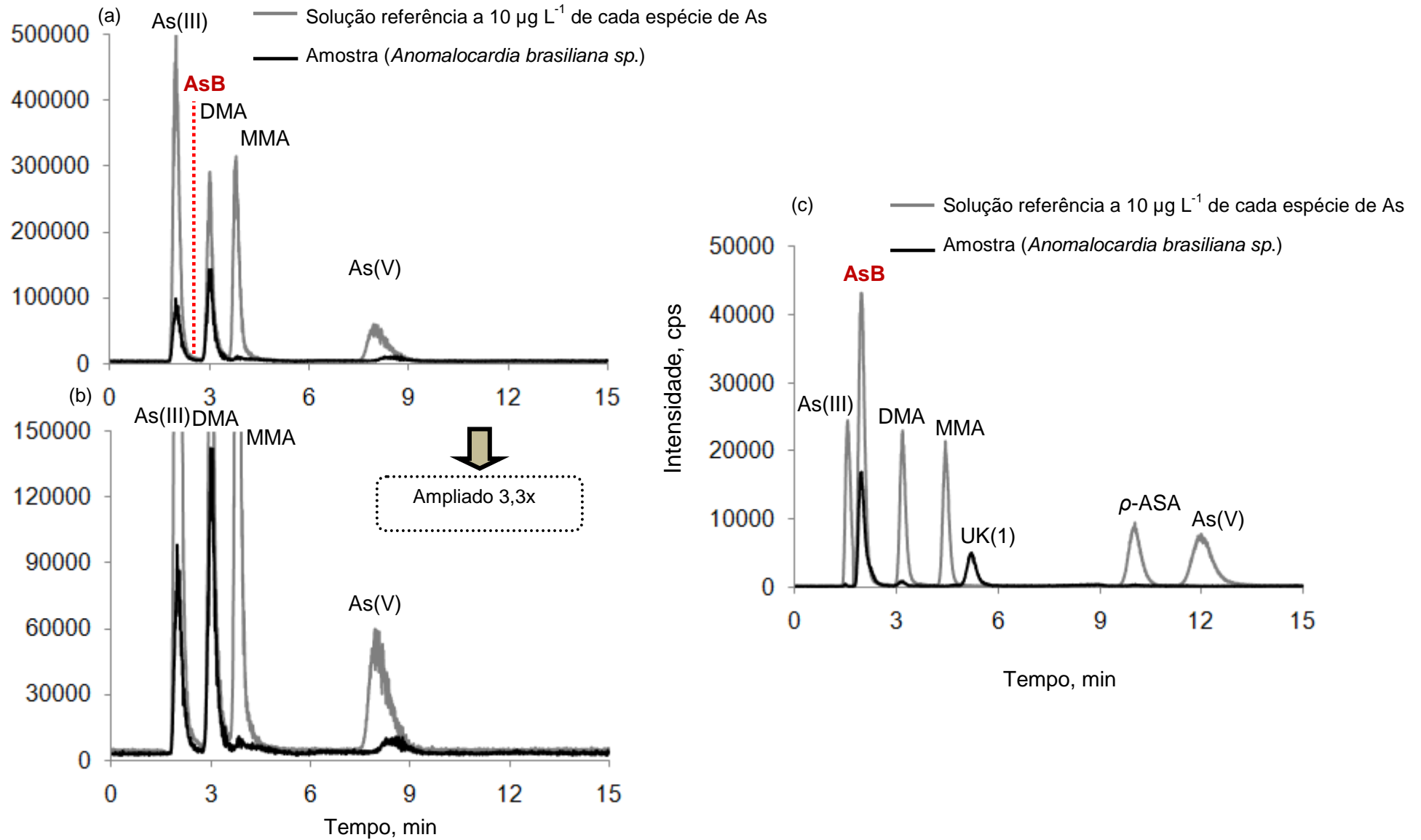


Figura 29. Cromatogramas obtidos após a injeção de 200 µL de solução referência e solução obtida da *Anomalocardia brasiliana* sp. após extração com água sob MAE. (a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma “a” ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS.

Extração em água por MAE. UK(1): espécie desconhecida.

Conforme exposto na Figura 29, no cromatograma (a), obtido por LC-CVG-ICP-MS, foram identificadas as espécies de As(III), DMA e As(V) em *Anomalocardia brasiliiana* sp. No cromatograma (c) é mostrada a presença de AsB nesta amostra, assim como uma espécie de As desconhecida [UK(1)] e como esta não foi identificada no cromatograma (a), provavelmente pode ser uma espécie de AsS ou AsC, já que estas espécies não formam hidretos voláteis.²⁵² Além disso, as espécies de MMA, *p*-ASA e As(V), que não foram detectadas por LC-ICP-MS (cromatograma c), também não foram detectadas por LC-CVG-ICP-MS conforme mostrado no cromatograma (a) e ampliado 3,3 vezes no cromatograma (b).

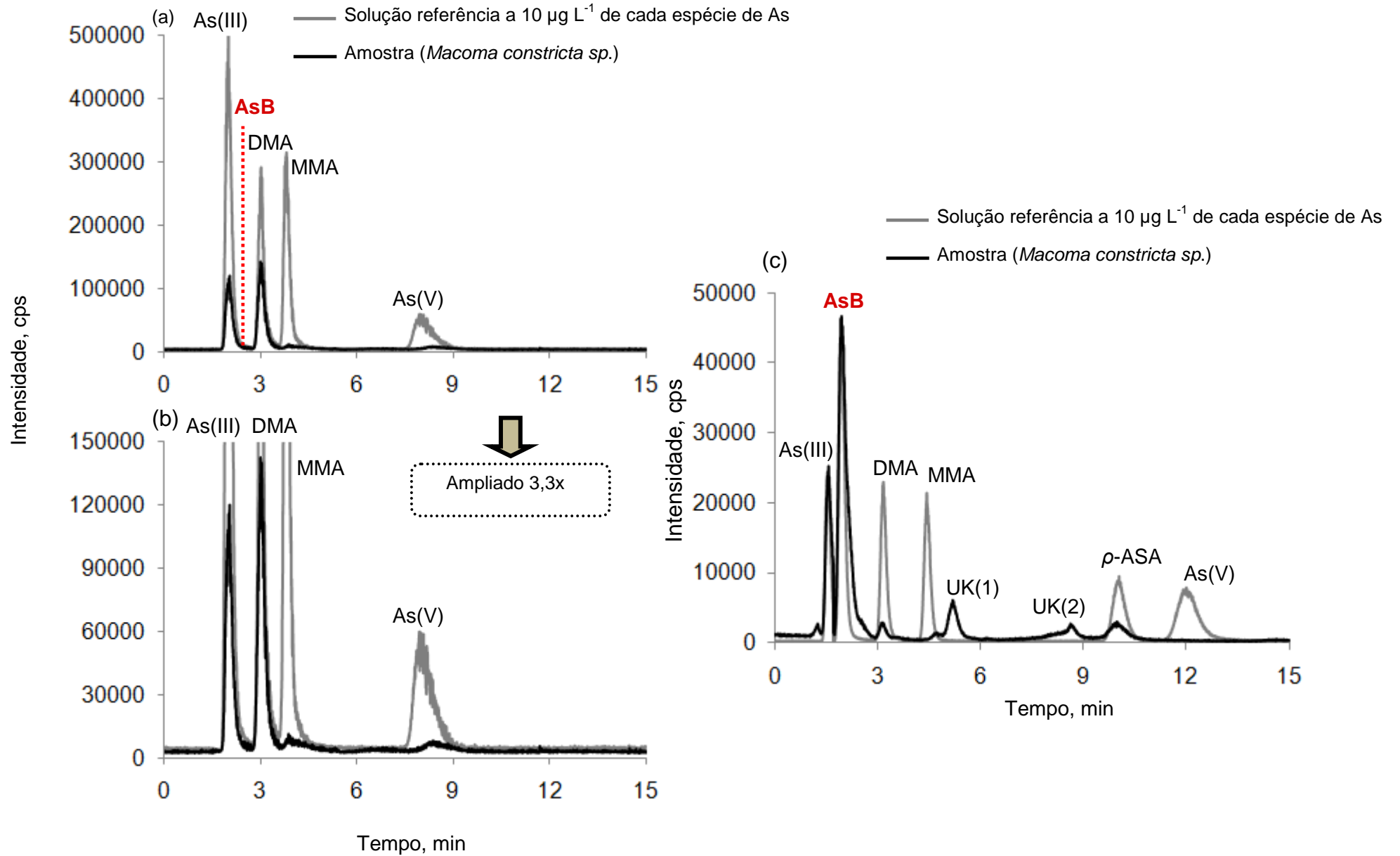


Figura 30. Cromatogramas obtidos após a injeção de $200 \mu\text{L}$ de solução referência e *Macoma constricta* sp.

(a) LC-CVG-ICP-MS e (b) a mesma "a" ampliada 3,3 vezes, (c) LC-ICP-MS. Extração em água por MAE.

UK(1): espécie desconhecida.

De acordo com a Figura 30, observa-se no cromatograma (a), obtido a partir da *Macoma constricta sp.*, a presença das espécies As(III), DMA e As(V), identificadas por LC-CVG-ICP-MS, sendo que as mesmas espécies de As foram também foram identificadas por LC-ICP-MS, como mostrado no cromatograma (c). Entretanto as espécies de As desconhecidas UK(1) e UK(2) não foram identificadas por LC-CVG-ICP-MS (cromatogramas a e b), provavelmente porque estas espécies podem ser AsS ou AsC. No cromatograma (c), observa-se a identificação de ρ -ASA por LC-ICP-MS de acordo com o tempo de retenção da solução de referência desta espécie. No entanto, não há relatos do comportamento de ρ -ASA quanto à formação de hidretos, mas como pode ser observado no cromatograma (a) por LC-CVG-ICP-MS, esta espécie não foi identificada assim como a AsB. Ou seja, não formou hidreto volátil nas condições de reação empregadas. Dessa forma, foi feito um teste com a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução referência de ρ -ASA e não foi detectada esta espécie por CVG, onde podemos concluir que esta espécie não forma hidretos voláteis.

Os cromatogramas obtidos por LC-CVG-ICP-MS para os extratos obtidos das amostras de *Trachycardium muricatum sp.* e *Iphigenia brasiliana sp.* foram semelhantes aos obtidos para *Anomalocardia brasiliana sp.* e *Macoma constricta sp.*, ou seja, as espécies As(III), DMA e As(V) foram identificadas por LC-CVG-ICP-MS e AsB, UK(1) e UK(2) não foram identificadas por LC-CVG-ICP-MS. Dessa forma, neste trabalho não serão mostrados os cromatogramas obtidos para *Trachycardium muricatum sp.* e *Iphigenia brasiliana sp.*, devido a semelhança dos perfis cromatográficos e as mesmas considerações citadas anteriormente quanto as espécies de As presentes nestas amostras.

Nas Tabelas 7 e 8 estão mostradas as concentrações obtidas das espécies de As e de As total nos extratos das quatro espécies de moluscos avaliadas neste trabalho por LC-ICP-MS.

Tabela 7. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local	Espécies de As (LC-ICP-MS)								As total	
		AsB	As(III)	DMA	MMA	UK(1)	UK(2)	p-ASA	As(V)	Σ Espécies de As (LC-ICP-MS)	MAE Extração (ICP OES)
<i>Macoma constricta</i> sp.	Bom Jesus	71 \pm 4	16 \pm 1	1,30 \pm 0,05	< 0,04	7,13 \pm 0,05	3,62 \pm 0,09	1,07 \pm 0,01	< 0,04	100 \pm 4	99 \pm 9
	Suape	18,2 \pm 0,7	3,4 \pm 0,1	< 0,02	< 0,04	5,22 \pm 0,02	1,80 \pm 0,05	2,51 \pm 0,02	< 0,04	31,1 \pm 0,7	30,0 \pm 0,4
<i>Trachycardium muricatum</i> sp.	Bom Jesus	7,23 \pm 0,5	< 0,03	< 0,02	3,54 \pm 0,07	0,412 \pm 0,005	2,03 \pm 0,05	< 0,03	< 0,04	13,2 \pm 0,5	12,7 \pm 0,2
	Mutá	6,89 \pm 0,3	< 0,03	< 0,02	4,37 \pm 0,07	0,602 \pm 0,02	2,24 \pm 0,01	< 0,03	< 0,04	14,1 \pm 0,8	13,6 \pm 0,9
	Suape	7,77 \pm 0,9	0,85 \pm 0,04	< 0,02	< 0,04	0,303 \pm 0,05	1,96 \pm 0,02	1,32 \pm 0,01	< 0,04	12,2 \pm 0,3	12,4 \pm 0,6
	Tainheiros	8,14 \pm 0,6	< 0,03	< 0,02	3,03 \pm 0,05	0,231 \pm 0,02	1,72 \pm 0,08	< 0,03	< 0,04	13,1 \pm 0,7	12,7 \pm 0,9

Tabela 8. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local	Espécies de As (LC-ICP-MS)								As total	
		AsB	As(III)	DMA	MMA	UK(1)	UK(2)	ρ -ASA	As(V)	Σ Espécies de As (LC-ICP-MS)	MAE Extração (ICP OES)
<i>Anomalocardia brasiliana</i> sp.	Acupe	11,1 \pm 0,7	2,81 \pm 0,02	< 0,02	2,51 \pm 0,06	< 0,02	-	< 0,03	< 0,04	16,7 \pm 0,6	16,4 \pm 0,9
	Ilha de Maré	5,7 \pm 0,2	1,30 \pm 0,01	< 0,02	2,11 \pm 0,03	< 0,02	-	< 0,03	< 0,04	9,6 \pm 0,4	9,1 \pm 1,0
	Tainheiros	6,4 \pm 0,4	1,70 \pm 0,03	< 0,02	1,70 \pm 0,03	< 0,02	-	< 0,03	< 0,04	9,8 \pm 0,2	9,6 \pm 0,7
<i>Iphigenia brasiliana</i> sp.	Mutá	9,1 \pm 0,7	< 0,03	0,87 \pm 0,03	3,9 \pm 0,5	< 0,02	3,53 \pm 0,4	< 0,03	< 0,04	17,4 \pm 0,9	16,8 \pm 0,5
	Salinas	9,7 \pm 0,3	< 0,03	1,04 \pm 0,03	4,4 \pm 0,8	0,51 \pm 0,09	2,17 \pm 0,08	< 0,03	< 0,04	17,8 \pm 1,2	16,9 \pm 0,7
	Suape	6,3 \pm 0,8	< 0,03	1,62 \pm 0,74	2,8 \pm 0,3	0,167 \pm 0,008	1,38 \pm 0,04	< 0,03	< 0,04	12,3 \pm 0,7	11,3 \pm 0,5

De acordo com as Tabelas 7 e 8, as concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS são variáveis o que pode estar diretamente relacionado com a capacidade do molusco em acumular As e, posteriormente, biometilar em outras espécies.

Além disso, os moluscos expressam a exposição ou efeito tóxico dos poluentes do local de coleta dos mesmos na BTS. Dessa forma, como era esperado, a espécie de concentração mais elevada para todos os moluscos foi a AsB. Na *Macoma constricta sp.* coletada nas regiões de Bom Jesus e Suape, foram identificadas todas as espécies de As em estudo e MMA e As(V) não foram detectadas, além disso, possui elevada concentração de AsB, o que pode estar relacionado com a capacidade de acúmulo do mesmo, ou devido a maior contaminação deste local por As. O *Trachycardium muricatum sp.*, nas três regiões avaliadas (Bom Jesus, Mutá e Suape) tem níveis de concentração de espécies de As semelhantes e, da mesma forma, a AsB é a espécie de As predominante. Espécies de As desconhecidas, denominadas UK(1) e UK(2) foram detectadas e com concentrações relativamente consideráveis. Com exceção da região de Bom Jesus, Mutá e Tainheiro, nos outros locais de coleta foi detectado As(III) em todos os moluscos, sendo este considerado tóxico e carcinógeno para humanos.

De acordo com os resultados obtidos e mostrados nas Tabelas 7 e 8, as concentrações de As total nos extratos de moluscos obtidos por extração com água por MAE e determinadas por ICP OES estão de acordo com o somatório das concentrações das espécies de As determinadas por LC-ICP-MS, com nível de confiança de 95% (de acordo com o Teste *t-Student*).

Pode-se observar que a água foi adequada para extrair as espécies de As, assim como, o procedimento de extração por MAE, pois extraiu quantitativamente as espécies de As, sem haver interconversão entre as espécies de As. Possivelmente, a presença das espécies de As nos moluscos analisados deve-se à bioacumulação em grandes quantidades relativamente e a capacidade de bioacumulação e metilação de espécies inorgânicas provenientes da contaminação ambiental, pois as atividades de refino de petróleo, atividades industriais, tráfego naval, defensivos agrícolas, rações

utilizados na carcinicultura e os produtos químicos utilizados para proteger as embarcações de madeira são fontes potenciais de As. A diferença de espécies e concentração das mesmas nos moluscos pode estar relacionado com o nível de exposição destes moluscos ao As. De acordo com a ANVISA, a concentração máxima de As em peixes e produtos de peixe para o consumo humano é de 1 mg kg^{-1} . Entretanto, não há legislação específica no Brasil que estabelece limites de As em moluscos bivalves para consumo humano, as concentrações de As total obtidas nos moluscos avaliados neste trabalho foram comparados com o valor estabelecido pela ANVISA para peixes e produtos de peixe e todos os valores (9 ± 1 a $99 \pm 9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) estão aproximadamente de 10 a 100 vezes acima do valor máximo permitido para consumo humano.

Nas Tabelas 9 e 10 estão mostradas as concentrações obtidas para as espécies de As por LC-CVG-ICP-MS em extratos de moluscos bivalves.

Tabela 9. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-CVG-ICP-MS em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Espécies de As (LC-CVG-ICP-MS)				As total
		As(III)	DMA	MMA	As(V)	Σ Espécies de As (LC-CVG-CP-MS)
<i>Anomalocardia brasiliana</i> sp.	Acupe	$2,03 \pm 0,10$	$1,88 \pm 0,07$	$0,758 \pm 0,003$	$0,316 \pm 0,007$	$4,9 \pm 0,1$
	Ilha de Maré	$2,16 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,05$	< 0,05	< 0,1	$3,91 \pm 0,06$
	Tainheiros	$2,69 \pm 0,08$	$1,83 \pm 0,08$	< 0,05	< 0,1	$4,5 \pm 0,1$
<i>Iphigenia brasiliana</i> sp.	Mutá	$3,34 \pm 0,06$	$0,906 \pm 0,002$	$0,297 \pm 0,001$	< 0,1	$4,54 \pm 0,06$
	Salinas	$2,98 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$	< 0,1	$4,75 \pm 0,05$
	Suape	$3,58 \pm 0,02$	$0,501 \pm 0,005$	$0,214 \pm 0,004$	< 0,1	$4,29 \pm 0,02$

Tabela 10. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-CVG-ICP-MS em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Espécies de As (LC-CVG-ICP-MS)				As total
		As(III)	DMA	MMA	As(V)	Σ Espécies de As (LC-CVG-CP-MS)
<i>Macoma constricta sp.</i>	Bom Jesus	9,1 ± 0,3	4,5 ± 0,4	< 0,04	0,81 ± 0,04	14,4 ± 0,5
	Suape	2,1 ± 0,1	0,68 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,19 ± 0,01	3,2 ± 0,1
<i>Trachycardium muricatum sp.</i>	Bom Jesus	2,84 ± 0,05	0,62 ± 0,03	0,66 ± 0,01	< 0,1	4,12 ± 0,06
	Mutá	2,15 ± 0,03	1,07 ± 0,02	0,78 ± 0,07	< 0,1	4,00 ± 0,08
	Suape	1,09 ± 0,03	0,75 ± 0,01	0,289 ± 0,007	< 0,1	2,13 ± 0,03
	Tainheiros	1,86 ± 0,02	0,93 ± 0,01	0,75 ± 0,03	< 0,1	3,54 ± 0,04

De acordo com os resultados mostrados nas Tabelas 9 e 10, pode ser observado que as espécies que formam hidretos voláteis, tais como As(III), DMA e MMA foram quantificadas por LC-CVG-ICP-MS. A concentração de As(V) abaixo do LOD, possivelmente devido às condições reacionais empregadas. Cabe destacar, novamente, que as espécies desconhecidas, porém quantificadas por LC-ICP-MS, não formam hidretos voláteis e, possivelmente, podem ser AsS ou AsC. Arsenoaçúcares e AsC estão presentes em algas e podem ser transferidos para os moluscos, pois estes se alimentam de fitoplâncton. Além disso, como a AsB, espécie predominante nos moluscos bivalves não forma hidreto volátil, o somatório das espécies de As obtidas por LC-CVG-ICP-MS é inferior a obtida por LC-ICP-MS. Nas Tabelas 11 a 14 são feitas as comparações dos valores de espécies de As com As total, onde podemos concluir que as diferenças nas somatórias das concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS são devidas as espécies desconhecidas de As e AsB.

Tabela 11. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Σ Espécies de As			As total	
		LC-ICP-MS	LC-CVG-ICP-MS	[(LC) - (LC-CVG)]-ICP-MS	MAE Extração (ICP OES)	MW Digestão (ICP OES)
<i>Anomalocardia brasiliiana sp.</i>	Acupe	16,7 ± 0,6	4,9 ± 0,1	11,5 ± 0,6	16,4 ± 0,9	17,1 ± 0,8
	Ilha de Maré	9,6 ± 0,4	3,91 ± 0,06	6,1 ± 0,4	9,1 ± 1,0	9,9 ± 0,7
	Tainheiros	9,8 ± 0,2	4,5 ± 0,1	6,3 ± 0,2	9,6 ± 0,7	10,9 ± 0,3
<i>Iphigenia brasiliiana sp.</i>	Mutá	17,4 ± 0,9	4,54 ± 0,06	13,1 ± 0,9	16,8 ± 0,5	17,1 ± 0,6
	Salinas	17,8 ± 1,2	4,75 ± 0,05	13,5 ± 1,2	16,9 ± 0,7	16,8 ± 0,5
	Suape	12,3 ± 0,7	4,29 ± 0,02	8,6 ± 0,7	11,3 ± 0,5	11,7 ± 0,6

Tabela 12. Concentrações das espécies de As obtidas por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS e As total por ICP OES em moluscos bivalves Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Σ Espécies de As			As total	
		LC-ICP-MS	LC-CVG-ICP-MS	[(LC) - (LC-CVG)]-ICP-MS	MAE Extração (ICP OES)	MW Digestão (ICP OES)
<i>Macoma constricta</i> sp.	Bom Jesus	100 ± 4	14,4 ± 0,5	84 ± 4	99 ± 9	100 ± 2
	Suape	31,1 ± 0,7	3,2 ± 0,1	27,6 ± 0,7	30,0 ± 0,4	33 ± 3
<i>Trachycardium muricatum</i> sp.	Bom Jesus	13,2 ± 0,5	4,12 ± 0,06	9,7 ± 0,5	12,7 ± 0,2	12,9 ± 0,2
	Mutá	14,1 ± 0,8	4,00 ± 0,08	9,8 ± 0,8	13,6 ± 0,9	14,5 ± 0,6
	Suape	12,2 ± 0,3	2,13 ± 0,03	10,3 ± 0,3	12,4 ± 0,6	11,9 ± 0,3
	Tainheiros	13,1 ± 0,7	3,54 ± 0,04	9,7 ± 0,7	12,7 ± 0,9	12,6 ± 0,3

Tabela 13. Comparação dos resultados obtidos por LC-ICP-MS e a soma dos resultados de LC-CVG com os valores da diferença entre as duas técnicas e as concentrações de As total (extratos e digeridos) por ICP OES em moluscos bivalves. Os resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Σ Espécies de As		As total		Teste estatístico
		LC-ICP-MS	LC-CVG-ICP-MS + (LC)- LC-CVG -ICP-MS	MAE Extração (ICP OES)	MW Digestão (ICP OES)	(Teste <i>t-Student</i>) Intervalo de confiança de 95%
<i>Macoma constricta sp.</i>	Bom Jesus	100 ± 4	98 ± 4	99 ± 9	100 ± 2	p = 0,9920
	Suape	31,1 ± 0,7	30,8 ± 0,7	30,0 ± 0,4	33 ± 3	p = 0,5344
<i>Trachycardium muricatum sp.</i>	Bom Jesus	13,2 ± 0,5	13,8 ± 0,5	12,7 ± 0,2	12,9 ± 0,2	p = 0,2672
	Mutá	14,1 ± 0,8	13,9 ± 0,8	13,6 ± 0,9	14,5 ± 0,6	p = 0,8712
	Suape	12,2 ± 0,3	12,5 ± 0,3	12,4 ± 0,6	11,9 ± 0,3	p = 0,7273
	Tainheiros	13,1 ± 0,7	13,2 ± 0,7	12,7 ± 0,9	12,6 ± 0,3	p = 0,8920

Tabela 14. Comparação estatística dos resultados obtidos por LC-ICP-MS e a soma dos resultados de LC-CVG com os valores da diferença entre as duas técnicas e as concentrações de As total (extratos e digeridos) por ICP OES em moluscos bivalves. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, representam à média e o desvio-padrão de três replicatas de cada amostra.

Molusco	Local de coleta	Σ Espécies de As		As total		Teste estatístico (Teste <i>t-Student</i>) Intervalo de confiança de 95%
		LC-ICP-MS	LC-CVG-ICP-MS + (LC)- LC-CVG -ICP-MS	MAE Extração (ICP OES)	MW Digestão (ICP OES)	
<i>Anomalocardia brasiliiana sp.</i>	Acupe	16,7 ± 0,6	16,5 ± 0,2	16,4 ± 0,9	17,1 ± 0,8	p = 0,9999
	Ilha de Maré	9,6 ± 0,4	10,0 ± 0,4	9,1 ± 1,0	9,9 ± 0,7	p = 0,7830
	Tainheiros	9,8 ± 0,2	10,80 ± 0,25	9,6 ± 0,7	10,9 ± 0,3	p = 0,1217
<i>Iphigenia brasiliiana sp.</i>	Mutá	17,4 ± 0,9	17,7 ± 0,9	16,8 ± 0,5	17,1 ± 0,6	p = 0,8460
	Salinas	17,8 ± 1,2	18,3 ± 1,2	16,9 ± 0,7	16,8 ± 0,5	p = 0,6454
	Suape	12,3 ± 0,7	12,9 ± 0,7	11,3 ± 0,5	11,7 ± 0,6	p = 0,3597

Conforme exposto nas Tabelas 11 a 14, após comparação dos resultados obtidos por LC-ICP-MS e a soma dos resultados de LC-CVG com a diferença de LC-CVG e LC-ICP-MS, foi observado que os valores são concordantes estatisticamente (Teste *t*-Student, intervalo de confiança de 95%, $p < 0,05$). Dessa forma, provavelmente as espécies que não formaram hidretos são AsB e as espécies desconhecidas, uma vez que os valores obtidos para estes por LC-ICP-MS são aproximados aos valores obtidos da diferença de LC com LC-CVG-ICP-MS.

5.7. Características analíticas da metodologia

Para avaliar as principais características da metodologia aplicada às amostras de moluscos bivalves para determinação de espécies de As, alguns parâmetros de mérito foram determinados para tal estudo.

As espécies de As foram separadas em 15 min para LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS mostrando que a metodologia aplicada é relativamente rápida. A curva de calibração foi preparada em água, a partir da solução referência de DMA na concentração de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, também, foi feita outra curva a partir de AsB na faixa de 20 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, devido a diferença de concentração de As(III), DMA, MMA, *p*-ASA, As(V) e AsB presentes na amostra. O coeficiente de correlação linear (*R*) das duas curvas de calibração foi melhor do que 0,999. A área do sinal cromatográfico de ambas as espécies de As (DMA e AsB) foram utilizadas para fazer as determinações das espécies de As por LC-ICP-MS. Boa repetibilidade das curvas de calibração foi obtida ao decorrer de 10 dias, sendo o RSD inferior a 10%. O LOD e LOQ foram calculados a partir do critério de 3σ e 10σ , respectivamente, onde o σ corresponde ao desvio padrão de 10 medições consecutivas do branco e a precisão foi calculada considerando cinco injeções de 200 μL de solução referência a 2,5 ng de As. Considerando uma massa de amostra de 200 mg, os valores obtidos de LOD e LOQ em $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 15) são suficientemente baixos para a metodologia avaliada (LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS). A exatidão do método foi avaliada pelos materiais de referência certificados (DORM-2, BCR 627 e NIST 1566b), de acordo com os resultados obtidos na (Tabela 15) pode-se observar que não

há diferença significativa entre os valores certificados e os resultados obtidos a um nível de confiança de 95%.

Tabela 15. Características analíticas obtidas da metodologia aplicada para LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS na determinação de espécies de As em moluscos bivalves.

Espécies de As	$\mu\text{g g}^{-1}$			
	LOD ^a	LOD ^b	LOQ ^a	LOQ ^b
As(III)	0,03	0,01	0,10	0,03
AsB	0,02	-----	0,07	-----
MMA	0,04	0,02	0,13	0,05
DMA	0,02	0,02	0,07	0,05
<i>p</i> -ASA	0,03	-----	0,10	-----
As(V)	0,04	0,05	0,13	0,10

^aLC-ICP-MS.

^bLC-CVG-ICP-MS.

Tabela 16. Resultados obtidos para As total e espécies de As por LC-ICP-MS nos CRMs ($\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{sd}$, $n = 3$).

CRMs	Espécies de As (LC-ICP-MS)						As total	
	AsB	As(III)	DMA	MMA	<i>p</i> -ASA	As(V)	Σ espécies de As (LC-ICP-MS)	MW
								Extração (ICP OES)
DORM-2	16,8 \pm 0,3	0,61 \pm 0,04	0,841 \pm 0,003	< 0,04	< 0,03	< 0,04	18,25 \pm 0,93	18,75 \pm 0,66
Valor certificado	16,4 \pm 1,1	-	-	-	-	-	-	-
BCR-627	3,80 \pm 0,11	0,29 \pm 0,04	0,147 \pm 0,013	0,085 \pm 0,005	< 0,03	0,035 \pm 0,001	4,35 \pm 0,18	4,68 \pm 0,03
Valor certificado	3,90 \pm 0,22	-	0,150 \pm 0,020	-	-	-	-	-
NIST 1566b	5,40 \pm 0,20	< 0,03	0,40 \pm 0,01	< 0,04	< 0,03	1,16 \pm 0,01	6,9 \pm 0,4	6,94 \pm 0,2
Valor certificado	-	-	-	-	-	-	-	-

Embora, o SRM 1566b (*Oyster tissue*) não apresenta certificado para espécies de As, este foi avaliado pela semelhança com a matriz da amostra e porque vários autores utilizaram este SRM para avaliar a exatidão da metodologia em amostras de moluscos. Os resultados obtidos neste estudo foram concordantes com os mesmos.^{10,101-102,161}

6 CONCLUSÕES

De acordo, com os objetivos propostos, foram avaliados procedimentos de preparo de amostra para espécies de As em moluscos bivalves (*Macoma constricta* sp., *Anomalocardia brasiliiana* sp., *Iphigenia brasiliiana* sp. e *Trachycardium muricatum* sp.) baseados no uso de extração assistida por ultrassom (UAE) e micro-ondas (MAE) para posterior determinação por LC-ICP-MS e LC-CVG-ICP-MS. Com base no procedimento de extração, foram avaliados diferentes meios e concentrações de extratores e verificou-se que a água é satisfatória para extrair quantitativamente, sem perda ou interconversão, as espécies de As presentes nas amostras. O método mais favorável para este meio extrator foi a MAE, pois foram obtidas recuperações satisfatórias entre 97 ± 3 a $101 \pm 5\%$ para As total em materiais de referência certificado (DORM-2, BCR-627 e NIST 1566b). O método de extração por MAE para determinação de espécies de As em CRMs e amostra tem como vantagem o rápido aquecimento da mistura de amostra no solvente de extração, pouco volume de solvente e reduzido tempo de extração. Além disso, várias amostras podem ser processadas simultaneamente e a reprodutibilidade e recuperações das espécies de As foram melhores em comparação com o uso da UAE.

Para a determinação de espécies de As por LC-ICP-MS os parâmetros de separação cromatográfica foram criteriosamente avaliados se obtendo o melhor desempenho de separação com fosfato e carbonato de amônio em pH 6,0 e 9,0, respectivamente, como fase móvel. O modo de eluição por gradiente favoreceu a separação das espécies de As. Foi observada a presença de seis espécies de As, sendo duas desconhecidas, tornando-se assim relevante a análise de especiação de As em moluscos bivalves. Após a detecção de espécies químicas de As desconhecidas por LC-ICP-MS, foi utilizada a LC-CVG-ICP-MS como técnica complementar para obtenção de mais informações sobre estas espécies

de As. Para o estudo com o uso da LC-CVG-ICP-MS foram avaliados os parâmetros necessários para a formação de hidretos voláteis. Com esta técnica foram obtidos melhores LODs e possibilitou afirmar a presença de espécies de As que não formam hidretos voláteis, como a AsB, e pressupõe-se que as duas espécies desconhecidas podem ser AsS ou AsC.

A espécie predominante nas amostras em estudo foi a AsB, espécie com baixa toxicidade a humanos. No entanto, as legislações somente preconizam o teor total de As e o interesse em avaliar as prováveis espécies tóxicas presentes nestas amostras ainda é restrito. Cabe destacar, que a AsB pode ser transformada em DMA e TMAs, sendo estas espécies eliminadas facilmente do organismo humano, mas dependendo da quantidade e tempo de exposição das mesmas pode acarretar em graves problemas de saúde.

No Brasil, não há legislação específica para limites de As em moluscos bivalves para consumo humano, no entanto as concentrações de As total determinadas nos moluscos avaliados neste trabalho foram comparadas com o valor estabelecido pela ANVISA para peixes e produtos de peixe e todos os valores (9 ± 1 a $99 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$) para As total estão acima em aproximadamente de 10 a 100 vezes ao valor máximo permitido para consumo humano.

Portanto, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida foi adequada para quantificar todas as espécies de As detectadas nos moluscos estudados, porém não foi possível identificar duas das espécies de As detectadas. Para tal, seriam necessários outros compostos de As ou o uso de outras técnicas, como a espectrometria de massa molecular. Dessa forma, a presença das diversas espécies de As detectadas mostra que a análise de especiação em organismos marinhos continua sendo uma tarefa desafiadora e que exige mais trabalho, principalmente nas etapas de preparo da amostra e identificação, uma vez que a presença de novas espécies, desperta o interesse no conhecimento do ciclo biológico e toxicidade das mesmas no organismo humano, assim como a capacidade de acúmulo do As inorgânico da água do mar e a conversão em compostos orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hatje V., Rocha G. O., Guarieiro A. L. N., Andrade J. B., Eça G. F., Aragão N. M., Aguiar R. M., Korn M. G. A., Brito G. B., Moura C. W. N. Contaminação na baía de Todos os Santos. *Rev. Virtual Quim.* 4 (2012) 583-610. Data de publicação na Web: 10 de Outubro de 2012.
2. Carvalho-Souza G. F., Tinôco M. S. Evaluation of Marine Debris in Rock Reefs in the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *J. Integrat. Coast. Zone Manage.* 11 (2011) 135-143.
3. Adams, M. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress. Maryland: American Fisheries Society Bethesda USA, 2002.
4. Fournier M., Pellerin J., Clermont Y., Morin Y., Brousseau P. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161 (2001) 201-211.
5. Hatje V., Macedo S. M., Jesus R. M., Cotrim G., Garcia K. S., Queiroz A. F., Ferreira S. L. C. Inorganic As speciation and bioavailability in estuarine sediments of Todos os Santos Bay, BA, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 2225-2232.
6. Edmonds J. S., Francesconi K. A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia* 43 (1987) 553-557.
7. Chen W-Y, Liao C-M. Toxicokinetics/toxicodynamics links bioavailability for assessing arsenic uptake and toxicity in three aquaculture species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 3868-3878.
8. Francesconi K. A., Edmonds, J. S. Arsenic species in marine samples. *Croact. Chem. Acta* 71 (1998) 343-359.
9. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski 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 (2000) 1453-1470.
10. McSheehy S., Szpunar J., Morabito R., Quevauviller, P. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 191-209.
 11. Salim E. I., Wanibuchi H., Morimura K., Wei M., Mitsuhashi M., Yoshida K., Endo G., Fukushima S. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 24 (2003) 335-342.
 12. Ebdon, L., Pitts L., Cornelius R., Crews H., Donard A. F. X., Quevauviller, Ph. Trace Element Speciation for Environment, Food and Health, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001. 391 p.
 13. Ackley K. L., B'Hymer C., Sutton K. L., Caruso J. A. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 845-850.
 14. Michalski R., Szopa S., Jabłńska M., Łyko, A. Application of Hyphenated Techniques in Speciation Analysis of Arsenic, Antimony, and Thallium. *Scientific World Journal* 2012 (2012) 1-17.
 15. Salgado S. G., Quijano M. A., Bonilla M. M. Determination of soluble toxic arsenic species in alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 54-60.
 16. Cullen W. R., Reimer K. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89 (1989) 713-764.
 17. U.S. FDA. Guidance document for arsenic in shellfish. Washington, D.C. 7 U.S. Food and Drug Administration, 1993. p. 25-27.
 18. Smedley P. L., Kinniburgh D. G. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17 (2002)

- 517-568.
19. Bissen M., Frimmel F. H. Arsenic - a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, and mobility. *Acta Hydroch. Hydrob.* 31 (2003) 9-18.
 20. WHO. Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria 224, second ed. World Health Organization, 2001, Geneva.
 21. Sillen L. G., Oceanography. American Association for the Advancement of Science, Washington, 1961, 574 p.
 22. Johnson D. Bacterial reduction of arsenate in seawater. *Nature* 240 (1972) 44-45.
 23. Andreae M. O. Arsenic speciation in seawater and interstitial waters: the influence of biological–chemical interactions on the chemistry of a trace element. *Limnol. Oceanograph.* 24 (1979) 440-452.
 24. Andreae M. O. Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae. *Deep Sea Res.* 25 (2005) 391-402.
 25. Francesconi K. A., Edmonds J. S. Biotransformation of arsenic in the marine environment. In: Nriagu, J.O. (Ed.), Arsenic In The Environment. Part I: Cycling and Characterization John Wiley, New York, 1994, 221–261 p.
 26. Chakraborty S., Ray M., Ray S. Arsenic toxicity: A heart-breaking saga of a freshwater mollusc. *Tissue Cell* 44 (2012) 151-155.
 27. Bundschuh J., Nath B., Bhattacharya P., Liu C., Armienta M. A., López M. V. M., Lopez D. J., Jean J., Cornejo L., Macedo L. F. L., Filho, A. T. Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective. *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 92-106.
 28. Oremland R. S., Stolz J. F. Review. The ecology of arsenic. *Science* 300 (2003) 939-944.
 29. Neff, J. M. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chemistry* 16 (1997) 917-927.
 30. Neff, J. M. Arsenic in the ocean. In Bioaccumulation in Marine Organisms - Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water,

- Elsevier Science, Oxford, 2002, 57–78 p.
31. Phillips D. J. H. Arsenic in aquatic organisms: a review emphasizing chemical speciation. *Aquat. Toxicol.* 16 (1990) 151-186.
 32. Phillips D. J. H., Depledge M. H. Metabolic pathways involving arsenic in marine organisms: a unifying hypothesis. *Mar. Environ. Res.* 17 (1985) 1-12.
 33. Fattorini D., Alonso-Hernandez C. M., Diaz-Asencio M., Munoz-Caravaca A., Pannacciulli F. G., Tangherlini M., Regoli. F. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring study. *Mar. Environ. Res.* 58 (2004) 845-850.
 34. Y. Marcus. Ion Properties, Marcel Dekker, New York, 1997, 54 p.
 35. Dani S. U. The arsenic for phosphorus swap is accidental, rather than a facultative one, and the question whether arsenic is nonessential or toxic is quantitative, not a qualitative one. *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 4889-4890.
 36. Francesconi K. A. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 373-381.
 37. Hughes M. F., Beck B. D., Chen Y., Lewis A. S., Thomas D. J. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicol. Sci.* 123 (2011) 305-332.
 38. Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181–182 (2002) 211-217.
 39. Marchiset-Ferlay, N., Savanovitch C., Sauvart-Rochat, M. P. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water? *Environ. Internat.* 39 (2012) 150-171.
 40. Naranmandura H., Suzuki N., Suzuki K. T. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem. Res. Toxicol* 19 (2006) 1010-1118.
 41. Suzuki K. T., Mandal B. K., Ogra Y. Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta* 58 (2002) 111-119.
 42. Mandal B. K., Ogra Y., Suzuki K. T. Speciation of arsenic in human

- nail and hair from arsenic affected area by HPLC inductively coupled argon plasma mass spectrometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 (2003) 73-83.
43. Raab A., Feldmann J. Arsenic speciation in hair extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 332-338.
44. Ratnaike R. N., Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med. J.* 79 (2003) 391-396.
45. Gebel T. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology* 62 (2000) 144-155.
46. Ghosh P., Banerjee M., Giri A. K., Ray K. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances, *Mutat. Res.* 659 (2008) 293-301.
47. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o regulamento técnico: "Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos e seus anexos: "limites máximos de intolerância para contaminantes inorgânicos"
48. Codex Alimentarius Commission. Priority list of food additives, contaminants and naturally occurring toxicants proposed for evaluation by jecfa. in: joint fao/who food standards programme Codex Alimentarius Commission, 26. Session, rome, italy, 30 jun.-5 jul. 2003. Report of the 35th session of the codex committee on food additives and contaminants, Arusha, Tanzania, 17-21 mar. 2003. (Alinorm 03/12 A, apr. 2003, appendix XV) 128 p.
49. United State Environmental Protection Agency Arsenic risk benefits analysis: an SAB review, 2001, Disponível em: <<http://www.epa.gov/sab/eco/008.pdf>> Acessado em 03 de dezembro de 2012.
50. International Agency for Research on Cancer. Arsenic and Arsenic Compounds (Group 1). IARC Monograph 23, Supplement 7. Lyon, France, 1987, 100–106 p.
51. Tseng C. H. A review on environmental factors regulating arsenic

- methylation in humans. *Toxicol. Appl. Pharm.* 235 (2009) 338-350.
52. Basu A., Mahata J., Gupta S. A. K. Genetic toxicology of paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488 (2001) 171-194.
53. Benramdane L., Accominotti M., Fanton L., Malicier D., Vallon J. J. Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning: a casa report. *Clin. Chem.* 45 (1999) 306-310.
54. Phillips D. J. H. The chemical forms of arsenic in aquatic organisms and their interrelationships. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment Part I: Cycling and Characteristics*. Wiley and Sons, New York, 1994, p. 263-288.
55. Eisler R. Arsenic hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* 85 (1998) 12 p.
56. Reuther R. Arsenic introduced into a littoral freshwater model ecosystem. *Sci. Total Environ.* 115 (1992) 219-237.
57. Stanley, M.E. *Environmental Chemistry*. 7.ed. London: Lewis, 2000, 187-188 p.
58. Hughs M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*, 133 (2002) 1-16.
59. Andrew A. S., Warren A. J., Barchowsky A., Temple K. A., Klei L., Soucy N. V., O'ara K. A., Hamilton, J. W. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 825-835.
60. Francesconi K. A, Edmonds J. S. Arsenic and marine organisms. *Adv. In. Chem.* 4 (1997) 147-189.
61. Shiomi K., Sugiyama Y., Shimakura K., Nagashima Y. Retention and biotransformation of arsenic compounds administered intraperitoneally to carp. *Fish. Sci.* 62 (1996) 261-266.
62. Kirby J., Maher W. Tissue accumulation and distribution of arsenic compounds in three marine fish species: relationships to trophic position. *Appl. Organomet. Chem.* 16 (2002) 108-115.

63. Reimer K. J., Koch I., Ollson C. A., Cullen, W. R., Granchinho S., Andrews P., Jamieson H., Walker S. R., Arsenic Report 72. Environmental Science Group, Royal Military College, Kingston, Ontario, Kingston., Hughs, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133 (2002) 1–16.
64. Leufroy A., Noël L., Beauchemin D., Guérin, T. Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2849-2859.
65. Kaise T. Distribution of inorganic arsenic and methylated arsenic in marine organisms. *Appl. Organomet. Chem.* 2 (1988) 539-546.
66. Edmonds J. S., Francesconi K. A. Arsenic in seafoods: human health aspects and regulations. *Mar. Pollut. Bull.* 26 (1993) 665-674.
67. Aposhian H. V. Biochemical toxicology of arsenic. *Rev. Biochem. Toxicol.* 10 (1989) 265-299.
68. Thompson D. J. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. *Chem. Biol. Interact.* 88 (1993) 89-114.
69. Le X. C., Cullen W. R., Reimer K. J. Human urinary arsenic excretion after one- time ingestion of seaweed, crab, and shrimp. *Clin. Chem.* 40 (1994) 617-624.
70. Yamamoto S., Konishi Y., Murai T., Shibata M. A., Matsuda T, Kuroda K., Endo G., Fukushima S. Enhancing effects of an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in a multi-organ carcinogenesis bioassay. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 197-199.
71. Ng J. C. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. *Environ. Chem.* 2 (2005) 146-160.
72. Sharma V. K., Sohn M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations and remediation. *Environment International* 35 (2009). 743-759.
73. Vaughn C. C, Hakenkamp C. C. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biol* 46 (2001) 1431 - 1446.

74. Gregory M. A., Marshall D. J., George R. C, Anandraj A., McClurg T. P. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Mar Pollut Bull* 45 (2002) 114-125.
75. Amaral C. Z., Rizzo A. E.; Arruda E. P. Manual de identificação dos invertebrados marinhos da região Sudeste-Sul do Brasil. São Paulo Edusp, 2005, v.1, 287 p.
76. Livingstone, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol* 57 (1993) 195-211.
77. Sanders, B. M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23 (1993) 49-75.
78. Bayne B. L., Brown D. A., Harrion F., Yevich P. D., Varela G., Webber D. L. Mussel health. In: The International Mussel Watch. Report of a Workshop Sponsored by the Environmental Studies Board. Commission on Natural Resources, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, DC, 1980,163–235 p.
79. Elder J. F., Collins J. J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev Environ Contam. Toxicol.* 122 (1991) 37-79.
80. Newman M. C., Jagoe C. H. Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions. CRC Press, 1994, 39-62 p.
81. CRA. Diagnóstico da concentração de metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo nos sedimentos e biota da baía de Todos os Santos. Consórcio BT Hydros CH2MHILL. Governo do Estado da Bahia, 2004.
82. Montes-Bayón, Maria. Metal speciation in biomolecules. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 287-288.
83. Meermann B., Sperling M. Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments

- and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1501 - 1522.
84. Ackley K. L., Caruso J. A., Alonso J. I. G., Encinar J. R. E., Michalke B., Chéry, C. C. Separation techniques, in: R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K.G. Heumann (Eds.), *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley and Sons, New York, 2003, 174 p.
85. Gonzalez A., Cervera M. L., Armenta S., de la Guardia M. A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 129-157.
86. Francesconi K. A. Applications of liquid chromatography/electrospray ionisation-single quadrupole mass spectrometry for determining arsenic compounds in biological samples *Appl. Organomet. Chem.* 16 (2002) 437-445.
87. Sheppard B. S., Caruso J. A., Heitkemper D. T., Wolnik K. A. Arsenic speciation by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Analyst* 117 (1992) 971-975.
88. Ipolyi I., Fodor P. Development of analytical systems for the simultaneous determination of the speciation of arsenic [As(III), methylarsonic acid, dimethylarsinic acid, As(V)] and selenium [Se(IV), Se(VI)]. *Anal. Chim. Acta* 413 (2000) 13-23.
89. Martinez A., Morales-Rubio A., Cervera M. L., de la Guardia, M. Atomic fluorescence determination of total and inorganic arsenic species in beer. *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2005) 1-8.
90. Nam S., Cheng J., Mindack 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 (2006) 903-910.
91. Dietz C., Sanz J., Sanz E., Muñoz-Olivas R., Cámara, C. Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation. *J. Chromatog. A* 1153 (2007) 114-129.
92. Wrobel K., Wrobel K., Caruso J. A. Pretreatment procedures for

- characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 317-331.
93. Simon S., Lobos G., Pannier F., Gregori I., Pinochet H., Potin-Gautier, M. Speciation analysis of organoarsenical compounds in biological matrices by coupling ion chromatography to atomic fluorescence spectrometry with on-line photooxidation and hydride generation. *Anal. Chim. Acta* 521 (2004) 99-108.
94. Slejkovec Z., Bajc Z., Doganoc D. Z. Arsenic speciation patterns in freshwater fish. *Talanta* 62 (2004) 931-936.
95. Schaeffer R., Soeroes C., Ipolyi I., Fodor P., Thomaidis N. S. Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography-[(photo-oxidation)-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry]. *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 109-118.
96. Lin H-T., Chen S-W., Shen C-J., Chun C. Arsenic speciation in fish on the market. *J. Food Drug Anal.* 16 (2008) 70-75.
97. Ochsenkühn-Petropulu M., Varsamis J., Parissakis G. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 323-327.
98. Pizarro I., Gómez M., Cámara C., Palacios M. A. Arsenic speciation in environmental and biological samples: extraction and stability studies. *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 85-98.
99. McKiernan J. W., Creed J. T., Brockhoff C. A., Caruso J. A., Lorenzana, R. M. A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 607-613.
100. Lai V. W.-M., Cullen W. R., Ray S. Arsenic speciation in scallops. *Mar. Chem.* 66 (1999) 81-89.
101. Wahlen R., McSheehy S., Scriver C., Mester, Z. Arsenic speciation in

- marine certified reference materials Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 876-882.
102. Larsen E. H. Speciation of dimethylarsinyl-riboside derivatives (arsenosugars) in marine reference materials by HPLC-ICP-MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* 352 (1995) 582-588.
103. Kirby J., Maher W. Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 838-843.
104. Chatterjee A. Determination of total a cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 51 (2000) 303-314.
105. Cleland S. L., Olson L. K., Caruso J. A., Carey J. M. Optimization of Arsenic Supercritical Fluid Extraction with ICP-MS Detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 975-978.
106. Miguens-Rodriguez M., Pickford R., Thomas-Oates J. E., Pergantis S. A. Arsenosugar identification in seaweed extracts using high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 16 (2002) 323-331.
107. Wrobel K, Kannamkumarath S. S., Caruso J. A. Identification of selenium species in urine by ion-pairing HPLC-ICP-MS using laboratory-synthesized standards. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 670-674.
108. Montes-Bayon M., Grant T. D., Meija J., Caruso J. A. Selenium speciation in wild-type and genetically modified Se accumulating plants with HPLC separation and ICP-MS/ES-MS detection. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1015-1023.
109. Gomez-Ariza J. L., Sanchez-Rodas D., Giraldez I., Morales E. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst* 125 (2000) 401-407.

110. Tukai R., Maher W. A., McNaught I. J., Ellwood M. J. Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 173-185.
111. Kirby J., Maher W., Ellwood M., Krikowa F. Arsenic species determination in biological tissues by HPLC-ICP-MS and HPLC-HG-ICP-MS. *Aust. J. Chem.* 57 (2004) 957-966.
112. Foster S., Maher W., Krikowa F., Apte S. A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues. *Talanta* 71 (2007) 537-549.
113. Dufailly V., Noel L., Fremy J.-M., Beauchemin D., Guerin, T. Optimisation by experimental design of an IEC/ICP-MS speciation method for arsenic in seafood following microwave assisted extraction. *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1168-1173.
114. Salgado S. G., Quijano M. A., Bonilla M. M. Assessment of total arsenic and arsenic species stability in alga samples and their aqueous extracts. *Talanta* 75 (2008) 897-903.
115. Cao X., Hao C., Wang G., Yang H., Chen D., Wang X. Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products. *Food Chemistry* 113 (2009) 720-726.
116. Leufroy A., Noel L., Dufailly V., Beauchemin D., Guerin T. Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data. *Talanta* 83 (2011) 770-779.
117. Rubio R., Ruiz-Chancho M. J., López-Sánchez J. F. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 53-69.
118. Gomez-Ariza J. L., Morales E., Giraldez I., Sanchez-Rodas D. Sample treatment and storage in speciation analysis. In: Ebdon L., Pitts L.,

- Cornelis R., Crews H., Quevauviller P. (eds.), Trace Element Speciation for Environment, Food and Health. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001, 51–81.
119. Mesko M. F., Hartwig C. A., Bizzi C. A., Pereira J. S. F., Mello P. A., Flores E. M. M. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Internat. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 123-136.
120. Seidi S., Yamini Y. Analytical sonochemistry: developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 938-976.
121. Bendicho C., De La Calle I., Pena F., Costas M., Cabaleiro N., Lavilla I. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 31 (2012) 50-60.
122. Priego-Capote F., Castro M. D. L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 644-653.
123. Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications. Edited by José-Luis Capelo-Martínez. 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 1-16 p.
124. Castro M. D. L., Priego-Capote F. Ultrasound-assisted preparation of liquids samples. *Talanta* 72 (2007) 321-334.
125. Gómez-Ariza J. L., Sánchez-Rodas D., Giráldez I., Morales E. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst* 125 (2000) 401-407.
126. Gallagher P. A., Wei X. Y., Shoemaker J. A., Brockhoff C. A., Creed J. T. Detection of arsenosugars from kelp extracts via IC-electrospray ionization-MS-MS and IC membrane hydride generation ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 14 (1999) 1829-1834.
127. Slejkovec Z., Van-Elteren J. T., Byrne A. R. Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-(UV)-HG-AFS. *Talanta* 49 (1999) 619-627.
128. Sanz E., Munoz-Olivas R., Cámara, C. Evaluation of a focused

- sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *J. Chromatogr A*. 1097 (2001) 265-274.
129. Rosemond S., Xie Q., Liber K. Arsenic concentration and speciation in five freshwater fish species from Back Bay near Yellowknife, NT, Canadá. *Environ. Monit. Assess.* 147 (2008) 199-210.
130. Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K., (Eds.), Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2003, 76 p.
131. Lagha A., Chemat S., Bartels P. V., Chemat, F. Microwave - ultrasound combined reactor suitable for atmospheric sample preparation procedure of biological and chemical products. *Analysis* 27 (1999) 452-457.
132. Vilanó M., Rubio R. Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-atomic fluorescence detection. *Appl. Organomet. Chem.* 15 (2001) 658-666.
133. Larsen E. H., Engman J., Sloth J. J., Hansen M., Jorhem L. Determination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and HPLC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 339-346.
134. Sloth J. J., Larsen E. H., Julshamn Y. Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6011-6018.
135. Nam S.-H., Oh H.-J., Min H.-S., Lee J.-H. A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC-ICP-MS. *Microchim. Acta* 95 (2010) 20-24.
136. Sloth J. J., Julshamn K. Survey of Total and Inorganic Arsenic Content in Blue Mussels (*Mytilus edulis L.*) from Norwegian Fiords: Revelation of Unusual High Levels of Inorganic Arsenic. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1269-1273.

137. Dressler V. L., Antes F. G., Moreira C. M., Pozebon D., Duarte F. A. As, Hg, I, Sb, Se and Sn Speciation in Body Fluids and Biological Tissues using Hyphenated-ICP-MS Techniques: A review. *Internat. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 149-162.
138. Kumaresan M., Riyazuddin P. Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current. Sci.* 80 (2001) 837-846.
139. Sörös C., Bodó E. T., Fodor P., Morabito, R. The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 25-31.
140. Gong Z., Xiufen L., Mingsheng M., Watt C. L., Chris X. Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58 (2002) 77-96.
141. Hsu K. C., Sun C. C., Huang Y. L. Arsenic speciation in biomedical sciences: recent advances and applications. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 27 (2011) 382-389.
142. Pohl P., Prusisz B. Ion-exchange column chromatography – an attempt to speciate arsenic. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 63-69.
143. Francesconi K. A., Kuehnelt D. Arsenic compounds in the environment. In: Frankenberger WT Jr (Ed) *Environmental Chemistry of Arsenic*, Marcel Dekker, New York, 2002, 51-94 p.
144. Terlecka E. Arsenic speciation analysis in water samples: A review of the hyphenated techniques. *Environ. Monit. Asses.* 107 (2005) 259-284.
145. Francesconi K. A., Kuehnelt, D. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications. *Analyst* 129 (2004) 373-395.
146. Tomlinson M. J., Lin L., Caruso, J. A. Plasma Mass Spectrometry as a Detector for Chemical Speciation Studies. *Analyst* 120 (1995) 583-589.
147. Zoorob G. K., McKiernan J. W., Caruso J. A. ICP-MS for Elemental Speciation Studies. *Microchim. Acta* 128 (1998) 145-168.
148. Jarvis K. E., Gray A. L., Houk, R. S. *Handbook of Inductively Coupled*

- Plasma Mass Spectrometry, Blackie, New York, USA, 1992, 380 p.
149. Wang T. Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC–ICP–MS), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 807-831.
150. Taboada-de la Calzada A., Villa-Lojo M. C., Beceiro-Gonzalez E., Alonso-Rodriguez E., Prada-Rodriguez D. Determination of arsenic species in environmental samples: use of the alga *Chlorella vulgaris* for arsenic(III) retention. *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 167-175.
151. Szpunar-Lobinski J., Witte, C., Lobinski R., Adams, F. C. Separation techniques in speciation analysis for organometallic species. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 351 (1995) 351-377.
152. Szpunar, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* 125 (2000) 963-988.
153. Montes-Bayón M., DeNicola K., Caruso J. A. Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457–476.
154. Branch S., Ebdon L., O'Neill P. Determination of arsenic species in fish by directly coupled high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 33-37.
155. Zheng J., Hintelmann H. Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish. *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 191-195.
156. Nam S., Kim H., Lee J., Lee Y. Study of arsenic species in *Hizikia* seaweed by IC–ICP-MS. *Am. Labor* 39 (2007) 9-11.
157. McSheehy S., Pohl P., Lobiński R., Szpunar J. Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS). *Analyst* 126 (2001) 1055-1062.

158. Kohlmeyer U., Kuballa J., Jantzen E. Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 16 (2002) 965-974.
159. Kohlmeyer U., Jantzen E., Kuballa J., Jakubik S. Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 6-13.
160. B'Hymer C., Caruso J. A. Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 1-13.
161. Kuehnelt D., Irgolic K. J., Goessler W. Comparison of three methods for the extraction of arsenic compounds from the NRCC standard reference material DORM-2 and the brown alga *Hijiki fuziforme*. *Appl. Organomet. Chem.* 15 (2001) 445-456.
162. Hanaoka K., Goessler W., Kaise T., Ohno H., Nakatani Y., Ueno S., Kuehnelt D., Schlagenhafen C. K., Irgolic, J. Occurrence of a few organo-arsenicals in jellyfish. *Appl. Organomet. Chem.* 13 (1999) 95-99.
163. Goessler W., Rudorfer A., Mackey E. A., Becker P. R., Irgolic K. J. Determination of arsenic compounds in marine mammals with high-performance liquid chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *J. Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 491-501.
164. Kubota R., Kunito T., Tanabe S. Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals. *Mar. Poll. Bull.* 45 (2002) 218-223.
165. Corr J. J., Larsen E. H. Arsenic speciation by liquid chromatography coupled mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 11 (1996) 1215-1224.

166. Kuehnelt, D., Goessler, W., Irgolic, K. J. Arsenic compounds in terrestrial organisms II: Arsenocholine in the Mushroom *Amanita muscaria*. *Appl. Organomet. Chem.* 11 (1997) 459-470.
167. Kuehnelt D., Goessler W., Schlagenhafen C., Irgolic K. J. Arsenic compounds in terrestrial organisms III: Arsenic compounds in *Formica* sp. From and Old Arsenic Smelter Site. *Appl. Organomet. Chem.* 11 (1997) 859-867.
168. Slejkovec A. R., Byrne T., Stijve W., Goessler, Irgolic K. J. Arsenic Compounds in Higher Fungi. *Appl. Organomet. Chem.* 11 (1997) 673-682.
169. Pedersen S. N., Francesconi K. A. Liquid Chromatography Electro spray Mass Spectrometry with Variable Fragmentor Voltage gives Simultaneous Elemental and Molecular Detection of Arsenic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrometry* 14 (2000) 641-645.
170. Gamble B. M., Gallagher P. A., Shoemaker J. A., Wei, X., Schwegel C. A., Creed J. T. (2002). An investigation of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Analyst*, 127(6), 781-785.
171. McSheehy S., Marcinek M., Chassaigne H., Szpunar J. Identification of dimethylarsinoyl-riboside derivatives in seaweed by pneumatically assisted electrospray tandem mass spectrometry *Anal. Chim. Acta*, 410 (2000) 71-84.
172. Geiszinger, A., Goessler, W., Pedersen, S. N., Francesconi, K. A. Arsenic Biotransformation by the brown macroalga *Fucus erratus* *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 2255-2262.
173. Gallagher, P.A., Shoemaker, J.A., Wei, X., Brockhoff-Schwegel, C.A., Creed, J.T. Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection. *Fresen. J. Anal. Chem.* 369 (2001) 71-80.
174. Madsen A. D., Goessler W., Pedersen S. N., Francesconi K.A. Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-

- electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 657-662.
175. Van-Hulle M., Zhang C., Zhang X., Cornelis R. Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. *Analyst* 127 (2002) 634-640.
176. Reyes L. H., Mar J. L. G., Mizanur R. G. M., Seybert B., Fahrenholz T., Kingston H. M. S. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively. *Talanta* 78 (2009) 983-990.
177. Ray S. J., Andrade F., Gamez G., McClenathan D., Rogers D., Schilling G., Wetzel W., Hieftje G. M. Plasma-source mass spectrometry for speciation analysis: state-of-the-art. *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 3-34.
178. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part I. *Spectroscopy* 16 (2001) 38-43.
179. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part IV: The interface region. *Spectroscopy* 16 (2001) 26-34.
180. Goessler W., Kuehnelt D. Analytical methods for the determination of arsenic and arsenic compounds in the environment" In: Environmental Chemistry of Arsenic, (W.T. Frankenberger Jr., ed.) Marcel Dekker, New York, 2002, 27-50 p.
181. Dědina J., Tsalev D. L., Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, volume 130, John Wiley & Sons, England, 1995, 183-205 p.
182. Dědina J., in Encyclopedia of Analytical Chemistry, Supplementary Volumes S1-S3, ed. R.A. Meyers, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2011, 897–936 p.
183. Tian Y., Chen M.-L., Chen X.-W., Wang J.-H., Hirano Y., Sakamoto H., Setsu I. Arsenic speciation with gradient hydride generation interfacing liquid chromatography and atomic absorption spectrometry.

- J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 48-54.
184. Pétursdóttir Á. H., Gunnlaugsdóttir H., Jörundsdóttir H., Mestrot A., Krupp E. M., Feldmann J. HPLC-HG-ICP-MS: a sensitive and selective method for inorganic arsenic in seafood. *Anal Bioanal Chem.* 404 (2012) 2185-2191.
185. Chen L. W. L., Lu X. F., Le X. C. Complementary chromatography separation combined with hydride generation-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation in human urine. *Anal Chim Acta* 675 (2010) 71-75.
186. Schmeisser E., Goessler W., Kienzl N., Francesconi K. A. Volatile Analytes formed from Arsenosugars: Determination by HPLC - HG-ICPMS and Implications for Arsenic Speciation Analyses. *Anal. Chem.* 76 (2004) 418- 423.
187. Liu B. H., Li Z. P. A review: Hydrogen generation from borohydride hydrolysis reaction. *J. Power Sources* 187 (2009) 214-220.
188. Hwang C. J., Jiang S. J. Determination of arsenic compounds in water samples by liquid-chromatography inductively-coupled plasma-mass spectrometry with an in-situ nebulizer-hydride generator. *Anal Chim. Acta* 289 (1994) 205-213.
189. Nakazato T., Tao H., Taniguchi T., Isshiki K. Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques. *Talanta* 16 (2002) 121-132.
190. Regmi R, Milne B. F., Feldmann J. Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 775-782.
191. Cannon J. R., Edmonds J. S., Francesconi K. A., Raston C. L., Saunders J.B, Skelton BW, White AH. Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, a constituent of the Western rock lobster, *Panulirus cygnus*, the dusky shark, *Carcharhinus obscurus*, and some samples of human urine. *Aust. J. Chem.* 34 (1981) 787-798.

192. Cullen W. R., Remer K. J. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89 (1989) 713-764.
193. Morita, M., Edmonds, J. S. Determination of arsenic species in environmental and biological samples. *Pure Appl. Chem.* 64 (1992) 575-590.
194. Gómez-Ariza J. L., Sánchez-Rodas D., Giráldez I., Morales, E. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst* 125 (2000) 401-407.
195. Rainbow, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120 (2002) 497–507.
196. Luoma S. N., Rainbow P. S. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 1921–1931.
197. Neves R. A .F., Echeverria C. A., Pessoa L. A., Paiva P. C., Paranhos R., Valentin J. L. Factors influencing spatial patterns of molluscs in a eutrophic tropical bay. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* (2012) 1-13.
198. Vélez D., Ybáñez N., Montoro R. Monomethylarsonic and Dimethylarsinic Acid Contents in Seafood Products. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 859–864.
199. Li W., Wei C., Zhan C., Van Hulle M., Cornelie R., Zhang X. A survey of arsenic species in chinese seafood. *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 1103–1110.
200. Sörös C., Bodó E. T., Fodor P., Morabito R., The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 25–31.
201. Hirata S., Toshimitsu H., Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC–ICP–MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 454–460.
202. Devesa V., Súnier M. A., Algora S., Vélez D., Montoro, R., Jalón M., Urieta I., Macho M.L. Organoarsenical Species Contents in Cooked Seafood. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 8813-8819.

203. Liu C.-W., Liang C.-P., Huang F. M., Hsueh Y.-M., Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. *Sci. Total Environ.* 361 (2006) 57– 66.
204. Súnier M. A., Devesa V., Clemente M. J., Vélez D., Montoro R., Urieta I., Jalón M., Macho M. L. Organoarsenical Species Contents in Fresh and Processed Seafood Products. *J Agric Food Chem.* 50 (2002) 924-932.
205. Moreda-Piñeiro A., Moreda-Piñeiro J., Herbelo-Hermelo P., Bermejo-Barrera P., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D. Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis-High performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6970– 6980.
206. Sean X. C. Le, William R. Cullen, Kenneth J. Reimer. Speciation of Arsenic Compounds in Some Marine Organisms. *Environ. Sci. Technol.* 28 (2004) 1598-1604.
207. Leufroy A., Noël L., Dufailly V., Beauchemin D., Guérin T. Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data. *Talanta* 83 (2011) 770–779.
208. Argese E., Bettiol C., Rigo C., Bertini S., Colombari S., Ghetti P. F., Distribution of arsenic compounds in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice lagoon (Italy). *Sci. Total Environ.* 348 (2005) 267– 277.
209. Chatterjee A., Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC–ICP-MS. *Talanta* 51 (2000) 303–314.
210. Sloth J. J., Julshamn K., Survey of Total and Inorganic Arsenic Content in Blue Mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian Fiords: Revelation of Unusual High Levels of Inorganic Arsenic. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1269–1273.

211. Fattorini D., Regoli F., Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete sabella spallanzanii. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2004) 1881–1887.
212. Lai V. W.-M. Cullen W. R., Ray S. Arsenic speciation in scallops. *Mar. Chem.* 66 (1999) 81-89.
213. Jarvis K. E., Gray A. L., Houk R. S. Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Blackie, New York, 1992, 380 p.
214. Montaser A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Wiley-VHC, New York, 1998, 964 p.
215. Fish R. H., Brinckman F. E., Jewett K. L., Fingerprinting inorganic arsenic and organoarsenic compounds in *in situ* oil shale retort and process waters using a liquid chromatography coupled with an atomic absorption spectrometer as a detector. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 174-179
216. Tan S. H., Horlick G. Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.* 40 (1986) 445-460.
217. Brisbin J. A., Caruso J. A. Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 127 (2002) 921–929.
218. Sang-Ho N., Hae-Joon O., Hyung-Sik M., Joung-Hae L. A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC–ICP-MS. *Microchem. J.* 95 (2010) 20-24.
219. Narukawa T., Inagaki K., Kuroiwa T., Chiba K. The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC–ICP-MS. *Talanta* 77 (2008) 427–432.
220. Yeh C.-F., Jiang S.-J. Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26 (2005) 1615-1621.
221. Jókai Z., Hegoczki J., Fodor P., Stability and optimization of extraction

- of four arsenic species. *Microchem. J.* 59 (1998) 117-124.
222. Palácios M. A., Gomez M., Cámara C., Lopez M. A., Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determination by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 340 (1997) 209-220.
223. Moll A. E., Heimbürger R., Lagarde F., Leroy M. J. F., Maier E. Arsenic speciation in marine organisms: from the analytical methodology to the constitution of reference materials. *Fresen. J. Anal. Chem.* 354 (1996) 550-556.
224. Hanaoka K., Ueno K., Tagawa S., Kaise T. Degradation of arsenobetaine by microorganisms associated with marine macroalgae, *Monostroma nitidum* and *Hizikia fusiforme*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B (1989) 379 - 382.
225. B'Hymer C., Caruso J. A. Arsenic and Its Speciation Analysis Using High-Performance Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 25 (2002) 639-653.
226. Brisbin J. A., B'Hymer C. Caruso J. A. A Gradient Anion Exchange Chromatographic Method for the Speciation of Arsenic in Lobster Tissue Extracts. *Talanta* 58 (2002) 133-145.
227. Xie R., Johnson W., Spayd S., Hall G. S., Buckley B. Arsenic Speciation Analysis of Human Urine Using Ion Exchange Chromatography Coupled to ICP MS. *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 186-194.
228. Ammann A A. Arsenic Speciation Analysis by Ion Chromatography - A Critical Review of Principles and Applications. *Am. J. Anal. Chem.* 2 (2011) 27-45.
229. Weiss J., Weiss T. Handbook of Ion Chromatography, 3rd Edition, Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 931p.

230. Fritz J. S., Gjerde D. T., Ion Chromatography, 4th Edition, Weinheim: Wiley, 2009, 659p.
231. Zimmermann M. D., Tossell J. A. Acidities of Arsenic (III) and Arsenic (V) Thio-and Oxyacids in Aqueous Solution Using the CBS-QB3/CPCM Method. *J. Phys. Chem.* 113 (2009) 5105-5111.
232. Vassileva E., Becker A., Broekaert J. A. C. Determination of arsenic and selenium species in groundwater and soil extracts by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 135-146.
233. Szakova J., Tlustos P., Goessler W., Pavlikova D., Balik J. Comparison of mild extraction procedures for determination of arsenic compounds in different parts of pepper plants (*Capsicum annum*, L.). *Appl. Organomet. Chem.* 19 (2005) 308-314.
234. van Elteren J. T., Slejkovec Z., Kahnc M., Goessler W. A systematic study on the extractability of arsenic species from algal certified reference material IAEA-140/TM (*Fucus* sp., Sea Plant Homogenate) using methanol/water extractant mixtures. *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 24–31.
235. Baer I., Baxter M., Devesa V., Vélez D., Raber G., Rubio R., Llorente-Mirandes T., Sloth J.J., Robouch P., de la Calle B.. Performance of laboratories in speciation analysis in seafood – case of methylmercury and inorganic arsenic. *Food Control* 22 (2011) 1028-1934.
236. Guerin T., Astruc A., Astru M. Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques. *Talanta* 50 (1999) 1–24.
237. McKiernan J. W., Creed J. T., Brockhoff C. A., Caruso J. A., Lorenzana R. M. A comparison of automated and traditional methods for extraction of arsenicals in fish. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 607-613.
238. Samanta G., Chowdhury U. K., Mandal B. K., Chakraborti D., Sekaran N.C., Tokunaga H., Ando M., High performance liquid chromatography

- inductively coupled plasma spectrometry for speciation of arsenic compounds in urine. *Microchem. J.* 65 (2000) 113-127.
239. Pardo-Martinez M., Vinas P., Fisher A., Hill S. J. Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid-chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods. *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 29-36.
240. Choi H., Park S.-H., Ki D.-S., Kim M. Determination of 6 arsenic species present in seaweed by solvent extraction, clean-up, and LC-ICP/MS. *Food Sci. Biotechnol.* 20 (2011) 39-44.
241. Coelho N. M. M., Coelho L. M., de Lima E. S., Pastor A., de la Guardia M. Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 66 (2005) 818-822.
242. Le S. X. C., Cullen W. R., Reimer K. J. Speciation of Arsenic Compounds in Some Marine Organisms. *Environ. Sci. Technol.* 28 (2004) 1598-1604.
243. Larsen E. H., Pritzl G., Hansen S. H. Arsenic speciation in seafood samples with emphasis on minor constituents: an investigation using high-performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 1075-1084.
244. Yamamoto S., Konishi Y., Murai T., Shibata M. A., Matsuda T., Kuroda K., Endo G., Fukushima S. Efeitos de aumento de um composto orgânico de arsênio, ácido dimetilarsínico (ácido cacodylic), num bioensaio de múltiplos órgãos carcinogênese. *Appl. Organomet. Chem.* 8 (1994) 197-199.
245. Ritsema R., Navarro T. R., van Leeuwen W., Oliveira N., Wolfs P., Leuret E., Speciation of arsenic compounds in urine by LC-ICP MS. *Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 591-599.
246. Šlejkovec Z., van Elteren J. T., Woroniecka U. D., Underestimation of the total arsenic concentration by hydride generation techniques as a

- consequence of the incomplete mineralization of arsenobetaine in acid digestion procedures. *Anal. Chim. Acta* 443 (2001) 277–282.
247. López M. A., Gómez M. M., Palacios M. A., Cámara C. Determination of six arsenic species by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry with on-line thermo-oxidation. *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 643-647.
248. Blais J. S., Momplaisir G. M., Marshall W. D., Determination of arsenobetaine, arsenocholine, and tetramethylarsonium cations by liquid chromatography-thermochemical hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 62 (1990) 1161-1166.
249. Tsalev D. L., Sperling M., Welz B. Speciation determination of arsenic in urine by high-performance liquid chromatography–hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line ultraviolet photooxidation. *Analyst* 123 (1998) 1703-1710.
250. Villa-Lojo M. C., Alonso-Rodríguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D.. Coupled high performance liquid chromatography–microwave digestion–hydride generation–atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue. *Talanta* 57 (2002) 741–750.
251. Nakazato, T., Taniguchi T., Tao H., Tominaga M., Miyazaki A. Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrixes. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1546 - 1552.
252. Niegel C., Matysik F. M. Analytical methods for the determination of arsenosugars a review of recent trends and developments. *Anal. Chim. Acta* 657 (2010) 83 -99.
253. Feldmann J., Krupp E. M. Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars - a class of benign arsenic species or justifi cation for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 1735 – 1741.