UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para
especação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e
avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz

Bruno Lemos Batista

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para
especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e
avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Bruno Lemos Batista

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 27/06/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ribeirão Preto

2012

<p>BATISTA, B. L.</p>	<p>Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz</p>	<p>DOUTORADO FCFRP-USP 2012</p>
---------------------------	--	---

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Batista, Bruno Lemos

Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz. Ribeirão Preto, 2012.

180p.:il; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

1.Especiação 2.Arsênio 3.Arroz 4.Tecidos 5.LC/ICP-MS/ESI-MS 6.Fitoquelatinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Lemos Batista

Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

"As oportunidades são únicas. Já ancorado na Antártica, ouvi ruídos que pareciam de fritura. Pensei: Será que até aqui existem chineses fritando pastéis? Eram cristais de água doce congelada que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo. Pensei em fotografar, mas falei pra mim mesmo - Calma, você terá muito tempo para isso... Nos 637 dias que seguiram o fenômeno não se repetiu. As oportunidades são únicas."

Amyr Klink

"Passados dois meses de tantas histórias, comecei a pensar no sentido da solidão. Um estado interior que não depende da distância... nem do isolamento; um vazio que invade as pessoas... E que a simples companhia ou presença humana não pode preencher. Solidão foi a única coisa que eu não senti, depois que parti... nunca... em momento algum. Estava, sim, atacado de uma voraz saudade. De tudo e de todos, de coisas e de pessoas que há muito tempo não via. Mas a saudade às vezes faz bem ao coração. Valoriza os sentimentos, acende as esperanças e apaga as distâncias. Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudade... mas não estará só!"

Amyr Klink

Dedicatória

A Deus, meu guia, em quem tenho muita fé e que está sempre a me proteger,

Aos e aos meus incríveis pais, Pedro e Noemia,

E às pessoas que acreditam na educação como único meio de revolucionar uma sociedade.

Agradecimentos

À Deus, que é a vontade de cada um estar feliz e que sempre nos mostra isso em nossos caminhos.

Aos meus pais Pedro Batista Filho e Noemia Maria Lemos Batista, amigos incondicionais, inspiradores. Fontes de sabedoria e espiritualidade. Exemplos experiência de vida que me guia.

Aos meus irmãos Talles e Camila pela amizade, carinho e apoio.

À minha sobrinha Cecília por proporcionar alegria a minha família e sorrisos de um tio em Aberdeen.

Às minhas tias, Joana Lemos e Maria José Lemos, pelo apoio e à minha cunhada Daviana, por nos presentear com a preciosa Cecília.

A todos os meus amigos, Bruno Alves, Jairo Lisboa, Samuel Ferreira, Gustavo Barcelos, Denise Grotto, Maria Carneiro, Letícia Nacano, Rodolfo Freitas, Letícia Costa, Vanessa Souza, Murilio Pazin, e Juliana Souza, por me apoiarem nessa caminhada.

Aos especiais amigos Bruno Alves Rocha e Jairo Lisboa Rodrigues.

À uma pessoa especial, Daniele Jacomini, que me acompanhou e apoiou em grande parte dessa jornada.

Ao meu Orientador Dr. Fernando Barbosa Junior pela dedicação e confiança no trabalho de seus alunos.

Ao Dr. Samuel Simião de Souza, pelos ensinamentos, amizade e apoio fundamentais para o meu crescimento e desenvolvimento deste trabalho.

A Vanessa pela dedicação ao Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

Aos integrantes do grupo TESLA (*Trace Element Speciation Laboratory, University of Aberdeen, School of Natural and Computing Sciences, Department of Chemistry*) Dr. Jörg Feldmann, Dra. Andrea Raab, Dra. Eva Krupp, Dr. Adrien Mestrot, Dra. Sabine Freitag e Dr. Kenneth Amayo e do *Plant and Soil Science (University of Aberdeen)* Dr. Adam Price, Dra. Meher Nigar e Dr. Gareth Norton, pelo apoio nos estudos desenvolvidos no período de estágio deste doutoramento no Reino Unido (Escócia, Aberdeen), e por todos os ensinamentos, amizade e confiança.

A todos (antigos e novos) integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Ana Lúcia, Rosemary e Rosana, pela atenção e dedicação ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido a esse estudo.

RESUMO

Batista, B. L. **Desenvolvimento de métodos rápidos de preparo de amostras para especiação química de arsênio em alimentos por LC-ICP-MS e avaliação das concentrações e do metabolismo em arroz.** 2012. 180f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O arsênio é um dos mais tóxicos elementos químicos e reconhecidamente carcinogênico. Ele pode ser encontrado em alimentos basicamente em 5 formas: arsenobetaina (AsB), dimetil-arsênio (DMA), monometil-arsênio (MMA), arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}), sendo estas duas últimas (As-i) as mais tóxicas. Assim, é de suma importância a utilização da especiação química de As para avaliação dos reais riscos associados à ingestão de alimentos contaminados. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de um método para separação das espécies de As por LC e detecção por ICP-MS; extrações quantitativas das espécies de As de tecidos animais e em grãos de arroz; aplicação dos métodos em amostras de alimentos consumidos no Brasil; e estudo do metabolismo do As em diferentes cultivares de arroz. O método desenvolvido para a extração das espécies de As em tecidos animais (ovo, músculos de ave, peixe e boi, etc.) utilizou apenas metanol (10%v/v) e ácido nítrico (2%v/v) como extratores e 2 minutos de sonicação, mostrando recuperação quantitativa do analito (>88%, n=3) pela análise dos materiais de referência (CE278, DOLT-3, DORM-3 e SRM NIST 1577). No entanto, para a análise de arroz, apenas ácido nítrico 2%v/v foi utilizado como extrator, possibilitando uma recuperação quantitativa (>94%, n=6), quando da análise do material de referência (NIST Rice Flour 1568a). Para a separação cromatográfica foram avaliadas diversas colunas, das quais a troca aniônica (Hamilton PRP-X100[®]) foi utilizada em todos os experimentos. A aplicação dos métodos na análise de alimentos diversos consumidos no Brasil mostrou uma grande variação nas concentrações das diferentes espécies do arsênio em músculos, ovos e, especialmente, no arroz. Devido as altas concentrações de As encontradas em amostras de arroz comercializadas no Brasil (em vários casos com predominância das espécies mais tóxicas, As^{3+} e As^{5+}) e ao grande consumo deste alimento no país e no mundo, foi também realizado um estudo de metabolismo do As em 6 diferentes cultivares. O foco deste estudo foi a síntese de fitoquelatinas (PCs), compostos não peptídicos produzidos por plantas expostas a elementos tóxicos, e sua influência no fator de transferência (TF) do As solo-grãos. O TF do As, assim como a concentração das PCs, variaram em relação aos cultivares (genótipos) estudados. Além disso, as PCs mostraram ter uma forte correlação positiva entre si e com a concentração de As-i nos grãos, bem como uma correlação negativa do TF do As raízes-grãos. Portanto, os métodos desenvolvidos demonstraram fácil aplicação em rotina para avaliação toxicológica dos alimentos em relação às espécies de As e, finalmente, o estudo de metabolismo do As pela planta do arroz pode contribuir para escolha de cultivares que o absorvam menos, reduzindo sua ingestão frente ao consumo de arroz.

Palavras chave: especiação, arsênio, arroz, tecidos, LC/ICP-MS/ESI-MS, fitoquelatinas.

ABSTRACT

Batista, B. L. **Development of rapid methods for sample preparation and chemical speciation of arsenic in foods by LC-ICP-MS and evaluation of metabolism and concentration in rice.** 2012. 180p. Thesis (Ph.D., Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Arsenic is one of the most toxic chemicals and known carcinogen. It can be found in food basically in 5 different forms: arsenobetaine (AsB), dimethyl arsenic (DMA), monomethyl arsenic (MMA), arsenate (As^{5+}) and arsenite (As^{3+}), the latter two forms (i-As) are the most toxic. Thus, it is of extreme importance the use of chemical speciation for the evaluation of the real risks associated to arsenic intake from contaminated food. In this sense, this study aimed develop a simple method for separation of arsenic species by LC and detection by ICP-MS, quantitative extraction of arsenic species from animal tissues and rice grains, the application of the proposed method in the analysis of food samples commercialized in Brazilian markets, and the study of arsenic metabolism in different rice cultivars. The method developed for the extraction of arsenic species in animal tissues (egg, muscle of chicken, fish and cattle, etc.) used only methanol (10%v/v) and nitric acid (2%v/v) as extractant and 2 minutes of sonication, showing quantitative recovery of the analyte (>88%, n=3) when analyzing reference materials (CE278, DOLT-3, DORM-3 e SRM NIST 1577). However, for the analysis of rice grains, only nitric acid (2%v/v) was used as extractant, allowing a quantitative recovery (>94%, n=6), when analyzing the reference material (NIST Rice Flour 1568a). For the chromatographic separation several columns were evaluated and an anion exchange column (Hamilton PRP X-100) was used in all experiments. The analysis of several foods consumed in Brazil, showed a wide variation in the concentrations of different arsenic species in muscle, eggs, and especially in rice. Due to the high concentrations of arsenic found in rice samples (in several cases with predominance of more toxic species, As^{3+} and As^{5+}) and the large consumption of this food in the country and abroad, it was also carried out a study on arsenic metabolism in 6 different rice cultivars. The focus of this study was the synthesis of phytochelatins (PCs), non-peptide compounds produced by plants exposed to toxic elements, and its influence on the transfer factor (TF) soil-grains. The TF of arsenic as well as the concentration of PCs varied in relation to the cultivars (genotype) studied. Furthermore, the PCs have shown a strong positive correlation between themselves and with the concentration of i-As in the grains, and a negative correlation with TF roots-grains. Therefore, the developed method demonstrated feasibility for routine use in toxicological studies of arsenic species in food samples and, finally, the study of arsenic metabolism in rice plant can contribute to the selection of cultivars that absorb less arsenic, thereby reducing the intake of this toxic element by rice consumption.

Keywords: speciation, arsenic, rice, tissues, LC/ICP-MS/ESI-MS, phytochelatins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1.1. Estruturas químicas de algumas espécies de arsênio.	2
FI: forma ionizada. (Adaptado de GONG et al., 2002).	
FIGURA 1.1.2. Metabolismo do arsênio no ser humano. GSH:	4
glutathiona reduzida; AS3MT: arsênio metiltransferase (Cyt 19); SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; GSTO1: glutathiona S-transferase omega-1; MMA ⁵⁺ : ácido mono-metil arsônico; MMA ³⁺ : ácido mono-metil arsonoso; DMA ⁵⁺ : ácido di-metil arsínico; DMA ³⁺ : ácido di-metil arsinoso; TMAO: óxido de tri-metil arsênio (Adaptado de KLAASSEN, 2008).	
FIGURA 4.1.1. Esquema do tratamento aplicado nas amostras de tecidos biológicos para extração das espécies de arsênio.	36
FIGURA 4.2.1. Esquema do tratamento aplicado nas amostras de arroz para extração das espécies de arsênio.	42
FIGURA 4.2.2. Mapa das cidades onde as amostras de arroz comercializadas foram adquiridas. Cidades onde o arroz foi beneficiado: 1: São Borja; 2: Itaqui; 3: Alegrete; 4: Dom Pedrito; 5: Bagé; 6: Pelotas; 7: Camaquã; 8: Sentinela do Sul; 9: Nova Prata; 10: Turvo; 11: Joinville; 12: Osasco; 13: Porto Ferreira; 14: Araguari; 15: Aparecida de Goiânia; 16: Anápolis.	44
FIGURA 4.3.1. Resumo das etapas dos experimentos conduzidos para o estudo do metabolismo do arsênio em arroz e determinação das PCs e PCs-As.	48
FIGURA 4.3.2. Esquema do preparo de amostras para a determinação de PCs livres e PCs-As por LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS.	50
FIGURA 4.3.3. Acoplamento das técnicas analíticas LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS utilizadas para a determinação de PCs livres e PCs-As.	52

- FIGURA 5.1.1.** Cromatograma típico obtido por uma solução estoque 62
de espécies de arsênio $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (expresso como arsênio, $m/z=75$). O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico e as condições analíticas estão nas Tabelas 4.1.1 e 4.2.2.
- FIGURA 5.1.2.** Cromatograma obtido com soluções estoque das 64
espécies de arsênio (2, 5, 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, linha cheia) e gálio (Ga) como padrão interno ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, linha pontilhada). O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico e as condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.
- FIGURA 5.1.3.** Cromatograma obtido por injeção de HCl 1% (v/v) 65
utilizando o método de separação descrito por Sanz et al. (2005a). O tempo de retenção, em minutos, está acima do pico e as condições analíticas são apresentadas na Tabela 4.1.1.
- FIGURA 5.1.4.** Influência do tempo de sonicação na recuperação das 69
espécies de arsênio do material de referência DORM-3 (50mg, $n=3$). Solução extratora: 1mL de metanol 10% (v/v) + ácido nítrico 2% (v/v). As condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.
- FIGURA 5.1.5.** Influência da massa de amostra na recuperação das 70
espécies de arsênio do material de referência DORM-3 ($n=3$). Tempo de extração: 2 minutos; solução extratora 1mL de solução de metanol 10% (v/v) + ácido nítrico 2% (v/v). As condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.
- FIGURA 5.1.6.** Cromatogramas obtidos de amostras reais aplicando 74
o método proposto: (A) ovo de galinha e (B) peixe (*Tilapia mariae* b). As concentrações estão na Tabela 5.1.2. O tempo de retenção está acima de cada pico, em minutos e as condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.
- FIGURA 5.2.1.** Estudo da influência do tempo de extração das 82
espécies de arsênio do arroz em função da recuperação. Material de referência NIST 1568a, recuperação dada como soma das concentrações das espécies de arsênio. Extração conduzida de acordo com os dados da condição F da Tabela 5.2.1. As condições analíticas estão na Tabela 4.2.2.

- FIGURA 5.2.2.** Estudo da influência da massa na extração das espécies de arsênio do arroz em função da recuperação. Material de referência NIST 1568a, recuperação dada como soma das concentrações das espécies de arsênio. Extração conduzida de acordo com os dados da condição H da Tabela 5.2.1. As condições analíticas estão na Tabela 4.2.2. 82
- FIGURA 5.2.3.** Cromatogramas típicos obtidos para: (a) soluções estoque de espécies de arsênio $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (expresso como arsênio) e (b) amostra de arroz do Rio Grande do Sul. O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico, o método de extração aplicado está representado na Figura 4.2.1 e as condições analíticas na Tabela 4.2.2. 86
- FIGURA 5.2.4.** Principais partes da planta do arroz (*Oryza sativa L.*). 1: panícula; 2: colmo (caule); 3: folha; 4: raiz; 5: casca; 6: pericarpo; 7: tegumento; 8: nucelo; 9: aleurona; 10: endosperma; 11: embrião; 12: farelo (Adaptada de: RBO, 2012 e HSW, 2012). 88
- FIGURA 5.2.5.** Distribuição de arsênio total nas amostras analisadas de grãos de arroz do Brasil. 90
- FIGURA 5.2.6.** Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\blacksquare$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz branco (B e OB) e avaliação quanto ao limite (—) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). 99
- FIGURA 5.2.7.** Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\blacksquare$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz integrais (I e PI) e avaliação quanto ao limite (—) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). 100
- FIGURA 5.2.8.** Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\blacksquare$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz parboilizado (PB e PO) e avaliação quanto ao limite (—) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). 100

- FIGURA 5.3.1.** Diagrama esquemático da absorção de arsênio (As) e 105
metabolismo por células de raízes de plantas não hiperacumuladoras (a) e hiperacumuladoras (b). A espessura da linha indica a capacidade de efluxo. A linha pontilhada indica o efluxo mais lento. As interrogações significam lacunas conhecidas. GSH: glutatona; GSSG: glutatona oxidada; PC: fitoquelatina (Adaptado de ZHAO et al. 2009).
- FIGURA 5.3.2.** Determinação das intensidades de arsênio (As), gálio 110
(Ga) e enxofre (S) com solução de calibração inserida pós-coluna utilizando o programa de eluição por gradiente do LC e injeção de um branco.
- FIGURA 5.3.3.** Diferenças nas intensidades dos sinais de enxofre (S) 111
(amostra controle do cultivar Itálica Carolina) e arsênio (As) (amostra exposta de Itálica Carolina) antes (linha azul) e após (linha vermelha) a correção matemática para compensação da variação de metanol.
- FIGURA 5.3.4.** Injeção sequencial dos padrões de enxofre (S) (5- 115
5000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e arsênio (As) (1-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) no sistema LC-HR-ICP-MS (a, linha vermelha As e linha azul S) e curvas de calibração analíticas de As (b) e S (c) elaboradas a partir das áreas dos picos com as correções matemáticas descritas.
- FIGURA 5.3.5.** Determinação por LC/HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI- 117
MS de PCs livres e PCs-As em raízes do cultivar Itálica Carolina exposto a arsenato. HR-ICP-MS: ^{32}S (linha preta); ^{75}As (linha vermelha). LTQ Orbitrap ESI-MS: 1 $^{\alpha}$: GSH; 2 $^{\beta}$: GSSG; 3 $^{\alpha}$: OH-Me-PC2; 4 $^{\alpha}$: PC2 reduzida; 5 $^{\alpha}$: DesGly-PC2; 6 $^{\alpha}$: PC2 auto-oxidada; 7-8 $^{\alpha}$: Iso-PC2-Glu; 9 $^{\beta}$: OH-Me-PC3-As; 10 $^{\beta}$: PC3; 11 $^{\beta}$: PC3-As; 12 $^{\beta}$: DesGly-PC3-As; 13 $^{\beta}$: Iso-PC3-Glu; 14 $^{\beta}$: Iso-PC3-Glu-As; 15-16 $^{\beta}$: PC4-As. a: picos de As inorgânico e sulfatos; j, l, m, o, p, q: picos de PCs-As; a", b", c" e d": complexos não identificados contendo As; b até q: peptídeos contendo As ou S e a correspondência do tempo de retenção entre os picos do HR-ICP-MS e LTQ Orbitrap ESI-MS.

FIGURA 5.3.6. Fórmulas estruturais da glutathione (GSH) e fitoquelatinas livres (PCs livres), massas teóricas e a abreviatura dos nomes.		118
FIGURA 5.3.7. Fórmulas estruturais das fitoquelatinas livres (PCs livres), massas teóricas e abreviaturas dos nomes.		119
FIGURA 5.3.8. Estruturas esquemáticas representando as ligações do arsenito às fitoquelatinas. São observadas três isoformas para As(III)-PC3. Glu: ácido glutâmico; Cys: cisteína; Ser: serina; Gly: glicina.		120
FIGURA 5.3.9. Análise de raízes de arroz (cultivar Itálica Carolina, controle e expostas) por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS. Em A1 e B1 (m/z 308 e 483, respectivamente) observam-se o espectro de massas dos analitos e em A2 e B2 (m/z 179 e 354, respectivamente) os respectivos espectros dos íons fragmentos (perda de ácido glutâmico, 129 uma).		121
FIGURA 5.3.10. Análise de raízes de arroz (cultivar Itálica Carolina expostas ao As) por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS. Em C1, D1 e E1 (m/z 772, 612 e 787, respectivamente) observam-se o espectro de massas dos analitos e em C2, D2 e E2 (m/z 643, 483 e 658, respectivamente) os respectivos espectros dos íons fragmentos (perda de ácido glutâmico, 129 uma).		122
FIGURA 5.3.11. Correlações entre: A) massa dos grãos produzidos pelas plantas de arroz e a concentração de arsênio total ([As]) nas raízes; B) massa dos grãos produzidos pelas plantas de arroz e a concentração total de fitoquelatinas (PCs) nas raízes.		133
FIGURA 5.3.12. Determinação das espécies de arsênio presentes no material de referência Rice Nist 1568a utilizando peróxido de hidrogênio para conversão do As^{3+} em As^{5+} .		135

FIGURA 5.3.13. Concentração das espécies de arsênio: arsênio 137

inorgânico (As-i), dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA) nos grãos dos diferentes cultivares. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. IC: Italica Carolina; DS: Dom Sofid; 9: 9524; K: Kitrana 508; Y: YRL-1; L: Lemont; (c): controles; (e): expostos; *: diferenças significativas entre controles e expostos ($p < 0,05$).

FIGURA 5.3.14. Fator de transferência do arsênio do solo para os 142

grãos (A) e do solo para os caules (B) dos cultivares estudados. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. IC: Italica Carolina; DS: Dom Sofid; 9: 9524; K: Kitrana 508; Y: YRL-1; L: Lemont; (c): controles; (e): expostos; diferenças significativas entre controles e expostos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

FIGURA 5.3.15. Correlação entre a razão da concentração de 146

arsênio inorgânico (As-i) nos grãos de arroz de plantas expostas e controles e a razão da concentração de fitoquelatinas (PCs) nas raízes de plantas expostas e controles.

FIGURA 5.3.16. Prováveis vias de biossíntese das 148

fitoquelatinas (PCs) nas raízes de arroz (família Poaceae). Esquema elaborado de acordo com as descrições de Klapheck, Fliegner e Zimmer (1994), Cobbett (2000), Cobbett e Goldsbrough (2002), Wood e Feldmann (2012) e as correlações entre as PCs encontradas neste estudo. LMW: baixa massa molecular; HMW: alta massa molecular; PCS: PC sintase; GCS: γ -glutamilcisteína sintetase; GS: glutatona sintetase; 1: absorção de arsênio pela célula da raiz; 2: produção da PC de menor massa molecular; 3: complexação das PCs ($2PC_2 + As^{3+}$ ou $PC_3 + As^{3+}$) com o arsênio para armazenamento no vacúolo.

FIGURA 5.3.17. Resumo geral dos eventos observados no 150

presente estudo. Observa-se com o aumento da disponibilidade de arsênio no solo (em vermelho): i) maior concentração de DMA e MMA nos grãos (em geral); ii) influência nas concentrações de arsênio total nas diferentes partes da planta, no fator de transferência do arsênio e produção de PCs.

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1.2.1. Compostos de arsênio utilizados como aditivos para alimentação animal.		14
TABELA 4.1.1. Condições operacionais do LC-ICP-MS para determinação de arsênio total e especiação de arsênio em amostras de tecidos biológicos.		34
TABELA 4.2.1. Programa de aquecimento do forno de microondas para digestão das amostras de arroz.		39
TABELA 4.2.2. Condições operacionais do LC e ICP-MS para determinação de arsênio total e espécies de arsênio em Material de Referência e amostras de arroz.		40
TABELA 4.3.1. Programa de aquecimento por microondas utilizado na digestão das amostras para determinação de arsênio total e extração das espécies químicas dos grãos de arroz para especiação.		54
TABELA 5.1.1. Resumo dos métodos cromatográficos avaliados para separação das espécies de arsenobetaina (AsB), arsenito (As ³⁺), dimetil arsênio (DMA), monometil arsênio (MMA) e arsenato (As ⁵⁺).		61
TABELA 5.1.2. Especiação de arsênio em materiais de referência (em negrito) e diferentes amostras utilizando o método proposto. Os valores encontrados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=3; ^A : ng g ⁻¹ ; ^B : µg g ⁻¹ ; LD: limite de detecção.		75
TABELA 5.2.1. Resumo dos métodos avaliados para extração das espécies de arsênio do material de referência NIST 1568a Rice Flour (valor de certificado para arsênio: 290±30 ng g ⁻¹ , recuperação calculada a partir da média deste valor).		81
TABELA 5.2.2. Comparação da concentração das espécies de arsênio encontradas no material de referência Rice Flour NIST 1568a em diferentes estudos (Valor certificado: 290±30 ng g ⁻¹ As).		85

TABELA 5.2.3. Espécies de arsênio em amostras de arroz 93	93
beneficiadas em cidades do Rio Grande do Sul (n=32).	
TABELA 5.2.4. Espécies de arsênio em amostras de arroz de outros 94	94
estados do Brasil (n=12).	
TABELA 5.2.5. Comparação da concentração (ng g^{-1}) das espécies de 102	102
arsênio nas amostras de arroz de diferentes países (média (mínimo-máximo)).	
TABELA 5.3.1. Massas teóricas exatas, massas experimentais, 116	116
exatidão das massas (ΔM) e tempo de retenção (TR) de todas as PCs livres e PCs-As identificadas neste estudo. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão, exceto para a massa teórica exata.	
TABELA 5.3.2. Descrição e avaliação das características das plantas 127	127
dos cultivares. Resultados representados como média ou média $\pm$ desvio padrão.	
TABELA 5.3.3. Concentrações de GSH, PCs livres e PCs-As nos 128	128
cultivares avaliados. Resultados expressos como mg PC Kg^{-1} de raízes $\pm$ desvio padrão; *: diferenças significativas entre controles e expostos ($p < 0,05$); ND: não detectado.	
TABELA 5.3.4. Resultados das concentrações de arsênio total nos 129	129
materiais de referência certificados utilizados para controle da qualidade nas análises. Análises em triplicata, resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão, em mg kg^{-1} .	
TABELA 5.3.5. Análise descritiva da concentração total de arsênio no 131	131
solo e nas diferentes partes das plantas de arroz. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mínimo-máximo), em mg kg^{-1} das amostras secas.	
TABELA 5.3.6. Determinação das espécies de arsênio no material de 134	134
referência de farelo de arroz Rice Flour NIST 1568a.	
TABELA 5.3.7. Correlações entre os analitos presentes nos grãos (As- 145	145
t, DMA, MMA e As-i), nas raízes (GSH, PCs livres e PCs-As) e TF das amostras expostas ao arsenato.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9: cultivar 9524

ACGIH: American Conference of Industrial Hygienists

Ala: alanina

As³⁺: arsenito

As⁵⁺: arsenato

As-t: arsênio total

AsB: arsenobetaína

AsC: arsenocolina

As-i: arsênio inorgânico

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B: arroz branco

Cys: cisteína

cps: contagens por segundo

DMA: dimetil-arsênio

DS: cultivar Dom Sofid

EFSA: European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization

Gly: glicina

Glu: ácido glutâmico

GSH: glutathiona

GSSG: glutathiona reduzida

HR-ICP-MS: Espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado

HR-LTQ Orbitrap ESI-MS: espectrometria de massas de alta resolução com eletrospray

I: arroz integral

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: cultivar Italica Carolina

ICP-MS: Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

K: cultivar Kitrana 508

L: cultivar Lemont

LC: Cromatografia líquida de alta eficiência

LC-ICP-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

LC/ICP-MS/ESI-MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada simultaneamente à espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado e à espectrometria de massas de alta resolução com eletrospray

MeOH: metanol

MMA: monometil-arsênio

NIST: National Institute of Standards and Technology

OB: arroz orgânico branco

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: arroz parboilizado branco

PCs: fitoquelatinas

PCs livres: fitoquelatinas livres

PCs-As: fitoquelatinas ligadas ao arsenito

PI: arroz parboilizado integral

PO: arroz parboilizado orgânico

Ser: serina

TF: fator de transferência

Y: cultivar YRL-1

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
1-Introdução.....	1
1.1- Arsênio.....	1
1.2 - Exposição ao arsênio.....	8
1.3 - Especiação química e ferramentas analíticas utilizadas.....	17
1.4- Especiação química de arsênio.....	21
2. Objetivos.....	26
2.1- Estudo I.....	26
2.2- Estudo II.....	26
2.3- Estudo III.....	26
3. Relevância.....	27
4- Material e Método.....	28
4.1- Estudo I- Desenvolvimento de um método simples e rápido para preparo de diferentes amostras de tecidos biológicos animais (ovo, músculos, fígado, crustáceos e moluscos) e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS.....	28
4.1.1- Equipamentos e acessórios.....	28
4.1.2- Reagentes e preparo de soluções contendo as espécies de arsênio.....	29
4.1.3- Avaliação de métodos cromatográficos para separação das espécies arsenobetaína (AsB), arsenito (As ³⁺), dimetil arsênio (DMA), monometil arsênio (MMA) e arsenato (As ⁵⁺).....	31
4.1.4- Avaliação do uso de padrão interno e da interferência pelo poliatômico ⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺	31
4.1.5- Avaliação do uso de metanol e ácido nítrico na solução extratora, estudo da influência do tempo e da massa de amostra na extração das espécies de arsênio e parâmetros analíticos de validação.....	32
4.1.6- Determinação de arsênio total em amostras e materiais de referência de tecidos diversos.....	32
4.1.7- Especiação de arsênio em amostras de tecidos biológicos (músculos de peixe, boi e frango, ovo, moluscos e material de referência) por LC-ICP-MS.....	33
4.1.8- Preparo das amostras de tecidos biológicos e material de referência para extração e especiação de arsênio por LC-ICP-MS.....	35
4.1.9- Seleção dos materiais de referência, das amostras de tecidos, pré-tratamento e aplicação do método.....	37

4.2- Estudo II- Validação de um método simples para preparo e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS em grãos de arroz e avaliação da concentração dessas espécies em amostras de grãos comercializadas no Brasil.....	38
4.2.1- Equipamentos, reagentes e soluções.....	38
4.2.2- Determinação de arsênio total em amostras e material de referência (NIST 1568a) de arroz.....	38
4.2.3- Avaliação dos métodos de extração das espécies de arsênio de amostras de arroz e estudos da influência do tempo e da massa na eficiência da recuperação.....	39
4.2.4- Método validado para preparo das amostras de arroz para especiação de arsênio por LC-ICP-MS.....	41
4.2.5- Seleção das amostras de arroz e pré-tratamento.....	43
4.3- Estudo III: Estudo do metabolismo do arsênio e dos efeitos da exposição em diferentes cultivares de arroz e identificação e quantificação das fitoquelatinas envolvidas por meio de técnicas avançadas de especiação (LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS).....	45
4.3.1- Equipamentos, reagentes e soluções.....	45
4.3.2- Condições de cultivo do arroz.....	46
4.3.3- Colheita das plantas de arroz, preparo das amostras para identificação e quantificação de PCs livres e PCs-As em raízes, determinação de arsênio total (solos, raízes, caules e grãos) e espécies de arsênio (DMA, MMA e As-i) em grãos.....	48
4.3.4- Quantificação das fitoquelatinas (PCs) livres e fitoquelatinas ligadas ao arsênio (PCs-As) por LC-HR-ICP-MS.....	52
4.3.5- Preparo das amostras de arroz para determinação de arsênio total e análise por especiação química.....	53
4.3.6- Avaliação do fator de transferência do arsênio nos cultivares de arroz.....	55
4.3.7- Análise estatística dos dados.....	56
5- Resultados e Discussão.....	57
5.1- Estudo I: Desenvolvimento de um método simples e rápido para preparo de diferentes amostras de tecidos biológicos animais (ovo, músculos, fígado, crustáceos e moluscos) e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS.....	57
5.1.1- Preparo dos padrões de calibração contendo arsênio e particularidades da especiação química utilizando LC-ICP-MS.....	58
5.1.2- Avaliação dos métodos de separação das espécies de arsênio (AsB, As ³⁺ , DMA, MMA e As ⁵⁺).....	59
5.1.3- Estudos preliminares no desenvolvimento do método analítico para preparo de amostras de tecidos animais.....	62
5.1.4- Avaliação do uso do metanol e ácido na extração.....	65
5.1.5- Avaliação da extração com extrator contendo metanol e ácido nítrico associado à energia ultrassônica.....	67
5.1.6- Avaliação da influência da massa da amostra.....	69

5.1.7- Avaliação da interconversão das espécies de arsênio.....	71
5.1.8- Estudos de validação do método.....	71
5.1.9- Especiação de arsênio em diferentes amostras reais contendo arsênio.....	72
5.2 Estudo II: Validação de um método simples para preparo e determinação das espécies de arsênio (AsB, As3+, DMA, MMA e As5+) por LC-ICP-MS em grãos de arroz e avaliação da concentração dessas espécies em amostras de grãos comercializadas no Brasil.....	76
5.2.1- Avaliação de métodos de extração das espécies de arsênio em arroz.....	76
5.2.2- Validação do método de extração, quantificação e controle de qualidade das análises.....	83
5.2.3- Considerações sobre o arroz e sua relação com o arsênio.....	87
5.2.4- Concentração de arsênio total nas amostras de arroz do Brasil e comparação com valores obtidos em amostras de outros países.....	89
5.2.5- Especiação de arsênio em amostras de arroz do Brasil.....	94
5.2.6- Arsênio inorgânico, DMA e MMA nas amostras de arroz brasileiras.....	97
5.2.7- Concentrações das espécies de arsênio em amostras de diferentes países.....	101
5.3- Estudo III: Estudo do metabolismo do arsênio e dos efeitos da exposição em diferentes cultivares de arroz e identificação e quantificação das fitoquelatinas envolvidas por meio de técnicas avançadas de especiação (LC-HR-ICP- MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS).....	103
5.3.1- Uma visão mais detalhada do metabolismo do arsênio em arroz.....	103
5.3.2- Quantificação de GSH, PCs livres e PCs-As por LC-HR-ICP- MS e identificação por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap HR-ESI- MS.....	107
5.3.3- Avaliação da influência do solo contaminado com arsênio no desenvolvimento dos cultivares experimentais e no comportamento fitoquímico (PCs e espécies de arsênio).....	123
5.3.4- Avaliação do fator de transferência do arsênio nos cultivares estudados.....	139
5.4.5- Correlações entre as concentrações de PCs, arsênio e fatores de transferência entre todos os cultivares estudados.....	143
6- Conclusões.....	151
7- Referências Bibliográficas.....	153
8- Anexo.....	179
Anexo A: Realização de parte do Doutorado no exterior.....	179
Anexo B: Artigos científicos publicados relacionados com a Tese....	180

1-Introdução

1.1- Arsênio

O arsênio é um semi-metal de massa atômica 75 uma, tóxico, carcinogênico e amplamente distribuído na biosfera. A palavra arsênio deriva da palavra persa “Zarnikh”, traduzida para o grego como “arsenikon”, que significa pigmento amarelo (As_2S_3). O arsênio era conhecido no passado como o “veneno” dos reis e o rei dos “venenos” (KLAASSEN, 2008). Os oceanos possuem uma concentração média deste elemento químico de 2 a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a crosta terrestre uma média de 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (PETROPULU, VARSAMIS e PARISSAKIS, 1997).

Os compostos de arsênio, especialmente o trióxido de arsênio (As_2O_3), eram utilizados no passado em tratamentos médicos de sífiis e tripanossomíase e, até mesmo hoje, são ainda encontrados em medicamentos utilizados no tratamento contra leucemia promielocítica (SOIGNET et al., 2001). O arsênio está no ambiente geralmente em diversas formas químicas que apresentam toxicidades bem diferenciadas. O arsênio inorgânico pode existir na natureza na forma trivalente como o As_2O_3 ou arsenito de sódio (NaAsO_2) ou ainda na forma pentavalente como arsenato de sódio (Na_2AsO_4), pentóxido arsênico (As_2O_5) e ácido arsênico (H_3AsO_4). Os compostos organo-arsenicais, incluindo o ácido arsanílico, arseno-açúcares e várias formas metiladas são produzidos por meio de biotransformação em vários organismos, incluindo os seres humanos (KLAASSEN, 2008). Na Figura 1.1.1 são mostradas as principais formas químicas do arsênio.

Em geral, algumas fontes de exposição incluem fumaças e poeiras industriais (fundição) ou na fabricação de praguicidas, herbicidas e outros produtos de uso agropecuário (ATSDR, 2005). Produtos agropecuários, de origem vegetal ou animal, uma vez tratados com esses praguicidas podem expor a população por meio da alimentação (grãos, frutos, folhas) ou contaminação de solos e águas de abastecimento, chegando ao organismo humano (SILBERGELD e NACHMAN, 2008).

FIGURA 1.1.1. Estruturas químicas de algumas espécies de arsênio. FI: forma ionizada. (Adaptado de GONG et al., 2002).

No homem, o arsênio pode ser absorvido por todas as vias, mas a via oral é a principal (80-90%) sendo que, por inalação, de 25 a 40% deposita-se nos pulmões (WHO, 1981). A exposição por via oral é mais comum devido a sua presença em organismos marinhos (peixes e crustáceos) utilizados como alimentos, onde os principais compostos presentes são arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC) e arseno-açúcares (SHIBATA, MORITA e FUWA, 1992; MA e LE, 1998; HSUEH et al., 2002). O arsênio é distribuído pelo organismo ligado às proteínas plasmáticas, acumulando-se no fígado e rins em exposições agudas e, nos pelos, unhas e cabelos em exposições crônicas. As formas inorgânicas sofrem metilação formando o ácido monometil-arsônico (MMA) e o ácido dimetil-arsínico (DMA). O As^{5+} (arsenato) é rapidamente reduzido pela enzima arsenato redutase a As^{3+} (arsenito) (APOSHIAN e APOSHIAN, 2006) que é 60 vezes mais tóxico que o As^{5+} (Figura 1.1.2). O As^{3+} é metilado a metil-arsonato (MMA^{5+}) e, sequencialmente, ao ácido dimetil-arsínico (DMA^{5+}) pela enzima arsênio metil-transferase (KLAASSEN, 2008). A principal via de excreção do arsênio é a urinária. Para indivíduos expostos ao arsênio inorgânico, as formas principais encontradas na urina são: 60-80% na forma de DMA, 10-20% como MMA e 10-20% como arsênio inorgânico (FELDMANN et al., 1999; APOSHIAN e APOSHIAN, 2006).

Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA^{5+} e DMA^{5+}) (CHATTERJEE et al., 1995), porém as espécies intermediárias MMA^{3+} e DMA^{3+} podem chegar a ser mais tóxicas que as formas inorgânicas por se ligarem à hemoglobina e outras proteínas no sangue (APOSHIAN e APOSHIAN, 2006; THOMAS et al., 2007). Arsenobetaína (AsB) e arsenocolina (AsC), encontradas em alimentos de origem marinha, não são

biotransformadas, sendo excretadas inalteradas na urina. Arseno-açúcares sofrem biotransformação principalmente a DMA (KLAASSEN, 2008).

A ordem crescente de toxicidade dos compostos de arsênio é: arsênio elementar (As^0) < compostos orgânicos de arsênio (DL_{50} AsC e AsB 10g kg^{-1}) < ácidos alquil-arsênicos (DL_{50} MMA $700\text{-}1800\text{ mg kg}^{-1}$ e DMA $700\text{-}2600\text{ mg kg}^{-1}$) < arsenato (DL_{50} As^{5+} 20 mg kg^{-1}) < arsenito (DL_{50} As^{3+} 14 mg kg^{-1}) < arsina (DL_{50} AsH_3 3 mg kg^{-1}) (SHIBATA, MORITA e FUWA, 1992; MA e LE, 1998; HSUEH et al., 2002; EVISA, 2010).

FIGURA 1.1.2. Metabolismo do arsênio no ser humano. GSH: glutatona reduzida; AS3MT: arsênio metiltransferase (Cyt 19); SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; GSTO1: glutatona S-transferase omega-1; MMA⁵⁺: ácido mono-metil arsênico; MMA³⁺: ácido mono-metil arsonoso; DMA⁵⁺: ácido di-metil arsínico; DMA³⁺: ácido di-metil arsinoso; TMAO: óxido de tri-metil arsênio (Adaptado de KLAASSEN, 2008).

Entretanto, essa metabolização não é a mesma para todos os indivíduos, ocorrendo grandes variações na metilação do arsênio devido a fatores como idade, sexo, etnia, dose de exposição, gravidez, estado nutricional e polimorfismo genético (VAHTER 2000; VAHTER, CONCHA e NERMELL, 2000). Vários grupos étnicos parecem ser bem semelhantes quanto à distribuição relativa média do arsênio e seus metabólitos na urina quando não consideramos o tipo e o tempo de exposição. Entretanto, há certas exceções, como a comparação entre os indígenas do norte da Argentina, que excretam uma baixa percentagem de MMA, com indivíduos de Taiwan, que excretam em média 27% (VAHTER et al., 1995; CHIOU et al., 1997; CONCHA, NERMELL e VAHTER, 1998).

Vários estudos apontam que os homens são mais susceptíveis que as mulheres aos efeitos na pele relacionadas ao arsênio devido à menor capacidade de metilação pelos homens (GUHA MAZUMDER et al., 1998; KADONO et al., 2002; CHEN et al., 2005; VAHTER et al., 2007). Durante a gestação há um aumento na excreção urinária de DMA e uma diminuição de espécies inorgânicas e MMA, que pode afetar o desenvolvimento fetal (HOPENHAYN et al., 2003). Já está bem estabelecido que uma diminuída capacidade de metilação do arsênio está relacionada ao aumento de arsênio nos tecidos em geral o que, provavelmente, corresponde ao aumento de toxicidade deste elemento (MARAFANTE e VAHTER, 1984; MARAFANTE, VAHTER e ENVAL, 1985; CONCHA, NERMELL e VAHTER, 1998).

Quanto ao polimorfismo genético, há no mínimo duas enzimas relacionadas às vias metabólicas de metilação e remetilação que podem afetar significativamente a metilação do arsênio. A metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHRF), relatada por Brouwer et al. (1992) como enzima chave na remetilação da homocisteína, quando

deficiente no organismo, resulta em homocisteinemia, homocistinúria e hipometioninemia, especialmente com baixa ingestão de metionina. A betacistationina sintase, responsável pela degradação da homocisteína em cistationina, também leva a homocisteinemia e homocistinúria, resultando em um decréscimo de metilação do arsênio com aumento de seu potencial de toxicidade.

Quanto aos mecanismos de toxicidade das espécies de arsênio em animais, os compostos trivalentes são tiol-reativos, sendo assim, inibem enzimas ou alteram proteínas por reagirem com grupos tiol de proteínas. O arsênio pentavalente é um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, através de um mecanismo provavelmente relacionado à substituição competitiva (mimetismo) do arsenato pelo fosfato na formação do trifosfato de adenosina. Já a forma mais tóxica, o gás arsina, uma vez inalado, chega à corrente sanguínea causando hemólise (NRC, 2001).

Somado a estes mecanismos básicos de ação, vários outros mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade e carcinogenicidade do arsênio. O arsênio e seus metabólitos têm mostrado capacidade de produzir oxidantes, dano oxidativo e alteração no estado de metilação do DNA, instabilidade genômica, comprometimento do reparo de danos ao DNA e aumento da proliferação celular (NRC 2001; ROSSMAN, 2003). Ao contrário de alguns carcinógenos, o arsênio não é um agente mutagênico para bactérias e age fracamente em células de mamíferos, mas pode induzir anormalidades cromossômicas, aneuploidia e formação de micronúcleos. O arsênio também pode agir como um co-mutagênico e/ou co-carcinogênico sendo ativado, por exemplo, por irradiação ultravioleta, produzindo câncer de pele (ROSSMAN, 2003; CHEN et al., 2005).

A exposição crônica ao arsênio também causa doenças vasculares periféricas, cardíacas e anemia (LEE et al., 2004; ATSDR, 2005; BISWAS et al., 2008). No caso da anemia, possivelmente devido às mudanças na membrana dos eritrócitos como o aumento da razão colesterol/fosfolípídio provocada pelo arsênio, os eritrócitos com deformação reversível não voltam à forma normal ocasionando então eritrofagocitose, hemólise e finalmente anemia (BISWAS et al., 2008). Quanto às desordens cardiovasculares, a exposição ao arsênio é associada em vários estudos à hipertensão e arritmias, disfunção vascular endotelial (por inativar a enzima óxido nítrico sintase endotelial), indução do estresse oxidativo, indução da arterosclerose (por aumentar a agregação plaquetária e reduzir a fibrinólise) e a sobre regulação de alguns intermediadores químicos celulares como fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e fator de crescimento endotelial que induz doenças cardiovasculares (BALAKUMAR e KAUR, 2009). Esses mecanismos não são mutuamente exclusivos e apontam provavelmente para mecanismos múltiplos de toxicidade e carcinogenicidade. Alguns mecanismos, entretanto, podem ser específicos de um órgão.

1.2 - Exposição ao arsênio

A sintomatologia da exposição aguda ao arsênio é a mesma para derivados orgânicos e inorgânicos, ou seja, quadro gastroenterítico grave com início após 30 minutos de exposição. A exposição crônica é observada ocupacionalmente e em pacientes tratados com compostos contendo arsênio, além de populações expostas através da água contaminada com arsênio (WHO, 1981). A exposição humana ao arsênio e seus compostos podem resultar em desenvolvimento de câncer de pele, pulmão, fígado, bexiga, rins e cólon e é reconhecido pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) e pela “American Conference of Industrial Hygienists” (ACGIH) como carcinogênico humano (BASU et al., 2001; ACGIH, 2003; IARC, 2004; ATSDR, 2005).

Várias são as maneiras pelas quais a população pode estar exposta ao arsênio. Em Bangladesh, devido à contaminação da população por doenças transmitidas pela água, como cólera e algumas verminoses, o governo, em conjunto com a Organização Mundial da Saúde (OMS), decidiram realizar a perfuração de poços artesianos. Porém, eles não contavam com a presença de arsênio no solo desta região, o que expôs cerca de 50 milhões de pessoas ao arsênio por meio do consumo da água dos poços (BGS, 2001). Ainda em Bangladesh, Huq et al. (2001) demonstraram que a fonte de exposição ao As se devia não apenas a ingestão de água contaminada, mas também pelo uso desta na irrigação com consequente contaminação dos alimentos. Na mesma região, Alam, Snow e Tanaka (2003) observaram que, além do arsênio, outros contaminantes como cádmio e chumbo,

estão presentes nos alimentos em concentrações maiores que em outras partes do mundo.

O arsênio foi considerado por vários anos a substância mais perigosa à saúde humana (ATSDR, 2003) sendo classificado de mediano a altamente tóxico para as plantas e altamente tóxico para mamíferos (McBRIDE, 1989). Outro ponto importante sobre a exposição aos compostos de arsênio é um relato de caso sobre uma menina de 16 anos exposta ao praguicida arsenito acetato de cobre. Devido a sua deficiência da enzima MTHFR, ela apresentava altas concentrações de homocisteína no plasma e na urina, além de elevadas concentrações de arsênio na urina e sintomas de neurotoxicidade. Apesar do restante da família ter o mesmo histórico de exposição ao praguicida, apenas ela desenvolveu os sintomas (BROUWER et al., 1992).

Além deste praguicida, existem outros que apresentam arsênio na sua composição. No Brasil, o herbicida monossódio metil-arsenato, que possui arsênio como um dos principais constituintes de sua formulação, é utilizado em culturas de algodão, café e cana-de-açúcar, expondo vários trabalhadores rurais a este semi-metal tóxico (BRASIL, 2004). Outra possível fonte de exposição são os fertilizantes, que contêm vários elementos químicos tóxicos em sua composição (PROCHNOW, PLESE e ABREU, 2001). Alguns elementos químicos tóxicos presentes no ambiente que apresentam a capacidade de se acumular nos vegetais e entrarem na cadeia alimentar podem ser provenientes de fontes naturais como rochas (que possuem em sua composição arsênio ou mercúrio, por exemplo) ou de fontes antropogênicas (como mineração, fundição, produção de fios elétricos, uso de preservantes em madeiras, exaustão de gases, despejo de resíduos em esgotos, produção e uso de combustíveis, energia elétrica, fertilizantes e praguicidas) (KABATA-PENDIAS e

PENDIAS, 1989; DEVKOTA e SCHMIDT, 2000; FROST e KETCHUM, 2000; ADRIANO, 2001; SINGH et al., 2004; MAPANDA et al., 2005;).

No Brasil, a mineração tem contribuído para a dispersão no ambiente de arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio e outros elementos, contribuindo para entrada destes na cadeia alimentar. Um exemplo disso é a alta concentração de elementos químicos tóxicos no ambiente de regiões de mineração do quadrilátero ferrífero e da Amazônia (MATSCHULLAT, 2000; SANTOS et al., 2003). Em Minas Gerais, mais especificamente na cidade de Paracatu, os rejeitos da exploração do ouro contribuem consideravelmente com a contaminação ambiental com arsênio. A quantidade de arsênio liberado das rochas de mina de ouro foi estimada em 300 mil toneladas onde cerca de 70% estão em duas grandes barragens de rejeitos. Isso eleva consideravelmente a concentração de arsênio livre (MONTE, 2002), aumentando o risco de contaminação do ar, solo, água e alimentos com comprometimento da saúde da população. Ainda em Minas Gerais, foram constatadas nas cidades de Nova Lima, Ouro Preto, Mariana e Santa Bárbara cursos de água e aquíferos com alta concentração de arsênio (até 7000 $\mu\text{g L}^{-1}$) (BUNDSCHUH et al., 2011).

No Amapá, mais especificamente na Serra do Navio, devido à atividade mineradora, houve a contaminação com arsênio da água utilizada na extração de óxidos e hidróxidos de manganês e ferro. Os valores encontrados na água potável, excetuando-se os valores nos pontos de rejeição da mineradora, foram em torno de 8,43 $\mu\text{g L}^{-1}$, ficando abaixo do valor máximo determinado na legislação brasileira que é de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SANTOS et al. 2003), porém esta avaliação sem a determinação de quais formas químicas (espécies químicas) de arsênio estavam presentes pode ser

equivoca, uma vez que, como visto, existem diferenças nas suas toxicidades (BALLIN, KRUSE e RÜSSEL, 1994).

Os alimentos por sua vez são fontes de exposição ao arsênio, uma vez que as plantações podem ser irrigadas com águas e solos contaminados, além do já citado uso de praguicidas contendo este elemento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza valores máximos de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio em água. Em Bangladesh, devido à alta concentração deste elemento no solo a concentração preconizada é de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e, muitas vezes, é excedida (BGS, 2001).

Vários estudos relataram elevadas concentrações de arsênio em arroz cultivado em solos irrigados com águas contaminadas (ALAM e SATTAR, 2000; MEHARG e RAHMAN, 2003; AHMED, 2005; FARID et al., 2005; ISLAM et al., 2005; SAHA e ALI, 2007). O arroz, *Oryza sativa L.*, é um alimento básico para grande parte da população brasileira e mundial, sendo o Brasil o maior produtor não asiático (LAGO et al., 2007). O consumo interno atinge aproximadamente 26,5 kg de arroz/habitante/ano (IBGE, 2010).

O interesse entre a relação arsênio/arroz surge em 1999 quando, Schoof et al., analisando alimentos da cesta básica norte americana, encontrou altas concentrações de arsênio inorgânico em grãos de arroz quando comparados aos outros alimentos. Desde então vários estudos foram conduzidos no sentido de entender essa alta concentração de arsênio no arroz. Em 2007, um relevante estudo conduzido por Williams et al., demonstrou que a planta do arroz é particularmente eficiente em absorver arsênio quando comparada à cevada e ao trigo, representando uma fonte significativa de arsênio (ATSDR, 2007; MEHARG et al., 2009). Smith, Juhasz e Naidu (2008) salientam que é importante se conhecer a

concentração das espécies de arsênio no arroz, uma vez que a proporção de arsênio orgânico/inorgânico tem implicações na avaliação do risco à saúde humana, pois as formas inorgânicas são mais biodisponíveis que as espécies metiladas. Portanto, a concentração total de arsênio não é o melhor parâmetro para se avaliar o risco do consumo de alimentos contendo arsênio (FOÀ et al., 1984; CULLEN e REIMER, 1989).

Deste modo, embasados especialmente nos estudos de Williams et al. (2007) e Schoof et al. (1999), muitos trabalhos foram desenvolvidos relacionando arsênio e arroz, principalmente em locais onde a contaminação do solo com arsênio é alta e/ou o consumo desse cereal é significativo (WILLIAMS et al., 2005; LIANG et al., 2010; BATISTA et al., 2011). Por outro lado, outros estudos objetivaram o entendimento da absorção de arsênio, metabolismo, distribuição, efeitos e acúmulo nas plantas de arroz (ABEDIN et al., 2002; ABEDIN, FELDMANN e MEHARG, 2002; LIU et al., 2006; MEHARG et al., 2008; LOMBI et al., 2009; SHRI et al., 2009; ZHAO et al., 2009; CAREY et al., 2010; ZHANG et al., 2010). O arroz e suas particularidades em relação ao arsênio serão discutidos com detalhes no decorrer deste trabalho.

Assim como o arroz, outros alimentos são fontes de exposição ao arsênio. No Brasil, a legislação para arsênio no leite em pó reconstituído (fluido), pronto para o consumo, é de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, pois houve casos de contaminação do fosfato de sódio, aditivo intencional utilizado como estabilizante, com As_2O_3 , em concentrações de 25 a $28 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 1998; MIDIO e MARTINS, 2000). Alimentos da flora e fauna marinhas também são fontes de exposição para o homem por conterem um grande número de compostos de arsênio, elemento provavelmente trocado por nitrogênio ou

fósforo nas vias metabólicas desses organismos. Tais compostos incluem, além da AsB e AsC, arseno-açúcares de algas (VAN LOON e BAREFOOT, 1992).

Organismos marinhos acumulam quantidades substanciais de arsênio de modo mais eficiente que os organismos terrestres. As algas marinhas absorvem arseniatos, forma predominante de arsênio na água de mar, similar ao fosfato, e o transformam em diferentes ribosídeos contendo arsênio. Assim, provavelmente, os organismos marinhos adquirem arsênio inorgânico através da cadeia alimentar e o transformam em AsB via metilação do MMA e DMA (PETROPULU, VARSAMIS e PARISSAKIS, 1997).

O consumo de carne de animais tratados com compostos arsenicais também é uma importante fonte de exposição. Esses compostos têm sido utilizados na produção de gado, porcos e aves (frango) nos Estados Unidos, China e outros países da América Latina (NRC, 1999). Vários compostos contendo arsênio, entre eles o Roxarsone[®] (ácido arsanílico), são permitidos nos Estados Unidos pelo “Food and Drug Administration” (FDA) como aditivos de ração para suínos e aves com dosagens de 25 a 200 mg kg⁻¹. Esse composto é administrado para promover o crescimento e para prevenção de doenças como disenteria em porcos (SILBERGELD e NACHMAN, 2008). A Tabela 1.2.1 resume os principais compostos de arsênio utilizados como aditivos para alimentação de animais (GONG et al., 2002).

TABELA 1.2.1. Compostos de arsênio utilizados como aditivos para alimentação animal.

Nome	Abreviação	Fórmula química
Ácido <i>p</i> -arsanílico	<i>p</i> -ASA	$\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{AsO}(\text{OH})_2$
Ácido 4-nitrofenil-arsônico	4-NPAA	$\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{AsO}(\text{OH})_2$
Ácido 4-hidroxi-3-nitrofenil-arsônico	4-NHPAA	$\text{NO}_2(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_4\text{AsO}(\text{OH})_2$
Ácido <i>p</i> -ureidofenil-arsônico	<i>p</i> -UPAA	$\text{NH}_2\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{AsO}(\text{OH})_2$

(Adaptado de GONG et al., 2002)

Assim como em muitos outros países asiáticos, a China experimenta uma ampla transformação na produção de alimentos para animais indo de pequenos métodos tradicionais a modelos industriais integrados que vêm utilizando cada vez mais aditivos para o crescimento e profilaxia dos animais. Estudos neste país encontraram até 37 mg kg^{-1} de arsênio em rações de suínos adultos e filhotes, sendo que um terço da ração excedeu o máximo permitido de 2 mg kg^{-1} de arsênio, segundo limites do “Food and Drug Administration” (FDA) (LI et al., 2005; OTTE et al., 2007). Outros valores de referência, segundo o FDA, estão nas partes dos animais tratados com compostos contendo arsênio: $<0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de arsênio nos músculos e $<2 \text{ mg kg}^{-1}$ de arsênio no fígado e rins (SILBERGELD e NACHMAN, 2008). Korsrud et al. (1985) encontraram concentrações de arsênio maiores que o permitido no fígado e rins de porcos, aves e gado no Canadá, e apontam que estes valores se devem a incorporação de compostos organo-arsenicais na ração para promover o crescimento dos animais. Alonso et al. (2000) avaliaram a presença de

arsênio entre outros elementos químicos em fígado, rins, músculos e sangue de bezerros e vacas de abatedouros da região da Galícia na Espanha e constataram que, nas concentrações encontradas, o arsênio não constituía risco a população. Possivelmente esses animais, por serem jovens, possuíam pouco tempo de exposição e, além disso, não se sabe exatamente quais espécies de arsênio estavam presentes.

Assim, estudos na transferência de contaminantes químicos por meio dos alimentos fornecem informações muito úteis ao desenvolvimento de programas de vigilância destinados a garantir a segurança do suprimento de alimentos e minimizar a exposição humana a agentes tóxicos. Nos Estados Unidos, há um rigoroso controle da segurança dos alimentos. Compostos como resíduos de praguicidas, elementos tóxicos (arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio), contaminantes orgânicos (acrilamida, benzeno, dioxinas/bifenilas policloradas, etil carbamatos, furanos, perclorado e radionuclídeos), antibióticos e hormônios são constantemente monitorados nos alimentos. O FDA possui um “web site” com um guia de informação para segurança alimentar que monitora os alimentos dos EUA em busca de contaminantes e nutrientes (ALBRECHT e NAGY-NERO, 2009).

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (“Environmental Protection Agency”, EPA) regulamenta, através de lei, o uso de organo-estanho (tributilestanho) em tintas e controla a concentração em água, sedimentos e organismos aquáticos (EVISA, 2010). A Comunidade Europeia já aprovou várias leis com respeito à segurança alimentar, ambiente e saúde ocupacional com relação à exposição a elementos tóxicos como mercúrio, arsênio, chumbo e cromo. Essas restrições são na maioria dos casos baseadas na concentração total dos elementos, porém, algumas determinações legais referidas a espécies de elementos já são percebidas

como a determinação de compostos orgânicos de fósforo, silício e estanho em poluentes marinhos, cromo VI em embalagem de descarte, veículos inutilizados, equipamentos elétricos e eletrônicos (EVISA, 2010). Assim, vê-se uma crescente preocupação com as espécies dos elementos, não só arsênio, quanto às suas toxicidades, atingindo já o âmbito legislativo.

Quanto aos compostos de arsênio, as informações disponíveis na literatura sobre as espécies químicas e toxicologia ainda não permitem uma detalhada avaliação de risco para a ingestão de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em alimentos. Isso reforça a necessidade de maiores informações sobre essas espécies e especiação química de arsênio para facilitar decisões significativas, com leis estabelecendo as diferenças de toxicidade e risco entre as várias espécies de arsênio presentes nos alimentos, garantindo segurança no consumo dos mesmos (BERG e LARSEN, 1999).

1.3 - Especificação química e ferramentas analíticas utilizadas

De acordo com a “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), a análise de especificação é definida como o processo de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas em uma mesma amostra; por outro lado, especificação química de um elemento é definida como a distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema (TEMPLETON et al., 2000).

As atividades antropogênicas podem alterar a forma química ou espécie de um elemento, aumentando o seu potencial tóxico e tornando este mais persistente no ambiente. A análise de especificação para amostras de diversas origens (ambientais, clínicas e de alimentos) está gradualmente se tornando mais aceita para fins de avaliação toxicológica e nutricional.

Existem vários aspectos importantes sobre o conceito de especificação que são relevantes para a saúde humana, como a identificação de formas específicas de um determinado elemento que exibe seus mais danosos efeitos tóxicos, elucidação sobre quais espécies de um elemento essencial está mais biodisponível e a quantificação de um elemento em relação às moléculas biológicas que está ligado, facilitando, assim, o conhecimento sobre toxicocinética, toxicodinâmica e os efeitos tóxicos das diferentes espécies de um elemento (PARSONS e BARBOSA, 2007).

Mais de 20 espécies de arsênio estão presentes no ambiente e em sistemas biológicos (GONG et al., 2002). Diferenças na sua toxicidade, comportamento bioquímico e ambiental reforçam a necessidade da determinação dessas espécies individualmente através da especificação. Técnicas hifenadas envolvendo separação

de alta eficiência e detectores de elevada sensibilidade têm se tornado as técnicas de escolha. Técnicas de separação baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (LC), cromatografia gasosa, cromatografia por fluido supercrítico e eletroforese capilar ligadas a detectores como espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrômetros de absorção atômica com geração de hidretos (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite ou com chama) ou espectrômetro de massas com “eletrospray” (ESI-MS), têm sido aplicados para a especiação de arsênio tanto em matrizes biológicas (como alimentos de origem marinha e arroz) como ambientais (GONG et al., 2002).

Dentre as técnicas utilizadas para a especiação química, a técnica LC-ICP-MS possui diversas vantagens tais como extrema sensibilidade, capacidade multi-elementar, amplo intervalo de linearidade e capacidade de determinação da razão isotópica, se tornando a ferramenta mais eficiente em laboratórios que trabalham com especiação de arsênio (AMMANN, 2007; PARSONS e BARBOSA, 2007).

Na técnica de ICP-MS, o plasma indutivamente acoplado é uma fonte bem caracterizada de alta temperatura, apropriada para a atomização e ionização de espécies elementares. O plasma, alimentado por argônio gasoso, é contido e formado em uma tocha de quartzo, através de uma fonte de radiofrequência que forma campos elétricos e magnéticos provocando colisões sucessivas do argônio que libera elétrons e energia, excitando e ionizando os analitos (JARVIS, GRAY e HOUK, 1992).

A forma física convencional de introdução da amostra na ICP é como líquido e o sistema típico de introdução de amostra consiste em um nebulizador (pneumático ou de ultrassom), que forma um aerossol fino, seguido por uma câmara de

nebulização que separa as gotas maiores das menores vindas do nebulizador. O aerossol é então transportado para o plasma pelo fluxo do gás nebulizador, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (JARVIS, GRAY e HOUK, 1992).

A ICP produz, eficientemente, íons monocarregados para o espectrômetro de massas (MS). Os íons são então separados no analisador de massas (quadrupolo, geralmente) de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (SUTTON e CARUSO, 1999). A ICP-MS não é livre de problemas, pois durante a análise os elementos químicos podem sofrer significativas interferências, devido a compostos formados por elementos presentes no ar atmosférico, no argônio, água e/ou matriz como de $^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ para a determinação de $^{80}\text{Se}^+$, $^{75}\text{As}^+$ e $^{56}\text{Fe}^+$, respectivamente (DIEGOR; LONGERICH, 2000; TANNER et al., 2002; KOPPENAAL et al., 2004). Para minimizar ou mesmo eliminar as interferências, vários equipamentos com diferentes tecnologias são utilizados, como celas de reação e/ou colisão, equipamentos versáteis para a eliminação de interferentes, dada a oportunidade de escolha de vários gases de reação como Xe, CH_4 , $(\text{CH}_3)_2$, NH_3 , He, e mistura $\text{H}_2:\text{Ar}$ (5:95v/v) injetados no interior da câmara, assim como a eliminação de etapas de pré-tratamento das amostras (BARANOV e TANNER, 1999; BATISTA et al., 2009a; BATISTA et al., 2009b).

O uso do ICP-MS como detector do LC, dependendo do elemento estudado, melhora a sensibilidade em aproximadamente três ordens de grandeza quando comparado aos detectores convencionais, como os de absorvância ultravioleta-visível (UV-Vis) e índice reflectivo. Além disso, a ICP-MS pode ter seu espectrômetro de massas ajustado para monitorar o sinal isotópico de um ou vários elementos ao mesmo tempo sendo um detector altamente seletivo, uma vantagem importante na

análise de matrizes complexas. Outro aspecto relevante é que a cromatografia líquida é a mais fácil técnica de separação cromatográfica para acoplar com a ICP-MS, devido às vazões da ordem de 0,1 a 1,0 mL min⁻¹ utilizadas no LC, compatíveis com o sistema de introdução de amostras no ICP-MS, onde vários nebulizadores podem ser utilizados para corresponder a esse fluxo (SUTTON e CARUSO, 1999).

Finalmente, a fase móvel do LC que elui da coluna está à pressão atmosférica e se torna idealmente apropriada para o sistema de introdução de amostras do ICP-MS. A interface do LC com o ICP-MS é realizada conectando a saída da coluna cromatográfica à entrada do nebulizador com tubo de aço inoxidável ou polímero inerte (SUTTON e CARUSO, 1999).

1.4- Especificação química de arsênio

Estudos de especificação de arsênio utilizando o acoplamento LC-ICP-MS estão se tornando cada vez mais comuns. Os métodos de separação mais utilizados em LC são o pareamento iônico e a troca iônica. O pareamento iônico é aplicado para a determinação de espécies neutras e ionizadas utilizando colunas de cromatografia em fase reversa como C8 e C18. Neste caso, a fase móvel contém um par aniônico ou um par catiônico como o hidróxido ou fosfato de tetrabutilamônio, fazendo a ligação entre o analito e a fase estacionária. Vários trabalhos empregando esse tipo de separação foram aplicados para especificação de arsênio em soro (ZHANG et al., 1996), águas (MARTIN et al., 1995; THOMAS e SNIATECKI, 1995), urina (LE e MA, 1998; LE et al., 2000; WANGKARN e PERGANTIS 2000), arroz (NARUKAWA et al., 2008), vinho, materiais sólidos (de referência), algas (B'HYMER, SUTTON e CARUSO, 1998; WANGKARN e PERGANTIS 2000; DO et al., 2001) e sangue (ITO et al., 2010).

Dependendo das características iônicas dos compostos de arsênio, a troca iônica é o melhor método de separação, onde a troca aniônica é mais comumente utilizada para determinação de As^{3+} , As^{5+} , MMA^{5+} e DMA^{5+} , a troca catiônica é mais utilizada para separar as espécies AsB, AsC, óxido de trimetil-arsina (TMAO) e tetrametil-arsônio (TMA) (GONG et al. 2002). Vários trabalhos utilizaram colunas de troca iônica aplicados para especificação de arsênio em urina (XIE et al., 2006; HEITLAND e KOSTER, 2009), tecidos biológicos (ACKLEY et al., 1999; MAHER et al., 1999), água (AKTER et al., 2005), diversos materiais de referência (FALK e EMONS, 2000), arroz (SANZ et al., 2007), sangue (MAHER et al., 1999; MANDAL et

al., 2004; TSENG et al., 2005), cabelo (RAAB et al., 2002; MANDAL, OGRA e SUZUKI, 2003; KINTZ et al., 2007) e unhas (MANDAL, OGRA e SUZUKI, 2003).

Um passo fundamental para se obter resultados com maior confiabilidade em uma análise de especiação é manter a integridade das espécies químicas durante o preparo das amostras. Procedimentos utilizados para a conservação, tratamento e análises das amostras podem resultar na oxidação das espécies como a conversão de As^{3+} a As^{5+} (HUANG, ILGEN e FECHER, 2010). Neste sentido, vários métodos foram desenvolvidos com o propósito de preservar estas espécies de arsênio nas amostras. Amostras de água de rio e água deionizada foram contaminadas com As^{3+} e As^{5+} , sendo que, em alguns dias, o As^{5+} foi reduzido a As^{3+} (HALL, PELCHAT e GAUTHIER, 1999). Frey et al. (1998) utilizaram ácido ascórbico e ácido clorídrico para preservar as espécies de arsênio e, durante 28 dias, as espécies inorgânicas ficaram preservadas em amostras sintéticas, porém, em água natural, em 8 dias o As^{3+} foi transformado a As^{5+} . Em águas de consumo, ricas em ferro (Fe^{3+}), as espécies de arsênio solúveis podem formar precipitados com o ferro, fornecendo resultados imprecisos. Gallagher et al. (2001a) adicionou EDTA às amostras de água para prevenir a formação dos precipitados. Outros estudos recomendam o congelamento das amostras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservação das espécies inorgânicas de arsênio (GONG et al. 2002). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que as espécies metiladas de arsênio são mais estáveis em amostras de água, urina e arroz (GONG et al. 2002; HUANG, ILGEN e FECHER, 2010).

Larsen, Pritzl e Hansen (1993) observaram que as concentrações de DMA, MMA e AsB em urina não convertem significativamente quando armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frasco âmbar. Jokai, Hegoczki e Fodor (1998) encontraram que, de $0,1$ a $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, as espécies MMA e DMA são estáveis por 5 a 6 meses em água à temperatura

ambiente. Gong et al. (2001) estudaram a estabilidade quanto à oxidação do As^{3+} em amostras de água e urina e relataram que baixas temperaturas (4 e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) são recomendadas para melhorar a estabilidade das espécies. Já para amostras de sangue a conservação durante o transporte deve ser em torno de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o armazenamento em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MANDAL et al., 2004).

O preparo de amostras sólidas, visando a especiação de arsênio, geralmente inclui procedimentos como trituração, liofilização, moagem, tamisação e extração. Para que um método de extração seja considerado ideal é desejável a total extração das espécies de arsênio sem conversão e que os solventes utilizados não interfiram na análise. Métodos de extração convencionais utilizam agitação das amostras por energia de ultrassom. Uma variedade de solventes é utilizada para extrair as espécies de arsênio de alimentos marinhos e arroz, sendo o uso de mistura metanol/água a mais comum (GONG et al. 2002; YUAN, JIANG e HE, 2005; HUANG, ILGEN e FECHER, 2010). Lipídeos, ácidos graxos, proteínas e açúcares podem interferir nas análises por LC-ICP-MS, sendo a remoção desses compostos possível empregando-se cartuchos C18 ou extração sequencial com diferentes solventes (McKIERNA et al., 1999; GALLAGHER et al., 2001b). Geralmente, acetona e clorofórmio são utilizados para remover ácidos graxos e lipídeos de tecidos e mistura metanol/água (1:1) pode ser utilizada para extrair as espécies de arsênio por sonicação (McKIERNA et al., 1999; YUAN, JIANG e HE, 2005).

Outros procedimentos de extração como solubilização com ácido clorídrico assistida por microondas e extração por solvente a alta pressão também foram utilizadas (GALLAGHER et al., 2001b; YUAN, JIANG e HE, 2005). Liang et al. (2010) utilizaram metanol 50% v/v mais ácido trifluoracético $0,2\text{ mol L}^{-1}$ por 10 h a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Digestão enzimática com tripsina, pancreatina, alfa amilase e protease combinada

com extração têm sido exploradas para melhorar a eficiência de extração para amostras de alimentos como peixes, arroz e maçã (GONG et al. 2002; SANZ et al., 2005). Porém, Huang, Ilgen e Fecher (2010), descreveram essa metodologia de preparo de amostra como difícil de ser executada, de alto custo e passível de contaminação. Para análise de amostras de grãos de arroz, os mesmos autores ainda destacaram que os vários métodos reportados na literatura não levam em consideração a variedade de tipos de grãos comercializados e sugerem o uso de ácido nítrico $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ a 95°C por 90 minutos como um método simples, barato e que abrange os vários tipos de processamento deste alimento, como integral e branco.

Mesmo com muitos estudos, ainda há divergências quanto ao método ideal para as análises de especiação química do arsênio em matrizes biológicas e as possíveis interferências durante a análise por LC-ICP-MS. Como exemplo disso, Hansen et al., (2004) mostraram que o DMA^{3+} , tem o mesmo tempo de retenção do ácido dimetilarsinotióico (DMAT), utilizando um determinado método de especiação. Os autores relataram que o DMAT está naturalmente presente na urina. Porém, durante a extração das espécies de arsênio de lã de carneiro, a presença de compostos contendo grupo tiol na lã convertem o DMA^{5+} em DMAT, gerando resultados errôneos. Como a identificação é baseada apenas no tempo de retenção, os autores salientaram a necessidade de técnicas complementares como espectrometria de massas com tempo de voo e ionização por “eletrospray” (ES-Q-TOF-MS) e ressonância magnética nuclear (^1H RNM) para elucidação da estrutura química do composto.

Informações sobre as espécies de arsênio são tão importantes para avaliar as implicações toxicológicas quanto para elucidar o ciclo biogeoquímico deste

elemento. Porém, a falta de protocolos padronizados para a coleta, armazenamento e preparo da amostra contribuem para algumas discrepâncias encontradas entre as informações geradas nos diferentes estudos (FRANCESCONI e PANNIER, 2004).

Existem vários grupos que trabalham há muitos anos com especiação química por LC-ICP-MS. Entretanto, no Brasil, esta ferramenta analítica ainda é incipiente e pode contribuir para o controle da segurança dos alimentos terrestres ou marinhos, controle da contaminação do ambiente (lodo, água, sedimentos), controle no estudo do comportamento de espécies de elementos químicos nos diversos organismos, biomonitoramento e avaliação de risco ocupacional, entre outros. As leis internacionais e nacionais caminham para a inclusão de concentrações limites para as diferentes espécies de arsênio, uma vez que as orientações gerais da Organização Mundial da Saúde (OMS/FAO) para água de consumo e alimentos estão se tornando mais específicas (CORNELIS et al., 2001; BRASIL, 2011). No entanto, apesar da vasta quantidade de métodos na literatura, ainda existe uma carência de métodos simples e rápidos para especiação química de arsênio em amostras biológicas.

2. Objetivos

2.1- Estudo I:

Desenvolver um método simples e rápido para preparo de diferentes amostras de tecidos biológicos animais (ovo, músculos, fígado, crustáceos e moluscos) e determinar as espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS.

2.2- Estudo II:

Validar um método simples para preparo e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS em grãos de arroz e avaliar a concentração dessas espécies em amostras de grãos comercializadas no Brasil.

2.3- Estudo III:

Estudar o metabolismo do arsênio e os efeitos da exposição em diferentes cultivares de arroz, identificando e quantificando as fitoquelatinas envolvidas por meio de técnicas avançadas de especiação (LC/HR-ICP-MS/ESI-MS).

3. Relevância

Apesar do vasto estudo toxicológico das espécies de arsênio, busca-se ainda avaliações e estudos mais concretos de cada espécie para um maior entendimento dos seus mecanismos de toxicidade. No mundo, devido à ação do homem e à introdução de novas tecnologias baseadas no uso intenso de agentes químicos, vê-se uma crescente preocupação quanto à contaminação ambiental e alimentar, refletida nas leis internacionais, que se direcionam para maior controle da segurança alimentar restringindo a importação/exportação de vários produtos devido a contaminações. Este estudo se enquadra em uma nova tendência de pesquisas dentro das análises toxicológicas e toxicologia de metais, ou seja, desenvolvimento e aplicação de métodos para análise de especiação química e determinação rápida de arsênio em alimentos (arroz e tecidos) para avaliação toxicológica/nutricional. Finalmente procurou-se, através de um estudo em conjunto com a “University of Aberdeen” (Escócia, Reino Unido), uma contribuição para o entendimento do metabolismo do arsênio em diferentes cultivares de arroz, um dos alimentos mais consumidos no mundo.

4- Material e Método.

4.1- Estudo I- Desenvolvimento de um método simples e rápido para preparo de diferentes amostras de tecidos biológicos animais (ovo, músculos, fígado, crustáceos e moluscos) e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS.

4.1.1- Equipamentos e acessórios:

As análises foram realizadas utilizando um ICP-MS com cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair - White Martins, Brasil) e um LC (PerkinElmer L-200, SCIEX) hifenados por um injetor de seis saídas (Rheodyne 9725). O eluente do LC é introduzido diretamente no nebulizador do ICP-MS através de tubos “PEEK” (1,59 mm o.d.) e de conectores “PEEK” de baixo volume morto. A coluna de troca aniônica utilizada foi Hamilton PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, EUA) nas seguintes dimensões: 5 µm, 150 mm x 4,6 mm.

Ambos os equipamentos foram conectados em um computador Dell Pentium 4 com os “softwares” Elan[®] (versão 3.4) e Chromera[®] (versão 2.1.0.1631), e impressora Hewlett-Packard Laserjet 4250 e encontram-se instalados no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

O sistema de introdução de amostra utilizado no ICP-MS foi composto por uma câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e um nebulizador de Meinhard[®] conectados por tubos Tygon[®] a bomba peristáltica do ICP-MS (a 20 rpm geralmente). O ICP-MS foi equipado com cone de amostragem e “skimmer” de platina (PerkinElmer, Norwalk, EUA).

Foi também utilizada uma ponteira de ultrassom de titânio Vibracell VC 100 controlada por processador USS-100 (Sonics & Materials, Danbury, CT, EUA).

4.1.2- Reagentes e preparo de soluções contendo as espécies de arsênio:

Foi utilizada água deionizada de alta pureza (Millipore RiOs-DITM, EUA, resistividade 18,2mΩ cm) para o preparo das amostras, soluções e padrões. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto os ácidos nítrico (HNO₃) e clorídrico (HCl) (Synth, Brasil) que foram previamente purificados em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik).

O reagente mono-hidrogenofosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄) foi adquirido da Sigma (Steinheim, Alemanha), di-hidrogenofosfato de amônio ((NH₄)H₂PO₄) e hidróxido de amônia (NH₄OH_{sol.}) foram adquiridos da Fluka (St. Louis, EUA). Ródio e gálio (10 mg L⁻¹) e a solução multi-elementar rastreada (10 mg L⁻¹) contendo arsênio foram obtidos da PerkinElmer (Shelton, CT, EUA) e o metanol da J.T. Baker (EUA). Triton[®] X-100 e hidróxido de tetrametil-amônio em água (TMAH) 25% (m/v) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, EUA).

Balões, béqueres e tubos cônicos (Becton Dickinson) foram limpos por imersão em HNO_3 15% (v/v) por 24 h, lavados cinco vezes com água ultra pura e secos em câmara de fluxo laminar antes do uso (FADINI e JARDIM, 2000). Os “vials” de plástico utilizados no LC foram submetidos a uma limpeza especial. Logo após a injeção, foram escovados e lavados com Extran[®], enxaguados com água de torneira 5 vezes e 3 vezes com água ultra pura e colocados em banho de HNO_3 30% v/v por 48 h. Finalmente foram lavados 3 vezes com água ultra pura e secos em câmara de fluxo laminar.

Todas as soluções estoque das espécies de As foram preparadas na concentração de arsênio de 1000 mg L^{-1} e armazenadas em frascos âmbar em temperatura menor que 4°C .

O As^{3+} (As_2O_3 , Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparado dissolvendo-se a respectiva massa em relação a arsênio em 25 mL de NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ e acidificado com 25 mL de HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, o que torna o meio não-oxidante e evitando assim a conversão de As^{3+} a As^{5+} . O As^{5+} ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparado dissolvendo-se a massa relativa a arsênio em 25 mL de NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ e acidificado com 25 mL de HNO_3 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (meio oxidante).

DMA ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$, Fluka, St. Louis, EUA), MMA ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{O}_3 \cdot \text{As} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Chem Service, West Chester, EUA) e AsB ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$, Fluka, St. Louis, EUA) foram preparados dissolvendo-se a massa correspondente a arsênio em HNO_3 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções intermediárias contendo arsênio a 10 mg L^{-1} foram preparadas solubilizando As^{3+} em HCl $0,024 \text{ mol L}^{-1}$ e AsB, DMA, MMA e As^{5+} em HNO_3 $0,0014 \text{ mol L}^{-1}$. Após o preparo das soluções, foi determinada a concentração real de arsênio por ICP-MS contra uma solução padrão rastreada.

4.1.3- Avaliação de métodos cromatográficos para separação das espécies arsenobetaina (AsB), arsenito (As^{3+}), dimetil arsênio (DMA), monometil arsênio (MMA) e arsenato (As^{5+}):

Foram avaliadas as colunas C8 (3 μm , 33 x 4,6 mm, Brownlee Aq, PerkinElmer, EUA), C18 (5 μm , 150 x 4,6 mm, Brownlee Aq, PerkinElmer, EUA) e troca aniônica (5 μm , 150 x 4,6 mm, Hamilton PRP X-100), bem como fases móveis variadas contendo trocadores aniônicos ou pareadores iônicos, como descrito na Tabela 5.1.1. Os volumes de injeção de amostra e vazão da fase móveis avaliados variaram de 5-100 μL e de 0,7-1,0 mL min^{-1} , respectivamente.

4.1.4- Avaliação do uso de padrão interno e da interferência pelo poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$:

Foram avaliadas os isótopos ^{71}Ga , ^{69}Ga e As^{5+} com injeção pós coluna em um sistema em fluxo utilizando uma bomba peristáltica complementar de 8 canais (Ismatec IPC, EUA) nas concentrações de 0,5-5 e 2-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ga e As^{5+} , respectivamente. O sistema em fluxo utilizado está descrito no item 4.1.8. O cloreto pode causar interferências na determinação de arsênio ($m/z = 75$), assim, 100 μL de uma solução contendo ácido clorídrico 1% v/v foi analisada para avaliação da interferência.

4.1.5- Avaliação do uso de metanol e ácido nítrico na solução extratora, estudo da influência do tempo e da massa de amostra na extração das espécies de arsênio e parâmetros analíticos de validação:

O material de referência DOLT-3 (100mg) foi utilizado para avaliação do uso do metanol e ácido nítrico como extratores. As concentrações de metanol e ácido nítrico estudadas foram de 2-60% e de 0,1-20% v/v, respectivamente. Na avaliação da influência do tempo e da massa na eficiência de extração foi utilizado o material de referência DORM-3. Os tempos de sonicação e as massas estudadas variaram de 0-4 min e de 10-80 mg, respectivamente. Para todos os experimentos, as condições otimizadas adotadas estão descritas na Tabela 4.1.1. Nesta etapa também foram avaliados os parâmetros analíticos de validação como limite de detecção ($3 \times DP_{\text{branco}} / \text{coeficiente angular}$), coeficiente de correlação linear (R) e intervalo de linearidade.

4.1.6- Determinação de arsênio total em amostras e materiais de referência de tecidos diversos:

As determinações de arsênio total nas diversas amostras e materiais de referência foram conduzidas de acordo com Batista et al. (2009c). As amostras e materiais de referência (aproximadamente 80 mg) foram pesados em triplicata e 1 mL de TMAH 50% (v/v) foi adicionado. Após, as amostras permaneceram em homogeneização rotacional (Tecnal TE 165, Brasil) por 24 horas. Então o volume foi

completado para 10 mL com um diluente contendo 0,5% (v/v) HNO_3 e 0,01% m/v Triton[®] X-100. Em todas as determinações de arsênio total foi utilizado o Rh como padrão interno na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção do método ($3 \times \text{DP}_{\text{branco}(n=20)} \times \text{fator de diluição}$) foi de $0,023 \mu\text{g g}^{-1}$. Demais condições do ICP-MS estão na Tabela 4.2.1.

4.1.7- Especificação de arsênio em amostras de tecidos biológicos (músculos de peixe, boi e frango, ovo, moluscos e material de referência) por LC-ICP-MS:

Previamente a cada análise, o LC foi exaustivamente purgado com água em todos os canais e os filtros ligados à tubulação também foram limpos. As amostras foram injetadas com seringa em um “loop” de $200 \mu\text{L}$. Todas as separações foram realizadas em temperatura de 25°C , sob condições isocráticas. A fase móvel, preparada diariamente, foi feita de acordo com Sanz et al. (2005), empregando-se $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 98% (v/v) + metanol (MeOH) 2% (v/v), em pH 8,5. Padrões de calibração analítica para espécies de arsênio foram preparadas diariamente, no intervalo de $2\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$ por meio de diluições em série em MeOH 2% (v/v) e HNO_3 0,4% (v/v). A vazão da fase móvel utilizada foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A quantificação foi feita baseada na calibração externa e área do pico. O equipamento utilizado está descrito no item 4.1.1 e a Tabela 4.1.1 resume as condições operacionais da técnica empregada para especificação química de arsênio em amostras de tecidos utilizando a técnica de LC-ICP-MS.

TABELA 4.1.1. Condições operacionais do LC-ICP-MS para determinação de arsênio total e especiação de arsênio em amostras de tecidos biológicos.

<i>Condições do LC</i>	
Coluna	Hamilton PRP-X100 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm)
Fase móvel	10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (pH 8,5)+MeOH 2%(v/v)
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	25°C
Tempo de equilíbrio	1 min
Tempo de corrida	9,0 min
Tempo de lavagem	1 min
Modo	Isocrático
Volume de injeção	100 µL
Quantificação	Área do pico
<i>Condições experimentais do ICP-MS</i>	
Potência de rádio frequência	1200W
Modo de varredura	“Peak hopping”
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L min ⁻¹ ; auxiliar 1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	0,86-0,98 L min ⁻¹
Padrão interno	¹⁰³ Rh (10 µg L ⁻¹) para As total
Padrão interno	⁶⁹ Ga (0,5 µg L ⁻¹) em confluência; bomba peristáltica a 10 rpm (0,5 mL min ⁻¹) para especiação de arsênio
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
“Skimmer”	0,9mm
Resolução	0,7 u
Isótopo	⁷⁵ As

4.1.8- Preparo das amostras de tecidos biológicos e material de referência para extração e especiação de arsênio por LC-ICP-MS:

O método desenvolvido para a extração das espécies de arsênio nos tecidos biológicos animais em estudo consistiu na utilização de metanol em meio ácido. Cerca de 50mg de amostra foram colocadas em tubos de fundo cônico de 15 mL. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de extrator composto por HNO_3 2 % (v/v) + MeOH 10% (v/v) e agitado em “vortex” por 1 minuto. Essa mistura foi sonicada por 2 minutos utilizando uma ponteira de ultrassom (80% de amplitude, 50 W de potência e 20 kHz de frequência). Com o intuito de evitar contaminações, a ponteira foi lavada com água ultra pura, sonicada em solução de HNO_3 2 % (v/v) por 20 segundos e lavada com água ultra pura novamente. Finalmente, foi adicionado água ultra pura até 5mL, as amostras foram filtradas em filtros de celulose de 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech, Almanha) e 100 μL do extrato filtrado foram injetados no LC-ICP-MS. A Figura 4.1.1 mostra os procedimentos de tratamento e extração das amostras de tecidos.

O gálio foi utilizado como padrão interno na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em HNO_3 0,2% v/v com sistema de injeção em fluxo. A bomba peristáltica do ICP-MS foi colocada em 10 rpm ($0,5 \text{ mL min}^{-1}$) durante todo o experimento. O sistema de injeção em fluxo foi composto por uma confluência com duas entradas: a-) um tubo “peek” (diâmetro interno de 0,18 mm) vindo do LC para a confluência e; b-) um tubo “peek” (diâmetro interno de 0,76 mm) da bomba peristáltica do ICP-MS para a confluência; e a mistura para o nebulizador do ICP-MS. As condições estão descritas na Tabela 4.1.1.

FIGURA 4.1.1. Esquema do tratamento aplicado nas amostras de tecidos biológicos para extração das espécies de arsênio.

4.1.9- Seleção dos materiais de referência, das amostras de tecidos, pré-tratamento e aplicação do método:

O método desenvolvido e validado foi aplicado na análise de amostras reais. Para este propósito, 10 amostras sendo: peito de frango (dois músculos), *Tilapia mariae* (tilápia, peixe comumente consumido no Brasil), carne de boi (músculo), ovo de galinha, *Mytella guyanensis* (mexilhão), *Octopus vulgaris* (polvo), *Merluccius hubbci* (pescada, peixe de mar), *Thunus atlanticus* (atum) e *Triops cancriformis* (camarão) foram adquiridas em mercados da cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil). A concentração de arsênio e as diferenças nas matrizes foram levadas em consideração nessa seleção.

Após as coletas das amostras, as partes comestíveis foram separadas e lavadas com água ultra pura. Pele, tendões, ossos, escamas entre outros foram removidas das amostras. Então, cerca de 10 g de cada amostra foi pré-homogeneizada, congelada a -80 °C, liofilizada (Liobrás L101, Brasil), moída em moinho criogênico (CryoMill, Retsch, Alemanha), tamizada em peneira de 150 µm de tamanho de partícula e homogeneizada.

Finalmente, com o intuito de verificar a exatidão e a precisão das análises, Materiais Certificados de Referência do “National Institute of Standards and Technology” (NIST) SRM 1577 (fígado bovino), do “Institute of Reference Materials and Measurements” (IRMM) CE 278 (tecido de mexilhão), e do “National Research Council Canada” (NRC) DOLT-3 (tecido de fígado de peixe-cão) e DORM-3 (proteína de peixe) foram analisados.

4.2- Estudo II- Validação de um método simples para preparo e determinação das espécies de arsênio (As^{3+} , DMA, MMA e As^{5+}) por LC-ICP-MS em grãos de arroz e avaliação da concentração dessas espécies em amostras de grãos comercializadas no Brasil.

4.2.1- Equipamentos, reagentes e soluções:

Os equipamentos, soluções e reagentes utilizados nesse estudo estão descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

4.2.2- Determinação de arsênio total em amostras e material de referência (NIST 1568a) de arroz:

Inicialmente, para efeito de comparação, o arsênio total foi determinado em diferentes amostras ordinárias e no material de referência NIST 1568a “Rice Flour” utilizando o ICP-MS. As amostras, em triplicata, foram digeridas em vasos de PTFE fechados utilizando forno de microondas (MILESTONE ETHOS D, Itália) de acordo com o método proposto por Nardi et al. (2009). Assim, as amostras de arroz (250 mg) foram precisamente pesadas e adicionados 5 mL de HNO_3 20% (v/v) + 2 mL de H_2O_2 30% (v/v) (Aldrich, St. Louis, EUA). Os vasos foram colocados em microondas (programa de aquecimento está descrito na Tabela 4.2.1). Em seguida, o digerido foi resfriado e o volume ajustado para 50 mL com água ultra pura. O Rh foi adicionado

como padrão interno na concentração final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção do método ($3 \times \text{DP}_{\text{branco}(n=20)} \times \text{fator de diluição}$) para arsênio total foi $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$. Os parâmetros experimentais do ICP-MS estão descritos na Tabela 4.2.2.

TABELA 4.2.1. Programa de aquecimento do forno de microondas para digestão das amostras de arroz.

Etapa	Temperatura (°C)	Potência (W)	Tempo (min)
1	160	1000	4,5
2	160	0	0,5
3	230	1000	5,0
4	230	1000	15,0
5	0	0	20,0

4.2.3- Avaliação dos métodos de extração das espécies de arsênio de amostras de arroz e estudos da influência do tempo e da massa na eficiência da recuperação:

Foram avaliados métodos de extração validados por Narukawa et al. (2008), Huang, Ilgen e Fecher (2010) e Sun et al. (2009) que utilizam como extrator água, ácido nítrico $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido nítrico 1 % v/v, respectivamente. Extrações utilizando energia de ultrassom e aquecimento por microondas e banho maria foram investigados. A Tabela 5.3.1 resume os métodos avaliados.

Foram estudadas as influências do tempo (0-3 h) e da massa (100-1000 mg) na recuperação das espécies de arsênio utilizando as condições analíticas descritas na Tabela 4.2.2 e o extrator como descrito no item 4.2.4.

TABELA 4.2.2. Condições operacionais do LC e ICP-MS para determinação de arsênio total e espécies de arsênio em material de referência e amostras de arroz.

<i>Condições do LC</i>	
Coluna (troca aniônica)	Hamilton PRP-X100 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm)
Fase móvel	10 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (pH 8,5)+2%(v/v) MeOH
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	25 °C
Equilíbrio	1 min
Tempo de corrida	8,5 min
Lavagem	1 min
Modo	Isocrático
Volume de injeção	100 µL
Quantificação	Altura de pico
<i>Condições experimentais do ICP-MS</i>	
Potência de rádio frequência	1200 W
Modo de varredura	“Peak hopping”
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L min ⁻¹ ; Auxiliar 1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,56-0,98 L min ⁻¹
Rotação bomba peristáltica	20 rpm
Padrão interno: Especificação de As	AsB (5 µg L ⁻¹)
Interface	Cones de Platina
Cone de Amostragem	1,1 mm
“Skimmer”	0,9 mm
Resolução	0,7u
Replicatas, “Sweeps” e Leituras	3, 40, 1, respectivamente, para As total
Padrão interno: As total	¹⁰³ Rh (10 µg L ⁻¹)
Isótopo	⁷⁵ As

4.2.4- Método validado para preparo das amostras de arroz para especiação de arsênio por LC-ICP-MS:

Foi utilizado um método simples de preparo de amostras de arroz combinando basicamente dois métodos previamente publicados, de Sun et al. (2009) e Huang, Ilgen e Fecher (2010). Duzentos miligramas de amostra (<250µm de tamanho de partícula, em triplicata) foram precisamente pesados em tubo cônico de 50 mL. Em seguida 10 mL de HNO₃ 2% (v/v) foram adicionados e o tubo fechado com fita de politetrafluoretileno. A mistura foi deixada em agitação de 12-15 hs e aquecida em banho maria de 25 a 95 °C durante 1 hora e por 1,5 horas a 95°C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente (25 °C), filtradas em filtros de celulose de 0,20 µm e, finalmente, 380 µL do filtrado foi misturado com 20 µL de uma solução contendo 100 µg L⁻¹ de AsB (utilizada como padrão interno, concentração final de 5 µg L⁻¹). Então, as amostras foram diretamente injetadas em LC-ICP-MS para análise por especiação química. A Figura 4.2.1 resume o procedimento adotado. As condições operacionais do LC-ICP-MS estão na Tabela 4.2.2.

FIGURA 4.2.1. Esquema do tratamento aplicado nas amostras de arroz para extração das espécies de arsênio.

4.2.5- Seleção das amostras de arroz e pré-tratamento:

Quarenta e quatro amostras de arroz cru em grão foram adquiridas de diferentes localidades (Figura 4.2.2), focando: a-) o tipo de beneficiamento: integral (I), integral parboilizado (PI), branco (B, polido), parboilizado branco (PB, polido), orgânico parboilizado branco (PO) e orgânico branco (OB); e b-) a região de beneficiamento. Assim, foram coletadas 10 PB, 12 B, 2 I, 6 IP, 1 OP e 1 OB do Rio Grande do Sul (amostras das cidades 1 a 9), 3 B de Goiás (amostras das cidades: 16 e 15), 3 B de Minas Gerais (amostras da cidade: 14), 2 B e 1 I de São Paulo (amostras das cidades: 13 e 12), 1 PB e 1 B de Santa Catarina (amostras das cidades: 10 e 11) e 1 B importado do Japão (adquirido em São Paulo). O estado do Rio Grande do Sul, por ser o maior produtor do Brasil, com mais de 50% da produção nacional, teve a maior participação na amostragem (32 amostras).

Para o pré-tratamento das amostras, após o quarteamento, seguindo as recomendações do *Codex Alimentarius* (CAC, 2004), 50 g de arroz foi individualmente moído, homogeneizado e tamizado (0,25 mm) em um moinho elétrico ultra centrífugo (Retsch ZM200 com auto-amostrador DR100) a 6000 rpm. Assim, as amostras foram acondicionadas em tubos de fundo cônico de 50 mL (Falcon® BD) e armazenadas em local seco até a análise de arsênio total, de acordo com o item 4.2.2, e especiação química de arsênio, de acordo com os itens 4.2.4 e 4.2.5. O material de referência certificado de arroz, SRM 1568a NIST Rice Flour e brancos foram analisados em triplicata a cada dia de análise.

Os programas estatísticos Statistica (V 6.0) e SigmaStat 3.5 foram utilizados para a análise estatística das concentrações de arsênio total e de suas espécies nas amostras. O valor de incerteza foi menor que 5%.

FIGURA 4.2.2. Mapa das cidades onde as amostras de arroz comercializadas foram adquiridas. Cidades onde o arroz foi beneficiado: 1: São Borja; 2: Itaqui; 3: Alegrete; 4: Dom Pedrito; 5: Bagé; 6: Pelotas; 7: Camaquã; 8: Sentinela do Sul; 9: Nova Prata; 10: Turvo; 11: Joinville; 12: Osasco; 13: Porto Ferreira; 14: Araguari; 15: Aparecida de Goiânia; 16: Anápolis.

4.3- Estudo III: Estudo do metabolismo do arsênio e dos efeitos da exposição em diferentes cultivares de arroz e identificação e quantificação das fitoquelatinas envolvidas por meio de técnicas avançadas de especiação (LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS).

Essa etapa do trabalho foi desenvolvida na “School of Natural and Computing Sciences (Department of Chemistry)” e “Plant and Soil Science da University of Aberdeen” na Escócia (Reino Unido) em um período de estágio deste doutoramento, sob supervisão do Professor Doutor Jörg Feldmann, no ano de 2011 (Anexo A).

4.3.1- Equipamentos, reagentes e soluções:

Água ultra pura foi obtida pelo sistema Elga (18mΩ Elga Ltd., High Wycomb, Bucks, RU) e utilizada em todas as soluções. Todos os reagentes foram de grau analítico. Ácido fórmico (88%), ácido nítrico (67%) e peróxido de hidrogênio (30%) foram adquiridos da Fluka (RU). Fosfato de potássio dibásico (99%) e N-acetil-cisteína (99%) foram adquiridas da Sigma. Ácido cacodílico (DMA) foi adquirido da Strem Chemicals (Newburyport, EUA). Soluções padrão contendo germânio (Ge), gálio (Ga) e arsênio (As) foram obtidos da High Purity Standards (Charleston, EUA) e o metanol da Fisher (RU). Mono-sódio arsenato (Na_2HAsO_4) foi adquirido da Merck (RU).

As soluções e amostras foram preparadas na sala de preparo de amostras dos laboratórios do grupo TESLA (“Trace Element Speciation Laboratory”) da

“University of Aberdeen”. Frascos de plástico e vidrarias foram lavados com detergente neutro e água, lavadas em máquina de lavar louças, rinsadas com água ultra pura, descontaminadas em solução HNO_3 15%v/v por 48 horas, lavadas cinco vezes com água ultra pura novamente e secadas em estufa.

Os equipamentos utilizados para especiação de fitoquelatinas livres (PCs) e ligadas a arsênio (PCs-As) foi composto de LC Accela com duas saídas, sendo parte do eluente dirigido ao HR-ICP-MS Element 2 e parte ESI-MS LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) (Figura 4.3.3). A especiação de arsênio foi conduzida utilizando um LC-ICP-MS da Agilent Technologies (Stockport, Cheshire, RU). A determinação de arsênio total foi realizada por um ICP-MS Agilent 7500c (Agilent Technologies) após digestão (Mars Digestion System, CEM, RU).

4.3.2- Condições de cultivo do arroz:

Inicialmente seis diferentes cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), Itálica Carolina (variedade japônica de florescimento rápido), 9524 (variedade japonesa), Lemont (variedade desenvolvida no Texas, EUA), Kittrana 508 (banco de semnetes de Idaho, EUA), Dom Sofid (variedade aromática) e YRL-1 (variedade indiana) foram selecionadas para este estudo por possuírem diferentes fatores de transferência do arsênio da raiz para o grão. Após a germinação no composto “John Innes” número 2 (contendo solo:turfa:areia na proporção de 7:3:2, e 0,6; 2,4; 2,4 e 1,2 Kg m^{-3} de calcário, farinha de casco, farinha de chifres, superfosfato e fosfato de potássio, respectivamente), as mudas de 17 dias foram transplantadas para vasos plásticos

de 2 L e 15 cm de profundidade, uniformemente preenchidos com 1,5 kg de um fino solo de superfície (pH 7,6; 3% de conteúdo orgânico, Rolawn Screened Loam Topsoil, RU) em condições de irrigação em alagamento (imersão do solo sob lâmina de água de 3-4 cm).

As plantas cresceram em estufa com controle de temperatura, ventilação e umidade até completa maturação dos grãos. A temperatura na estufa variou de 20 a 35°C e a umidade de 60 a 75%. Cada cultivar foi tratado por dois diferentes modos. Logo após o transplante, quatro replicatas de cada cultivar recebeu 10mL de uma solução contendo 10 mg L⁻¹ de As⁵⁺ (Na₂HAsO₄.7H₂O, Sigma). Outras quatro replicatas cresceram sem adição de arsênio. Após transplantadas, as mudas receberam solução nutritiva de Yoshida (composição 91,4; 40,3; 71,4; 88,6; 324; 1,5; 0,074; 0,934; 0,035; 0,031; 7,7 e 11,9 g L⁻¹ de NH₄NO₃, NaH₂PO₄.2H₂O, K₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄.7H₂O, MnCl₂.4H₂O, (NH₄)₆.Mo₇O₂₄.4H₂O, H₃BO₃, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5H₂O, FeCl₃.6H₂O e ácido cítrico monohidratado, respectivamente), nos 38°, 57°, 74°, 108°, 119° dias 10, 2, 2, 2 e 2 vezes, respectivamente (YOSHIDA et al., 1972). O cultivar Italica Carolina, por ter sido analisado primeiro e por ter um tempo de florescência menor, não recebeu solução Yoshida no 119° dia. O desenho esquemático de todo o experimento é mostrado na Figura 4.3.1.

FIGURA 4.3.1. Resumo das etapas dos experimentos conduzidos para o estudo do metabolismo do arsênio em arroz e determinação das PCs e PCs-As.

4.3.3- Colheita das plantas de arroz, preparo das amostras para identificação e quantificação de PCs livres e PCs-As em raízes, determinação de arsênio total (solos, raízes, caules e grãos) e espécies de arsênio (DMA, MMA e As-i) em grãos:

Apenas após completa maturação dos grãos, as plantas de arroz foram coletadas. Previamente, toda a planta foi pesada e a altura aferida. Em seguida, de

cada vaso, 5 a 10 g de solo e todos os grãos (com casca) foram coletados, pesados e armazenados em sacos plásticos com massa previamente determinada. Então, cada planta foi removida do vaso plástico e lavada com água de torneira em abundância (principalmente as raízes). As raízes e o caule, cada parte individualmente, cortadas com tesoura a 2 cm do solo, foram pesados para biomassa total (8 plantas de cada cultivar).

Imediatamente após pesada ("in natura"), porções de raízes vivas foram lavadas com água de torneira no laboratório e incubadas por 10 minutos com uma solução contendo 100 mmol L^{-1} de monoidrogênio fosfato de potássio como descrito por Meharg e MacNair (1992). Após, as raízes foram lavadas com água de torneira, secadas com papel toalha e moídas em gral com nitrogênio líquido. Como as PCs são mais estáveis sob condições ácidas do que alcalinas ou neutras (RAAB, FELDMANN e MEHARG, 2004), as raízes moídas (1 g) foram incubadas com 5 mL de ácido fórmico (1 % v/v) por 60 minutos em banho de gelo e levemente agitadas (RAAB et al, 2005). Em seguida, o extrato foi centrifugado em tubos de fundo cônico de 1,5 mL (10 min, 5000 rpm) e o sobrenadante coletado em duas frações: uma para determinação de PCs-As e PCs livres por LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS e outra armazenada a -20°C para avaliação da recuperação da coluna (RAAB et al., 2005). Na Figura 4.3.2 estão resumidas as etapas desse complexo tratamento das amostras de raízes do arroz.

FIGURA 4.3.2. Esquema do preparo de amostras para a determinação de PCs livres e PCs-As por LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS.

Após a injeção da amostra (100 µL), a separação foi realizada utilizando uma fase móvel de água e metanol contendo 1% de ácido fórmico em gradiente com coluna de fase reversa (Eclipse, XDB-C18, 5 µm, 150 x4,6 mm, Agilent). A fase móvel foi composta de duas soluções: 0,1 % v/v de ácido fórmico em água (A) e 0,1

% v/v de ácido fórmico em metanol (MeOH) (B). O gradiente foi de 0 a 20 % v/v da solução B de 5 a 25 minutos, com rampa de 7min minutos nessa concentração e então, de 20% a zero de 32 a 40 minutos. O eluente foi dividido em uma parte (25%) para o detector espectrômetro de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado (HR-ICP-MS) e 3 partes (75%) para o espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por “eletrospray” (HR-LTQ Orbitrap ESI-MS). Na Figura 4.3.3 estão os equipamentos utilizados, ilustrando esquematicamente a conexão entre o LC e os espectrômetros de massas (detectores).

No HR-ICP-MS, em modo de resolução médio, as intensidades dos sinais das m/z 32, 75 e 69 foram determinadas para enxofre (S, analito presente nas PCs livres), arsênio (As, analito ligado as PCs-As) e gálio (Ga, padrão interno), respectivamente. Um nebulizador micro-concêntrico foi utilizado. O HR-LTQ Orbitrap ESI-MS foi utilizado em modo positivo de ultra varredura de 100 a 2000 m/z e o espectro MS^2 foi armazenado quando as intensidades dos sinais foram maiores que 50000 contagens por segundo (cps). A voltagem do capilar, pressão do nebulizador, vazão do gás de secagem, temperatura do quadrupolo e voltagem de fragmentação para modo de ionização positivo foram de 4000 v, 40 psi, 12 L min⁻¹ at 350 °C, 100 °C e 100 v, respectivamente. Durante todos os experimentos a coluna e o auto-amostrador foram mantidos a 30 °C e 4 °C, respectivamente.

FIGURA 4.3.3. Acoplamento das técnicas analíticas LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS utilizadas para a determinação de PCs livres e PCs-As.

4.3.4- Quantificação das fitoquelatinas (PCs) livres e fitoquelatinas ligadas ao arsênio (PCs-As) por LC-HR-ICP-MS:

A quantificação das PCs e PCs-As foi realizada de acordo com Amayo et al. (2011). Como as PCs livres têm enxofre (S) e as PCs-As têm arsênio (As além de S) nas suas estruturas, o sinal desses analitos foram selecionados para quantificação no HR-ICP-MS. Para as PCs livres foram utilizados padrões de calibração com enxofre nas concentrações de 5 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da N-acetil-cisteína. Já para as PCs-As foram utilizados padrões de calibração com arsênio nas concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir de DMA. Todos os padrões foram preparados no dia de

análise na mesma solução utilizando somente água como diluente e injetados em triplicata em uma mesma corrida. O padrão interno utilizado foi gálio (^{69}Ga) injetado com confluência em fluxo, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. As curvas de calibração foram construídas a partir da média das áreas dos picos (triplicata) de cada ponto da curva de calibração analítica. O cálculo exato é discutido na seção *Resultados e Discussão* (5.3 Estudo III).

4.3.5- Preparo das amostras de arroz para determinação de arsênio total e análise por especiação química:

Para a determinação de arsênio total e especiação, todas as partes da planta e solos foram secos em estufa a 50°C até massa constante e moídos (tamanho de partícula $<250 \mu\text{m}$, Endecotts tamis Ltd., London, RU). A determinação de arsênio total foi conduzida primeiramente pela digestão em sistema aberto. Para isso, 1 mL de HNO_3 (67% de pureza) foi adicionado às partes da planta e solo (até 100 mg de amostra) e deixados para uma pré-digestão por 48 horas em tubos de fundo cônico de 50mL abertos em capela com exaustão. Após, 2 mL de H_2O_2 (30% pureza analítica) foi adicionada e a solução final foi aquecida de acordo com o programa mostrado na Tabela 4.3.1. Assim como as partes da planta e o solo, os extratos para PCs-As das raízes (1 mL) foram digeridos para determinação da recuperação da coluna (RAAB et al., 2005).

Finalmente, o digerido foi diluído com água ultra pura para 50 mL e a m/z 75 e 69, arsênio e gálio respectivamente, foram determinadas por ICP-MS (Agilent

7500cc, Agilent, Stockport, RU). Quatro materiais de referência foram utilizados para avaliação do controle de qualidade das análises, sendo: NIST 1568a (grãos de arroz), IAEA 140 TM (algas), DORM-3 (proteína de peixe) e NCS ZC 73007 (solo).

TABELA 4.3.1. Programa de aquecimento por microondas utilizado na digestão das amostras para determinação de arsênio total e extração das espécies químicas dos grãos de arroz para especiação.

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	5	Temperatura inicial a 55
2	10	50
3	5	50 a 75
4	10	75
5	5	75 a 95
6	30	95
7	20	Resfriamento

As mesmas amostras de grãos de arroz foram submetidas à extração das espécies de arsênio para especiação por LC-ICP-MS, seguindo Sun et al., (2009). Em tubos de fundo cônico de 50 mL foram adicionados 200 mg de grãos moídos (<250µm) e adicionados 10 mL de ácido nítrico 1% (v/v) deixando agir por cerca de 15 horas. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em forno de microondas de acordo com o programa de aquecimento na Tabela 4.3.1.

O extrato foi centrifugado em tubos de fundo cônico de 1,5 mL a 10000 rpm por 5 minutos. Então, 100 µL de H₂O₂ (30% de pureza analítica) foram adicionados a 500 µL do extrato, agitado vigorosamente para completa conversão do As³⁺ a As⁵⁺,

deixando reagir por 24 horas. Esse procedimento foi adotado para descartar a presença de outras espécies catiônicas de arsênio como tetrametil arsênio (TMA), óxido de tri-metil arsina (TMAO) e arsenobetaina (AsB) (HANSEN et al., 2010).

Assim, 50 µL foram injetados no sistema de especiação utilizando LC-ICP-MS (HP1100 series acoplado a um ICP-MS Agilent 7500cc) com auto amostrador com resfriamento (4°C) e coluna de troca aniônica (Hamilton PRP-X100 10 µm x 150 x 4,1 mm) na temperatura de 30°C (forno de Peltier). A vazão da fase móvel (6,66 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄ e 6,66 mmol L⁻¹ NH₄NO₃, pH 6,2) foi de 1 mL min⁻¹ (WILLIAMS et al., 2005). O limite de detecção do método (3xDP_{branco(n=10)} x fator de diluição) para a especiação foi de 4 ng kg⁻¹ arsênio com coeficiente de correlação linear acima de 0,997.

4.3.6- Avaliação do fator de transferência do arsênio nos cultivares de arroz:

Este estudo foi conduzido de acordo com Raab et al. (2005). Os fatores de transferência (TF) do arsênio raiz/caule, raiz/grãos e caule/grãos foram calculados dividindo a concentração total de arsênio no caule, grãos e grãos (massas secas) pela concentração total de arsênio na raiz, raiz e caule (massas secas), respectivamente.

4.3.7- Análise estatística dos dados:

Todos os resultados foram analisados por ANOVA “one-way” (Duncan’s multiple range test & critical ranges). O programa estatístico Statistica (V 6.0) foi utilizado para este propósito. A incerteza foi menor que 5%.

Como os dados das espécies de As, PCs livres, PCs-As e fatores de transferência do arsênio das amostras expostas ao arsenato se mostraram não paramétricos, o teste de correlação de “Spearman” foi utilizado. O programa estatístico SPSS (versão 13.0, Inc., Chicagom IL, EUA) foi empregado para os cálculos e a incerteza menor que 5%.

5- Resultados e Discussão

5.1- Estudo I: *Desenvolvimento de um método simples e rápido para preparo de diferentes amostras de tecidos biológicos animais (ovo, músculos, fígado, crustáceos e moluscos) e determinação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) por LC-ICP-MS.*

Devido às diferentes toxicidades das espécies de arsênio encontradas em uma gama de produtos alimentícios e medicamentos utilizados na agricultura e para crescimento animal, a análise de especiação de arsênio é atualmente de fundamental importância para a segurança alimentar. O “European Food Safety Authority” (EFSA) destaca a importância do controle da concentração de compostos orgânicos e inorgânicos de arsênio em uma variedade de alimentos. Recomendam a redução na exposição ao arsênio através da dieta e uma rotineira especiação de arsênio em alimentos com o intuito de entender e avaliar o risco humano à exposição (EFSA, 2009). Além disso, destacam que o valor de ingestão provisional tolerável por semana (PTWI) de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de arsênio por massa corporal não é mais apropriado. Assim, a validação de métodos robustos é essencial para determinação de arsênio inorgânico (mais tóxico) e para entendimento do metabolismo de compostos organo-arsenicais como os arsenolipídeos, ainda pouco estudados (EFSA, 2009; FELDMANN e KRUPP, 2010).

5.1.1- Preparo dos padrões de calibração contendo arsênio e particularidades da especiação química utilizando LC-ICP-MS:

O primeiro passo da especiação é o preparo dos padrões de calibração. Esses padrões devem estar diluídos em um meio que não provoque mudanças estruturais na molécula, pois assim o analista garante confiabilidade nos resultados. Para as espécies de arsênio, especial cuidado foi tomado ao preparar os padrões. As espécies orgânicas, AsB, DMA e MMA, foram solubilizadas em meio diluente ácido de baixa concentração. Para As^{3+} foi utilizado primeiramente um meio alcalino para dissolução do sal e em seguida um ácido não oxidante (HCl) para evitar a conversão de As^{3+} em As^{5+} . Já para o As^{5+} foi utilizado o mesmo meio alcalino para dissolução do sal, porém o ácido utilizado agora foi um ácido oxidante (HNO_3), que mantém a espécie dissolvida e no estado de oxidação desejado. Feito isso, foram determinadas as concentrações exatas de arsênio em todos os padrões das espécies, utilizando um padrão de calibração analítico rastreado. Uma vez que o detector é o ICP-MS, a determinação é feita em relação à concentração de arsênio (^{75}As , $m/z=75$), independente da espécie química que contenha este elemento químico.

O ICP-MS, após passar pela otimização diária comum onde avalia-se a presença de óxidos, íons de dupla carga, vazão do gás de nebulização e voltagem das lentes, passou por uma nova otimização com uma solução contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio para se obter os parâmetros para a melhor sensibilidade do equipamento. Finalmente, para estudos de separação por LC, cada espécie foi injetada

separadamente para obter-se o tempo de retenção de cada uma e ter a certeza de qual espécie está sendo eluída no dado tempo.

5.1.2- Avaliação dos métodos de separação das espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺):

Há na literatura inúmeros métodos utilizando LC para análise de especiação de arsênio. Nossos estudos preliminares foram conduzidos objetivando explorar as melhores condições instrumentais do equipamento (coluna e fase móvel) para separar as cinco espécies de arsênio (AsB, As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺) no menor tempo possível. A Tabela 5.1.1 resume os métodos de separação empregados e os resultados obtidos. Durante a avaliação da separação cromatográfica, todos os padrões foram preparados em uma solução igual a da fase móvel.

Primeiramente testou-se uma coluna C8 de 3,3cm e com grandes chances de prover um menor tempo de corrida. Esta mesma coluna foi utilizada com sucesso na separação de espécies de mercúrio pelo nosso grupo (BATISTA et al., 2011a). As fases móveis avaliadas foram planejadas baseadas nos trabalhos de Wangkarn e Pergantis (2000) e Le et al. (2000). Utilizando-se a coluna C8 não houve separação das espécies, sendo o tempo de corrida de aproximadamente 1min. Mesmo variando o volume de injeção, a vazão da fase móvel e a concentração do pareador iônico, não se obteve sucesso na separação (condições experimentais A a E da Tabela 5.1.1).

Mantendo o pareador iônico, hidróxido de tetrabutyl amônio (TBAH), avaliou-se uma coluna C18 de 15 cm com o intuito de se promover maiores interações entre os analitos e a fase estacionária, aumentando assim o tempo de retenção bem como a separação das espécies de arsênio (condições F e G da Tabela 5.1.1). Houve um ganho em resolução dos picos e separação, porém apenas quatro picos foram observados (condição G da Tabela 5.1.1). Assim, abandonou-se o uso de colunas de fase reversa e decidiu-se trabalhar com uma fase estacionária diferente.

Para isso, foi avaliada uma coluna de troca aniônica (condições H e J da Tabela 5.1.1). Na condição J da Tabela 5.1.1, houve separação completa dos analitos e o metanol, presente na fase móvel, melhorou a detectabilidade para duas espécies de arsênio, DMA e MMA. Efeito possivelmente atribuído à formação do carbo-cátion, que aumenta a intensidade de determinados analitos no plasma (HU et al., 2004). Porém, empregando-se o método para análise de extratos de amostras contendo espécies de arsênio, houve sobreposição dos picos de AsB e As³⁺, prejudicando sua utilização em rotina.

Finalmente, testou-se um método de separação descrito por Sanz et al. (2005a), utilizando esta mesma coluna (condição K da Tabela 5.1.1). Este método mostrou melhores resultados como resolução de pico, sensibilidade e robustez durante as análises. A Figura 5.1.1 mostra um cromatograma comum de um padrão contendo as espécies de arsênio e as Tabelas 4.1.1 e 4.2.2 descrevem as condições experimentais dos métodos de especiação por LC-ICP-MS empregados para análise de extratos de tecidos biológicos de animais e grãos de arroz, respectivamente.

TABELA 5.1.1. Resumo dos métodos cromatográficos avaliados para separação das espécies de arsenobetaina (AsB), arsenito (As^{3+}), dimetil arsênio (DMA), monometil arsênio (MMA) e arsenato (As^{5+}).

Avaliação	Coluna	Composição da FM	VI (μL)	Vazão (mL min^{-1})	Resultado
A	C8 (3 μm , 33 x 4,6 mm)	NaH_2PO_4 0,025 M+ TBAH 5 mM (pH 5,8)	50	0,7	Coeluição AsB e As^{3+} ; (TC=0,8 min).
B			20	0,7	Coeluição/TC=1,1 min.
C			5	0,7	
D	C8 (3 μm , 33 x 4,6 mm)	NaH_2PO_4 0,025 M+ TBAH 30 mM (pH 7,5)	50	1,0	Coeluição: DMA, MMA e As^{3+} .
E	C8 (3 μm , 33 x 4,6 mm)	NaH_2PO_4 0,025 M+ TBAH 30 mM (pH 6)	50	1,0	3 picos sem resolução; > TC (1,4 min)
F	C18 (5 μm , 150 x 4,6 mm)	FM "D" + Água (1:1)	50	1,0	> TC (8,5 min); melhor resolução (3 picos)
G	C18 (5 μm , 150 x 4,6 mm)	95% NaH_2PO_4 0,025 M e TBAH 30 mM + 5% MeOH (pH 5,9)	100	1,0	4 picos (2 sem resolução); TC=7,5 min.
H	Troca aniônica (5 μm , 150 x 4,6 mm)	NH_4NO_3 10 mM + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (pH 9,4)	100	1,0	4 picos bem resolvidos; TC=7 min.
J		99% FM "G"/1%MeOH (pH5,9)	100	1,0	5 picos; > intensidade p/ DMA e MMA; instável em rotina
K	Troca aniônica (5 μm , 150 x 4,6 mm)	98% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mM e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (pH 8,5) + 2% v/v MeOH	100	1,0	5 picos; TC=8 min; estável em rotina.

FM: fase móvel; **VI:** volume injetado; **TBAH:** hidróxido de tetrabutyl amônio; **TR:** tempo de retenção; **TC:** tempo de corrida; **MeOH:** metanol.

FIGURA 5.1.1. Cromatograma típico obtido por uma solução estoque de espécies de arsênio $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (expresso como arsênio, $m/z=75$). O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico e as condições analíticas estão nas Tabelas 4.1.1 e 4.2.2.

5.1.3- Estudos preliminares no desenvolvimento do método analítico para preparo de amostras de tecidos animais:

É descrito em seguida o desenvolvimento de um método rápido e simples baseado em extração assistida por ultrassom para especiação em tecidos biológicos de animais por LC-ICP-MS. O método foi validado analisando-se quatro materiais de referência (MR) para determinação de cinco espécies de arsênio (As^{3+} , As^{5+} , DMA,

MMA e AsB). Além disso, 10 amostras ordinárias de alimentos foram também analisadas utilizando o método proposto.

Os experimentos foram realizados para o desenvolvimento de um método de especiação química de arsênio que apresentasse vantagens dentro de uma análise em rotina para amostras de diversos tecidos biológicos (músculos, ovo, moluscos, entre outros). Neste sentido, a fase móvel e coluna (condição K da Tabela 5.1.1) foram escolhidas tendo em vista a possibilidade de aplicação em amostras com características diversas como solo, arroz, frango e peixe, de acordo com Sanz et al. (2005a). As condições instrumentais utilizadas nas análises estão descritas na Tabela 4.1.1.

Durante os estudos preliminares foram verificadas consideráveis variações na intensidade do ^{75}As . Por essa razão, o uso de padrão interno foi essencial em todo o estudo. Assim, dois isótopos de Ga (^{71}Ga e ^{69}Ga) e o As^{5+} foram avaliados como possíveis padrões internos. O Ga, na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, apresentou as melhores precisões intra ($n=5$) e entre dias ($n=3$), $<7\%$ e $<12\%$, respectivamente. Para simplificar ainda mais o sistema, o padrão interno foi aspirado utilizando a própria bomba peristáltica do ICP-MS operando a 10rpm ($0,5 \text{ mL min}^{-1}$). Assim, todas as seguintes análises deste estudo foram realizadas utilizando o ^{69}Ga como padrão interno (Figura 5.1.2).

FIGURA 5.1.2. Cromatograma obtido com soluções estoque das espécies de arsênio (2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, linha cheia) e gálio (Ga) como padrão interno (0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, linha pontilhada). O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico e as condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.

A etapa seguinte consistiu em avaliar a potencial interferência do cloreto (Cl^-) presente principalmente em alimentos marinhos e água de mar em altas concentrações (ACKLEY et al. 1999). O cloro, quando combinado com argônio, resulta em $\text{Ar}^{40}\text{Cl}^{35+}$, um poliatômico interferente do $^{75}\text{As}^+$. Assim, o tempo de retenção do Cl^- e a formação do poliatômico foram também avaliados. O tempo de retenção do cloreto (injeção de solução de HCl 1 % (v/v), cerca de 3300 mg L^{-1} Cl^-) foi diferente de qualquer das espécies. Ao comparar as Figuras 5.1.2 e 5.1.3, observa-se que esse elemento (Cl^-) não interfere com as espécies de arsênio durante uma análise de especiação por LC-ICP-MS nas condições utilizadas.

FIGURA 5.1.3. Cromatograma obtido por injeção de HCl 1% (v/v) utilizando o método de separação descrito por Sanz et al. (2005a). O tempo de retenção, em minutos, está acima do pico e as condições analíticas são apresentadas na Tabela 4.1.1.

5.1.4- Avaliação do uso do metanol e ácido na extração:

A eficiência da extração das espécies de arsênio para amostras sólidas depende do solvente utilizado. Vários solventes têm sido propostos incluindo metanol, ácido nítrico, água e mistura metanol/água (ACKLEY et al., 1999; SANZ et al., 2005; FOSTER et al., 2007; CAO et al., 2009; BATISTA et al., 2011b). Em geral, a eficiência de extração é maior em soluções contendo metanol (ACKLEY et al., 1999; CAO et al., 2009). Assim, nesse estudo avaliou-se primeiramente a eficiência

de extração das espécies de arsênio utilizando diferentes concentrações de metanol. O material de referência DOLT-3 (100mg) foi utilizado nessa etapa.

O metanol provoca consideráveis mudanças na intensidade do sinal em concentrações acima de 2-3 % (v/v) (GUERIN et al., 1997; HU et al., 2004). Assim, após a extração com metanol, as amostras foram injetadas a uma concentração final de 2 % (v/v), a mesma da fase móvel. Os padrões foram preparados do mesmo modo. Nesta condição, a melhor recuperação (aproximadamente 40 %) foi para o extrator contendo metanol a 10 % (v/v). A recuperação foi baseada na soma da concentração das espécies de arsênio em relação ao valor alvo do material de referência DOLT-3.

Para aumentar a recuperação, foi também avaliado o uso de ácido nítrico na solução extratora. O ácido nítrico foi selecionado de acordo com os estudos de Foster et al. (2007) e Huang, Ilgen e Fecher (2010) que demonstraram previamente recuperações acima de 85 % em diferentes amostras (plantas, tecidos biológicos e arroz). Os mesmos autores reportaram melhor preservação das espécies químicas de arsênio e, segundo Cao et al. (2009), um aumento na extração das formas inorgânicas As^{3+} e As^{5+} utilizando este ácido. Várias concentrações de ácido nítrico com em solução com metanol a 10 % (v/v) foram avaliadas. A melhor recuperação, mas ainda assim baixa (71%, material de referência DOLT-3), foi obtida com a solução extratora contendo 2,0 % (v/v) ácido nítrico + 10 % (v/v) metanol. Em seguida, no sentido de aumentar essa recuperação, foi avaliado o uso da energia de ultrassom.

5.1.5- Avaliação da extração com extrator contendo metanol e ácido nítrico associado à energia ultrassônica:

A extração assistida por ultrassom tem sido aplicada com sucesso para extrações totais ou parciais de amostras sólidas em fases líquidas (LAVILLA, VILAS e BENDICHO, 2008; BATISTA et al., 2009b). Isso simplifica o preparo das amostras aumentando a taxa de extração, evitando a contaminação das amostras e prevenindo a perda dos analitos.

A extração por ultrassom se baseia na remoção dos elementos químicos de materiais sólidos e transferência para um solvente apropriado. Após passar através do líquido, a energia de ultrassom produz bolhas devido a mudanças rápidas na pressão do líquido. Durante esse processo as bolhas explodem, gerando radicais e energia térmica que aceleram os efeitos físicos na solução, propiciando maior extração (SUSLICK, et al., 1999). Recuperações significativas dependerão das interações do analito com a matriz, dos reagentes empregados na extração e da eficiência do processador de ultrassom. Controlar essas variáveis no intuito de obter extrações quantitativas do analito na fase aquosa pode resultar em procedimentos rápidos e vantajosos.

Devido a essas vantagens, o uso de extração assistida por ultrassom tem sido proposta como uma alternativa simples e de baixo custo para acelerar a extração de diferentes elementos químicos de amostras biológicas (BATISTA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; SOUZA et al., 2010; BATISTA et al., 2011a).

Primeiramente variou-se o tempo de extração, de 0 a 4 minutos, utilizando a ponteira de ultrassom no extrator (HNO_3 2 % (v/v) + metanol 10 % (v/v)). Tempos

maiores não foram investigados, pois o principal objetivo era o desenvolvimento de um método rápido de extração. Neste experimento a concentração da solução extratora (1mL da solução contendo metanol 10 % (v/v) + HNO₃ 2 % (v/v)) e a massa de amostra (50 mg do material de referência DORM-3) foram mantidos constantes.

Uma recuperação quantitativa (102,2 %), com precisão satisfatória <7 % foi alcançada aplicando-se apenas 2 minutos de ultrassom utilizando ponteira de ultrassom (Figura 5.1.4). Os estudos de recuperação foram baseados na concentração de arsênio após a análise por especiação por LC-ICP-MS (soma da concentração das espécies de arsênio no material de referência DORM-3) e a concentração total de arsênio estabelecida como valor alvo no material de referência.

FIGURA 5.1.4. Influência do tempo de sonicação na recuperação das espécies de arsênio do material de referência DORM-3 (50 mg, n=3). Solução extratora: 1 mL de metanol 10 % (v/v) + ácido nítrico 2 % (v/v). As condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.

5.1.6- Avaliação da influência da massa da amostra:

A massa da amostra tem substancial influência na extração e homogeneidade. Os dados de precisão e exatidão estão também intimamente ligados à massa. De acordo com Lavilla, Vilas e Bendicho (2008), um excesso de massa pode resultar em baixa recuperação por diminuir o efeito do ultrassom. Então, foi também investigado o efeito da massa da amostra na eficiência da extração das espécies de arsênio. Para esse experimento as condições otimizadas adotadas estão descritas na Tabela 4.2.1.

O material de referência DORM-3 também foi escolhido para esse experimento. Massas variando de 10 a 80 mg foram avaliadas. Com 10 ou 20 mg de amostras, a recuperação foi $>90\%$, entretanto, o desvio padrão relativo foi maior que 10% para ambas as massas, provavelmente devido a problemas com a representatividade. Por outro lado, para uma massa de 50 mg houve 88 % de recuperação com boa precisão ($<5\%$, $n=3$) (Figura 5.1.5). Portanto esta massa foi selecionada para os estudos seguintes. Na Figura 4.1.1 pode ser observado o tratamento completo das amostras e materiais de referência pelo método proposto.

FIGURA 5.1.5. Influência da massa de amostra na recuperação das espécies de arsênio do material de referência DORM-3 ($n=3$). Tempo de extração: 2 minutos; solução extratora 1 mL de solução de metanol 10 % (v/v) + ácido nítrico 2 % (v/v). As condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.

5.1.7- Avaliação da interconversão das espécies de arsênio:

Devido à possibilidade de interconversão das espécies de arsênio durante o procedimento de preparo das amostras, a estabilidade dos padrões das espécies de arsênio sob ação da energia de ultrassom foi investigada. Vários padrões contendo as cinco espécies de arsênio determinadas no presente estudo foram preparadas e analisadas por LC-ICP-MS após a aplicação do método de extração proposto. As recuperações de todas as espécies de arsênio variaram de 92 % a 103 % que demonstram que o proposto procedimento não provoca conversão das espécies.

5.1.8- Estudos de validação do método:

O método desenvolvido foi validado analisando materiais de referência de matrizes com diferentes constituições. Os materiais de referência NIST SRM 1577 (fígado bovino), IRMM CE 278 (tecido de mexilhão), NRC DOLT-3 (tecido de fígado de peixe-cão) e NRC DORM-3 (proteína de peixe) foram analisados em triplicata. Os resultados estão na Tabela 5.1.2.

A soma da concentração das espécies está de acordo com os valores alvo para todos os valores certificados dos materiais de referência. Isso assegura a precisão e exatidão do método proposto. O cromatograma do material de referência IRMM CE 278 apresentou três picos para arsênio em diferentes tempos de retenção com baixas concentrações (dados não apresentados).

Os limites de detecção instrumentais ($3 \times DP_{\text{branco}} / \text{coeficiente angular}$) para AsB, As^{3+} , DMA, MMA e As^{5+} foram 1,3; 0,9; 0,6; 0,7 e 0,8 $ng\ g^{-1}$, respectivamente. As curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação melhores que 0,998 para todas as espécies com concentrações dos padrões até 30 $\mu g\ L^{-1}$, pois acima desta concentração os picos dos padrões de AsB e As^{3+} se aproximam, prejudicando a resolução cromatográfica. A precisão intra-dia ($n=7$) foi $<8,0\ \%$, enquanto a precisão entre-dias ($n=5$) foi $<12,0\ \%$ (ambos os testes realizados com DORM-3) para todas as espécies de arsênio. Esses valores estão de acordo com Ribani et al. (2004) que preconizam valores aceitáveis de precisão melhores que 20% para determinações de traços em amostras biológicas.

5.1.9- Especificação de arsênio em diferentes amostras reais contendo arsênio:

O método desenvolvido neste estudo foi aplicado para a especificação de arsênio em 10 diferentes amostras de alimentos. A soma de todas as espécies de arsênio obtidas com o método proposto está de acordo com a concentração de arsênio total determinado por ICP-MS. As recuperações foram sempre $>85\ \%$, de acordo com a Tabela 5.1.2.

Nas amostras de alimentos marinhos, AsB foi a forma predominante de arsênio encontrada enquanto o músculo e ovo de galinha, MMA foi a forma principal. Em algumas amostras (*Mytella guyanensis*, *Octopus vulgaris*, *Merluccius hubbci*), as concentrações das formas inorgânicas (As^{3+} e As^{5+}) excederam 500 $ng\ g^{-1}$.

Infelizmente não é possível localizar a origem do arsênio presente nessas amostras. Dois cromatogramas de amostras reais são apresentados na Figura 5.1.6 A e B. Pode-se observar na Figura 5.1.6A um cromatograma da especiação de um ovo (gema + clara) contaminado com arsênio onde a espécie predominante, MMA, possui uma concentração 20 vezes maior que o As^{5+} nesta mesma amostra. Na Figura 5.1.6B observa-se um cromatograma de uma amostra de peixe comumente consumido no Brasil contendo as cinco espécies de arsênio estudadas.

Alimentos marinhos naturalmente acumulam arsênio presente na água de mar (PETROPULU, VARSAMIS e PARISSAKIS, 1997). Sendo assim, é importante monitorar a concentração de arsênio e as espécies para determinar o real risco da ingestão de alimentos contaminados devido às diferenças na toxicidade nas espécies de arsênio.

FIGURA 5.1.6. Cromatogramas obtidos de amostras reais aplicando o método proposto: (A) ovo de galinha e (B) peixe (*Tilapia mariae* b). As concentrações estão na Tabela 5.1.2. O tempo de retenção está acima de cada pico, em minutos e as condições analíticas estão na Tabela 4.1.1.

TABELA 5.1.2. Especificação de arsênio em materiais de referência (em negrito) e diferentes amostras utilizando o método proposto. Os valores encontrados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão; n=3; ^A: ng g⁻¹; ^B: µg g⁻¹; LD: limite de detecção.

Amostras	As Total	AsB	As ³⁺	DMA	MMA	As ⁵⁺	Soma das espécies	Recuperação(%)
Músculo de frango ^A	116,4 $\pm$ 8,6	8,7 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 0,2	26,5 $\pm$ 9,2	41,3 $\pm$ 9,3	17,0 $\pm$ 2,1	99,6 $\pm$ 4,4	85,6
<i>Tilapia mariae</i> (a) ^A	353,6 $\pm$ 20,3	283,9 $\pm$ 14,7	<LD	<LD	<LD	27,7 $\pm$ 1,1	311,6 $\pm$ 3,2	88,1
Músculo de boi ^A	75,1 $\pm$ 13,1	46,9 $\pm$ 8,5	<LD	9,1 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 4,2	78,3 $\pm$ 2,9	104,2
<i>Tilapia mariae</i> (b) ^A	246,8 $\pm$ 35,1	55,7 $\pm$ 10,6	86,8 $\pm$ 42,6	27,1 $\pm$ 6,9	25,5 $\pm$ 1,3	39,3 $\pm$ 35,5	234,5 $\pm$ 19,3	95,0
SRM1577^A (fígado de boi)	55,0$\pm$5,0	9,9$\pm$0,2	<LD	28,7$\pm$2,3	8,1$\pm$0,4	12,3$\pm$1,0	59,0$\pm$0,8	107,3
Ovo de galinha ^B	12,2 $\pm$ 3,5	<LD	<LD	<LD	13,1 $\pm$ 1,8	0,7 $\pm$ 0,01	13,7 $\pm$ 0,4	112,2
<i>Mytella guyanensis</i> ^B	5,7 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,1	85,6
<i>Octopus vulgaris</i> ^B	46,3 $\pm$ 4,6	40,3 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,03	42,0 $\pm$ 0,1	90,5
<i>Merluccius hubbsi</i> ^B	52,7 $\pm$ 2,2	43,6 $\pm$ 4,6	1,0 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	45,1 $\pm$ 1,0	85,6
<i>Thunus atlanticus</i> ^B	4,4 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,01	<LD	0,2 $\pm$ 0,1	<LD	<LD	3,8 $\pm$ 0,03	88,9
<i>Triops cancriformis</i> ^B	21,3 $\pm$ 5,6	19,5 $\pm$ 0,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	91,6
CE 278^B (tecido de mexilhão)	6,1$\pm$0,1	3,1$\pm$0,2	0,2$\pm$0,02	1,5$\pm$0,07	0,2$\pm$0,7	0,4$\pm$0,04	5,3$\pm$0,1	88,0
DOLT-3^B (fígado de peixe)	10,2$\pm$0,5	7,8$\pm$0,8	0,3$\pm$0,07	0,6$\pm$0,1	0,3$\pm$0,2	0,4$\pm$0,2	9,4$\pm$0,3	91,9
DORM-3^B (proteína de peixe)	6,9$\pm$0,3	5,4$\pm$0,7	<LD	0,62$\pm$0,07	0,32$\pm$0,04	0,4$\pm$0,1	6,8$\pm$0,2	98,9

5.2 Estudo II: *Validação de um método simples para preparo e determinação das espécies de arsênio (AsB , As^{3+} , DMA , MMA e As^{5+}) por LC-ICP-MS em grãos de arroz e avaliação da concentração dessas espécies em amostras de grãos comercializadas no Brasil.*

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um alimento básico na dieta mundial. Em um estudo em alimentos da cesta básica nos EUA foram encontradas altas concentrações de arsênio inorgânico no arroz quando comparado a outros alimentos (SCHOOFF et al., 1999). A partir de então, o arroz passou a ser estudado com relação às formas e concentrações de arsênio presentes. Outros estudos demonstraram que esse cereal é particularmente eficiente em acumular arsênio nos grãos e caule quando comparado à cevada e ao trigo (WILLIAMS et al., 2007). Assim, o arroz representa uma fonte significativa de arsênio, principalmente com relação às formas mais tóxicas, As^{3+} e As^{5+} (MEHARG et al., 2009; ATSDR, 2007).

5.2.1- Avaliação de métodos de extração das espécies de arsênio em arroz:

Inicialmente foi avaliado o método de extração das espécies de arsênio desenvolvido no Estudo I. No entanto, foi observada uma baixa recuperação (<30%) das espécies de arsênio. Neste sentido, buscou-se na literatura métodos já estabelecidos e previamente validados na tentativa de utilização e validação no presente estudo. Os métodos que foram avaliados estão resumidos na Tabela 5.2.1. Para estes estudos sempre foram determinadas as recuperações de arsênio a partir

da soma das concentrações das espécies de arsênio e comparação com a concentração total presente no material de referência NIST Rice Flour 1568a.

O primeiro método avaliado, proposto por Narukawa et al. (2008), onde se utiliza água como extrator, mostrou-se ineficiente para extrair as espécies de arsênio de arroz (condição A da Tabela 5.2.1). Posteriormente, foi avaliada uma solução básica contendo tetrametil-amônio (TMAH) como extrator (BATISTA et al., 2009c). Este extrator contendo TMAH, em duas diferentes concentrações, também não mostrou ser eficiente (condições B e C da Tabela 5.2.1), além de gerar um extrato de difícil filtração.

A utilização do ácido nítrico $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ no extrator, como reportado por Huang, Ilgen e Fecher (2010), se mostrou mais eficaz que os métodos anteriores em extrair as espécies de arsênio. Este método propõe a utilização de extração em meio ácido assistida por microondas. Para facilitar o processo, inicialmente, testou-se o mesmo método, porém trocando a energia de microondas por energia ultrasônica, com o uso de ponteira de ultrassom (em diversos tempos) para facilitar o processo de extração. No entanto, o uso da energia de ultrassom por um período $>8\text{min}$ reduziu a recuperação a zero quando comparada ao não uso de sonicação (recuperação de 32%) (condição D da Tabela 5.2.1). Os efeitos térmicos e de cavitação são os principais mecanismos da ultrassonicação e, combinados, geram grande energia térmica na solução (SUSLICK et al., 1999). Por este motivo, o provável cozimento do arroz prejudicou a recuperação uma vez que, nos tempos de extração avaliados, formou-se uma massa de difícil filtração. Para uma boa filtração deve haver completa hidrólise dos carboidratos do arroz.

Em seguida, aplicou-se exatamente o mesmo método proposto por Huang, Ilgen e Fecher (2010), utilizando energia de microondas para extração das espécies de arsênio em meio ácido (condição E da Tabela 5.2.1). A recuperação foi um pouco maior que as anteriores (~44%), porém, na aplicação a diferentes tipos de amostras de grãos de arroz (integral, parboilizado, polido), observaram-se reduções nas recuperações entre as amostras e maior inviabilidade em aplicá-lo em análises de rotina, devido à baixa frequência analítica do equipamento de microondas utilizado neste estudo (12 vasos). Essa diferença na recuperação, devido ao processamento dos grãos de arroz, também foi relatada no artigo de Huang, Ilgen e Fecher (2010).

Um seguinte método avaliado baseou-se na aplicação do método de Huang, Ilgen e Fecher (2010), porém utilizando banho maria. Neste caso a extração se mostraria mais fácil de ser operada em rotina, em detrimento ao forno de microondas. No entanto, ainda foi observada baixa porcentagem de recuperação (~35% com 2 h de extração a 95 °C) (condição F da Tabela 5.2.1). Observa-se também que houve uma relação do tempo de extração com a recuperação (Figura 5.2.1). Entre 30min e 1h (Figura 5.2.1, condição F da Tabela 5.2.1), houve dificuldade na filtração do extrato devido, provavelmente, ao cozimento de arroz e formação de uma “massa” e, conseqüentemente, baixa recuperação (<20%). Já ao se aplicar o tempo de 2 h a 95 °C observou-se melhor recuperação.

Em seguida, avaliou-se a combinação dos métodos de Sun et al. (2009), que propõe a utilização de massas de amostra de 0,2 g para extração de espécies de arsênio de arroz, combinada com o método proposto por Huang, Ilgen e Fecher (2010) (condição G da Tabela 5.2.1), utilizando frascos de 50mL do tipo Falcon® abertos contendo as amostras em banho maria ao invés do uso de sistemas fechados em microondas. A recuperação aumentou consideravelmente (~66%),

mostrando uma relação entre a massa de grãos utilizada e a recuperação. Esta influência da massa da amostra na extração foi em seguida avaliada utilizando o método modificado de Huang, Ilgen e Fecher (2010) com a troca do uso de forno de microondas por aquecimento de frascos contendo as amostras de arroz em banho maria, mas fechados (Figura 5.2.2, condição H da Tabela 5.2.1). Massas inferiores a 200 mg apresentaram melhores recuperações quantitativas. No entanto, a massa de 200 mg foi selecionada às melhores precisão e recuperação ($85\pm 7\%$) entre as massas de amostra avaliadas. Este procedimento apesar de mostrar resultados satisfatórios para o material de referência de arroz NIST 1568a, mostrou recuperações variadas e bem mais baixas para amostras ordinárias de arroz (arroz branco, integral e parboilizado).

Finalmente, adicionou-se uma etapa ao método anterior na tentativa de aumentar a eficiência de extração das espécies para todos os tipos de grãos de arroz. Assim, a agitação por um período de 12-15 h (“overnight”), anterior ao aquecimento, foi adicionada ao método (Figura 4.2.1, condição I da Tabela 5.2.1). Este foi aplicado para as amostras de grãos de diversos tipos de processamento e material de referência utilizando 200mg de amostra e 10 mL de ácido nítrico (2%v/v) em tubo de 50 mL do tipo Falcon[®], fechado com fita de politetrafluoretileno. Este tubo foi então agitado em sistema rotacional por 12-15h e aquecido em banho maria por cerca de 2,5 h a 95 °C (Figura 4.2.1).

Com relação à conversão das espécies no meio extrator, não foram observadas conversões, mesmo entre As^{3+} e As^{5+} utilizando o método descrito na Figura 4.2.1. Alguns estudos apontam importantes dados sobre a inter-conversão $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$. Parece que essa conversão não é de grande importância na planta do arroz, pois a inter-conversão $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$ ocorre naturalmente (XU, McGRATH e

ZHAO, 2007) pela ação da GSH (glutathiona reduzida) presente no grão de arroz que, em pH ácido, pode converter o As^{5+} a As^{3+} (SCOTT et al., 1999). Finalmente, um recente estudo de Calle et al. (2011) sobre análise de um material de referência de arroz, mostrou que o método em si não importa para a determinação de arsênio total e inorgânico ($\text{As}^{3+} + \text{As}^{5+}$), destacando ainda a necessidade de estabelecimento de limites máximos desses analitos em alimentos.

TABELA 5.2.1. Resumo dos métodos avaliados para extração das espécies de arsênio do material de referência NIST 1568a Rice Flour (valor de certificado para arsênio: $290 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$, recuperação calculada a partir da média deste valor).

Avaliação	Extrator (mL)	Massa NIST 1568a Rice Flour	Método de aquecimento	Recuperação (%)	Observação
A	10mL água ultra pura	1g	MO: 0-80 °C 5 min; 80 °C 30 min; resfriamento 10 min	10 $\pm$ 3	Difícil filtração.
B	10mL TMAH 0,05M	1g	MO: 0-80 °C 5 min; 80 °C 30 min; resfriamento 10 min	0	Difícil filtração.
C	10mL TMAH 0,07M	1g	MO: 0-80 °C 5 min; 80 °C 30 min; resfriamento 10 min	0	Difícil filtração.
D	10mL HNO ₃ 0,28M	1g	Ponteira US em 0, 2, 3, 5, 8, 15 e 20 min	32, 29, 26, 21, 0, 0 e 0, respectivamente	DMA 50% do total.
E	10mL HNO ₃ 0,28M	1g	MO 95 °C 90 min	44 $\pm$ 5	DMA 50% do total.
F	10mL HNO ₃ 0,28M	1g	BM 95 °C de 0-3 h	Figura 5.2.1	Sistema aberto; difícil filtração em 0,5 e 1h.
G	10mL HNO ₃ 2%v/v	0,2g	BM 2 h	66 $\pm$ 5	Sistema aberto.
H	10mL HNO ₃ 2%v/v	0,1-1g	BM 2 h 95 °C	Figura 5.2.2	Sistema fechado; relação negativa entre massa e recuperação.
I	10mL HNO ₃ 2%v/v	0,2g	Agitação “overnight”+BM 95 °C ~2,5 h	85 $\pm$ 7	Sistema fechado.

TMAH: hidróxido de tetrametil amônio; **MO:** microondas; **US:** de ultrassom; **BM:** banho maria.

FIGURA 5.2.1. Estudo da influência do tempo de extração das espécies de arsênio do arroz em função da recuperação. Material de referência NIST 1568a, recuperação dada como soma das concentrações das espécies de arsênio. Extração conduzida de acordo com os dados da condição F da Tabela 5.2.1. As condições analíticas estão na Tabela 4.2.2.

FIGURA 5.2.2. Estudo da influência da massa na extração das espécies de arsênio do arroz em função da recuperação. Material de referência NIST 1568a, recuperação dada como soma das concentrações das espécies de arsênio. Extração conduzida de acordo com os dados da condição H da Tabela 5.2.1. As condições analíticas estão na Tabela 4.2.2.

5.2.2- Validação do método de extração, quantificação e controle de qualidade das análises:

Para verificar a precisão e exatidão do método proposto, o material de referência de farinha de arroz do “National Institute of Standards and Technology” (NIST), SRM 1568a, foi analisado em todos os experimentos de validação e também durante as análises das amostras ordinárias de grãos de arroz comercializadas no Brasil. Para arsênio total foi encontrado $297 \pm 8 \text{ ng g}^{-1}$ ($n=5$), que está em concordância com o valor certificado ($290 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$). Como o valor de arsênio neste material de referência é somente certificado para a concentração de arsênio total, utilizamos os valores obtidos para as diferentes espécies de arsênio com a aplicação do método aqui utilizado e confrontamos os valores com os apresentados por outros estudos da literatura (Tabela 5.2.2).

Na Tabela 5.2.2 pode-se observar as concentrações das diferentes espécies de arsênio no material de referência NIST SRM 1568a encontradas neste e em outros estudos publicados na literatura. As diferenças observadas podem ser devido a variáveis como tempo e temperatura de extração, extrator (água, metanol/água ácido nítrico), tratamento enzimático e homogeneização do material de referência, que não é certificado para espécies de arsênio. Para o arsênio inorgânico, os valores variaram de 80 a $144,6 \text{ ng g}^{-1}$ (As^{3+} e As^{5+} variaram de 52 a 129,2 e de 15,4 a $53,7 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente). Por outro lado, para as espécies orgânicas, os valores variaram de 33,4 a 185 ng g^{-1} (MMA e DMA variaram de 1,9 a 14,9 e de 31,5 a 174 ng g^{-1} , respectivamente). Os valores encontrados no presente estudo estão em concordância com os observados nos estudos de D’Amato, Forte e Caroli (2004),

Mar et al. (2009), Narukawa et al. (2008) e Sun et al. (2009) e a soma das espécies não diferiram estatisticamente ($p=0,400$) do valor certificado no material de referência NIST Rice Flour 1568a (Tabela 5.2.2).

Os limites de detecção instrumental para As^{3+} , DMA, MMA e As^{5+} ($3 \times \text{DP}_{\text{branco}}/\text{coeficiente angular}$) foram: 0,4; 0,1; 0,1 e 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A Figura 5.2.3A mostra um cromatograma típico de uma amostra de arroz comercializada no estado do Rio Grande do Sul. Foram observadas pequenas variações no tempo de retenção entre as espécies durante as análises em rotina intradia. A maior variação (4,5% inferior ao tempo de retenção inicial) foi observada para o As^{5+} . As demais espécies variaram menos que 3% durante as análises em rotina (cerca de 10 amostras/dia em triplicata). O coeficiente de correlação linear (R) apresentou-se $>0,993$ para todas as espécies de arsênio. As concentrações dos padrões de calibração foram de 2 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. O uso de um padrão interno, neste caso AsB (não presente em amostras de arroz), se mostrou obrigatório, uma vez que principalmente em análises em rotina, há significativas flutuações no sinal do ICP-MS.

TABELA 5.2.2. Comparação da concentração das espécies de arsênio encontradas no material de referência Rice Flour NIST 1568a em diferentes estudos (Valor certificado: $290 \pm 30 \text{ ng g}^{-1} \text{ As}$; $n=6$).

Soma das espécies (ng g^{-1})	Recuperação (%)	As^{3+} (ng g^{-1})	As^{5+} (ng g^{-1})	DMA (ng g^{-1})	MMA (ng g^{-1})	Referência
272,8 $\pm$ 14,8	94,1 $\pm$ 5,1	63,4 $\pm$ 3,5	50,3 $\pm$ 2,9	144,2 $\pm$ 4,5	14,9 $\pm$ 3,9	Presente trabalho
286,4 $\pm$ 6,1	99,1 $\pm$ 2,1	129,2 $\pm$ 3,1	15,4 $\pm$ 3,8	31,5 $\pm$ 1,6	1,9 $\pm$ 0,7	Sanz et al., 2005
281 $\pm$ 2	97,0	52 $\pm$ 1	44 $\pm$ 2	173 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0,8	Narukawa et al., 2008
271 $\pm$ 3	93 $\pm$ 1	67 $\pm$ 5	36 $\pm$ 1	162 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	Zhu et al., 2008
286,4 $\pm$ 6,2	82,3 $\pm$ 1,6	68,3 $\pm$ 3,7	20,5 $\pm$ 2,3	135,4 $\pm$ 4,1	8,1 $\pm$ 1,3	Sanz et al., 2007
276	95,2	75	12	180	9	Pizarro et al., 2003
272	93,8	55 $\pm$ 6	41 $\pm$ 3	166 $\pm$ 6	10 $\pm$ 2	Mar et al., 2009
277	95,5	67 $\pm$ 4	39 $\pm$ 3	158 $\pm$ 5	13 $\pm$ 2	Kohlmeyer et al., 2003
288,2	99,4	54,7 $\pm$ 1,4	53,7 $\pm$ 3,3	165 $\pm$ 8	14,8 $\pm$ 1,8	D'Amato et al., 2004
240 $\pm$ 40	80 $\pm$ 12	80 $\pm$ 14		160 $\pm$ 24	2	Williams et al., 2005
274	94	92 $\pm$ 4		174 $\pm$ 9	8 $\pm$ 2	Heitkemper et al., 2001
290 $\pm$ 10	98,3	110 $\pm$ 10		180 $\pm$ 3		Sun et al., 2009

FIGURA 5.2.3. Cromatogramas típicos obtidos para: (a) soluções estoque de espécies de arsênio $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (expresso como arsênio) e (b) amostra de arroz do Rio Grande do Sul. O tempo de retenção, em minutos, está acima de cada pico, o método de extração aplicado está representado na Figura 4.2.1 e as condições analíticas na Tabela 4.2.2.

5.2.3- Considerações sobre o arroz e sua relação com o arsênio:

São variados os tipos de beneficiamento ou processamento do arroz. O arroz integral é o arroz que não sofreu o processo de polimento, ou seja, a retirada da parte que recobre o grão que vai do pericarpo até a aleurona (Figura 5.2.4), conhecido como “farelo de arroz”. O arroz polido sofre este processo de limpeza, sendo esta referida camada retirada. Já o arroz parboilizado, termo adaptado do inglês “partial boiled”, é o arroz parcialmente cozido com a casca. Neste processo, o grão (endosperma) absorve nutrientes da casca como elementos químicos e vitaminas. Assim, o arroz pode ser parboilizado e depois descascado somente, fornecendo o arroz integral, ou descascado e posteriormente polido, fornecendo o arroz branco ou polido (EMBRAPA, 2011). Para melhor compreensão, a Figura 5.2.4 representa uma planta de arroz cultivada em sistema irrigado (também chamado anaeróbico ou terras baixas).

FIGURA 5.2.4. Principais partes da planta do arroz (*Oryza sativa* L.). 1: panícula; 2: colmo (caule); 3: folha; 4: raiz; 5: casca; 6: pericarpo; 7: tegumento; 8: nucelo; 9: aleurona; 10: endosperma; 11: embrião; 12: farelo (Adaptada de: RBO, 2012 e HSW, 2012).

O arroz, diferente de outros cereais, é cultivado, geralmente, em solos inundados, onde condições anaeróbicas somadas ao excesso de água levam a mobilização do arsênio e, conseqüentemente, ao aumento do acúmulo na planta (XU et al., 2008). O As^{3+} , espécie mais tóxica, tem alta solubilidade e mobilidade no solo, sendo eficientemente absorvido pelas raízes, chegando aos grãos e entrando na alimentação (MA et al., 2008). Por estes motivos a presença de arsênio em amostras de arroz vem sendo avaliada em vários países. Porém, no Brasil, um país

onde este alimento é muito consumido, há pouca informação sobre a concentração total de arsênio e sobre suas espécies.

5.2.4- Concentração de arsênio total nas amostras de arroz do Brasil e comparação com valores obtidos em amostras de outros países:

As concentrações de As nas amostras de arroz do Brasil variaram entre 107,9 a 427,7 ng g⁻¹. A Figura 5.2.5 mostra a distribuição de arsênio (considerando apenas o valor total) nas amostras de arroz analisadas no presente estudo. Essa distribuição se aproxima de uma distribuição normal. Os dados de Meharg et al. (2009), que reúne informações de amostras de arroz do mundo (ponderado pela percentagem de contribuição na produção mundial de arroz) e de países em desenvolvimento (Bangladesh, China, Egito, Tailândia e Índia), mostram uma distribuição da concentração de arsênio total aproximada às amostras brasileiras.

FIGURA 5.2.5. Distribuição de arsênio total nas amostras analisadas de grãos de arroz do Brasil.

Entre todos os tipos analisados neste estudo, o arroz integral (I), parboilizado integral (PI), branco (B) e parboilizado branco (PB) apresentaram médias de 348,4; 265,9; 222,9 e 214,9 ng g⁻¹ de arsênio (Tabela 5.2.5). Considerando-se apenas o arroz branco (215,9±75,6 ng g⁻¹ de arsênio), parboilizado (214,9±94,3 ng g⁻¹ de arsênio) e integral (parboilizado e não parboilizado, 293,4±62,5 ng g⁻¹ de arsênio), não houve significativas diferenças estatísticas entre o arroz branco e parboilizado ($p=0,07$), porém verificaram-se significativas diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre o arroz branco e o integral, assim como também observado por Meharg et al. (2008), sendo o arroz integral o de maior concentração de arsênio, provavelmente pela prevalência da camada que vai do pericarpo até a aleurona. Comparando-se as

concentrações de arsênio em relação à origem do produto (por estado), que, infelizmente não revela o local de cultivo, não se observa diferenças estatisticamente significativas.

Uma análise descritiva revela que os valores da concentração total de arsênio nas amostras brasileiras analisadas estão próximos às concentrações das amostras de outras partes do mundo (Tabela 5.2.5), exceto Canadá (65 ng g^{-1} para arroz selvagem) e Índia ($45,6 \text{ ng g}^{-1}$ para o arroz branco e 70 ng g^{-1} para o integral) que representam exemplos de arroz com baixas concentrações de arsênio. Ainda com relação à Tabela 5.2.5, Bangladesh e Taiwan apresentaram as maiores concentrações de arsênio total (610 ng g^{-1} para o arroz integral e $383,3 \text{ ng g}^{-1}$ para o branco).

Levando em consideração os estados brasileiros (Tabela 5.2.3), o Rio Grande do Sul, com o maior número de amostras ($n=32$), apresentou uma concentração média de $214,8 \pm 81,3 \text{ ng g}^{-1}$ de arsênio para o arroz branco (B e OB). Para o arroz parboilizado branco, a concentração média de arsênio foi $223,7 \pm 93,6 \text{ ng g}^{-1}$ (PB e OP). Já as concentrações de arsênio para o arroz integral (I e PI) foram $349,2 \pm 111,0$ e $262,3 \pm 32,7 \text{ ng g}^{-1}$.

Por outro lado, no arroz de outros estados (Tabela 5.2.4), São Paulo e Minas Gerais apresentaram os seguintes valores para o arroz branco (B): $283,9 \pm 114,4$ e $256,2 \pm 78,0 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. O arroz integral de São Paulo (I, 12) e parboilizado branco de Santa Catarina (PB, 11) apresentaram concentrações de arsênio de $346,9 \pm 9,2$ e $118,0 \pm 4,8 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. As amostras analisadas provenientes do estado de Goiás apresentaram a menor concentração média de arsênio para o arroz B ($195 \pm 1,4 \text{ ng g}^{-1}$).

Quando comparamos essas concentrações nos diferentes estados (tipos de solo) e processamento devemos levar vários fatores em consideração. Por exemplo, no estado de Goiás, o latossolo (IGREJA et al., 1995) é mais comum, então o cultivo é predominante em terras altas (sem alagamento), ao mesmo tempo a concentração de ferro neste tipo de solo é maior, o que possivelmente pode reduzir a absorção de arsênio pelas raízes do arroz (LIU, TRIBST e LIAO, 2005; HEIKENS, 2006). Assim arrozais cultivados com alagamento, como o Rio Grande do Sul (planossolo, solos argilosos), a alta mobilidade do arsênio (XU et al., 2008; HEIKENS, 2006) provavelmente aumenta as concentrações de arsênio na planta, como observado (Tabelas 5.2.3 e 5.2.4). Este processo ocorre da seguinte forma: quando submerso o arsênio do solo se mobiliza de duas maneiras: i) dissolução redutiva dos óxidos e hidróxidos de ferro e liberação do arsênio associado a estes óxidos; ii) redução do As^{5+} , mais fortemente adsorvido, a As^{3+} , fracamente adsorvido, aumentando a concentração de arsênio solubilizado na água de irrigação (ZHAO, McGRATH e MEHARG, 2010). Portanto, o tipo de solo, processamento do grão, condição de cultivo (alagamento ou não) e a qualidade da água utilizada na irrigação influenciam as concentrações de arsênio total e consequentemente de suas espécies no arroz (HEIKENS, 2006; SAHA e ALI, 2007).

TABELA 5.2.3. Espécies de arsênio em amostras de arroz beneficiadas em cidades do Rio Grande do Sul (n=32).

Tipo de Arroz	Cidade	As Total (ng g ⁻¹)	As ³⁺ (ng g ⁻¹)	As ⁵⁺ (ng g ⁻¹)	DMA (ng g ⁻¹)	MMA (ng g ⁻¹)	Soma das espécies (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
B	1 a	135,3±3,7	47,6±2,9	30,2±6,9	35,3±1,9	11,8±3,3	124,9±3,7	92,3
	2 a	122,2±3,6	48,6±2,3	45,2±6,8	14,6±4,1	<LD	108,4±4,4	88,7
	2 b	270,6±4,9	120,6±2,1	42,4±0,2	108,6±4,5	11,9±2,6	283,5±2,4	104,8
	2 c	109,3±2,5	51,3±3,9	27,5±2,9	19,2±3,1	<LD	98,1±3,3	89,7
	3 a	247,8±5,2	92,1±3,9	26,8±0,8	113,1±7,6	11,5±1,5	243,5±3,5	98,3
	3 b	139,0±5,0	78,0±7,8	23,4±2,6	54,7±6,6	7,7±1,4	163,8±4,6	117,8
	4 a	318,3±12,3	127,4±8,0	25,6±0,6	165,8±13,4	11,8±0,7	330,6±5,7	103,9
	6 a	256,5±7,2	66,7±3,0	28,8±10,1	97,6±13,7	25,4±0,6	218,5±6,9	85,3
	6 b	373,9±20,4	155,7±2,6	37,7±7,4	93,6±13,0	29,3±8,9	316,3±8,0	84,6
	6 c	207,3±10,2	66,9±2,8	25,2±8,1	109,4±14,5	<LD	201,5±8,5	97,2
	6 d	263,1±9,4	95,8±1,4	48,1±3,9	139,8±2,8	16,2±3,7	299,8±2,4	113,9
	7	174,9±5,4	50,1±9,5	59,4±8,2	39,1±6,3	<LD	148,7±8,0	85,1
	OB 7	174,1±16,1	85,6±1,8	33,1±0,7	39,9±9,3	<LD	158,7±3,9	91,2
	PB 1 a	119,6±3,7	54,4±10,6	39,1±6,0	29,0±4,2	<LD	122,5±6,9	102,4
PB	1 b	107,9±2,9	44,9±4,4	41,5±0,5	30,0±2,3	<LD	116,3±2,4	107,8
	1 c	317,1±8,1	127,3±5,1	39,0±13,6	113,8±5,7	9,1±1,8	289,2±6,6	91,2
	2 d	127,1±6,7	67,8±8,9	44,7±2,5	26,2±3,4	9,3±5,3	148,0±5,0	116,4
	5	366,7±14,9	127,1±2,2	60,2±0,6	85,5±8,3	50,5±9,2	323,3±5,1	88,2
	6 a	366,6±22,3	116,7±8,8	60,4±1,9	139,4±5,0	<LD	316,5±5,2	86,3
	6 b	216,0±7,2	77,5±2,7	46,9±3,5	73,6±9,8	21,3±0,7	219,3±4,2	101,6
	7 a	226,8±4,3	61,1±7,5	50,9±8,9	76,3±8,8	8,6±1,7	196,8±5,4	86,8
	7 b	241,2±6,1	103,6±5,0	48,5±3,5	95,7±8,1	9,6±1,7	257,4±4,6	106,7
	7 c	210,5±7,2	102,2±4,8	23,6±0,3	57,0±3,1	11,6±1,6	194,4±2,5	92,4
	PO 2 e	161,6±8,3	92,5±5,4	49,9±8,3	36,1±0,1	<LD	178,5±4,6	110,5
I	9	427,7±16,3	148,2±9,6	37,5±2,3	206,2±14,1	18,0±1,7	410,0±6,9	95,8
	7	270,7±5,7	139,2±4,0	51,3±14,7	70,1±8,2	14,2±0,4	274,8±6,8	101,5
PI	6 a	287,7±6,9	106,3±7,6	40,6±3,7	101,2±11,3	<LD	248,1±7,5	86,2
	6b	316,4±9,0	95,5±4,6	63,1±6,4	111,4±6,1	<LD	270,0±5,7	85,4
	7 a	240,6±6,4	101,2±5,6	53,9±6,2	70,1±0,5	27,8±1,2	253,1±3,4	105,2
	7 b	226,3±6,3	94,2±3,7	38,3±6,1	76,7±6,7	7,9±0,6	217,1±4,3	95,9
	8 a	255,6±9,8	128,8±1,8	45,3±1,2	46,0±9,2	<LD	220,1±4,1	86,2
	8 b	268,9±5,3	97,5±4,6	68,9±1,8	86,5±3,2	<LD	252,9±3,2	94,1

PB: arroz parboilizado branco; B: arroz branco; I: arroz integral; PI: arroz parboilizado integral; PO: arroz parboilizado orgânico (branco); OB: arroz orgânico branco; LD: limite de detecção.

TABELA 5.2.4. Espécies de arsênio em amostras de arroz de outros estados do Brasil (n=12).

Tipo de arroz	Cidade	As Total (ng g ⁻¹)	As ³⁺ (ng g ⁻¹)	As ⁵⁺ (ng g ⁻¹)	DMA (ng g ⁻¹)	MMA (ng g ⁻¹)	Soma das espécies (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
Goiás								
B	15	193,8±8,1	54,2±2,9	22,2±1,5	96,7±3,0	<LD	173,2±2,5	89,3
	16 a	194,7±7,4	58,7±3,2	23,5±0,4	86,0±4,5	<LD	168,1±2,7	86,4
	16 b	196,6±5,2	85,4±5,5	22,9±2,9	74,9±13,9	12,8±5,9	195,9±7,1	99,6
Santa Catarina								
B	10	128,2±3,9	39,7±2,4	15,6±1,3	42,6±4,3	6,0±1,4	103,9±2,4	81,0
PB	11	118,0±4,8	72,9±3,4	27,5±1,6	16,5±0,9	<LD	116,9±2,0	99,1
São Paulo								
B	12	320,1±6,9	122,8±3,5	62,1±0,8	83,9±2,0	<LD	268,8±2,1	83,9
	12 *	375,8±6,2	51,1±10,0	34,7±3,3	257,8±4,5	13,5±1,3	357,1±4,8	95,0
	13	155,7±5,2	48,9±6,3	28,1±3,7	74,0±13,6	8,5±3,4	159,4±5,4	102,4
I	12	346,9±9,2	151,1±6,1	37,3±1,3	105,0±5,4	<LD	293,4±4,3	84,5
Minas Gerais								
B	14 a	343,9±15,7	75,2±12,9	40,4±5,8	184,9±5,9	<LD	300,4±8,2	87,3
	14 b	230,3±5,6	91,9±10,7	43,8±7,3	124,4±6,7	9,9±1,6	269,9±6,6	117,2
	14 c	194,4±3,6	70,4±7,8	33,1±1,7	87,7±14,9	<LD	191,1±8,1	98,3

*Arroz japonês frequentemente consumido em São Paulo; PB: arroz parboilizado branco; B: arroz branco; I: arroz integral; LD: limite de detecção.

5.2.5- Especificação de arsênio em amostras de arroz do Brasil:

Nas raízes do arroz, o arsenito é absorvido principalmente via transportadores de ácido silícico e o arsenato por competição com fosfato devido à similaridade molecular. Por outro lado, as formas metiladas, DMA e MMA, são absorvidas mais lentamente que as formas inorgânicas (ABEDIN et al., 2002; ABEDIN, FELDMANN e MEHARG, 2002; MA et al., 2008). Xu et al. (2008) mostraram as diferenças entre o tipo de cultivo e absorção de espécies de arsênio. Nos grãos de arroz de plantas cultivadas em sistema de irrigação (também chamada anaeróbica, terras baixas ou alagamento) e sequeiro (também chamado aeróbico ou terras altas) prevalecem arsênio inorgânico e DMA, respectivamente. As formas inorgânicas de arsênio e outros elementos tóxicos prejudicam o metabolismo das células da planta. Esses

elementos tóxicos interagem com grupo sulfidríla, promovendo a substituição de fosfato da adenosina trifosfato (SHRI et al., 2009), além de reduzir o crescimento da planta e o rendimento das culturas (CARBONELL-BARRACHINA, CARBONELL e BENEYTO, 1995; CARBONELL-BARRACHINA et al., 1998; KNAUER et al., 1999). Os radicais livres gerados a partir da absorção de elementos tóxicos, especialmente arsênio inorgânico (ZHANG et al., 2002), promovem a peroxidação lipídica, reduzindo a germinação, tamanho e crescimento das raízes e brotos de arroz (SHRI et al., 2009). Entretanto, o arroz possui vias de detoxificação para o arsenito como efluxo das raízes (XU, McGRATH e ZHAO, 2007) e quelação por fitoquelatinas, compostos que possuem tiol na sua estrutura e se ligam ao arsênio, dificultando seu deslocamento na planta (RAAB et al., 2005). As produções das fitoquelatinas assim como suas interações com o arsênio serão vistas com mais detalhes no último estudo.

Para prevenir a contaminação da planta de arroz, assim como a exposição humana por meio do consumo, é importante conhecer as espécies de arsênio presentes nos grãos. Considerando as amostras analisadas e as espécies encontradas neste primeiro estudo de especiação de arsênio em grãos do Brasil, as amostras apresentaram, como em outras partes do mundo (Tabela 5.2.5), predominantemente as espécies inorgânicas, As^{3+} e As^{5+} , e DMA. Para DMA, As^{3+} , MMA e As^{5+} a média percentual encontrada nas amostras foram 38,7; 39,7; 3,7 e 17,8%; respectivamente.

Quando se considera as concentrações de As^{3+} , As^{5+} e soma dessas duas espécies (As-i) nas amostras de arroz branco (concentrações médias em $ng\ g^{-1}$: $As^{3+}=78,8\pm30,8$; $As^{5+}=33,9\pm12,2$; As-i= $112,7\pm36,5$), parboilizado (concentrações médias em $ng\ g^{-1}$: $As^{3+}=87,3\pm28,3$; $As^{5+}=44,4\pm11,2$; As-i= $131,7\pm33,3$) e integral

(concentrações médias em ng g^{-1} : $\text{As}^{3+}=118,0\pm23,7$; $\text{As}^{5+}=48,5\pm11,7$; $\text{As-i}=166,5\pm20,0$), verifica-se que há uma significativa diferença estatística ($p<0,05$) entre as duas espécies inorgânicas e também a soma presente nos grãos de arroz integral (parboilizado e não parboilizado) e branco, como também observado por Meharg et al. (2008) neste mesmo tipo de amostra. Entretanto, considerando as concentrações das espécies DMA e MMA nas amostras de arroz branco (concentrações médias em ng g^{-1} : DMA= $85,7\pm44,8$; MMA= $13,6\pm7,0$), parboilizado (concentrações médias em ng g^{-1} : DMA= $64,9\pm39,0$; MMA= $17,1\pm15,4$) e integral (parboilizado e não parboilizado, concentrações médias em ng g^{-1} : DMA= $97,0\pm45,8$; MMA= $17,0\pm8,3$), não houve uma significativa diferença estatística ($p>0,05$), indicando que não há uma relação entre o processamento e as concentrações de espécies orgânicas nos grãos.

A análise descritiva da concentração dessas espécies nas diversas amostras revela que, em relação à média de arsênio inorgânico, o arroz integral (I) dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul apresentaram $188,4$ e $188,1 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. Entretanto o arroz branco (B) de Santa Catarina e Goiás apresentaram concentrações de $55,3$ e $89,0 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. Para As^{3+} e As^{5+} , o arroz branco (B) de Santa Catarina apresentou $39,7$ e $15,6 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente, enquanto o As^{3+} foi $155,7 \text{ ng g}^{-1}$ no arroz branco (B) da cidade 6 e para As^{5+} foi $68,9 \text{ ng g}^{-1}$ no arroz parboilizado integral (PI) da cidade 8, ambos do Rio Grande do Sul (Tabelas 5.2.3 e 5.2.4).

Por outro lado, para a média de arsênio orgânico, o arroz integral (I, cidade 9) do Rio Grande do Sul e o branco (B, cidade 12*) do estado de São Paulo apresentaram as concentrações de $224,2$ e $271,3 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. As amostras de arroz parboilizado branco (PB) e branco (B) de Santa Catarina

apresentaram valores de 16,5 e 48,6 ng g⁻¹, respectivamente. Para o DMA e MMA, o arroz branco (B) de Santa Catarina apresentou os menores valores: 16,5 e 6,0 ng g⁻¹, respectivamente. Entretanto, foram encontradas as maiores concentrações de DMA (206,2 ng g⁻¹) no arroz integral (I da cidade 9) e de MMA (50,5 ng g⁻¹) no arroz parboilizado branco (PB, cidade 5) de amostras do Rio Grande do Sul. Para o DMA, uma única amostra de arroz de origem japonesa (arroz branco) comercializada no Brasil apresentou a maior concentração entre todas as amostras analisadas (257,8 ng g⁻¹) (Tabelas 5.2.3 e 5.2.4).

5.2.6- Arsênio inorgânico, DMA e MMA nas amostras de arroz brasileiras:

De acordo com Zavala et al. (2008) o arroz pode ser dividido em dois tipos: tipo inorgânico ou tipo DMA, de acordo com a maior concentração de arsênio inorgânico (As³⁺ + As⁵⁺) ou DMA, respectivamente. Neste estudo de Zavala et al. (2008) é reportado que, quando a concentração de arsênio aumenta, a concentração de DMA também aumenta. Porém Meharg et al. (2009) verificaram que a concentração de DMA é dependente do cultivar do arroz. O arroz brasileiro, por sua vez, apresentou uma correlação positiva significativa estatisticamente entre a concentração de arsenito e a de DMA ($r=0,773$, $p<0,01$).

Quando as amostras de arroz são separadas por tipo (branco, integral e parboilizado branco), podem-se observar as diferenças nas concentrações das espécies dentro do mesmo tipo de arroz. Analisando a Figura 5.2.6, destaca-se, por exemplo, as amostras 6B e 12*, ambas acima de 300 ng g⁻¹, limite de arsênio estabelecido em uma recente consulta pública da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). A amostra 6B possui uma concentração total de arsênio

próxima da amostra 12*, porém a amostra 6B apresentou uma concentração de arsênio inorgânico bem superior à amostra 12*, implicando em maior risco de seu consumo devido a maior toxicidade das espécies inorgânicas.

Comparando duas amostras abaixo de 300 ng g^{-1} , 7A e 16A, é observada uma diferença na concentração de espécies inorgânicas e DMA, provavelmente devido ao tipo de cultivar (variedade), cultivo ou solo. Outro bom exemplo é a comparação das amostras 14A (acima do limite) e 2B (abaixo do limite). Podemos ver claramente que a concentração total de arsênio não é um parâmetro único para avaliar o risco, uma vez que a proporção de arsênio inorgânico na amostra 2B é maior que nas amostras 14A.

Nas Figuras 5.2.6, 5.2.7 e 5.2.8 podem ser observadas as diferenças no risco do consumo não associado somente a concentração de arsênio total (amostras 6B e 7 da Figura 5.2.7 e amostras 1C, 5 e 6A comparadas a amostra 2 na Figura 5.2.8). Diferenças nas concentrações e a presença de MMA em algumas amostras mostram claras diferenças no metabolismo das plantas. Plantas de diferentes cultivares, como citado anteriormente, além do emprego de diferentes métodos de cultivo influenciam as concentrações de arsênio nos grãos. Portanto, conclui-se que um limite máximo para arsênio não é suficiente para avaliar o risco de seu consumo, uma vez que grãos com concentrações abaixo desse limite possuem concentrações maiores de arsênio inorgânico que grãos acima do limite, sendo o seu consumo, portanto, de maior risco.

FIGURA 5.2.6. Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\blacksquare$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz branco (B e OB) e avaliação quanto ao limite ($\longrightarrow$) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011).

FIGURA 5.2.7. Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\square$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz integrais (I e PI) e avaliação quanto ao limite (—) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011).

FIGURA 5.2.8. Comparação das concentrações de arsênio total ($\square$), DMA ($\square$), MMA ($\blacksquare$) e As inorgânico ($\blacksquare$) entre as diferentes amostras de arroz parboilizado (PB e PO) e avaliação quanto ao limite (—) de 300 ng g^{-1} definido em consulta pública pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011).

5.2.7- Concentrações das espécies de arsênio em amostras de diferentes países:

Ao comparar a concentração de espécies de arsênio nos diferentes tipos de arroz avaliados no presente estudo com de outros países (Tabela 5.2.5), observa-se que a espécie AsB foi encontrada somente em uma amostra da Índia/Bangladesh. Esta espécie é incomum no grão de arroz e possivelmente estava presente na água de irrigação, onde algas podem produzir esta espécie. Para o As inorgânico (As-i), as concentrações variaram de 10 ng g^{-1} (arroz de Bangladesh e Canadá) a 510 ng g^{-1} (arroz branco de Taiwan), enquanto para o As^{3+} variaram de 40 ng g^{-1} (arroz branco do Brasil) a 341 ng g^{-1} (arroz da Índia/Bangladesh) e de zero (arroz branco da China e arroz da Índia/Bangladesh) a 137 ng g^{-1} (arroz da Índia/Bangladesh) para As^{5+} . As espécies metiladas, DMA e MMA, variaram de zero (arroz da Índia) a 572 ng g^{-1} (arroz integral dos EUA) e de zero (arroz da Itália, Espanha, Tailândia, Índia Canadá, Brasil e EUA) a 60 ng g^{-1} (arroz B de Taiwan), respectivamente.

Para entender essa grande diferença entre as concentrações das espécies de arsênio nas amostras de arroz deve-se considerar o tipo de cultivo, a concentração de arsênio na água utilizada na irrigação (SAHA e ALI, 2007), o tipo de solo e sua constituição assim como o beneficiamento do grão comercializado. Recentemente, Meharg et al. (2008) demonstraram que o arroz integral possui maior concentração de As-i que o arroz branco, o que também pode ser confirmado quando comparamos com o arroz integral e branco dos EUA ou Brasil.

TABELA 5.2.5. Comparação da concentração (ng g^{-1}) das espécies de arsênio nas amostras de arroz de diferentes países (média (mínimo-máximo)).

Amostras	Tipo de Arroz	AsB	As^{3+}	As^{5+}	DMA	MMA	Soma das espécies	As total	Referência
			{As-i}						
Brasil	B	-	78(40-156)	34(16-62)	93(39-258)	8(<LD-29)	212(98-357)	223(109-376)	Este estudo
	PB	-	87(45-127)	43(24-60)	65(17-139)	10(<LD-51)	207(116-323)	215(108-367)	
	I	-	146(139-151)	42(37-51)	127(70-206)	11(<LD-18)	326(275-410)	348(271-428)	
	PI	-	104(94-129)	52(38-69)	82(46-111)	6(<LD-28)	244(217-270)	266(226-316)	
EUA	B	-	{76(20-100)}		77(50-260)	<LD	231(160-340)	277(170-400)	Williams et al. (2005)
	B	-	92(79-101)	42(32-51)	137(141-136)	-	271(254-289)	329(308-350)	Zhu et al. (2008)
	B	-	{110}		100	<LD	210	280	Meharg et al. (2008)
	B	-	86(49-122)	17(3-95)	155(40-302)	0,6(0-6)	257(169-382)	265(162-383)	Zavala et al. (2008)
	I	-	{105(60-140)}		90(10-150)	<LD	195(100-290)	225(110-340)	Williams et al. (2005)
	I	-	{170}		140	10	320	440	Meharg et al. (2008)
	I	-	131(97-168)	8,2(<5-13)	173(36-572)	1,4(0-13)	313(164-769)	331(201-710)	Zavala et al. (2008)
Canadá	Se	-	{45(10-80)}		10	<LD	50(10-90)	65(20-110)	Williams et al. (2005)
Índia	B	-	{27(20-40)}		66	0,7	32(20-40)	46(30-50)	Williams et al. (2005)
	I	-	{40}		<LD	<LD	40	70	Williams et al. (2005)
	Ve	-	{50}		10	<LD	60	80	Williams et al. (2005)
Índia/Bangladesh	NE	4(2-11)	240(110-341)	40(0-137)	5(1-16)	1(0-4)	290(137-479)	354(143-637)	Sanz et al. (2007)
Bangladesh	NE	-	{83(10-210)}		19(0-50)	-	101(20-240)	131(30-300)	Williams et al. (2005)
	I	-	{280}		170	10	460	610	Meharg et al. (2008)
Taiwan	B	-	{247(110-510)}		37(30-50)	32(15-60)	310(160-610)	383(190-760)	Williams et al. (2005)
China	B	-	114(51-302)	40(24-84)	40(9-147)	1,3(7-13)	195(79-495)	230(19-586)	Zhu et al. (2008)
	B	-	76(48-190)	6,2(0-27)	26(5-44)	1,1(0-6)	109(65-268)	114(65-274)	Liang et al. (2010)
	I	-	{210}		90	10	310	360	Meharg et al. (2008)
Tailândia	Já	-	{80}		30	<LD	110	110	Williams et al. (2005)
Espanha	Pa	-	{80}		50	<LD	130	170	Williams et al. (2005)
Itália	I	-	{100}		50	<LD	150	190	Williams et al. (2005)
	Ri	-	{130(120-140)}		85(80-90)	<LD	215(210-220)	220(220-220)	Williams et al. (2005)

PB: arroz parboilizado branco; B: arroz branco; I: arroz integral; PI: arroz parboilizado integral; Se: selvagem, Ve: vermelho; NE: não estabelecido, Ja: jasmim;

Pa: paella; Ri: risoto; LD: limite de detecção.

5.3- Estudo III: *Estudo do metabolismo do arsênio e dos efeitos da exposição em diferentes cultivares de arroz e identificação e quantificação das fitoquelatinas envolvidas por meio de técnicas avançadas de especiação (LC-HR-ICP-MS/HR-LTQ Orbitrap ESI-MS).*

Este estudo procurou melhor compreender os mecanismos envolvidos na transferência de arsênio do solo às diversas partes de plantas de arroz, seus efeitos, bem como a identificação e quantificação das fitoquelatinas envolvidas no metabolismo do arsênio e especiação de arsênio nos grãos de seis diferentes cultivares de arroz. Devido à experiência nessa área e estrutura bem sedimentada, optou-se por realizar os experimentos no “Trace Element Speciation Laboratory” (University of Aberdeen, Escócia, Reino Unido) durante um estágio de doutoramento.

5.3.1- Uma visão mais detalhada do metabolismo do arsênio em arroz:

A absorção de arsênio pelo arroz depende de vários fatores. Em geral, cultivo em condições de irrigação (anaeróbicas ou terras baixas) (XU et al., 2008) em locais com água e solo contaminados com arsênio aumentam a concentração desse elemento nos grãos (LIAO et al., 2005; SAHA e ALI, 2007; LU et al., 2009; MEHARG et al., 2009). Com relação à absorção das diferentes espécies de arsênio, o DMA e o MMA são absorvidos mais lentamente que as formas inorgânicas. Arsenito e arsenato são principalmente absorvidos por transportadores de silicato e fosfato

devido às similaridades no tamanho da molécula. Uma mutação no transportador de silício (Si) assim como adição de fosfato ou silicato reduzem significativamente o acúmulo de arsênio (MEHARG, NAYLOR e MACNAIR, 1994; ABEDIN et al., 2002; ABEDIN, FELDMANN e MEHARG, 2002; MA et al., 2006; MA et al., 2008).

Com relação aos efeitos tóxicos na planta de arroz, o arsênio e outros elementos ligam-se a grupos sulfidríla na planta, e esse processo leva ao acúmulo de elementos tóxicos causando danos severos como desacoplamento do fosfato da adenosina tri-fosfato, peroxidação lipídica (geração de radicais livres) assim como redução da germinação, crescimento e massa das raízes e caule (ZHANG et al., 2002; SHRI et al., 2009), além de uma queda na produtividade da cultura e no crescimento da planta (CARBONELL-BARRACHINA, CARBONELL, BENEYTO, 1995; CARBONELL-BARRACHINA et al., 1998; KNAUER et al., 1999).

Na Figura 5.3.1 é mostrado esquematicamente o processo de absorção e de metabolismo de arsênio pelas células de raízes de plantas não hiperacumuladoras, como o arroz, e em plantas hiperacumuladoras, como uma espécie de samambaia (*Pteris vittata*). Após entrar nas células da raiz, o arsenato é prontamente convertido em arsenito e o efluxo dos canais Lsi2 expõe para o xilema. Esse mecanismo é o mais importante no controle do efluxo de Si e arsenito das raízes, sendo essencial para reduzir o acúmulo de arsênio (MA et al., 2008; ZHAO et al., 2009). Finalmente, ainda na Figura 5.3.1, pode-se observar que a planta possui, além do efluxo de arsênio e a conversão em arsenato, alguns sistemas de proteção através da complexação/sequestro de arsênio para os vacúolos das células utilizando compostos contendo grupos tiol, dependentes de glutatona (GSH), conhecidos como fitoquelatinas (PCs) (RAAB et al., 2005, RAAB et al., 2007a; SONG et al., 2010).

FIGURA 5.3.1. Diagrama esquemático da absorção de arsênio (As) e metabolismo por células de raízes de plantas não hiperacumuladoras (a) e hiperacumuladoras (b). A espessura da linha indica a capacidade de efluxo. A linha pontilhada indica o efluxo mais lento. As interrogações significam lacunas conhecidas. GSH: glutationa; GSSG: glutationa oxidada; PC: fitoquelatina (Adaptado de ZHAO et al. 2009).

A produção das fitoquelatinas (PCs) pode ser induzida pela exposição da planta a vários íons de prata, cádmio, cobre, mercúrio, chumbo, selênio e arsênio (GRILL, WINNACKER e ZENK, 1985). PCs são estruturalmente relacionadas à glutationa (GSH) e a constituição comum de uma PC é $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$, onde n varia de 2 a 5 repetições de $\gamma\text{-Glu-Cys}$, sendo PC_2 e PC_3 as formas mais comuns (COBBETT, 2000; COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002).

O enxofre tem um importante papel na formação de substâncias não proteicas contendo tiol. Em um estudo de privação de enxofre, Zhang et al. (2010) observaram um decréscimo na formação de substâncias não proteicas contendo tiol, além de um baixo acúmulo de arsenito quando comparado ao arsenato nas raízes. Os autores atribuem esse decréscimo à baixa concentração de GSH, responsável pela redução catalítica do arsenato. O mesmo foi observado por Zhao et al. (2003) em *Pteris vittata* tratada com BSO (L-butionina-sulfoxima), um potente inibidor de gama-glutamil-cisteína sintetase. Zhang et al. (2010) e Duan et al. (2011) observaram que a privação de enxofre e a diminuição da produção de GSH e PCs aumentam a translocação do arsênio em plantas de arroz, das raízes para o caule e do caule para o grão, respectivamente. Duan et al. (2011) reportaram diferentes tipos de acúmulo de arsênio ligado a PCs (PCs-As) e produção de PCs entre os diferentes cultivares de arroz estudados e concluíram que as PCs exercem um papel importante na translocação do arsênio e acúmulo em grãos de arroz. Infelizmente os autores não identificaram exatamente a concentração e quais as PCs-As e PCs livres estavam envolvidas no metabolismo para melhor conhecimento sobre a influência das PCs na translocação do arsênio e suas espécies na planta de arroz.

Para esse propósito, são necessárias ferramentas analíticas avançadas com capacidade de caracterização de moléculas formadas pela interação do arsênio com componentes orgânicos da matriz. O uso do LC hifenado simultaneamente ao HR-ICP-MS e a um LTQ Orbitrap HR-ESI-MS foi aplicado com sucesso para identificar PCs-As e PCs livres em vários extratos de plantas (RAAB, FELDMANN e MEHARG, 2004; RAAB et al., 2005; RAAB et al., 2007a; BLUEMLEIN et al., 2008; LIU et al., 2010). Essas técnicas analíticas aliadas a um recente método de especiação proposto por Amayo et al. (2011), discutido a seguir, foram aplicadas para

identificação e determinação da concentração de PCs livres e PCs-As em raízes de plantas de arroz expostas a longo prazo à arsenato (do plantio das mudas até a maturação completa dos grãos).

5.3.2- Quantificação de GSH, PCs livres e PCs-As por LC-HR-ICP-MS e identificação por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap HR-ESI-MS:

Devido ao uso de metanol (MeOH) na fase móvel em gradiente para separação dos analitos, as intensidades dos elementos enxofre (S) e arsênio (As) se alteram (BLUEMLEIN et al., 2008; RABER et al., 2010). Esses dois elementos são utilizados para a determinação da concentração de PCs livres (S) e PCs-As (As) por LC-HR-ICP-MS. Atualmente não há padrões comerciais disponíveis para a determinação das PCs. Assim, Amayo et al. (2011) descreveram uma metodologia simplificada para o ajuste da variação na intensidade dos sinais de S, As e gálio (Ga, padrão interno) causadas pela modificação na concentração do MeOH em uma análise em gradiente (Figura 5.3.2).

Para superar essa variação poderiam ser empregados dois métodos: i) síntese química de padrões de calibração ou; ii) o uso de uma adição pós-coluna de MeOH para compensar a variação (PRÖFROK e PRANGE, 2009). O primeiro método exigiria muito tempo e reagentes e, ainda assim, nem todas as PCs seriam sintetizadas e o último teria duas desvantagens: o uso de outra bomba peristáltica e a diluição do eluente, o que pode diminuir a sensibilidade aos analitos, prejudicando a análise.

Para resolver estas limitações, um método simples adicionando-se pós-coluna uma solução de calibração contendo S (5 mg L⁻¹), As (1 mg L⁻¹) e Ga (0,01 mg L⁻¹), em uma corrida com injeção de um branco, foi validado por Amayo et al. (2011). Após a injeção de um branco, um fator de resposta ao gradiente para MeOH (FRG_{MeOH}) pode ser calculado para o As, S e Ga de zero a 35 minutos, segundo a equação 1:

$$\frac{[\text{Intensidade da solução injetada pós-coluna}_{(\text{gradiente, 0-35min})}]}{[\text{Média da intensidade 1ºmin da solução injetada pós-coluna}_{(\text{Isocrático 0-1min})}]} = [\text{FRG}_{\text{MeOH}}] \quad (1)$$

O FRG_{MeOH} varia de zero a duas unidades, assim, intensidades abaixo da média do 1º minuto (S e Ga,) foram multiplicadas por um número maior que 1 e intensidades acima da média (As) foram multiplicadas por um número menor que 1 (Figura 5.3.2), e as intensidades, de zero a 35 minutos, foram corrigidas pelo fator de resposta (ICFR_{MeOH(0-35min)}), resumindo-se na equação 2:

$$\frac{[\text{Intensidade do analito}_{(\text{padrões e amostras de 0-35min})}]}{[\text{FRG}_{\text{MeOH}(0-35min)}]} = [\text{ICFR}_{\text{MeOH}(0-35min)}] \quad (2)$$

Finalmente, fez-se o uso do padrão interno (Ga), seguindo-se a equação 3:

$$\frac{[ICFR_{(As\ ou\ S)MeOH(0-35min)}]}{[ICFR_{(69Ga)MeOH(0-35min)}]} =$$

$$[Sinal\ corrigido\ para\ MeOH + padrão\ interno\ (SCMeOH+PI)_{As\ ou\ S\ de\ 0-35min}](3)$$

Com os dados a cada tempo de retenção (TR) elaborou-se um cromatograma (TR *versus* SCMeOH+PI⁷⁵_{As} e TR *versus* SCMeOH+PI³²_S) e calcularam-se as áreas de cada pico (padrões de calibração e amostras) para determinação da concentração de PCs, segundo o cromatograma de enxofre, e PCs-As, segundo o cromatograma de arsênio.

Na Figura 5.3.3 são observadas as diferenças nas intensidades dos sinais antes e após a correção matemática aplicada. Pode-se notar, assim como na injeção da solução de calibração, que a variação do arsênio é relativamente pequena quando comparada ao enxofre ou gálio.

FIGURA 5.3.2. Determinação das intensidades de arsênio (As), gálio (Ga) e enxofre (S) com solução de calibração inserida pós-coluna utilizando o programa de eluição por gradiente do LC e injeção de um branco.

FIGURA 5.3.3. Diferenças nas intensidades dos sinais de enxofre (S) (amostra controle do cultivar Itálica Carolina) e arsênio (As) (amostra exposta de Itálica Carolina) antes (linha azul) e após (linha vermelha) a correção matemática para compensação da variação de metanol.

Assim, após a corrida de 35 minutos com injeção de um branco para o cálculo do fator de resposta, é iniciada uma nova corrida de 35 minutos para a leitura dos padrões de calibração analítica. Padrões contendo arsênio (DMA) e enxofre (N-acetil-cisteína) foram preparados e analisados por LC-HR-ICP-MS. Pode ser observado na Figura 5.3.4a a injeção sequencial dos padrões contendo ambas as substâncias (DMA e N-acetil-cisteína). Assim, após a correção matemática acima descrita, as médias das áreas destes picos foram calculadas para a elaboração das curvas de calibração para enxofre e arsênio (Figura 5.3.4 b e c).

Finalmente, partiu-se para a identificação das PCs livres e PCs-As. Esta foi feita pela comparação do tempo de retenção dos picos de enxofre e arsênio do cromatograma gerado pelo sistema LC-HR-ICP-MS com o tempo de retenção do cromatograma das massas exatas das PCs livres e PCs-As gerado pelo LC-ESI-MS. Porém, apenas a comparação dos tempos de retenção não é suficiente para se confirmar que aquela massa gerada pelo ESI-MS é uma PC livre ou PC-As. Assim, novamente, uma equação matemática foi aplicada para se garantir estatisticamente (incerteza <5%) que a massa fornecida pelo LTQ Orbitrap ESI-MS possui exatidão.

Por exemplo, a glutathiona (GSH) tem m/z teórica $[(\text{GSH}+\text{H})^+]$ de 308,09163u, quando consideramos apenas os isótopos de maior abundância do composto (^{12}C , ^{16}O , ^{14}N , ^1H e ^{32}S). O LTQ Orbitrap ESI-MS fornece uma m/z experimental $[(\text{GSH}+\text{H})^+]$ de 308,09070u. Para certificar se a m/z experimental é de uma GSH, aplica-se a equação 4:

$$[(m/z \text{ teórica}) - (m/z \text{ experimental})] / [(m/z \text{ teórica}) \times 10^6] = [\Delta m] \quad (4)$$

Sendo a variação da exatidão da massa (Δm) $-5\text{ppm} < \Delta m < 5\text{ppm}$, pode-se afirmar com mais de 95% de confiança que é uma molécula de GSH protonada (GROSS, 1994; MAKAROV et al., 2006). A Tabela 5.3.1 apresenta a média e o desvio padrão de todos os Δm nas análises realizadas, bem como as massas teóricas, experimentais e o tempo de retenção de cada analito. Essa determinação da Δm é essencial para se evitar equívocos na identificação de analitos por ESI-MS. Pode-se verificar na tabela que houve uma pequena variação na Δm , assim como no tempo de retenção e massa experimental dos analitos (análise entre dias, de diferentes cultivares de arroz).

Além disso, o pico de enxofre fornecido pelo detector HR-ICP-MS (ver Figura 5.3.5, picos 1, GSH, e b, S) é uma segunda confirmação que, naquele tempo de retenção, moléculas de GSH, que contém enxofre em sua estrutura, estão sendo eluídas, sendo o enxofre presente em sua molécula detectado pelo HR-ICP-MS e sua m/z detectada pelo LTQ Orbitrap ESI-MS. Todas as fórmulas estruturais das PCs livres, previamente identificadas em outros trabalhos (MEUWLY et al., 1995; ZENK, 1996; KUBOTA et al., 2000; SCHMÖGER, OVEN e GRILL, 2000; MOUNICOU et al., 2001; FAN, LANE e HIGASHI, 2004; BLUEMLEIN et al., 2008) e que foram identificadas e quantificadas neste estudo, estão apresentadas nas Figuras 5.3.6 e 5.3.7, assim como os seus respectivos nomes, abreviaturas e massas teóricas. As PCs-As estão representadas na Figura 5.3.8, que demonstra com clareza a ligação do arsenito às PCs pelo grupamento sulfidrila (-SH) da cisteína presente. As respectivas massas teóricas, experimentais, tempos de retenção e Δm das PCs-As estão na Tabela 5.3.1.

A variação da exatidão da massa (Δm) considera apenas a composição dos elementos da molécula, mas não sua estrutura. A estrutura molecular pode ser

avaliada a partir da fragmentação da molécula. A fragmentação (MS^2) dos analitos gera íons filhos de massas conhecidas e, a partir da m/z desses íons, podemos inferir a quebra de ligações específicas, como a ligação peptídica, nos analitos (Figuras 5.3.9 e 5.3.10). Os íons gerados e a ligação quebrada apresentam relevantes informações com relação à estrutura molecular dos analitos. As Figuras 5.3.9 e 5.3.10 mostram a fragmentação de cinco dos analitos desse estudo e o local da quebra. Na fragmentação desses analitos há sempre a quebra da ligação peptídica e perda de um gama-ácido glutâmico (129u), típico das PCs, como observado por Bluemlein et al. (2008).

FIGURA 5.3.4. Injeção sequencial dos padrões de enxofre (S) (5-5000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e arsênio (As) (1-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) no sistema LC-HR-ICP-MS (a, linha vermelha As e linha azul S) e curvas de calibração analíticas de As (b) e S (c) elaboradas a partir das áreas dos picos com as correções matemáticas descritas.

TABELA 5.3.1. Massas teóricas exatas, massas experimentais, exatidão das massas (Δm) e tempo de retenção (TR) de todas as PCs livres e PCs-As identificadas neste estudo. Valores dados como média $\pm$ desvio padrão, exceto para a massa teórica exata.

Analito	[GSH+H]⁺	[OH-Me-PC3-As+H]⁺	[GSSG+H]⁺	[PC3+H]⁺
<i>Massa teórica</i>	308,09163	874,10388	613,15979	772,19514
<i>Massa experimental</i>	308,09067 $\pm$ 0,00024	874,10218 $\pm$ 0,00113	613,15842 $\pm$ 0,00043	772,19373 $\pm$ 0,00086
<i>Δm (ppm)</i>	3,02 $\pm$ 0,90	1,86 $\pm$ 1,32	2,06 $\pm$ 1,09	1,82 $\pm$ 1,17
<i>TR (min)</i>	3,93 $\pm$ 0,11	17,95 $\pm$ 0,16	7,47 $\pm$ 0,18	18,49 $\pm$ 0,25
Analito	[OH-Me-PC2+H]⁺	[PC3-As+H]⁺	[PC2 Reduzida+H]⁺	[Iso-PC3-Glu-As+H]⁺
<i>Massa teórica</i>	570,15392	844,09324	540,14341	916,11445
<i>Massa experimental</i>	570,15265 $\pm$ 0,00028	844,09183 $\pm$ 0,00119	540,14224 $\pm$ 0,00030	916,11345 $\pm$ 0,00147
<i>Δm (ppm)</i>	2,22 $\pm$ 0,67	1,67 $\pm$ 1,45	2,08 $\pm$ 0,68	1,09 $\pm$ 1,61
<i>TR (min)</i>	11,22 $\pm$ 0,27	18,59 $\pm$ 0,16	11,83 $\pm$ 0,27	19,04 $\pm$ 0,87
Analito	[DesGly-PC2+H]⁺	[DesGly-PC3-As+H]⁺	[PC2 auto-oxidada+H]⁺	[PC4-As+H]⁺
<i>Massa teórica</i>	483,12190	787,07179	538,12776	1076,14505
<i>Massa experimental</i>	483,12047 $\pm$ 0,00029	787,07035 $\pm$ 0,00049	538,12658 $\pm$ 0,00028	1076,14382 $\pm$ 0,00159
<i>Δm (ppm)</i>	2,95 $\pm$ 0,80	1,83 $\pm$ 0,71	2,11 $\pm$ 0,68	1,28 $\pm$ 1,35
<i>TR (min)</i>	12,28 $\pm$ 0,33	19,48 $\pm$ 0,33	12,61 $\pm$ 0,22	23,42 $\pm$ 0,34
Analito	[Iso-PC2 Glu+H]⁺	[Iso-PC3-Glu+H]⁺	-	-
<i>Massa teórica</i>	612,16450	844,21630	-	-
<i>Massa experimental</i>	612,16336 $\pm$ 0,00058	844,21629 $\pm$ 0,00205	-	-
<i>Δm (ppm)</i>	1,87 $\pm$ 0,99	0,01 $\pm$ 2,42	-	-
<i>TR (min)</i>	14,30 $\pm$ 0,25	20,75 $\pm$ 0,60	-	-

FIGURA 5.3.5. Determinação por LC/HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS de PCs livres e PCs-As em raízes do cultivar Italic Carolina exposto a arsenato. HR-ICP-MS: ^{32}S (linha preta); ^{75}As (linha vermelha). LTQ Orbitrap ESI-MS: 1 $^{\alpha}$: GSH; 2 $^{\beta}$: GSSG; 3 $^{\alpha}$: OH-Me-PC2; 4 $^{\alpha}$: PC2 reduzida; 5 $^{\alpha}$: DesGly-PC2; 6 $^{\alpha}$: PC2 auto-oxidada; 7-8 $^{\alpha}$: Iso-PC2-Glu; 9 $^{\beta}$: OH-Me-PC3-As; 10 $^{\beta}$: PC3; 11 $^{\beta}$: PC3-As; 12 $^{\beta}$: DesGly-PC3-As; 13 $^{\beta}$: Iso-PC3-Glu; 14 $^{\beta}$: Iso-PC3-Glu-As; 15-16 $^{\beta}$: PC4-As. a: picos de As inorgânico e sulfatos; j, l, m, o, p, q: picos de PCs-As; a'', b'', c'' e d'': complexos não identificados contendo As; b até q: peptídeos contendo As ou S e a correspondência do tempo de retenção entre os picos do HR-ICP-MS e LTQ Orbitrap ESI-MS.

FIGURA 5.3.6. Fórmulas estruturais da glutationa (GSH) e fitoquelatinas livres (PCs livres), massas teóricas e a abreviatura dos nomes.

FIGURA 5.3.7. Fórmulas estruturais das fitoquelatinas livres (PCs livres), massas teóricas e abreviaturas dos nomes.

FIGURA 5.3.8. Estruturas esquemáticas representando as ligações do arsenito às fitoquelatinas. São observadas três isoformas para As(III)-PC3. Glu: ácido glutâmico; Cys: cisteína; Ser: serina; Gly: glicina.

FIGURA 5.3.9. Análise de raízes de arroz (cultivar Itálica Carolina, controle e expostas) por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS. Em A1 e B1 (m/z 308 e 483, respectivamente) observam-se o espectro de massas dos analitos e em A2 e B2 (m/z 179 e 354, respectivamente) os respectivos espectros dos íons fragmentos (perda de ácido glutâmico, 129 uma).

FIGURA 5.3.10. Análise de raízes de arroz (cultivar Itálica Carolina expostas ao As) por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS. Em C1, D1 e E1 (m/z 772, 612 e 787, respectivamente) observam-se o espectro de massas dos analitos e em C2, D2 e E2 (m/z 643, 483 e 658, respectivamente) os respectivos espectros dos íons fragmentos (perda de ácido glutâmico, 129 uma).

5.3.3- Avaliação da influência do solo contaminado com arsênio no desenvolvimento dos cultivares experimentais e no comportamento fitoquímico (PCs e espécies de arsênio):

Neste tópico serão discutidas as mudanças ocorridas nas plantas como massa dos grãos, altura, tempo para florescimento entre outras, bem como a determinação de arsênio total no solo, raízes, caules e grãos dos diversos cultivares. As especiações químicas de GSH, PCs livres e PCs-As nas raízes e de arsênio nos grãos (determinação de DMA, MMA e arsênio inorgânico) também serão aqui discutidos.

Antes de cada coleta e análise das raízes as características das plantas foram avaliadas. A Tabela 5.3.2 apresenta os dados coletados de cada cultivar. A escolha dos cultivares foi realizada de acordo com estudos prévios do fator de transferência de arsênio (NORTON et al., 2012). Com relação à altura da planta e diâmetro dos caules apenas os cultivares Italice Carolina e Lemont, respectivamente, apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando expostos a arsênio. Quanto à produtividade (massa dos grãos produzidos) os cultivares Italice Carolina, Dom Sofid e Kitrana 508 quando expostos, apresentaram uma redução na biomassa ($p < 0,05$), já os cultivares Italice Carolina, 9524 e Kitrana 508 apresentaram redução no comprimento dos grãos (Tabela 5.3.2). Finalmente, considerando a massa total das plantas, o cultivar Italice Carolina foi o único que sofreu uma redução significativa ($p < 0,05$) quando exposto a arsênio. No geral, este cultivar foi o que menos tolerou a presença de arsênio na concentração em estudo, ao contrário do cultivar YRL-1. O tempo de florescimento e o número de caules para

todos os cultivares não foram afetados significativamente pela contaminação do solo com arsênio. Na Tabela 5.3.2, além desses dados, podem ser consultadas as abreviaturas dos nomes dos cultivares.

Após a colheita das plantas, com as raízes ainda frescas, foram identificadas e determinadas as concentrações de GSH, PCs livres e PCs-As por LC-HR-ICP-MS/LTQ Orbitrap ESI-MS. A Tabela 5.3.3 apresenta as concentrações desses analitos.

Neste ponto, o cultivar Italica Carolina quando exposto ao arsênio produziu todas as PCs livres e PCs-As pesquisadas com diferença significativa entre as amostras expostas e os controles ($p < 0,05$). Quando comparado às amostras controles ou expostas do cultivar Dom Sofid apresentou concentrações maiores de PCs livres e PCs-As. Isso implica em dizer que, provavelmente, o cultivar Dom Sofid tem uma sensibilidade maior ao arsênio, desencadeando uma produção acelerada de PCs. No caso das amostras expostas ao arsenato, o cultivar Dom Sofid apresentou um significativo aumento na produção de DesGly-PC2, PC2 auto-oxidada, Iso-PC3-Glu e de PCs-As (DesGly-PC3-As e PC4-As) (Tabela 5.3.3).

Ao contrário, os cultivares YRL-1 e Lemont não apresentaram diferenças estatísticas na concentração das PCs. Pode-se observar nestes cultivares uma redução na concentração de GSH nas raízes, utilizada provavelmente na produção de PC3, Iso-PC3-Glu, DesGly-PC3, PC4 e OH-Me-PC3, as quais foram quantificadas também nas suas formas ligadas ao As^{3+} nas amostras expostas (Tabela 5.3.3). O cultivar 9524 apresentou uma maior concentração de GSH nas raízes expostas ao arsenato e um aumento significativo na produção de Iso-PC2-Glu, PC3 e Iso-PC3-Glu, além da detecção de PCs-As. Entretanto, o cultivar Kitrana

508 apresentou uma concentração reduzida de GSH quando exposto ao arsenato, assim como outros cultivares (Italica Carolina, Dom Sofid, YRL-1 e Lemont). Além disso, o cultivar Kitrana 508 apresentou maiores concentrações de DesGly-PC2, Iso-PC2-Glu e Iso-PC3-Glu (PCs livres) quando exposto ao arsenato (Tabela 5.3.3).

O aumento da biossíntese de PCs sob a exposição ao arsênio induz a absorção de sulfato pela planta para cobrir a demanda na síntese de GSH, que depende de cisteína (DUAN et al. 2011). A concentração de GSH em uma dada parte da planta é resultado da combinação de biossíntese, consumo e degradação. A GSH é consumida em um grande número de reações redox que combatem o estresse oxidativo, resultando na GSSG, a forma oxidada, que pode ser reciclada pela glutathione reductase (MISHRA et al., 2008). A GSH tem a capacidade conjugar elementos químicos (arsênio, chumbo, cádmio entre outros) ou seus metabólitos através da glutathione-S-transferase (MOONS, 2003), além de promover a conversão de As^{5+} em As^{3+} , que pode ser então conjugado com PCs ou GSH (RAAB, FELDMANN e MEHARG, 2004; BLEEKER et al., 2006).

Assim como nos resultados aqui apresentados, Tripathi et al. (2012) observaram que as concentrações de GSH e GSSG variam para mais ou para menos, de acordo com a concentração de arsenato e com o cultivar de arroz estudado. Além disso, Tripathi et al. (2012) observaram que a síntese de PC2, PC3 e PC4 aumenta com o aumento da dose de arsenato, especialmente nos cultivares mais sensíveis a esse analito. Em outro estudo, Klapheck, Fliegner e Zimmer (1994) identificaram e determinaram as concentrações de GSH e PCs livres (PC2, DesGly-PC2, PC3, DesGly-PC3 e PC4) em raízes e caules de um cultivar de arroz exposto ao cádmio por 7 dias. Eles concluíram que a primeira defesa da planta é a síntese de GSH, seguida por PC2 e então as PCs de cadeias maiores, sendo essa síntese

dependente da concentração de cádmio e do tempo de exposição da planta. Assim, através da determinação da concentração total de arsênio nas diferentes partes das plantas, pode-se investigar a influência da concentração de arsênio na síntese das PCs livres e PCs-As e a influência destas na absorção de arsênio e transporte até os grãos.

Para a determinação de arsênio total foram utilizados materiais de referência certificados para o controle da qualidade das análises (Tabela 5.3.4). Todos os materiais de referência apresentaram recuperação em torno de 100%, exceto o solo. No caso deste material a recuperação foi em torno de 50%, devido à presença de silicatos, por exemplo. A disponibilidade de arsênio no solo depende de vários fatores como composição mineral (ferro, fósforo), conteúdo de matéria orgânica, potencial redox, entre outros (TU e MA, 2003; CAO e MA, 2004). Uma vez que todos esses fatores foram similares para todos os cultivares (solo, adição de arsenato, irrigação, umidade, temperatura, entre outros), pode-se deduzir que a disponibilidade de arsênio foi a mesma para todos os vasos. Portanto, apesar da baixa recuperação (Tabela 5.3.4), a determinação foi realizada no sentido de se comparar a concentração de arsênio total e avaliar as diferenças estatísticas nas concentrações de arsênio no solo das plantas controles e expostas.

TABELA 5.3.2. Descrição e avaliação das características das plantas dos cultivares. Resultados representados como média ou média $\pm$ desvio padrão.

Cultivar de arroz		Abreviatura	F(dias)	AP(cm)	DC(mm)	PG(g)	CS(mm)	NC	TF	MP (g)
Italica Carolina	Controle	IC(c)	51	101,5*	22,8 $\pm$ 2,5	9,59*	7,77 $\pm$ 0,78*	5	Baixo	102,8*
	Exposto	IC(e)	51	89,6	17,8 $\pm$ 4,4	4,34	6,71 $\pm$ 0,65	4		90,6
Dom Sofid	Controle	DS(c)	87	137,5	19,0 $\pm$ 3,1	7,18*	8,04 $\pm$ 0,43	4	Muito	138,4
	Exposto	DS(e)	88	128,5	17,7 $\pm$ 6,9	5,40	8,05 $\pm$ 0,65	4	Baixo	129,4
9524	Controle	9(c)	91	140,5	23,1 $\pm$ 2,5	10,64	7,13 $\pm$ 0,51*	4	Médio	141,4
	Exposto	9(e)	94	133,8	19,7 $\pm$ 2,6	8,68	6,73 $\pm$ 0,44	4		134,6
Kitrana 508	Controle	K(c)	94	155,3	17,8 $\pm$ 2,2	6,99*	7,49 $\pm$ 0,16*	4	Muito	156,1
	Exposto	K(e)	94	150,5	16,1 $\pm$ 1,5	5,80	7,00 $\pm$ 0,24	3	Baixo	151,3
YRL-1	Controle	Y(c)	91	115,8	24,1 $\pm$ 4,8	11,81	7,64 $\pm$ 0,45	5	Alto	116,9
	Exposto	Y(e)	91	110,5	23,7 $\pm$ 6,2	10,17	7,37 $\pm$ 0,54	5		111,8
Lemont	Controle	L(c)	102	76,9	27,1 $\pm$ 2,0*	9,46	7,34 $\pm$ 0,45	4	Muito	77,9
	Exposto	L(e)	107	83,4	21,3 $\pm$ 2,9	7,88	7,18 $\pm$ 0,44	3	baixo	84,2

AP: altura da planta; **MP:** massa da planta (biomassa média das raízes+caule+grãos); **F:** tempo para florescência (média entre 4 replicatas); **TF:** fator de transferência do As raiz-grão (NORTON et al., 2012); **DC:** diâmetros dos caules (entre nós, soma de todos os diâmetros); **PG:** Produtividade de grãos (média da biomassa de todos as panículas produzidas por planta); **CS:** comprimento da semente; **NC:** Número de caules; *: diferenças significativas entre controles e expostos ($p < 0,05$).

TABELA 5.3.3. Concentrações de GSH, PCs livres e PCs-As nos cultivares avaliados. Resultados expressos como mg PC kg⁻¹ de raízes ± desvio padrão; *: diferenças significativas entre controles e expostos (p<0,05); ND: não detectado.

Cultivares	[GSH]	[GSSG]	[OH-Me-PC2]	[PC2 Reduzida]	[DesGly PC2]	[PC2 auto-oxidada]	[Iso-PC2 Glu]
IC(c)	33,6±21,1*	5,87±4,69	1,35±0,11*	1,39±0,37*	1,59±0,31*	1,93±0,53*	4,30±0,91*
IC(e)	446,3±61,7	3,62±2,09	3,04±0,67	3,45±1,46	9,93±4,46	5,08±1,97	7,86±2,47
DS(c)	895,1±512,7	15,94±5,73	25,27±9,16	21,32±11,08	15,77±6,44*	14,59±4,51*	35,46±10,00
DS(e)	192,4±175,8	19,76±11,72	17,97±3,62	22,60±8,62	24,30±5,77	22,64±1,87	44,37±14,90
9(c)	42,1±15,9*	4,80±4,09	2,52±0,94	2,61±1,03	2,38±1,16	2,59±1,18	1,81±1,06*
9(e)	384,9±142,6	3,23±1,55	2,32±1,25	2,62±1,17	3,86±1,67	2,60±1,13	6,22±2,18
K(c)	289,5±152,2*	5,14±1,46	2,91±0,92	3,31±1,44	6,08±1,35*	4,59±1,67	10,03±1,34*
K(e)	53,5±23,9	5,20±1,76	3,66±1,41	4,40±0,50	11,02±2,95	6,96±2,72	14,66±2,06
Y(c)	704,7±674,9	2,83±1,36	1,99±0,40	1,83±0,56	2,73±1,86	2,75±1,23	4,05±2,92
Y(e)	225,3±37,9	2,41±0,55	1,47±0,36	1,12±0,47	2,37±0,89	1,26±0,20	2,97±0,78
L(c)	406,7±337,7	5,59±3,69	2,36±0,87	2,67±0,75	3,30±0,28	3,12±0,58	8,01±3,09
L(e)	108,6±58,9	3,29±0,73	3,28±0,49	2,57±0,59	3,44±0,30	3,19±0,83	5,66±1,27
Cultivares	[PC3]	[PC3-As]	[Iso-PC3-Glu-As]	[DesGly-PC3-As]	[PC4-As]	[Iso-PC3-Glu]	[OH-Me-PC3-As]
IC(c)	1,36±0,65*	ND	ND	ND	ND	1,74±0,41*	ND
IC(e)	3,94±0,50	0,17±0,12	0,18±0,03	0,31±0,22	1,48±0,77	9,87±4,18	0,14±0,06
DS(c)	21,09±12,88	3,11±1,89	3,36±2,15	2,96±1,25*	13,04±5,48*	22,46±9,85*	2,09±1,33
DS(e)	21,90±3,45	4,49±2,06	4,00±3,10	12,60±5,81	26,05±9,04	62,50±14,50	2,25±0,89
9(c)	1,84±0,46*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9(e)	3,22±0,94	4,35±1,56	ND	4,76±2,72	27,96±6,28	2,95±1,31	5,39±4,74
K(c)	6,07±2,94	2,50±1,17	ND	6,96±2,78	19,39±6,52	11,16±5,08*	2,12±2,04
K(e)	10,66±9,49	4,16±2,05	8,28±4,94	13,67±5,71	25,70±11,79	38,71±22,06	6,28±9,09
Y(c)	1,06±0,64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Y(e)	1,83±0,39	1,26±0,52	1,16±0,09	2,92±2,09	14,18±6,90	2,24±1,39	1,15±0,10
L(c)	0,90±0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L(e)	1,02±0,48	2,37±1,14	ND	4,08±2,10	15,59±6,83	ND	1,79±0,52

TABELA 5.3.4. Resultados das concentrações de arsênio total nos materiais de referência certificados utilizados para controle da qualidade nas análises. Análises em triplicata, resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão, em mg kg^{-1} .

Material de Referência	Concentração		Recuperação*
	Encontrada	Alvo	
NIST 1568a (grãos de arroz)	0,33 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03	114 $\pm$ 13
IAEA 140 TM (alga)	42,46 $\pm$ 6,89	44,3 $\pm$ 2,1	96 $\pm$ 16
DORM-3 (proteína de peixe)	7,01 $\pm$ 1,24	6,88 $\pm$ 0,3	102 $\pm$ 18
NCS ZC 73007 (solo)	8,81 $\pm$ 2,31	18 $\pm$ 2	49 $\pm$ 13

*: recuperação calculada a partir da média do valor certificado.

A Tabela 5.3.5 revela a concentração de arsênio total no solo e nas diversas partes da planta. A comparação entre amostras controles e expostas de um mesmo cultivar mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a concentração total de arsênio no solo, raízes, caules e grãos, exceto para o cultivar Lemont nas raízes, caules e grãos. Considerando somente a concentração de arsênio no solo de todas as amostras expostas ou controles (de todos os cultivares), não foi observado diferenças estatísticas assim, pode-se considerar que os cultivares receberam concentrações similares de arsênio. Pela Tabela 5.3.5 ainda observa-se que o cultivar Itálica Carolina foi o que mais acumulou arsênio nos grãos, por outro lado, o cultivar Lemont foi o que mostrou o menor acúmulo. Assim, diferentes genótipos de plantas, cultivados sob mesmas condições, apresentam diferentes comportamentos de absorção de arsênio devido, principalmente, as diferenças genéticas (NORTON et al., 2012; TRIPATHI et al., 2012).

Analisando os dados como porcentagem, sabe-se que a média de aumento da concentração de arsênio no solo das amostras expostas foi de 112%. A porcentagem média de aumento no acúmulo de arsênio nas diferentes partes da

planta do arroz, em comparação aos controles, nos cultivares 9524, YRL-1, Itálica Carolina, Kitrana 508, Dom Sofid e Lemont foram:

Raízes: 1863, 1843, 529, 245, 227 e 16%;

Caules: 110, 164, 71, 76, 86 e 82%;

Grãos: 225, 125, 110, 78, 86 e 17%, respectivamente.

Assim, pode-se observar que os cultivares que mais acumulam arsênio nas raízes são aqueles que têm maior capacidade de absorção pelas raízes e, por conseguinte, o transfere com maior eficiência para os caules e grãos. Como relatado por Tripathi et al. (2012), essa transferência depende da sensibilidade do cultivar e da síntese de PCs, que nem sempre tem uma resposta dose-dependente em relação à concentração de arsenato. Foi também observado pelos autores que, em geral, os cultivares aumentam a síntese de PCs com o aumento da concentração de arsenato. Porém, acima de determinadas concentrações de arsenato, há redução da síntese de PCs. Além disso, como observado neste estudo e por Norton et al. (2009), o cultivar Lemont apresentou um baixo acúmulo de arsênio nos grãos. Esse acúmulo varia de acordo com o local de cultivo, o que acontece para outros genótipos. Assim, Norton et al. (2009) sugeriram que o genótipo e o ambiente influenciam a absorção de arsênio e acúmulo nos grãos.

TABELA 5.3.5. Análise descritiva da concentração total de arsênio no solo e nas diferentes partes das plantas de arroz. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (mínimo-máximo), em mg kg⁻¹ das amostras secas.

Cultivar	Tratamento	Solo	Raízes	Caules	Grãos
Italica Carolina	Controle	5,8 $\pm$ 0,3 (5,6-6,2)*	59,3 $\pm$ 30,4 (31,9-102,8)*	22,3 $\pm$ 7,6 (15,5-32,4)*	1,0 $\pm$ 0,3 (0,6-1,2)*
	Exposto	15,3 $\pm$ 0,9 (14,3-16,2)	373,0 $\pm$ 20,8 (353,7-401,5)	38,2 $\pm$ 8,6 (28,5-45,2)	2,1 $\pm$ 0,1 (2,0-2,2)
Dom Sofid	Controle	9,1 $\pm$ 2,6 (7,0-12,6)*	79,2 $\pm$ 26,5 (63,9-118,8)*	19,1 $\pm$ 5,6 (12,3-23,7)*	0,7 $\pm$ 0,2 (0,5-0,9)*
	Exposto	19,7 $\pm$ 3,7 (15,7-22,9)	258,8 $\pm$ 16,2 (240,1-268,4)	35,6 $\pm$ 4,1 (31,1-39,3)	1,3 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)
9524	Controle	6,8 $\pm$ 1,0 (6,0-7,9)*	9,4 $\pm$ 4,6 (4,7-13,9)*	6,7 $\pm$ 0,5 (6,3-7,3)*	0,4 $\pm$ 0,02 (0,3-0,4)*
	Exposto	14,2 $\pm$ 9,2 (8,2-24,8)	184,6 $\pm$ 64,5 (111,9-234,7)	14,1 $\pm$ 3,6 (10,0-16,7)	1,3 $\pm$ 0,2 (1,0-1,4)
Kitrana 508	Controle	5,8 $\pm$ 0,4 (5,4-6,2)*	92,1 $\pm$ 14,2 (78,8-109,6)*	18,2 $\pm$ 9,1 (8,9-26,2)*	0,9 $\pm$ 0,1 (0,8-1,1)*
	Exposto	13,0 $\pm$ 4,0 (7,8-16,8)	317,6 $\pm$ 74,2 (272,1-428,2)	32,1 $\pm$ 5,3 (26,4-38,9)	1,6 $\pm$ 0,3 (1,4-2,1)
YRL-1	Controle	6,9 $\pm$ 0,6 (6,3-7,7)*	6,9 $\pm$ 2,9 (3,6-10,6)*	8,7 $\pm$ 2,4 (6,3-11,6)*	0,8 $\pm$ 0,2 (0,7-1,1)*
	Exposto	15,8 $\pm$ 2,9 (13,3-19,3)	134,1 $\pm$ 63,9 (61,3-191,3)	23,0 $\pm$ 6,5 (14,8-29,1)	1,8 $\pm$ 0,4 (1,4-2,2)
Lemont	Controle	6,9 $\pm$ 1,0 (5,5-7,7)*	55,6 $\pm$ 28,2 (29,8-95,8)	7,4 $\pm$ 2,8 (4,3-11,1)	0,6 $\pm$ 0,1 (0,5-0,7)
	Exposto	12,6 $\pm$ 2,8 (9,7-16,1)	64,8 $\pm$ 11,2 (54,8-77,0)	13,5 $\pm$ 4,0 (9,1-16,9)	0,7 $\pm$ 0,2 (0,5-0,9)
Análise geral	Controle	7,0$\pm$1,6 (5,4-12,6)	49,9$\pm$36,9 (3,6-118,8)	13,2$\pm$7,2 (4,3-26,2)	0,7$\pm$0,2 (0,3-1,2)
	Exposto	14,9$\pm$4,5 (7,8-24,8)	223,5$\pm$117,6 (54,8-428,2)	25,6$\pm$11,0 (9,1-45,2)	1,4$\pm$0,5 (0,5-2,2)

*: diferenças significativas entre controles e expostos (p<0,05).

Utilizando esses dados (avaliação dos efeitos no desenvolvimento das plantas, concentrações de arsênio total e PCs) pode-se observar que, de acordo com a Figura 5.3.11, a planta “paga um preço” pela contaminação do solo com arsênio e pela ativação de seus sistemas de defesa (produção das PCs e GSH, por exemplo). Observa-se que o aumento da concentração de arsênio nas raízes causa o aumento da concentração de PCs, culminando com a redução da massa dos grãos, ou seja, prejudicando a produtividade (Figuras 5.3.11A e B), como previamente observado por Carbonell-Barrachina, Carbonell, Beneyto (1995), Carbonell-Barrachina et al. (1998) e Knauer et al. (1999).

Quanto às espécies de metiladas de arsênio, MMA, DMA e TMAO, sabe-se que estas podem ser encontradas em alguns solos, geralmente em baixas concentrações. O MMA e o DMA podem ser sintetizados a partir do arsênio inorgânico através de bio-metilação por microrganismos ou algas presentes no solo, além disso, esses dois compostos podem ser introduzidos no solo a partir da utilização de praguicidas e herbicidas (ZHAO, McGRATH e MEHARG, 2010). Além do DMA e MMA, devido à alta concentração de arsênio nos grãos, suspeitou-se da presença de espécies catiônicas de arsênio como tetrametil arsênio (TMA) e óxido de tri-metil arsina (TMAO). O método de separação por LC empregado faz com que essas espécies eluam no mesmo tempo de retenção do As^{3+} . Assim, de acordo com Hansen et al. (2010), foi adicionado peróxido de hidrogênio para conversão do As^{3+} em As^{5+} , evitando esta sobreposição de picos.

FIGURA 5.3.11. Correlações entre: A) massa dos grãos produzidos pelas plantas de arroz e a concentração de arsênio total ([As]) nas raízes; B) massa dos grãos produzidos pelas plantas de arroz e a concentração total de fitoquelatinas (PCs) nas raízes.

Do mesmo modo do Estudo II, o controle da qualidade das análises de especiação foi realizado pela análise do material de referência de arroz NIST 1568a Rice Flour (Tabela 5.3.6). Sendo o valor de referência de $290 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$ de arsênio, a

recuperação para a especiação química ficou acima de 85% e a soma das espécies não diferiram estatisticamente ($p=0,200$) do valor certificado no material de referência NIST Rice Flour 1568a. A Figura 5.3.12 apresenta um cromatograma de uma análise do referido material. Observa-se a presença de 3 espécies (DMA, MMA e As-i) e a conversão do As^{3+} , o que ocorreu para as amostras, descartando assim a presença das espécies catiônicas.

TABELA 5.3.6. Determinação das espécies de arsênio no material de referência de farelo de arroz Rice Flour NIST 1568a.

Analito	Concentração média $\pm$ desvio padrão (ng g^{-1})	Recuperação $\pm$ desvio padrão (%)[*]
As-i	87,1 $\pm$ 9,4	
DMA	150,6 $\pm$ 12,2	
MMA	13,3 $\pm$ 0,8	
Soma	251,0 $\pm$ 22,4	86,5 $\pm$ 7,7

*: valor certificado $290 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$, recuperação calculada a partir da média.

FIGURA 5.3.12. Determinação das espécies de arsênio presentes no material de referência Rice NIST 1568a utilizando peróxido de hidrogênio para conversão do As^{3+} em As^{5+} .

A Figura 5.3.13 revela as concentrações das espécies de arsênio nos grãos dos cultivares estudados. Os dados foram analisados estatisticamente comparando a concentração das espécies de arsênio (arsênio inorgânico, DMA e MMA) entre as amostras controles e expostas, dentro de um mesmo cultivar, bem como em cultivares diferentes (controle x controle e exposto x exposto).

Comparando a concentração de arsênio inorgânico entre controles e expostos, uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi observada apenas para o cultivar YRL-1. As amostras controles de YRL-1 e Itálica Carolina apresentaram diferenças significativas da concentração de As-i em relação a todos os outros cultivares, exceto entre eles mesmos. Comparando as amostras expostas de todos os seis cultivares, YRL-1 apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) com todos os outros cultivares e Itálica Carolina diferenças com Kitrana 508 e Lemont ($p < 0,05$).

Por outro lado, quando comparamos as concentrações de DMA nas amostras expostas e controles de uma mesmo cultivar, diferenças significativas ($p < 0,05$) podem ser observadas para Itálica Carolina, Dom Sofid, 9524, Kitrana 508 e YRL-1. Comparando todos os expostos de todos os cultivares, diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram observadas para estes mesmos cultivares comparados ao Lemont. Para o MMA (controles x expostos), observam-se significativas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para todos os cultivares, exceto Lemont. A comparação entre as plantas expostas de todos os cultivares mostrou que Kitrana 508, com maior concentração de MMA, apresentou significativas diferenças com 9524, YRL-1 e Lemont, e, por outro lado, Lemont, com menor concentração, apresentou diferenças ($p < 0,05$) com Itálica Carolina e Dom Sofid.

FIGURA 5.3.13. Concentração das espécies de arsênio: arsênio inorgânico (As-i), dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA) nos grãos dos diferentes cultivares. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. IC: Italica Carolina; DS: Dom Sofid; 9: 9524; K: Kitrana 508; Y: YRL-1; L: Lemont; (c): controles; (e): expostos; *: diferenças significativas entre controles e expostos ($p < 0,05$).

Portanto, o cultivar YRL-1 quando exposto ao arsenato parece ter uma maior capacidade para transferir o arsênio inorgânico para os grãos, seguido por Itálica Carolina, 9524, Dom Sofid, Kitrana 508 e Lemont (porém estes, sem significativa diferença estatística entre amostras controles e expostas). A adição do arsenato no solo, de alguma forma, aumenta a concentração de DMA nos grãos dos cultivares Itálica Carolina, Dom Sofid, 9524 e Kitrana 508 e, interessante, não aumenta a concentração de arsênio inorgânico nos grãos, apesar do arsênio total estar fortemente correlacionado com a concentração de DMA nos grãos ($r=0,788^*$). Este comportamento ocorre de forma semelhante para o MMA. Como o meio de cultivo é o mesmo, estes cultivares apresentaram meios de absorção mais eficientes para o DMA e não alteraram o seu padrão de absorção para o arsênio inorgânico, oferecendo portanto menor risco do consumo de seu grão, uma vez que o DMA é menos tóxico.

Além disso, de acordo com Li et al. (2009), sabe-se que o aquaporo da raiz do arroz, Lsi1, é responsável pela absorção de DMA e MMA pentavalente não dissociado. Quando esse aquaporo sofre uma mutação, sua capacidade de absorção reduz para o MMA e DMA 80% e 50%, respectivamente. Esses achados em conjunto com os estudos de Zhao, McGrath e Meharg (2010) sobre metilação do arsenato pode explicar parte desse comportamento diferenciado na absorção das espécies de arsênio e suas concentrações nos grãos de arroz.

5.3.4- Avaliação do fator de transferência do arsênio nos cultivares estudados:

Outro importante ponto a ser considerado é o fator de transferência (TF) do As do solo para os grãos, passando pelas raízes e caule. Esse TF é definido como o potencial de absorção da planta a determinado elemento do solo para as raízes, destas para o caule e então para os grãos em uma condição específica de cultivo (CHUMBLEY e UNWIN, 1982; CARBONELL et al., 1998 RAAB et al., 2007b). O TF é dependente da sensibilidade das espécies ou genótipos das plantas à concentração, forma e disponibilidade dos elementos químicos em um definido solo (CARBONELL et al., 1998; HARTLEY-WHITAKER et al., 2001; ALAM, SNOW e TANAKA, 2003; RAAB et al., 2007a).

O estudo do TF é relevante, pois o arsênio pode acumular-se nos grãos e entrar na cadeia alimentar (HUANG et al., 2006). De acordo com Zhang e Duan (2008), após a absorção pelas raízes, a transferência do arsênio (das raízes para o caule, do caule para os grãos e das raízes para os grãos) e a transformação das espécies (das formas inorgânicas para orgânicas) são alguns dos fatores que regulam a concentração e toxicidade do arsênio. Entender os mecanismos de translocação e transformação do arsênio nas plantas ajuda a melhorar a segurança no cultivo do arroz em solos contaminados e reduzir o risco de seu consumo.

A capacidade de acumular arsênio varia consideravelmente nos vegetais. Plantas que acumulam nas partes aéreas menos que 1 mg kg^{-1} de massa seca (menos de 10% da concentração de As no solo) são consideradas excludoras, com $\text{TF} < 0,1$ e transferência restrita de arsênio das raízes para o caule. Em outro extremo, estão as plantas hiperacumuladoras de arsênio (*Pteris vittata*, por

exemplo), com concentrações de arsênio nas partes aéreas em torno de 2% (20g kg^{-1}) e $\text{TF} > 1$. Entre estas duas categorias de plantas encontram-se as intermediárias, com concentrações nas partes aéreas de 400 a 1000 mg kg^{-1} , faixa na qual se enquadra o arroz de acordo com Zhao, McGrath e Meharg (2010). Os cultivares aqui estudados estão próximos a duas categorias: hiperacumuladoras e intermediárias. As plantas apresentaram TFs solo-caule > 1 , característico de hiperacumuladoras (Figura 5.3.14F) e acúmulo de arsênio nos caules de 4,3 a $45,2\text{ mg kg}^{-1}$ (Tabela 5.3.5), valores menores que as plantas consideradas intermediárias e maiores que as plantas consideradas excludoras. Lemont foi o único cultivar que não mostrou diferenças estatísticas nos TF solo-raízes (Figura 5.3.14A).

De acordo com Williams et al. (2007), o arroz (TF solo-caule: 0,05-3,84) tem uma capacidade cerca de 50 vezes maior que o trigo (TF solo-caule: 0,002-0,142) e a cevada (TF solo-caule: 0,002-0,095) para acumular arsênio. Os TFs solo-caule encontrados neste estudo (Figura 5.3.14F) estão próximos dos TFs encontrados por Williams et al. (2007). Nenhum dos cultivares apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre controles e expostos para TFs solo-caules, e os cultivares Lemont e Kitrana 508 apresentaram diferenças no TF solo-grãos entre controles e expostos (Figura 5.3.14D).

Segundo Huang et al. (2006), comparado a outras plantas como espinafre, mostarda, cebola, alface, alho entre outras, o TF do arsênio do solo para a planta do arroz é também maior. Essa capacidade pode ser devida às condições de plantio sob irrigação e absorção de arsênio pelos canais de silício. Além disso, Norton et al. (2009) identificaram cultivares de arroz com diferentes capacidades de acúmulo de arsênio, atribuindo essa capacidade à variação genética entre os cultivares.

Em geral, neste estudo, todos os controles de cinco dos seis cultivares mostraram alto TF raízes-caule (Figura 5.3.14B) e raízes-grão (Figura 5.3.14E) quando comparado aos expostos, ou seja, o TF reduziu com a exposição ao As^{5+} adicionado ao solo. Isso ocorre possivelmente pelo aumento nas concentrações de PCs. O controle do cultivar YRL-1 se destaca entre os outros (TF raízes-caules > 1 e TF raízes-grãos > 0,13), sendo estatisticamente maior comparado aos outros cultivares ($p < 0,05$) (Figuras 5.3.14B e 5.3.14E). Lemont apresentou diferença no TF solo para raízes ($p < 0,05$). Quanto aos TFs caules-grãos, Figura 5.3.14C, foram observadas diferenças estatísticas somente entre os controles dos cultivares 9524 e YRL-1 ($p < 0,05$).

Vários fatores podem influenciar nessas diferenças nos TFs como: i) alta taxa de conversão do As^{5+} em As^{3+} pelas enzimas arseno-redutases (ZHAO et al. 2009); ii) mecanismo eficiente de efluxo de As^{3+} das raízes (ZHAO et al. 2009; ZHAO, McGRATH e MEHARG, 2010); iii) modificação nos transportadores (Lsi1 selvagem e mutante) de arsênio nas células das raízes (LI et al., 2009); iv) mecanismo de produção de PCs dose-dependente de arsênio e variável em relação ao genótipo (cultivar) de arroz (NORTON et al., 2009; NORTON et al., 2012; TRIPATHI et al., 2012). Assim, por exemplo, o cultivar Lemont pode não ter recebido uma dose de arsênio suficiente para desencadear uma produção de PCs, o que reduziria seus TFs.

FIGURA 5.3.14. Fator de transferência (TF) do arsênio entre o solo e as partes das plantas dos cultivares estudados. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. IC: Italica Carolina; DS: Dom Sofid; 9: 9524; K: Kitrana 508; Y: YRL-1; L: Lemont; (c): controles; (e): expostos; diferenças significativas entre controles e expostos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.4.5- Correlações entre as concentrações de PCs, arsênio e fatores de transferência entre todos os cultivares estudados:

Para evitar ou reduzir os danos provocados pelos elementos químicos tóxicos, as plantas possuem mecanismos de defesa como a indução do sistema antioxidante (ZHANG e GE, 2008), aumento da síntese de compostos contendo grupo sulfidril e produção de fitoquelatinas (PCs) (DUAN et al., 2011). O arsênio está entre estes elementos tóxicos e, como visto anteriormente, é um potente indutor de síntese de PCs. Recentemente, Lombi et al. (2009) relataram que o As^{3+} está ligado principalmente a complexos tiol no farelo de arroz e endosperma. Eles sugeriram que essas espécies são sequestradas nos vacúolos, onde o pH é 5,5, favorecendo sua estabilidade (ZHAO et al., 2009). Liu et al., (2010) mostraram que a complexação PCs-As nas raízes de *Arabidopsis thaliana* reduz o transporte de arsênio das raízes para o caule.

De acordo com a Tabela 5.3.7 há várias correlações entre as concentrações de arsênio total, suas espécies nos grãos e as concentrações de PCs nas raízes do arroz exposto ao arsenato. O arsênio total nos grãos tem uma correlação positiva com a concentração de DMA e MMA ($r=0,643$ e $0,570$, respectivamente). As concentrações desses analitos nos cultivares estudados estão de acordo com o estudo de Zavala et al. (2008), que mostra uma correlação positiva entre arsênio total nos grãos, DMA e MMA.

Ainda na Tabela 5.3.7, observa-se uma correlação negativa entre PC4-As e Iso-PC3-Glu-As com a concentração total de arsênio nos grãos ($r=-0,485$ e $-0,425$, respectivamente). Por outro lado, correlações positivas significativas estatisticamente são observadas entre DMA e MMA nos grãos e GSSG e PCs livres

(PC2red, DesGly-PC2, PC2 auto-oxidada, Iso-PC2Glu e PC3). Parece claro que a introdução do arsenato no solo de cultivo aumenta ao mesmo tempo a produção de PCs e a metilação deste provavelmente por microrganismos, levando a uma absorção de MMA e DMA pelos transportadores Lsi1 presentes nas raízes (LI et al., 2009). De acordo com Zhao, McGrath e Meharg (2010) o DMA é eficientemente transferido das raízes para os caules (e grãos) por mecanismos desconhecidos. É também apresentado na Tabela 5.3.7 correlações negativas (mas não significativas) entre As-i e 11 PCs (PCs livres ou PCs-As), ou seja, quanto maior a concentração de PCs menor a concentração de As-i nos grãos. Quando se correlaciona a razão da concentração de As-i nos grãos de plantas expostas e controle com a razão da concentração total de PCs também em plantas expostas e controles, essa influência exercida pelas PCs sobre a absorção de As-i fica evidente (Figura 5.3.17).

Como observado por Raab et al. (2005) em um estudo com *H. annuus* e *B. juncea*, a concentração de As-i nas partes aéreas dessas plantas tem uma correlação negativa com a síntese de PCs, sendo essa síntese dependente do tempo e da concentração de arsênio no meio. Além dessa semelhança com o estudo de Raab et al. (2005), neste presente trabalho, observou-se que o As-i tem uma correlação positiva ($r=0,442$) com a concentração de GSH. Como visto, a GSH participa na produção de PCs bem como na conversão de As^{3+} em As^{5+} e na defesa antioxidante (RAAB, FELDMANN e MEHARG, 2004; BLEEKER et al., 2006; DUAN et al., 2011), o que explica essa correlação. Klapheck, Fliegner e Zimmer (1994) mostraram que a produção de PCs de arroz exposto ao cádmio é também dose e tempo dependentes.

TABELA 5.3.7. Correlações entre os analitos presentes nos grãos (As-t, DMA, MMA e As-i), nas raízes (GSH, PCs livres e PCs-As) e TF das amostras expostas ao arsenato.

Analitos	As-t	DMA	MMA	As-i	GSH	GSSG	OHMe PC2	PC2 Red.	DesGly PC2	PC2 Auto	Iso-PC2 Glu	OHMe PC3As	PC3	PC3As	Iso-PC3 GluAs	DesGly PC3As	PC4As	Iso-PC3 Glu	TFRC
DMA	,643**																		
MMA	,570**	,858**																	
As-i	,726**	,317	,302																
GSH	,170	,214	,105	,442*															
GSSG	,041	,417*	,403	-,252	,086														
OHMe PC2	-,026	,314	,292	-,262	,257	,761**													
PC2 Red.	,160	,508*	,483*	-,178	,049	,719**	,712**												
DesGly PC2	,139	,569**	,491*	-,214	,293	,699**	,718**	,775**											
PC2 Auto	,116	,540**	,486*	-,317	,008	,797**	,757**	,902**	,891**										
Iso-PC2 Glu	,066	,517*	,468*	-,302	,042	,800**	,691**	,794**	,902**	,921**									
OHMe PC3As	-,288	,210	,224	-,161	-,152	,275	,240	,253	,114	,170	,292								
PC3	,280	,625**	,585**	,050	,238	,634**	,536**	,799**	,743**	,781**	,733**	,146							
PC3As	-,322	,238	,296	-,184	-,083	,405	,294	,345	,220	,246	,378	,928**	,332						
Iso-PC3 GluAs	-,425*	,130	,386	-,392	-,162	,416	,289	,310	,139	,289	,440	,776**	,153	,756**					
DesGly PC3As	-,185	,283	,458*	-,241	-,221	,500*	,321	,432*	,418*	,419*	,504*	,763**	,326	,791**	,741**				
PC4As	-,485*	,111	,225	-,244	-,210	,292	,155	,284	,168	,229	,321	,853**	,311	,910**	,756**	,833**			
Iso-PC3 Glu	,091	,363	,483*	-,419	,103	,777**	,853**	,743**	,814**	,819**	,782**	,118	,824**	,238	,319	,329	,052		
TFRC	,244	-,177	-,086	,186	-,326	-,027	,052	-,097	-,222	-,018	-,043	-,268	-,015	-,277	-,301	-,178	-,159	,262	
TFRG	,468*	-,053	-,079	,444*	-,184	-,241	-,221	-,324	-,410*	-,277	-,296	-,402	-,204	-,440*	-,445*	-,451*	-,384	-,118	,842**

As-t: arsênio total; DMA: dimetil-arsênio; MMA: monometil-arsênio; As-i: arsênio inorgânico; TF: fator de transferência; TFRC: fator de transferência raízes-caules; TFRG: fator de transferência raízes-grãos; *: p<0,05; **: p<0,01.

Cobbett e Goldsbrough (2002) relatam que as PCs de baixa massa molecular são sintetizadas a partir da GSH e/ou compostos relacionados (GSSG). Já as PCs de alta massa molecular são sintetizadas a partir das PCs de massas moleculares menores e com a adição de cisteína e sulfeto. Na Tabela 5.3.7 observa-se que a GSH não se correlaciona com qualquer PC, somente com o As-i, possivelmente por participar das vias de detoxificação. Porém a GSSG correlaciona-se significativamente com as PCs de menor massa molecular como Iso-PC2-Glu, PC2, PC2 auto-oxidada, OH-Me-PC2, PC3, DesGly-PC2, Iso-PC3-Glu e, com menor força à DesGly-PC3-As e DMA (ver Tabela 5.3.1 para massas moleculares).

FIGURA 5.3.15. Correlação entre a razão da concentração de arsênio inorgânico (As-i) nos grãos de arroz de plantas expostas e controles e a razão da concentração de fitoquelatinas (PCs) nas raízes de plantas expostas e controles.

Entre as PCs determinadas (livres ou PCs-As) são observadas diversas correlações fortes (Tabela 5.3.7) que mostram uma possível ligação nas vias de biossíntese desses compostos. Por exemplo, a PC de estrutura mais simples, DesGly-PC2, possui fortes correlações com todas as outras PCs ($r \geq 0,718$), indicando que possivelmente é substrato para a formação das PCs mais complexas (e de maior massa molecular como PC2 reduzida, PC3 entre outras; ver Figuras 5.3.6 e 5.3.7). A Figura 5.3.16 demonstra as possíveis vias de biossíntese em uma célula de raiz de plantas da família Poaceae (gramíneas).

Para ajudar a compreender essas correlações entre as PCs é interessante uma descrição detalhada sobre a síntese desses compostos. Inicialmente a enzima γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) faz a ligação GluCys e a glutathione synthetase (GS) finaliza a síntese de GSH adicionando Gly a estrutura, formando assim γ -GluCysGly. A GSH, por retroalimentação negativa, controla a atividade da GCS (COBBETT, 2000; COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002). A biossíntese dos peptídeos $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Gly}$ nas plantas é catalisada por elementos tóxicos (arsênio e cádmio, por exemplo) e pela enzima constitutiva PC sintase (PCS), que transfere a fração glutamyl-cysteine da GSH para uma molécula aceptora de GSH ou para um peptídeo $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Gly}$ existente, produzindo $(\gamma\text{-GluCys})_{n+1}\text{Gly}$ (Figura 5.3.16). Outro meio de síntese (por leveduras e outros micro-organismos) é a polimerização de $(\gamma\text{-GluCys})_n$ sem ou com adição de Gly, pela GS. Sem adição de Gly a PC é chamada DesGly-PC. Diferentes famílias e ordens de plantas podem ter PCs com diferentes aminoácidos. Por exemplo, a ordem Fabales (de monocotiledôneas) produzem $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Ala}$ quando expostas ao cádmio, já a família Poaceae (gramíneas como trigo e arroz) podem produzir PCs do tipo $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Glu}$, $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Gly}$ e $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{Ser}$, além de $(\gamma\text{-GluCys})_n$, uma DesGly-PC (Figura 5.3.16) (KLAPHECK,

As correlações entre os TFs raízes-caules (TFRC) e raízes-grãos (TFRG) e as concentrações de GSH, GSSG, PCs, espécies de arsênio e arsênio total apresentaram resultados interessantes (Tabela 5.3.7). O TFRC mostrou correlações negativas com GSH, GSSG e PCs (exceto Iso-PC3-Glu e OH-Me-PC2) e positivas com As-i e arsênio total, porém sem diferenças estatísticas. Entretanto, o TFRG revelou correlações negativas significativas estatisticamente com DesGly-PC2, PC3-As, Iso-PC3-Glu-As e DesGly-PC3-As e positivas, também estatisticamente significativas, com arsênio total, As-i e TFRC. Assim, pode-se inferir que quanto maior o TFRC maior o TFRG, apresentando as PC-As acima citadas uma influência negativa sob a transferência do arsênio das raízes para os grãos. Além disso, apesar de uma correlação fraca, o DMA e o MMA tem uma influência negativa na transferência do arsênio das raízes para as partes aéreas da planta, devido a menor absorção dessas espécies pelas raízes como observado por Abedin et al. (2002), Abedin, Feldmann e Meharg (2002) e Ma et al. (2008).

Em geral, os eventos aqui observados nos cultivares de arroz podem ser resumidos na Figura 5.3.17. Com o aumento da concentração de arsênio livre no solo (vermelho), em detrimento do arsênio que já havia no solo (azul), há uma maior conversão deste As^{5+} em DMA e MMA, provavelmente por microrganismos presentes no solo (fungos e/ou bactérias). Assim, cultivares que possuem transportadores Lsi1 mais ativos, como Itálica Carolina, 9524, Kitrana 508 e Dom Sofid, apresentaram maiores concentrações de arsênio orgânico nos grãos. Já o cultivar YRL-1 aumentou significativamente a concentração de As-i nos grãos, possivelmente por possuir menor produção de PCs e/ou maior absorção de As-i do solo. Lemont, diferente destes cultivares, não sofreu aumento nas concentrações de arsênio (As-i ou arsênio orgânico) nos grãos.

FIGURA 5.3.17. Resumo geral dos eventos observados no presente estudo. Observa-se com o aumento da disponibilidade de arsênio no solo (em vermelho): i) maior concentração de DMA e MMA nos grãos (em geral); ii) influência nas concentrações de arsênio total nas diferentes partes da planta, no fator de transferência do arsênio e produção de PCs.

6- Conclusões

Foi desenvolvido e validado um método de separação e detecção de diferentes espécies de arsênio por LC-ICP-MS. O método conta com um procedimento de preparo de amostra simples e rápido e com uma vantagem de poder ser aplicado em diferentes tipos de amostras de alimentos. Como não foi possível aplicar este método para análises de arroz visando à especiação química de arsênio, inúmeros protocolos previamente publicados para esta matriz foram avaliados na expectativa de obter um procedimento com maior simplicidade para o preparo de amostras. Após estes estudos preliminares, tanto o método desenvolvido e validado neste estudo para as matrizes de tecidos animais quanto o método validado para amostras de arroz foram aplicados na análise de diversos alimentos consumidos no Brasil. Foram observadas grandes variações nas concentrações de arsênio em alimentos consumidos no Brasil como carnes, ovos e arroz. O arroz (*Oryza sativa* L.), em especial, de diferentes processamentos, apresentou média de concentração de arsênio de $222,8 \text{ ng g}^{-1}$. Em geral, seu consumo parece seguro, pois essa média está abaixo das concentrações de arsênio total preconizadas pela consulta pública da ANVISA (300 ng g^{-1}), apesar de algumas amostras terem apresentado valor superior. No entanto, quando se observa as concentrações de uma forma mais refinada em relação às diferentes espécies químicas do arsênio, principalmente as mais tóxicas, como o arsenito e o arsenato, revela-se diferentes riscos ao seu consumo. Além disso, como demonstrado no estudo III, essas diferentes concentrações das espécies de arsênio nos grãos estão intimamente ligadas com as concentrações de arsênio no solo e à capacidade do cultivares de transferi-los aos grãos. Esta capacidade está conectada,

principalmente, a síntese de fitoqueltinas (PCs) pelas plantas de arroz, que controla, especialmente, a absorção de arsênio inorgânico e sua transferência na planta.

Finalmente, espera-se que este trabalho possa ajudar a suprir uma área carente de pesquisas em nosso país, propiciando a aplicação dos métodos em rotina em estudos de segurança alimentar no Brasil. Por outro lado, o estudo do metabolismo também colabora no âmbito do conhecimento e remediação da contaminação dos grãos com arsênio uma vez que, conhecendo a característica de cada cultivar (genótipo) e a concentração (disponibilidade) de arsênio no solo, pode-se variar o cultivar, prevenindo ou reduzindo a contaminação dos grãos por arsênio e o risco de seu consumo.

7-Referências Bibliográficas

ACGIH, AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold Limits Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices for 2003**. Cincinnati, OH, 2003.

ACKELY, K.L.; B'HYMER, C.; SUTTON, K.L.; CARUSO, J. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 845-850, 1999.

ABEDIN, M. J.; CRESSER, M. S.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J.; COTTER-HOWELLS, J. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Science and Technology**, 36, 962-968, 2002.

ABEDIN, M. J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Uptake kinetics of As species in rice plants. **Plant Physiology**, 128, 1120-1128, 2002.

ADRIANO, D. C. **Trace Elements in the Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals**. New York, Springer, 2001.

AHMED, Z. U. **Proceedings of Symposium on Behavior of Arsenic in Aquifers**, 2005. Em: SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, 379, 180-189, 2007.

AKTER, K. F.; CHEN, Z.; SMITH, L.; DAVEY, D.; NAIDU, R. Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS. **Talanta**, 68, 406-415, 2005.

ALAM, M. B.; SATTAR, M. A. Assessment of arsenic contamination in soils and waters in some areas of Bangladesh. **Water Science and Technology**, 42, 185-192, 2000.

ALAM, M. G. M.; SNOW, E. T.; TANAKA, A. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. **The Science of the Total Environment**, 308, 83–96, 2003.

ALBRECHT, J. A.; NAGY-NERO, D. Position of the American Dietetic Association: Food and Water Safety. **Journal of the American Dietetic Association**, 109, 1449-1460, 2009.

ALONSO, M. L.; BENEDITO, J. L.; MIRANDA, M.; CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; SHORE, R. F. Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. **Science of the Total Environment**, 246, 237-248, 2000.

AMAYO, K. O.; PETURSDOTTIR, A.; NEWCOMB, C.; GUNNLAUGSDOTTIR, H.; RAAB, A.; KRUPP, E. M.; FELDMANN, J. Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICP-MS and high-resolution electrospray-MS without species-specific standards. **Analytical Chemistry**, 83, 3589-3595, 2011,.

AMMANN, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. **Journal of Mass Spectrometry**, 42, 419-427, 2007.

APOSHIAN, H. V.; APOSHIAN, M. M. Arsenic toxicology: five questions. **Chemical Research in Toxicology**, 19, 1-15, 2006.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **CERCLA priority list of hazardous substances**. Atlanta, GA, 2003.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for arsenic**. Atlanta, GA, 2005.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Arsenic**. Atlanta, GA, 2007.

B'HYMER, C.; SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Comparison of four nebulizer-spray chamber interfaces for the high-performance liquid chromatographic separation of arsenic compounds using inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 13, 855-858, 1998.

BALAKUMAR, P.; KAUR, J. Arsenic Exposure and Cardiovascular Disorders: An Overview. **Journal of Cardiovascular Toxicology**, 9, 169-176, 2009.

BALLIN, U.; KRUSE, R.; RÜSELL, H. A. Determination of total arsenic and speciation of arsenobetaine in marine fish by means of reaction headspace gas-chromatography utilizing flame-ionization detection and element-specific spectrometric detection. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 350, 54-61, 1994.

BARANOV, V. I.; TANNER, S. D. A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). Part 1. The rf-field energy contribution in thermodynamics of ion-molecule reactions. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 1133-1142, 1999.

BASU, A.; MAHATA, J.; GUPTA, S.; GIRI, A. K. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. **Mutation Research**, 488, 171-194, 2001.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; NUNES, J. A.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica Chimica Acta**, 639, 13-18, 2009a.

BATISTA, B. L.; NACANO, L. R.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS. **Food Additives and Contaminants**, 29, 780-788, 2012.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. **Food Chemistry**, 126, 2000-2004, 2011a.

BATISTA, B. L.; SOUZA, J. M. O.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **Journal of Hazardous Materials**, 191, 342-348, 2011b.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. A fast ultrasound-assisted extraction procedure for trace elements determination in hair samples by ICP-MS for forensic analysis. **Forensic Science International**, 192, 88-93, 2009b.

BATISTA, B. L. **Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue.** 2009b. 79 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2009**.

BERG, T.; LARSEN, E. H. Speciation and legislation – Where are we today and what do we need for tomorrow? **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 363, 431-434, 1999.

BGS, BRITISH GEOLOGICAL SURVEY. **Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh**, 2001. Em: SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 379, 180-189, 2007.

BISWAS, D.; BANERJEE, M.; SEN, G.; DAS, J.K.; BANERJEE, A.; SAU, T.J.; PANDIT, S.; GIRI, A.K.; BISWAS, T. Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 230, 57-66, 2008.

BLEEKER, P. M.; HAKVOORT, H. W. J.; BLIEK, M.; SOUER, E.; SCHAT, H. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. **The Plant Journal**, 45, 917–929, 2006.

BLUEMLEIN, K.; RAAB, A.; MEHARG, A. A.; CHARNOCK, J. M.; FELDMANN, J. Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 390, 1739-1751, 2008.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Consulta Pública nº 101, de 27 de outubro de 2010 sobre contaminantes inorgânicos em alimentos.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c396c80447ab90d93e1d37d15359461/CP+N%C2%BA+101+GGALI.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 07 de junho de 2011.

BRASIL. **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO: AGROFIT, Secretaria de Defesa Agropecuária**, Brasília, DF, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos**, Brasília, DF, Portaria n. 685 de 27 de agosto de 1998.

BROUWER, O. F.; ONKENHOUT, W.; EDELBROEK, P. M.; DE KOM, J. F. M.; DE WOLF, F. A.; PETERS, A. C. B. Increased neurotoxicity of arsenic in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 94, 307-308, 1992.

BUNDSCHUH, J.; LITTER, M. I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROSS, G.; NICOLLI, H.B.; JEAN, J-S.; LIU, C-W.; LÓPEZK, D.; ARMIENTA, M. A.; GUILHERME, L. R.; CUEVAS, A. G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAGUEZ, R. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of the Total Environment**, 2011. In press.

CAC, General Guidelines on Sampling CAC-GL-50. **Codex Alimentarius Commission**, 2004, 1-69.

CAO, X. D.; MA, L. Q. Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. **Environmental Pollution**, 132, 435-442, 2004.

CAREY, A. M.; SCHECKEL, K. G.; LOMBI, E.; NEWVILLE, M.; CHOI, Y.; NORTON, G. J.; CHARNOCK, J. M.; FELDMANN, J.; PRICE, A. H.; MEHARG, A. A. Grain unloading of arsenic species in rice. **Plant Physiology**, 152, 309-319, 2010.

CALLE, M. B.; EMTEBORG, H.; LINSINGER, T.P.J.; MONTORO, R.; SLOTH, J.J.; RUBIO, R.; BAXTER, M.J.; FELDMANN, J.; VERMAERCKE, P.; RABER, G. Does the determination of inorganic arsenic in rice depend on the method? **Trends in Analytical Chemistry**, 30, 641-651, 2011.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; AARABI, M. A.; DELAUNE, R. D.; GAMBRELL, R. P.; PATRICK, W. H. The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. **Plant and Soil**, 198, 33-43, 1998.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; CARBONELL, F. B.; BENEYTO, J. M. Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: Effect of arsenite on plant growth and yield. **Journal of Plant Nutrition**, 18, 1237-1250, 1995.

CHATTERJEE, A.; DAS, D.; MANDAL, B. K.; CHOWDHURY, T. R.; SAMANTA, G.; CHAKABORTI, D. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. Part I. Arsenic species in drinking water and urine of the affected people. **Analyst**, v. 120, 643-650, 1995.

CHEN, C.J.; HSU, L.I.; WANG, C.H.; SHIH, W.L.; HSU, Y.H.; TSENG, M.P.; LIN, Y.C.; CHOU, W.L.; CHEN, C.Y.; LEE, C.Y.; WANG, L.H.; CHENG, Y.C.; CHEN, C.L.; CHEN, S.Y.; WANG, Y.H.; HSUEH, Y.M.; CHIOU, H.Y.; WU, M.M. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 206, 198-206, 2005.

CHIOU, H. Y.; HSUEH, Y. M.; HSIEH, L. L.; HSU, L. Y.; HSU, Y. H.; HSIEH, F. I.; WEI, M. L.; CHEN, H. C.; YANG, H. T.; LEU, L. C.; CHU, T. H.; CHEN-WU, C.; YANG, M. H.; CHEN, C. J. Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. **Mutation Research**, 386, 197-207, 1997.

CHUMBLEY C. G.; UNWIN R. J. Cadmium and lead content of vegetable crops grown on land with a history of sewage sludge application. **Environmental Pollution B**, 4, 231-237, 1982.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, 53, 159-182, 2002.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, 123, 825-833, 2000.

CONCHA, G.; NERMELL, B.; VAHTER, M. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. **Environmental Health Perspectives**, 106, 355-359, 1998.

CORNELIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O. F. X.; EBDON, L.; QUEVAUVILLER, P. Trends in certified reference materials for the speciation of trace elements. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 370, 120-125, 2001.

CULLEN, W.R.; REIMER, K.J. Arsenic speciation in the environment. **Chemical Reviews of American Chemical Society**, 89, 713-764, 1989.

D'AMATO, M.; FORTE, G.; CAROLI, S. Identification and quantification of major species of arsenic in rice. **Journal of AOAC International**, 87, 238-243, 2004.

DEVKOTA, B.; SCHMIDT, G. H. Accumulation of heavy metals in food plants and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. **Agricultural, Ecosystems and Environment**, 78, 85-91, 2000.

DIEGOR, W. G.; LONGERICH, H. P. Parameter Interaction in Signal Optimization of an ICP Mass Spectrometer. **Atomic spectroscopy**, 21, 111-117, 2000.

DO, B.; ROBINET, S.; PRADEAU, D.; GUYON, F. Speciation of arsenic and selenium compounds by ion-pair reversed-phase chromatography with electrothermic atomic absorption spectrometry: Application of experimental design for chromatographic optimisation. **Journal of Chromatography A**, 918, 87-98, 2001.

DUAN, G-L.; HU, Y.; LIU, W-J.; KNEER, R.; ZHAO, F-J.; ZHU, Y-G. Evidence for a role of phytochelatins in regulating arsenic accumulation in rice grains. **Environmental and Experimental Botany**, 71, 416-421, 2011.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Agência de Informação EMBRAPA: Arroz.** Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/Abertura.html>, Acesso em: 08 de março de 2011.

EVISA, EUROPEAN VIRTUAL INSTITUTE FOR SPECIATION ANALYSIS. **Speciation and Toxicity: leis: Council Directive 94/62EC; Council Decision 75/437/EEC; Directive 2000/53/EC; Directive 2002/95/EC; Organotin Antifouling Paint Control Act 1988 33 U.S.C. 2401**. Disponível em: <http://www.speciation.net>. Acesso em: 07 abril de 2010.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles. **Analyst**, 125, 549-551, 2000.

FALK, K.; EMONS, H. Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 643-649, 2000.

FAN, T. W-M.; LANE, A. N.; HIGASHI, R. M. An Electrophoretic Profiling Method for Thiol-rich Phytochelatins and Metallothioneins. **Phytochemical Analysis**, 15, 175-183, 2004.

FARID, A.T.M.; SEN, R.; HAQUE, M.A.; HOSSAIN, K.M.; PANAUULLAH, G.M.; MEISNER, C.A. **Symposium on Behavior of Arsenic in Aquifers, Soil and Plants**, 2005. Em: SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 379, 180-189, 2007.

FELDMANN, J.; LAI, VW-M.; CULLEN, W. R.; MA, M.; LU, X.; LE, X. C. Sample Preparation and Storage Can Change Arsenic Speciation in Human Urine. **Clinical Chemistry**, 45, 1988-1997, 1999.

FOÀ, V.; COLOMBI, A.; MARONI, M.; BURATTI, M.; CALZAFERRI, G. The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. **Science of the Total Environment**, 34, 241-259, 1984.

FRANCESCONI, K.A.; PANNIER, F. Selenium Metabolites in Urine: A Critical Overview of Past Work and Current Status. **Clinical Chemistry**, 50, 2240-2253, 2004.

FREY, M. M.; OWEN, D. M.; CHOWDHURY, Z. K.; RAUCHER, R. S.; EDWARDS, M. A. Cost to utilities of a lower MCL for arsenic. **Journal of American Water Works Association**, 90, 89-102, 1998.

FROST, H. L.; KETCHUM, L. H. Trace metal concentration in durum wheat from application of sewage sludge and commercial fertilizer. **Advances in Environmental Research**, 4, 347-355, 2000.

GALLAGHER, P. A.; SCHWEGEL, C. A.; WEI, X.; CREED, J. T. Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection. **Journal of Environmental Monitoring**, 3, 371-376, 2001a.

GALLAGHER, P. A.; SHOEMAKER, X.; WEI, X.; BROKHOFF-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. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, 369, 71-80, 2001b.

GONG, Z.; LU, X.; CULLEN W. R.; LE, X. C. Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 16, 1409-1413, 2001.

GONG, Z.; LU, X.; MA, M.; WATT, C.; LE, X. C. Arsenic speciation analysis. **Talanta**, 58, 77-96, 2002.

GRILL, E.; WINNACKER, E-L.; ZENK, M. H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, 230, 674-676, 1985.

GROSS, M. L. Accurate masses for structure confirmation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 5, 57, 1994. Editorial.

GUHA MAZUMDER, D. N.; HAQUE, R.; GHOSH, N.; DE, B. K.; SANTRA, A.; CHAKRABORTY, D.; SMITH, A. H. Arsenic levels in drinking water and the prevalence of skin lesions in West Bengal, India. **International Journal of Epidemiology**, 27, 871-877, 1998.

HALL, G. E. M.; PELCHAT, J. C.; GAUTHIER, G. Stability of inorganic arsenic (III) and arsenic (V) in water samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 205-213, 1999.

HANSEN, H.R.; RAAB, A.; JASPARS, M.; MILNE, B.F.; FELDMANN, J. Sulfur-Containing Arsenical Mistaken for Dimethylarsinous Acid [DMA(III)] and Identified as a Natural Metabolite in Urine: Major Implications for Studies on Arsenic Metabolism and Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, 17, 1086-1091, 2004

HANSEN, H. R.; RAAB, A.; PRICE, A. H.; DUAN, G.; ZHU, Y.; NORTON, G. J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Identification of tetramethylarsonium in rice grains with elevated arsenic content. **Journal of Environmental Monitoring**, 13, 32-34, 2010.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; VOOIJS, R.; BOOKUM, W. T.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology**, 126, 299–306, 2001.

HEIKENS, A. **Arsenic contamination of irrigation water, soil and crops in Bangladesh: Risk implication for sustainable agriculture and food safety in Asia**. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2006.

HEITKEMPER, D. T.; VELA, N. P.; STEWART, K. R.; WESTPHAL, C. S. Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 16, 299-306, 2001.

HEITLAND, P.; KOSTER, H. D. Comparison of different medical cases in urinary arsenic speciation by fast HPLC–ICP-MS. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 212, 432-438, 2009.

HOPENHAYN, C.; HUANG, B.; CHRISTIAN, J.; PERALTA, C.; FERRECCIO, C.; ATALLAH, R.; KALMAN, D. Profile of urinary arsenic metabolites during pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, 111, 1888-1891, 2003.

HSUEH, Y. M.; HSU, M. K.; CHIOU, H. Y.; YANG, M. H.; HUANG, C. C.; CHEN, C. J. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. **Toxicology Letters**, 133; 83-91, 2002.

HSW, HOW STUFF WORKS. **The Rice Plant**. Disponível em: <http://science.howstuffworks.com>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2012.

HUANG, R-Q.; GAO, S-F.; WANG, W-L.; STAUNTON, S.; WANG, G. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China. **Science of the Total Environment**, 368, 531–541, 2006.

HUANG, J. H.; ILGEN, G.; FECHER, P. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 800-802, 2010.

HUQ, I.; SMITH, E.; CORRELL, R.; SMITH, L.; SMITH, J.; AHMED, M.; ROY, S.; BARNES, M.; NAIDU, R. **Arsenic transfer in water soil crop environments in Bangladesh. Managing arsenic for our Future**. Austrália, 2001, 50 p.

HU, Z.; HU, S.; GAO, S.; LIU, Y.; LIN, S. Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. **Spectrochimica Acta Part B**, 59, 1463-1470, 2004.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Agents reviewed by the IARC monographs**. France: 2004, 88 p.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Grandes Regiões, segundo os produtos, período 2008-2009**. 2010.

IGREJA, A.C.M., YOKOYAMA, L.P., ROCHA, M.B., ALMEIDA, J. Cultura de arroz nos estados de Goiás e Tocantins: aspectos sócio-econômicos e tecnológicos nos sistemas de cultivo. **Agricultura em São Paulo**, 42, 65-93, 1995.

ISLAM, M.R.; JAHIRUDDIN, M.; RAHMAN, G.K.M.M.; MIAH, M.A.M.; FARID, A.T.M.; PANAULLAH, G.M.; et al. **Symposium on Behavior of Arsenic in Aquifers, Soil and Plants**, 2005. Em: SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, 379, 180-189, 2007.

ITO, K.; PALMER, C.D.; STEUERWALD, A.J.; PARSONS, P.J. Determination of five arsenic species in whole blood by liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 1334-1342, 2010.

JARVIS, K.E.; GRAY, A.L.; HOUK, R.S. **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. 1st ed. New York: Blackie & Son Ltd., 1992, 380 p.

JOKAI, Z; HEGOCZKI, J; FODOR, P. Stability and Optimization of Extraction of Four Arsenic Species. **Microchemical Journal**, 59, 117-124, 1998.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in the soil and plants**. Boca Raton: CRC Press, 1989.

KADONO, T.; INAOKA, T.; MURAYAMA, N.; USHIJIMA, K.; NAGANO, M.; NAKAMURA, S.; WATANABE, C.; TAMAKI, K.; OHTSUKA, R. Skin manifestations of arsenicosis in two villages in Bangladesh. **International Journal of Dermatology**, 41, 841-846, 2002.

KINTZ, P.; GINET, M.; MARQUES, N.; CIRIMELE, V. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. **Forensic Science International**, 170, 204-206, 2007.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. USA: McGraw-Hill, 2008.

KLAPHECK, S.; FLIEGNER, W.; ZIMMER, I. Hydroxymethyl-Phytochelatin [(γ -Glutamylcysteine)_n-Serine] Are Metal-Induced Peptides of the Poaceae. **Plant Physiology**, 104, 1325-1332, 1994.

KNAUER, K.; BEHRA, R.; HEMOND, H. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. **Aquatic Toxicology**, 46, 221-230, 1999.

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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 377, 6-13, 2003.

KOPPENAAL, D. W.; EIDEN, G. C.; BARINAGA, C. J. Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19, 561-570, 2004.

KORSRUD, G. O.; MELDRUM, J. B.; SALISBURY, C. D.; HOULAHAN, B. J.; SASCHENBRECKER, P. W.; TITTIGER, F. Trace element levels in liver and kidney from cattle, swine and poultry slaughtered in Canada. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, 49, 159-163, 1985.

KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T.; MAITANI, T. Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. **Phytochemistry**, 53, 239-245, 2000.

LAGO, A.; CORONEL, D. A.; LENGLER, L.; SILVA, T. N.; OLIVEIRA, C. B. O setor orizícola brasileiro e gaúcho: desafios, oportunidades e estratégias frente a crise atual. **Cadernos de Economia – Cursos de Ciências Econômicas, Unochapecó**, 11, 7-26, 2007.

LARSEN, E. H.; PRITZL, G.; HANSEN, S. H. Speciation of eight arsenic compounds in human urine by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection using antimonate for internal chromatographic standardization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 8, 557-563, 1993.

LAVILLA, I.; VILAS, P.; BENDICHO, C. Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry**, 106, 403-409, 2008.

LE, X. C.; MA, M. Short-Column Liquid Chromatography with Hydride Generation Atomic Fluorescence Detection for the Speciation of Arsenic. **Analytical Chemistry**, 70, 1926-1933, 1998.

LE, X. C.; LU, X.; MA, M.; CULLEN, W. R.; APOSHIAN, H. V.; ZHENG, B. Speciation of Key Arsenic Metabolic Intermediates in Human Urine. **Analytical Chemistry**, 72, 5172-5177, 2000.

LEE, J. J.; KIM, Y. K.; CHO, S. H.; PARK, K. S.; CHUNG, I. J.; CHO, D.; RYANG, D. W.; KIM, H. J. Hemolytic Anemia as a Sequela of Arsenic Intoxication Following Long-Term Ingestion of Traditional Chinese Medicine. **Journal of Korean Medical Science**, 19, 127-129, 2004.

LIANG, F.; LI, Y.; ZHANG, G.; TAN, M.; LIN, J.; LIU, W.; LI, Y.; LU, W. Total and speciated arsenic levels in rice from China. **Food Additives and Contaminants**, 27, 810-816, 2010.

LIAO, X.; CHEN, T.; XIE, H.; LIU, Y. Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. **Environment International**, 31, 791-798, 2005.

LI, R-Y.; AGO, Y.; LIU, W-J.; MITANI, N.; FELDMANN, J.; MCGRATH, S. P.; MA, J. F.; ZHAO, F-J. The Rice Aquaporin Lsi1 Mediates Uptake of Methylated Arsenic Species. **Plant Physiology**, 150, 2071–2080, 2009.

LIU, W. J.; ZHU, Y. G.; HU, Y.; WILLIAMS, P. N.; GAULT, A. G.; MEHARG, A. A.; CHARNOCK, J. M.; SMITH, F. A. Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza sativa* L.). **Environmental Science & Technology**, 40, 5730-5736, 2006.

LIU, H. Y.; PRIBST, A.; LIAO, B. H. Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead/zinc mine spill (Hunan, China). **Science of the Total Environment**, 339, 153-166, 2005.

LI, Y. X.; et al. **Concentrations of additive arsenic in Beijing pig feeds and the residues in pig manure**, 2005. Em: SILBERGELD, E. K.; NACHMAN, K. The Environmental and Public Health Risks Associated with Arsenical Use in Animal Feeds. New York Academy of Sciences, 1140, 346-357, 2008.

LIU, J. G.; LIANG, J. S.; LI, K. Q.; ZHANG, Z. J.; YU, B. Y.; LU, X. L.; YANG, J. C.; ZHU, Q. S. Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. **Chemosphere**, 52, 1467–1473, 2003.

LOMBI, E.; SCHECKEL, K. G.; PALLON, J.; CAREY, A. M.; ZHU, Y. G.; MEHARG, A. A. Speciation and distribution of arsenic and localization of nutrients in rice grains. **New Phytologist**, 184, 193-201, 2009.

LU, Y.; ADOMAKO, E. E.; SOLAIMAN, A. R. M.; ISLAM, M. R.; DEACON, C.; WILLIAMS, P. N.; RAHMAN, G. K. M.; MEHARG, A. A. Baseline soil variation is a major factor in As accumulation in bengal delta paddy rice. **Environmental Science and Technology**, 43, 1724-1729, 2009.

MAHER, W.; GOESSLER, W.; KIRBY, J.; RABER, G. Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (*Mugil cephalus*) from Lake Macquarie NSW, Australia. **Marine Chemistry**, 68, 169-182, 1999.

MA, J. F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; XU, X. Y.; SU, Y. H.; MCGRAPH, S. P.; ZHAO, F. J. Transporters of arsenite in rice and their role in As accumulation in rice grain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, 9931-9935, 2008.

MA, J. F.; TAMAI, K.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; KONISHI, S.; KATSUHARA, M.; ISHIGURO, M.; MURATA, Y.; YANO, M. A silicon transporter in rice. **Nature**, 440, 688-691, 2006.

MA, M.; LE, X. C. Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. **Clinical Chemistry**, 44, 539-550, 1998.

MANDAL, B. K.; OGRA, Y.; ANZAI, K.; SUZUKI, K. T. Speciation of arsenic in biological samples. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 198, 307-318, 2004.

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. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 189, 73-83, 2003.

MAPANDA, F.; MANGWAYANA, E. N.; NYAMANGARA, J.; GILLER, K. E. The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. **Agricultural, Ecosystems and Environmental**, 107, 151-165, 2005.

MAKAROV, A.; DENISOV, E.; LANGE, O.; HORNING, S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. **American Society for Mass Spectrometry**, 17, 977-982, 2006.

MAR, J. L. G.; REYES, L. H.; RAHMAN, G. M. M.; KINGSTON, H. M. S. Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 3005-3013, 2009.

MARAFANTE, E.; VAHTER, M. The effect of methyltransferase inhibition on the metabolism of [^{74}As] arsenite in mice and rabbits. **Chemico-Biological Interactions**, 50, 49-57, 1984.

MARAFANTE, E.; VAHTER, M.; ENVALL, J. The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. **Chemico-Biological Interactions**, 56, 225-238, 1985.

MARTIN, I.; LOPEZ-GONZALEVEZ, M. A.; GOMEZ, M.; CAMARA, C.; PALACIOS, M. A. Evaluation of high-performance liquid chromatography for the separation and determination of arsenic species by on-line high-performance liquid chromatographic-hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 666, 101-109, 1995.

MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere — a review. **Science of the Total Environment**, 249, 297-312, 2000.

MCBRIDE, M. B. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. **Advances in Soil Sciences**, 10, 1-56, 1989.

MCKIERNA, 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. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 607-613, 1999.

MEHARG, A. A.; LOMBI, E.; WILLIAMS, P. N.; SCHECKEL, K. G.; FELDMANN, J.; RAAB, A.; ZHU, Y.; ISLAM, R. Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains. **Environmental Science and Technology**, 42, 1051-1057, 2008.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **Journal of Experimental Botany**, 43, 519-524, 1992.

MEHARG, A. A.; NAYLOR, J.; MACNAIR, M. R. Phosphorous nutrition of arsenate tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. **Journal of Environmental Quality**, 23, 234-238, 1994.

MEHARG, A. A.; RAHMAN, M. M. Arsenic Contamination of Bangladesh Paddy Field Soils: Implications for Rice Contribution to Arsenic Consumption. **Environmental Science and Technology**, 37, 229-234, 2003.

MEHARG, A. A.; WILLIAMS, P. N.; ADOMAKO, E.; LAWGALI, Y. Y.; DEACON, D.; VILLADA, A.; CAMBELL, R. C. J.; SUN, G.; ZHU, Y. G.; FELDMANN J.; RAAB, A.; ZHAO, F-J.; ISLAM, R.; HOSSAIN, S.; YANAI, J. Geographical variation in total and inorganic As content of polished (white) rice. **Environmental Science and Technology**, 43, 1612-1617, 2009.

MEUWLY, P.; THIBAUT, P.; SCHWEN, A. L.; RAUSER, W. E. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. **The Plant Journal**, 7, 391-400, 1995.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 295 p.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; TRIVEDI, P. K. Thiol metabolism and antioxidant system complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology**, 86, 205–215, 2008.

MONTE, M. B. M. L., F. F.; DUTRA A. J. B.; ALBUQUERQUE C. R. F.; TONDO L. A. **The influence of the oxidation state of pyrite and arsenopyrite on the flotation of an auriferous sulphide ore**. Rio de Janeiro: CETEM (Centro de Tecnologia Mineral) e MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia), 2002.

MOONS, A. Osgstu3 and Osgstu4, encoding tau class glutathione Stransferases, are heavy metal- and hypoxic stress- induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. **FEBS Letters**, 553, 427–432, 2003.

MOUNICOU, S.; VACCHINA, V.; SZPUNAR, J.; POTIN-GAUTIER, M.; LOBINSKI, R. Determination of phytochelatins by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). **Analyst**, 126, 624-632, 2001.

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

NORTON, G. J.; PINSON, S. R. M.; ALEXANDER, J.; MCKAY, S.; HANSEN, H.; DUAN, G-L; ISLAM, M. R.; ISLAM, S.; STROUD, J. L.; ZHAO, F-J.; MCGRATH, S. P.; ZHU, Y-G.; LAHNER, B.; YAKUBOVA, E.; GUERINOT, M. L.; TARPLEY, L.; EIZENGA, G. C.; SALT, D. E.; MEHARG, A. A.; PRICE, A. H. Variation in grain arsenic assessed in a diverse panel of rice (*Oryza sativa*) grown in multiple sites. **New Phytologist**, 193, 650–664, 2012.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Arsenic in the Drink Water**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 225 p.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and risks**. Washington, DC: National Academy Press, 1999.

OTTE, J. et al. **Industrial livestock production and global health risks**, 2007. Em: SILBERGELD, E. K.; NACHMAN, K. The Environmental and Public Health Risks Associated with Arsenical Use in Animal Feeds. New York Academy of Sciences, 1140, 346-357, 2008.

PARSONS, P. J.; BARBOSA, F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochimica Acta, Part B**, 62, 992-1003, 2007.

PETROPULU, M. O.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G. Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 337, 323-327, 1997.

PIZARRO, I.; GÓMEZ, M.; CÁMARA, C.; PALACIOS, M. A. Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies. **Analytica Chimica Acta**, 495, 85-98, 2003.

PROCHNOW, L. I.; PLESE, L. M.; ABREU, M. F. Bioavailability of cadmium contained in single superphosphates produced from different Brazilian raw materials. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 32, 283-294, 2001.

PRÖFROCK, D.; PRANGE, A. Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides. **Journal of Chromatography A**, 1216, 6706–6715, 2009.

RAAB, A.; HANSEN, H. R.; ZHUANG, L.; FELDMANN, J. Arsenic accumulation and speciation analysis in wool from sheep exposed to arsenosugars. **Talanta**, 58, 67-76, 2002.

RAAB, A.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. The nature of arsenic-phytochelatin complexes I *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. **Plant Physiology**, 134, 1113-1122, 2004.

RAAB, A.; FERREIRA, K.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J. Can arsenic-phytochelatin complex formation be used as an indicator for toxicity in *Helianthus annuus*? **Journal of Experimental Botany**, 58, 1333-1338, 2007a.

RAAB, A.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A.; FELDMANN, J. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic–phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. **New Phytologist**, 168, 551-558, 2005.

RAAB, A.; WILLIAMS, P. N.; MEHARG, A.; FELDMANN, J. Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. **Environmental Chemistry**, 4, 197–203, 2007b.

RABER, G.; RAML, R.; GOESSLER, W.; FRANCESCONI, K. A. Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 570-576, 2010.

RBO, RICE BRAN OIL. **What is Rice Bran Oil**. Disponível em: <http://www.ricebranoil.info>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2012.

RODRIGUES, J. L., SOUZA, S. S., SOUZA, V. C. O., BARBOSA, F. Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. **Talanta**, 80, 1158-1163, 2010.

ROSSMAN, T. G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. **Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 533, 37-65, 2003.

SAHA, G. C.; ALI, M. A. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **Science of the Total Environment**, 379, 180-189, 2007.

SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; BRABO, E. S.; FAYAL, K. F.; FILHO, G. C. S.; LIMA, M. O.; MIRANDA, A. M. M.; MASCARENHAS, A. S.; SÁ, L. L. C.; SILVA, A. P.; CÂMARA, V. M. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 6, 171-185, 2003.

SANZ, E.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. **Analytica Chimica Acta**, 535, 227-235, 2005.

SANZ, E; MUÑOZ-OLIVAS, R; CÁMARA, C; SENGUPTA, K; AHAMED, S. Arsenic speciation in rice, straw, soil, hair and nails samples from the arsenic-affected areas of Middle and Lower Ganga plain. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, 42, 1695-1705, 2007.

SCHMÖGER, M. E. V.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. **Plant Physiology**, 122, 793–801, 2000.

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

SCOTT, N.; HATLELID, K. M.; MACKENZIE, J. N. E.; CARTER, D. E. Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. **Chemical Research in Toxicology**, 6, 102-106, 1999.

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

SHRI, M.; KUMAR, S.; CHAKRABARTY, D.; TRIVEDI, P. K.; MALLICK, S.; MISRA, P.; SHUKLA, D.; MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D.; TULI, R. Effect of arsenic on growth, oxidative stress and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72, 1102-1110, 2009.

SILBERGELD, E. K.; NACHMAN, K. The Environmental and Public Health Risks Associated with Arsenical Use in Animal Feeds. **New York Academy of Sciences**, 1140, 346-357, 2008.

SINGH, K. P.; MOHON, D.; SINHA, S.; DALWANI, R. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. **Chemosphere**, 55, 227-255, 2004.

SMITH, E.; JUHASZ, A. L.; NAIDU, W. R. Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water. **Science of the Total Environment**, 392, 277-283, 2008.

SOIGNET, S. L.; FRANKEL, S. R.; DOUER, D.; TALLMAN, M. S.; KANTARJIAN, H.; CALLEJA, E.; STONE, R. M.; KALAYCIO, M.; SCHEINBERG, D. A.; STEINHERZ, P.; SIEVERS, E. L.; COUTRE, S.; DAHLBERG, S.; ELLISON, R.; WARRELL, R. P. United States Multicenter Study of Arsenic Trioxide in Relapsed Acute Promyelocytic Leukemia. **Journal Clinical Oncology**, 19, 3852-3860, 2001.

SONG, W-Y.; PARK, J.; MENDOZA-CÓZATL, D. G.; SUTER-GROTEMEYER, M.; SHIM, D.; STEFAN HÖRTENSTEINER, GEISLER, M.; WEDER, B.; REA, P. A.; RENTSCH, D.; SCHROEDER, J. I.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. **Plant Biology**, 107, 21187–21192, 2010.

SOUZA, S. S.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. A fast sample preparation procedure for mercury speciation in hair samples by high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 79-83, 2010.

SUN, G-X.; WILLIAMS, P. N.; ZHU, Y-G.; DEACON, C.; CLAIRE, A-M.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. **Environmental International**, 35, 473-475, 2009.

SUSLICK, K. S., DIDENKO, Y., FANG, M. M., HYEON, T., KOLBECK, K. J., MCNAMARA, W. B., MDLELENI, M. M., WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, 357, 335-353, 1999.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 856, 243-258, 1999.

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I.; BANDURA, D. R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, 57, 1361-1452, 2002.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; VAN LEEWEN, H. P.; LOBINSK, R. Guidelines for terms related to chemical speciations and fractionation of elements : definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **IUPAC Recommendations – Pure Applied Chemistry**, 72, 1453-1470, 2000.

THOMAS, D. J.; LI, J.; WATERS, S. B.; XING, W.; ADAIR, B. M.; DROBNA, Z.; DEVESA, V.; STYBLO, M. Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase and the Methylation of Arsenicals. **Experimental Biology and Medicine**, 232, 3-13, 2007.

THOMAS, P.; SNIATECKI, K. Determination of trace amounts of arsenic species in natural waters by high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 10, 615-618, 1995.

TRIPATHI, P.; MISHRA, A.; DWIVEDI, S.; CHAKRABARTY, D.; TRIVEDI, P. K.; SINGH, R. P.; TRIPATHI, R. D. Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 79, 189–198, 2012.

TSENG, W-C.; CHENG, G-W.; LEE, C-F.; WU, H-L.; HUANG, Y-L. On-line coupling of microdialysis sampling with high performance liquid chromatography and hydride generation atomic absorption spectrometry for continuous in vivo monitoring of arsenic species in the blood of living rabbits. **Analytica Chimica Acta**, 543, 38-45, 2005.

TU, S.; MA, L. Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorous on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 50, 241–251, 2003.

VAHTER, M. Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. **Toxicology Letters**, 112-113, 209-217, 2000.

VAHTER, M.; AKESSON, A.; LIDEN, C.; CECCATELLI, S.; BERGLUND, M. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. **Environmental Research**, 104, 85-95, 2007.

VAHTER, M.; CONCHA, G.; NERMELL, B. Factors influencing arsenic methylation in humans. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, 13, 173-184, 2000.

VAHTER, M.; CONCHA, G.; NERMEL, B.; NILSSON, R.; DULOUT, F.; NATARAJAN, A. T. A unique metabolism of inorganic arsenic in native Andean women. **European Journal of Pharmacology**, 293, 455-462, 1995.

VAN LOON, J. C.; BAREFOOT, R. R. Overview of analytical methods for elemental speciation. **Analyst**, 117, 563-570, 1992.

WANGKARN, S.; PERGANTIS, S. A. High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 627-633, 2000.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Arsenic: Environmental Health Criteria**. Geneva, SWZ, 1981.

WILLIAMS, P. N.; PRICE, A. H.; RAAB, A.; HOSSAIN, S. A.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. **Environmental Science and Technology**, 39, 5531-5540, 2005.

WILLIAMS, P. N.; VILLADA, A.; DEACON, C.; RAAB, A.; FIGUEROLA, J.; GREEN, A. J.; FELDMANN, J.; MEHARG A. A. Greatly enhanced As shoot assimilation in rice leads to elevated grain levels compared to wheat and barley. **Environmental Science and Technology**, 41, 6854-6859, 2007.

WOOD, B. A.; FELDMANN, J. Quantification of phytochelatins and their metal(loid) complexes: critical assessment of current analytical methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 402, 3299-3309, 2012.

XIE, R.; JOHNSON, W.; SPAYD, S.; HALL, G. S.; BUCKLEY, B. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 578, 186-194, 2006.

XU, X. Y.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A.; ZHAO, F. J. Growing rice aerobically markedly decreases As accumulation. **Environmental Science and Technology**, 42, 5574-5579, 2008.

XU, X. Y.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. **New Phytologist**, 176, 590-599, 2007.

YUAN, C.; JIANG, G.; HE, B. Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 20, 103-110, 2005.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, 2nd Ed.** Philippines, Los Baños: The International Rice Research Institute, 1972.

ZAVALA, Y. J.; GERADS, R.; GURLEYUK, H.; DUXBURY, J. M. Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human Health. **Environmental Science and Technology**, 42, 3861-3866, 2008.

ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. **Gene**, 179, 21-30, 1996.

ZHANG, C. H.; GE, Y. Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress. **Rice Science**, 15, 73-76, 2008.

ZHANG, F.; SHI, W.; JIN, Z.; SHEN, Z. Response of Antioxidative Enzymes in Cucumber Chloroplasts to Cadmium Toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, 26, 1779-1788, 2002.

ZHANG, J.; DUAN, G-L. Genotypic Difference in Arsenic and Cadmium Accumulation by Rice Seedlings Grown in Hydroponics. **Journal of Plant Nutrition**, 31, 2168–2182, 2008.

ZHANG J.; ZHAO, Q-Z.; DUAN, G-L.; HUANG, Y-C. Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, 72, 34-40, 2010.

ZHANG, X.; CORNELIS, R.; KIMPE, J.; MEES, L. Speciation of toxicologically important arsenic species in human serum by liquid chromatography–hydride generation atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 11, 1075-1079, 1996.

ZHAO, F-J.; MA, J. F.; MEHARG, A. A.; MCGRATH, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, 181, 777–794, 2009.

ZHAO, F-J.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annual Review of Plant Biology**, 61, 535–559, 2010.

ZHAO, F. J.; WANG, J. R.; BARKER, J. H. A.; SCHAT, H.; BLEEKER, P. M.; MCGRATH, S. P. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. **New Phytologist**, 159, 403-410, 2003.

ZHU, Y. G.; SUN, G. X.; LEI, M.; TENG, M.; LIU, Y. X.; CHEN, N. C.; WANG, L. H.; CAREY, A. M.; DEACON, C.; RAAB, A.; MEHARG, A. A.; WILLIAMS, P. N. High Percentage Inorganic Arsenic Content of Mining Impacted and Nonimpacted Chinese Rice. **Environmental Science and Technology**, 42, 5008-5013, 2008.

8- ANEXOS

ANEXO A: Realização de parte do Doutorado no exterior:

UNIVERSITY
OF ABERDEEN

Prof. Dr. Jörg Feldmann

Phone: 01224-272911

FAX: 01224-272921

email: j.feldmann@abdn.ac.uk

College of Physical Sciences
Department of Chemistry
Meston Walk
Old Aberdeen
AB24 3UE
Scotland, UK

Aberdeen, 23 September 2011

TO WHOM IT MAY CONCERN

I declare that the PhD student, **Bruno Lemos Batista**, holding a scholarship from *Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP* (Process FAPESP number 2010/07566-1) under coordination of Prof. **Fernando Barbosa Junior**, from *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FCFRP-USP*, conducted, from June 15 of 2011 to October 20 of 2011, a project under my supervision, in **Trace Elements Speciation Laboratory (TESLA)**, at the **University of Aberdeen** (Aberdeen, Aberdeenshire, Scotland, United Kingdom). During this time the student developed activities as rice cultivation and harvesting, sample preparation for determination of: i) phytochelatins in roots, ii) total arsenic in roots, shoots, soil and grains, iii) arsenic species in grains, by using instrumental techniques as high performance liquid chromatography (HPLC), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and microwave oven.

Aberdeen, 15th of October 2011,

Yours sincerely,

Prof. Dr. Jörg Feldmann

ANEXO B: Artigos científicos publicados relacionados à Tese:

RODRIGUES, J. L.; SERPELONI, J. M.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. **Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury.** Archives of Toxicology, 84, 891-896, 2010.

BATISTA, B. L.; SOUZA, V. C. O.; DA SILVA, F. G.; BARBOSA, F. **Survey of 13 trace elements of toxic and nutritional significance in rice from Brazil and exposure assessment.** Food Additives and Contaminants: Part B, 3, 253–262, 2010.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; SOUZA, S. S.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA, F. **Mercury speciation in seafood samples by LC–ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples.** Food Chemistry, 126, 2000–2004, 2011.

BATISTA, B. L.; SOUZA, J. M. O.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. **Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption.** Journal of Hazardous Materials, 191, 342–348, 2011.

BATISTA, B. L.; NACANO, L. R.; SOUZA, S. S.; BARBOSA, F. **Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS.** Food Additives and Contaminants, 29, 780-788, 2012.

BATISTA, B. L.; Nacano, L. R.; Freitas, R.; Souza, V. C. O.; Barbosa, F. **Determination of Essential (Ca, Fe, I, K, Mo) and Toxic Elements (Hg, Pb) in Brazilian Rice Grains and Estimation of Reference Daily Intake.** Food and Nutrition Sciences, 3, 129-134, 2012.