

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lívia Botelho de Abreu

**Especiação química de arsênio em samambaia utilizando
espectrometria de massas com ionização ambiente**

Belo Horizonte
2016

UFMG/ICEx/DQ. 1.156^a
T. 519^a

Lívia Botelho de Abreu

**Especiação química de arsênio em samambaia utilizando
espectrometria de massas com ionização ambiente**

Tese apresentada ao Departamento
de Química do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutora
em Ciências - Química

Belo Horizonte
2016

A162e Abreu, Livia Botelho de
2016 Especificação química de arsênio em samambaia
T utilizando espectrometria de massas com ionização
ambiente [manuscrito] / Livia Botelho de Abreu. 2016.
95 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Química analítica - Teses 2. Arsênio - Especificação
química - Teses 3. Samambaia - Teses 4. Espectrometria
de massa - Teses I. Nascentes, Clésia Cristina,
Orientadora II. Augusti, Rodinei, Coorientador III.
Título.

CDU 043.....

"Especiação Química de Arsênio em Samambaia Utilizando Espectrometria de Massas com Ionização Ambiente"

Livia Botelho de Abreu

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG


Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
UFMG


Prof. Evandro Piccin
UFMG


Prof. Leticia Malta Costa
UFMG


Prof. Boniek Gontijo Vaz
UFMG


Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda
UNICAMP

Belo Horizonte, 24 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por ter me concedido inteligência, saúde e capacidade de finalizar esta etapa! Nada seria possível se Ele não estivesse sempre junto a mim!

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores, Clésia e Rodinei, pela oportunidade de trabalhar em seus grupos de pesquisa, me orientando com muita paciência e incentivo. Seus ensinamentos foram de grande contribuição para realização deste trabalho!

À Universidade Federal de Santa Maria, nas pessoas dos professores Érico Flores e Valderi Dressler, Natália Rossi e Lucas Schmidt, pelo apoio nas análises de especiação química.

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do professor Marcos Eberlin, Nicolas Schwab e Pedro Vendramini, pelo apoio nas análises com DESI-MSI.

À Universidade Federal de Lavras, na pessoa do professor Moacir, pela compreensão na etapa final da tese.

Ao Maurício, por sempre acreditar em mim e nunca medir esforços para me ajudar, sempre me apoiando tanto emocionalmente quanto na companhia das viagens para execução dos trabalhos da tese.

À minha família, minha mãe Tereza, meu pai Geraldo, minhas irmãs Laís e Laene, por sempre acreditarem em mim, me ajudarem e torcerem para que meus sonhos fossem realizados.

Aos colegas do laboratório 157 pelo companheirismo, incentivo e trocas de experiências.

Aos colegas do laboratório 167 pelas trocas de experiências sobre espectrometria de massas, em especial à Camila e à Bruna, pela ajuda e discussões com PS-MS e DESI-MSI.

Meu eterno obrigada!

RESUMO

As diferentes formas químicas dos compostos de arsênio, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, apresentam diferentes toxicidades e impactos ambientais. A espectrometria de massas com ionização ambiente, como por exemplo DESI-MS (*desorption electrospray ionization mass spectrometry*), DESI-MSI (*desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging*) e PS-MS (*paper spray mass spectrometry*), são excelentes técnicas para análise *in situ*, sob pressão atmosférica, à temperatura ambiente e necessita de mínimo preparo de amostra. Com o objetivo de expandir suas aplicações, essas técnicas foram aplicadas para a rápida detecção de compostos inorgânicos (arsenato – As(V) e arsenito – As(III)) e orgânicos (ácido dimetilarsínico – DMA) e dissódio metilarsenato hexahidratado – MMA) de arsênio em folhas de samambaia. As condições operacionais do DESI-MS foram otimizadas com solução padrão de DMA depositada sobre uma superfície de papel para melhorar a eficiência de ionização. Após otimização, DESI-MS foi aplicado para a análise de folhas de samambaia contaminadas artificialmente com As. As análises no DESI-MSI foram realizadas pelo método indireto onde foi feita a impressão da folha de samambaia em filtro de PTFE e posteriormente feita a varredura de íons em sua superfície. Para o PS-MS, um extrato da folha de samambaia em metanol foi depositado em papel triangular e em seguida analisado. Os espectros de massas para todas as espécies de As foram adquiridos no modo positivo e no modo negativo e pôde-se confirmar a presença do As (V), pelos íons de m/z 140,92, 142,93 e 160,94; do As (III), pelos íons de m/z 106,91, 124,92, 126,94 e 144,95; DMA, pelos íons de m/z 138,97 e 156,98; e MMA, pelos íons de m/z 138,93, 140,95 e 158,96. Para o DESI-MS e PS-MS, espectros MS/MS confirmaram a identidade de cada composto de As pelo perfil de fragmentação característico. Para o DESI-MSI a confirmação foi feita pelo erro estimado de massas para cada íon analisado. As quantificações das espécies de As por LC-ICP-MS confirmaram os resultados obtidos pelas três técnicas. Desse modo, foi possível demonstrar a aplicabilidade do DESI-MS, DESI-MSI e PS-MS como métodos rápidos, simples, eficientes e com pouco preparo da amostra na detecção de compostos de As em matrizes complexas.

Palavras-chave: DESI-MS. DESI *imaging*. PS-MS. Especificação de As. Samambaias

ABSTRACT

Chemical speciation of arsenic in fern using ambient ionization mass spectrometry

The various chemical forms of arsenic compounds, including organic and inorganic species, exhibit different toxicities and environmental impacts. Ambient ionization mass spectrometry, such as DESI-MS (desorption electrospray ionization mass spectrometry), DESI-MSI (desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging) and PS-MS (paper spray mass spectrometry), are excellent techniques for in situ analysis, under atmospheric pressure, at room temperature and low sample-consumption analysis to be performed with minimal sample pretreatment. These three techniques were applied for the rapid detection of inorganic compounds (arsenate - As (V) and arsenite - As (III)) and organic compounds (dimethylarsinic acid - DMA and disodium hexahydrate metilarsenate - MMA) of arsenic in fern leaves, aiming to expand applications for these techniques. Operating conditions of DESI-MS were optimized with DMA standard solution deposited on a paper surface to improve ionization efficiency. DESI-MS was applied to the fern leaves analysis artificially contaminated with As. Analyses in DESI-MSI were performed by the indirect method where the impression of fern leaf on a PTFE filter surface was made and the ions analyzed in the full scan mode. For PS-MS, fern leaf extract in methanol was placed in a triangular paper and analyzed. Mass spectra for all species of As were acquired in positive and negative ion mode and can confirm the presence of As (V) by ions of m/z 140,92, 142,93 e 160,94; As (III), by ions of m/z 106,91, 124,92, 126,94 e 144,95; DMA, by ions of m/z 138,97 e 156,98; and MMA, by ions of m/z 138,93, 140,95 e 158,96. For DESI-MS and PS-MS, MS/MS spectra were confirmed the identity of each As compound by the characteristic fragmentation profile. For the DESI-MSI, the confirmation was made by the mass error for each analyzed ion. The quantification of the As compounds by LC-ICP-MS confirmed the results obtained by three techniques. Thus, it is possible demonstrate the applicability of the DESI-MS, DESI-MSI e PS-MS as rapid, simple, efficient and with little sample preparation for detecting arsenic compounds in complex matrices.

Keywords: DESI-MS. DESI imaging. PS-MS. Arsenic speciation. Fern

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da técnica DESI-MS (Lordeiro, 2011)	14
Figura 2. Representação esquemática da técnica PS-MS (Adaptado de Paula et al., 2015). ...	18
Figura 3. Vista frontal e lateral da fonte DESI acoplada ao espectrômetro de massas utilizados neste trabalho.	22
Figura 4. Vista frontal da fonte <i>paper spray</i> utilizada neste trabalho	23
Figura 5. Vista frontal e lateral da fonte DESI <i>imaging</i> acoplada ao espectrômetro de massas utilizados neste trabalho.	24
Figura 6. A) Imagem óptica da folha de samambaia preparada para a impressão no papel de filtro; B) Prensa utilizada no procedimento de impressão.....	31
Figura 7. Resultados da otimização dos parâmetros A) voltagem do capilar; B) temperatura do capilar e C) fluxo do solvente.....	36
Figura 8. Abundância de íons para as diferentes espécies de As obtidas por DESI-MS/MS utilizando como solvente de ionização: acetonitrila:água, acetonitrila:ácido fórmico, ácido fórmico, formiato de amônio, hidróxido de amônio e metanol:água. Os símbolos (-) e (+) representam, respectivamente, modo negativo e modo positivo.	39
Figura 9. DESI(-)MS/MS para o íon As (III) de A) m/z 107; B) m/z 125; e DESI(+)MS/MS para o íon As (III) de C) m/z 127; D) m/z 145. Todos os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de NaAsO_2 (5 mg.L^{-1}) depositada em papel filtro.	42
Figura 10. DESI(-)MS/MS para o íon As (V) de: A) m/z 141; e DESI(+)MS/MS para o íon As(V) de: B) m/z 143 e C) m/z 161. Todos os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de KH_2AsO_4 (5 mg.L^{-1}) depositada em papel filtro.	43
Figura 11. DESI(+)MS/MS para o íon DMA de: A) m/z 139 e B) m/z 157. Todos os espectros foram gerados a partir de solução padrão de $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ (5 mg.L^{-1}) depositada em papel filtro.	44

Figura 12. DESI(+) ^{MS/MS} para íons derivados de MMA: A) m/z 141; B) m/z 159. C) DESI(-) ^{MS/MS} para o íon de m/z 139 (MMA em sua forma desprotonada). Todos os espectros foram gerados a partir de solução padrão de $\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 2\text{Na} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) depositada em papel filtro.	45
Figura 13. Espectro DESI(+) ^{MS} para folhas de samambaia não enriquecidas com As.	46
Figura 14. Espectro DESI(+) ^{MS} para folhas de samambaia enriquecidas com As (III), As (V), DMA e MMA.	47
Figura 15. DESI(-) ^{MS/MS} para o íon As (III) de m/z 107: A) para a planta enriquecida com As (III) e B) branco da samambaia. DESI(+) ^{MS/MS} para o íon As (III) de m/z 127 e 145 sendo C) e D) para a planta enriquecida com As(III) e D) e F) branco da samambaia.	48
Figura 16. DESI(-) ^{MS/MS} para o íon As (V) de m/z 141: A) para a planta enriquecida com As (V) e B) branco da samambaia. DESI(+) ^{MS/MS} para o íon As (V) de m/z 143 e 161 sendo, respectivamente, C) e D) para a planta enriquecida com As(V) e D) e F) branco da samambaia.	49
Figura 17. DESI(+) ^{MS/MS} para o íon derivado do DMA de m/z 139 e 157 sendo, respectivamente, A) e C) para planta enriquecida com DMA e B) e D) branco da samambaia.	50
Figura 18. DESI(-) ^{MS/MS} para o íon MMA de m/z 139: A) para a samambaia enriquecida com MMA e B) branco da samambaia. DESI(+) ^{MS/MS} para o íon MMA de m/z 141 e 159 sendo, respectivamente, C) e E) para a samambaia enriquecida com MMA e D) e F) branco da samambaia.	51
Figura 19. Cromatograma das quatro espécies de As presentes no extrato de folhas de samambaia enriquecidas com As.	54
Figura 20. Cromatogramas das espécies de As em extratos de folhas de samambaia enriquecidas com: A) MMA; B) DMA; C) As (V); D) As (III) e E) extrato da folha de samambaia não enriquecida com As.	55

Figura 21. Imagem da folha de samambaia (<i>Pteris vittata</i>). Lado esquerdo: imagem ótica da folha preparada para a impressão. Lado direito: imagem ótica da impressão na superfície do filtro de PTFE.	58
Figura 22. DESI(-)MSI do íon As (III) de m/z 106,91. Resolução espacial: 70 μm	59
Figura 23. DESI(-)MS do íon As(III) de m/z 106,91 obtido na geração da imagem da folha de samambaia.	59
Figura 24. DESI(-)MS do íon As (V) de m/z 140,92.....	60
Figura 25. Imagem da folha da samambaia: A) DESI(+)MSI do íon DMA de m/z 138,97; B) DESI(-)MSI do íon MMA de m/z 138,94 . A resolução espacial foi de 150 μm	61
Figura 26. DESI(+)MS para o íon DMA de m/z 138,97.	62
Figura 27. DESI(-)MS para o íon MMA de m/z 138,94.....	63
Figura 28. DESI-MS de varredura completa sobre a impressão da folha de samambaia, em filtro de PTFE, não enriquecida com As (branco): A) modo positivo; B) modo negativo. NL indica o nível de normalização em unidade arbitrária.	63
Figura 29. A) PS(+)MS para o extrato da samambaia <i>Pteris vitatta</i> ; PS(+)MS/MS do extrato da samambaia para B) As (III), íon de m/z 127; C) As (V), íon de m/z 143; D) DMA, íon de m/z 139 e E) MMA, íon de m/z 141.....	66
Figura 30. A) PS(+)MS para o extrato da samambaia <i>Pityrogramma calomelanos</i> ; PS(+)MS/MS do extrato da samambaia para B) As (III), íon de m/z 127; C) As (V), íon de m/z 143; D) DMA, íon de m/z 139 e E) MMA, íon de m/z 141.	68
Figura 31. Curva de concentração-resposta para soluções padrões de A) As (III) e B) As (V). Padrão interno: DMA 10 mg.L^{-1}	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de arsênio comumente detectadas no ambiente e em sistemas biológicos (Gong et al., 2002; Suárez, 2010; Hedegaard; Sloth, 2011).....	4
Tabela 2. Condições instrumentais para a determinação do teor total de As por ICP OES e determinação das espécies de As por LC-ICP-MS.....	25
Tabela 3. Espécies de As analisadas por ESI-MS/MS e seus respectivos íons - m/z	35
Tabela 4. Concentração de As total e As(V), As(III), DMA e MMA em MRC e folhas de <i>Pteris vittata</i> contaminadas e não contaminadas com As determinadas por LC-ICP-MS e ICP OES.....	53
Tabela 5. Concentração das espécies As (III), As (V), DMA e MMA em folhas de samambaias contaminadas naturalmente com As determinadas por LC-ICP-MS.....	61
Tabela 6. Concentrações das espécies As (III), As (V), DMA, MMA em folhas de samambaias de duas diferentes espécies contaminadas naturalmente com As determinadas por LC-ICP-MS.	67
Tabela 7. Performance analítica do PS-MS para especificação química de As	72

LISTA DE ACRÔNIMOS

2D: Duas dimensões

3D: Três dimensões

AAS: Espectrometria de Absorção Atômica

AFS: Espectrometria de Fluorescência Atômica

As (III): Arsenito

As (V): Arsenato

As: Arsênio

ATSDR: Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças

CE: Eletroforese Capilar

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo

CG: Cromatografia Gasosa

CID: Dissociação Induzida por Colisão

DESI-MS: Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry

DESI-MSI: Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging

DMA: Ácido dimetilarsínico

ESI-MS: Espectrometria de Massas por Ionização de Eletrospray

EXAFS: Espectroscopia da Estrutura Fina de Absorção

HG-AAS: Espectroscopia de Absorção Atômica com Geração de Hidretos

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-ICP-MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

IC: Cromatografia Iônica

ICP OES: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado

ICP-MS: Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD: Limite de detecção

LD₅₀: Dose letal mediana

m/z: Razão massa/carga

MALDI: Dessorção/Ionização a laser auxiliada por matriz

MMA: Ácido monometilarsônico

MS/MS: Espectrometria de massas sequencial

MS: Espectrometria de Massas

NL: Nível de normalização

PEEK: Polieter éter cetona

pH: Potencial hidrogênionico

PS-MS: Paper spray Mass Spectrometry

PTFE: Politetrafluoretileno (Teflon®)

SIMS: Espectrometria de Massas de Íons Secundários

WHO: Organização Mundial de Saúde

XANES: Espectroscopia de Alta Resolução da Borda de Absorção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Arsênio.....	2
2.2. Arsênio no meio ambiente	3
2.3. Plantas hiperacumuladoras de arsênio	6
2.4. Especificação química.....	8
2.5. Métodos analíticos para especificação	9
2.6. Técnicas para separação e quantificação	10
2.7. Técnicas analíticas para análise direta em especificação química	12
2.7.1. <i>Desorption electrospray ionization mass spectrometry</i> – DESI-MS.....	13
2.7.2. Técnicas de imageamento por espectrometria de massas	15
2.7.2.1. <i>Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging</i> – DESI-MSI	16
2.7.3. <i>Paper spray mass spectrometry</i> – PS-MS.....	17
3. OBJETIVO	20
3.1 Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Materiais, Reagentes e Soluções.....	21
4.2. Instrumentação.....	21
4.2.1. DESI-MS	21
4.2.2. PS-MS	22
4.2.3. DESI-MSI.....	23
4.2.4. LC-ICP-MS	24
4.2.5. ICP OES	24
4.2.6. Demais equipamentos	26
4.3. Amostras - Samambaias.....	26
4.4. Análise de especificação de As por ESI-MS/MS.....	26
4.5. Análise de especificação de As por DESI-MS.....	27
4.6. Análise de especificação de As por DESI-MS em samambaias contaminadas artificialmente com As.....	28

4.7. Análise de especiação de As por LC-ICP-MS em samambaias contaminadas artificialmente	29
4.7.1. Procedimento de extração	29
4.7.2. Quantificação das espécies de As.....	29
4.8. Determinação do teor total de As em samambaias contaminadas artificialmente.....	30
4.9. Análise de especiação de As por DESI-MSI	30
4.10. Análise de especiação de As por PS-MS em samambaia contaminada naturalmente.	31
4.11. Figuras de mérito	32
4.11.1. Precisão	32
4.11.2. Limite de detecção do método	32
4.11.3. Curva de calibração	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Especiação de arsênio por ESI-MS/MS.....	34
5.2. Otimização dos parâmetros DESI-MS.....	34
5.2.1. Fluxo do solvente, temperatura do capilar e voltagem do capilar.....	34
5.2.2. Solvente de ionização.....	37
5.3. Especiação de arsênio utilizando DESI-MS/MS	40
5.3.1. Análise dos padrões de arsênio	40
5.3.2. Especiação de As em folhas de samambaia contaminadas artificialmente.....	45
5.4. Análise por ICP OES e LC-ICP-MS das samambaias.....	52
5.5. Análise de especiação de As por DESI-MSI	56
5.6. Análise de especiação de As por PS-MS em samambaias contaminadas naturalmente	64
5.6.1. Avaliação da performance analítica por PS-MS	69
6. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

A determinação do teor total de alguns elementos traço no não é o bastante para estimar os riscos potenciais à saúde humana/animal e ao meio ambiente, já que a toxicidade, mobilidade e biodisponibilidade destes elementos são altamente dependentes da forma química na qual eles se encontram. Diante desse contexto, nos últimos anos, o interesse por estudos sobre especiação química tem aumentado.

O arsênio está entre os elementos mais nocivos à saúde humana, sendo considerado uma ameaça significativa. Contudo, sua toxicidade é dependente da forma química na qual está presente, sendo as formas inorgânicas, arsenito e arsenato, mais tóxicas do que as formas metiladas, como monometilarsônico e dimetilarsínico.

O desenvolvimento (ou mesmo o aperfeiçoamento) de métodos analíticos para a especiação de As em amostras vegetais é necessário, visando uma avaliação correta do impacto ambiental e do risco potencial. Contudo, análises de especiação são laboriosas e os procedimentos utilizados devem garantir que as espécies químicas de interesse não sofram nenhuma alteração durante as etapas de preparo das amostras.

Inúmeras técnicas analíticas têm sido utilizadas para a determinação das espécies de As em plantas. Porém, a maioria necessita de um laborioso preparo da amostra, e com o aumento de etapas do processo analítico, aumenta-se também o risco de conversão das espécies e de perda dos analitos.

Neste contexto, a espectrometria de massas com ionização ambiente, como por exemplo DESI-MS e PS-MS, são excelentes alternativas para análise *in situ*, em tempo real, sob pressão atmosférica e à temperatura ambiente. Além disso, consomem uma pequena quantidade de amostra e podem ser realizadas com mínimo preparo. Já foi demonstrado que é possível realizar a análise direta de plantas por meio dessas técnicas. No entanto, trabalhos que empregam essas técnicas em estudos sobre a especiação de As em amostras vegetais ainda não foram descritos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Arsênio

O arsênio (As) é um elemento químico que se localiza no grupo 15 da tabela periódica, localizado entre o P e Sb, sendo considerado um não metal. Esse elemento possui quatro estados de oxidação: arsina (-3), arsênio elementar (0), arsenito (+3) e arsenato (+5). Arsênio elementar (por vezes referido como arsênio metálico) possui várias formas alotrópicas (arsênio cinza, amarelo e preto); sendo que o arsênio cinza é sua forma mais estável. Contudo, o arsênio, é normalmente encontrado no ambiente combinado com outros elementos, tais como oxigênio, cloro e enxofre. Quando combinado com esses elementos é chamado de arsênio inorgânico. Já, quando combinado com carbono e hidrogênio, é referido como arsênio orgânico (Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR, 2007a).

Minerais de arsênio, como o realgar (As_2S_2) e ouropigmento (As_2S_3), ambos usados como pigmentos, eram conhecidos pelos Gregos desde os tempos de Aristóteles, quando o elemento e sua toxicidade ainda nem eram conhecidos. Arsênio foi descrito pela primeira vez por Albertus Magnus, no século XIII (Prohaska & Stingeder, 2005) e foi muito utilizado como veneno. Há relatos de que a morte de personalidades notáveis como Napoleão Bonaparte e do presidente norte americano Zachary Taylor, tenha sido, provavelmente, em função do envenenamento causado por esse elemento (Dembitsky; Rezanka, 2003). No século XIX, ele era amplamente usado em remédios populares, sendo principalmente usado para reduzir febre, Peste Negra, furúnculos e até mesmo para melhorar a aparência e bem estar (Dembitsky; Rezanka, 2003; Nogueira, 2005). Somente em 1941, o As ficou conhecido como um elemento tóxico (Prohaska & Stingeder, 2005). No século XX, esse elemento teve grande aplicação na agricultura e na indústria.

Na contemporaneidade, o arsênio é usado, principalmente, como conservante de madeira para torná-la resistente ao apodrecimento e à decomposição (arsenato de cobre cromatado, CCA) (Khan et al., 2006). Em 2003, o uso de conservantes de madeira contendo As foi extinto para certos usos residenciais, tais como estruturas de jogos, mesas, assoalhos, cercas e calçadões. Arsênio, em conservantes de madeira, ainda é usado em aplicações industriais. Várias espécies orgânicas de As são utilizadas como herbicidas, para o controle de plantas daninhas, e como aditivos antimicrobianos, em rações de animais e aves. Na indústria

eletrônica, o arseneto de gálio (GaAs) é usado em semicondutores para telecomunicações, células solares e pesquisa espacial (ATSDR, 2007b).

O As está entre os metais mais nocivos à saúde humana, assim como o mercúrio, o chumbo e o cádmio. Na lista de prioridade de substâncias que são consideradas ameaças mais significativas para a saúde humana, elaborada pela ATSDR e EPA (Environmental Protection Agency), o As é o primeiro, devido à sua toxicidade e potencial de exposição humana (ATSDR, 2011). Deve-se notar que essa lista não é uma lista de substâncias tóxicas, mas uma combinação da frequência ou ocorrência, toxicidade e potencial de exposição humana a uma determinada substância.

A absorção de As via oral e respiratória pode causar irritação respiratória, náusea, vômito, diarreia, danos cardiovasculares, encefalopatia, efeitos dermatológicos como hiperpigmentação, hiperqueratose, calosidade e verrugas, além de aumentar o risco de vários tipos de câncer, principalmente de pele, bexiga e pulmão (ATSDR, 2007b; EPA, 2000).

A espécie de As mais tóxica é a forma mais reduzida, arsina (AsH_3), seguida pelas formas inorgânicas trivalente (As (III)) e pentavalente (As (V)). Os compostos inorgânicos são em torno de 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA). A arsenobetaína e a arsenocolina são consideradas relativamente não tóxicas (ATSDR, 2007b; WHO, 2001). A dose letal mediana (LD_{50}) para a arsina é de 3 mg kg^{-1} e para as espécies As (III) e As (V) são, respectivamente, 14 e 87 mg kg^{-1} . Já para as formas metiladas, MMA e DMA, menos tóxicas, é 1800 mg kg^{-1} . A arsenocolina e a arsenobetaína, que são consideradas praticamente não tóxicas, possuem LD_{50} de 6500 mg kg^{-1} e maior do que 10000 mg kg^{-1} , respectivamente (WHO, 2001).

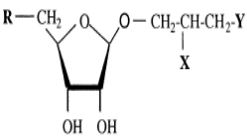
Muitos compostos de As estão presentes no ambiente e em sistemas biológicos (Tabela 1). Contudo, as espécies mais comuns e de interesse em estudos de especiação são as formas inorgânicas arsenito e arsenato e as orgânicas monometilarsênico, dimetilarsênico, arsenocolina e arsenobetaína (Barra et al., 2000; Kumaresan; Riyazuddin, 2001).

2.2. Arsênio no meio ambiente

O As está distribuído amplamente no meio ambiente, sendo o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre (FAO/WHO, 1999). Geralmente, o As ocorre em quantidades traços em rochas, solo, água e ar. Porém, sua concentração pode ser maior, em certas áreas, como resultado de intemperismo e atividades antropogênicas (WHO, 2001).

Tabela 1. Espécies de arsênio comumente detectadas no ambiente e em sistemas biológicos (Gong et al., 2002; Suárez, 2010; Hedegaard; Sloth, 2011)

Nome	Abreviatura	Fórmula Química
Arsenito (ácido arsenioso)	As (III)	As(OH) ₃
Arsenato (ácido arsênico)	As (V)	AsO(OH) ₃
Ácido monometilarsônico	MMA (V)	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido monometilarsenioso	MMA (III)	CH ₃ As(OH) ₂
Ácido dimetilarsínico	DMA (V)	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Ácido dimetilarsenioso	DMA (III)	(CH ₃) ₂ AsOH
Ácido dimetilarsinoil acético	DMAA	(CH ₃) ₂ As(O)CH ₂ COOH
Propionato de trimetilarsônio	TMAP	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ COOH
Propionato de dimetilarsinoil	DMAP	(CH ₃) ₂ As(O)CH ₂ CH ₂ COOH
Ácido dimetilarsinotionato	DMAS	(CH ₃) ₂ As(=S)(OH)
Acetato de dimetilarsinotiol	DMAAS	(CH ₃) ₂ As(=S)CH ₂ COOH
Dimetilarsinoil etanol	DMAE	(CH ₃) ₂ AsOCH ₂
Óxido de trimetilarsina	TMAO	(CH ₃) ₃ AsO
Trimetilarsina	TMA (III)	(CH ₃) ₃ As
Íon tetrametilarsônio	Me ₄ As ⁺	(CH ₃) ₄ As ⁺
Arsenobetaína	AsB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COO ⁻
Arsenobetaína 2	ASB-2	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ COO ⁻
Arsenocolina	AsC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
Arsina	AsH ₃ , MeAsH ₂ , Me ₂ AsH	(CH ₃) _x AsH _{3-x} (x=0-3)
Etilmetilarsina	Et _x AsMe _{3-x}	(CH ₃ CH ₂) _x As(CH ₃) _{3-x}
Roxarsone	Roxarsone	(OH)NO ₂ C ₆ H ₅ As(OH) ₂ O
p-aminobenzenoarsonato	PABA	NH ₂ C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido fenilarsônico	PAA	C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido hidroxifenilarsônico	4-HPAA	(OH)C ₆ H ₅ As(OH) ₂ O
Ácido amino hidroxifenilarsônico	3-AHPAA	NH ₂ (OH)C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido nitrofenilarsônico	4-NPAA	NO ₂ C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido hidroxinitrofenilarsônico	3-NHPAA	NO ₂ (OH)C ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido ureidofenilarsônico	p-UPAA	NH ₂ CONHC ₆ H ₅ AsO(OH) ₂
Ácido arsanílico	p-ASA	NH ₂ C ₆ H ₄ AsO
Arsênio com grupos ribosídios	arsenoaçúcares	*

	*	R	X	Y
	Açúcar glicerol	(CH ₃) ₂ As(O)-	-OH	-OH
	Açúcarfosfato	(CH ₃) ₂ As(O)-	-OH-PO ₃ H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
	Açúcar sulfonato	(CH ₃) ₂ As(O)-	-OH	-SO ₃ H
	Açúcar sulfato	(CH ₃) ₂ As(O)-	-OH	-OSO ₃ H
		(CH ₃) ₂ As(O)-	-NH ₂	-SO ₃ H
	(CH ₃) ₂ As ⁺	-OH	-OSO ₃ H	

O As está presente em mais de 200 espécies minerais, o qual cerca de 60% são arsenato, 20% sulfeto e sulfosais e os 20% restantes incluem arsenetos, arsenitos, óxidos e arsênio elementar (Prohaska; Stingeder, 2005). Desses, o mais comum é a arsenopirita (FeAsS) que ocorre associado a sulfetos metálicos, como de zinco, níquel, cobre, bem como em minérios de ouro e prata (Ciminelli et al., 1999). Estima-se que um terço do fluxo atmosférico do As seja de origem natural. A atividade vulcânica é uma das mais importantes fontes naturais de As, seguido pela dissolução de minerais (principalmente em águas subterrâneas), exsudatos de vegetação e poeira (não necessariamente nessa ordem). Outra fonte natural importante de As é a oxidação de sulfetos de As da crosta terrestre, como arsenopirita (FeAsS). Esse mineral pode ser oxidado por O_2 , Fe^{3+} e NO_3^- . Em condições ambientais a oxidação inorgânica dos sulfetos é lenta e pode ser acelerada pela participação de bactérias (Palmieri, 2006). Mineração, fundição de metais e queima de combustíveis fósseis são os principais processos industriais que contribuem para contaminação antropogênica da água, ar e solo por As. Além desses, historicamente, o uso de pesticidas contendo As deixou grandes extensões de solos agrícolas contaminados. Igualmente, a utilização de As na preservação da madeira, também conduziu à contaminação do ambiente (World Health Organization – WHO, 2001; 2010).

Em solos, a média global de As é de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Níveis naturais elevados de As em solos podem estar associados com o substrato geológico, tal como minérios de sulfeto. Em locais onde existiu ou ainda existem atividades de mineração do ouro, como na região do Quadrilátero Ferrífero e, principalmente, na região do município de Nova Lima, ambas em Minas Gerais, os teores de As no solo podem ultrapassar 1000 mg kg^{-1} (Deschamps; Mello, 2007). Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo – CETESB – em solos, o valor de referência de qualidade é de $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e o de prevenção, ou seja, concentração acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo, é de 15 mg kg^{-1} (CETESB, 2005). Mais detalhes sobre especiação, ocorrência, transformação e comportamento de As no meio ambiente podem ser vistos em Huang et al. (2011) e Rezende et al. (2015).

Plantas terrestres podem acumular As pela absorção do solo pelas raízes ou pela absorção de As transportado pelo ar e depositado nas folhas. O grau de absorção de As do solo pelas plantas varia bastante entre as diferentes espécies. O nível de As em plantas terrestres costuma estar bem abaixo daquele encontrado nos solos, sendo que a maioria delas não acumulam níveis superiores a 1 mg kg^{-1} , principalmente em regiões consideradas não contaminadas (Vasconcelos et al., 2007). Por outro lado, em locais onde a concentração de As

no solo é maior, plantas hiperacumuladoras de As podem acumular mais de 20 g kg^{-1} de As (peso seco) (Ma et al., 2001).

2.3. Plantas hiperacumuladoras de arsênio

Algumas plantas desenvolveram a habilidade de acumular altos níveis de As (ou outros metais) em seus tecidos sem sintomas de toxicidade. Essas plantas que são hábeis em acumular altas concentrações de metais e/ou metaloides são chamadas de hiperacumuladoras (Salgado et al., 2012). O termo hiperacumuladora foi usado, pela primeira vez, em 1977, por Brooks e colaboradores, para definir plantas que acumulavam mais de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de níquel (Brooks et al., 1977).

As plantas hiperacumuladoras são interessantes para estudos de especiação, pois essas análises implicam na determinação de espécies com concentrações muito baixas e envolvem sérias dificuldades para encontrar métodos sensíveis e seletivos (Gonzalvez et al., 2009).

A samambaia chinesa *Pteris vittata*, foi a primeira planta a ser reconhecida como hiperacumuladora de As, sendo recomendada para o uso de remediação de solos contaminados por esse elemento (Ma et al., 2001; Wang et al., 2007). A *Pteris vittata* é extremamente eficiente na extração de As dos solos e translocação em sua biomassa. Estudos mostram que essa planta pode acumular mais de 20 g kg^{-1} de As (Ma et al., 2001). Além dessa, a samambaia *Pityrogramma calomelanos* também é eficiente na absorção de As de solos (Niazi et al., 2012; Campos et al., 2015), podendo acumular mais de 8 g kg^{-1} de As (Francesconi et al., 2002). Muitos estudos sobre especiação de As com *Pteris vittata* e com *Pityrogramma calomelanos* têm sido descritos na literatura (Daus et al., 2005; Kachenko et al., 2010; Mathews et al., 2010; Vetterlein et al., 2009; Webb et al., 2003; Zhang et al., 2002). A alta acumulação de As não é uma característica geral das samambaias (Bergqvist; Greger, 2012). Em um estudo sobre a acumulação de As em 45 espécies de samambaias, somente plantas do gênero *Pteris* mostraram-se eficientes em acumular altas concentrações de As. Contudo, algumas plantas desse gênero, como *Pteris straminea* e *tremula*, não hiperacumularam As (Meharg, 2002).

A análise de uma variedade de plantas terrestres, coletadas em locais contaminados por As, tem mostrado que elas possuem As predominantemente nas formas inorgânicas, principalmente como arsenito (Singh; Ma, 2006; Vetterlein et al., 2009; Zhang et al., 2002). Contudo, há trabalhos que mostram que a espécie inorgânica pentavalente se sobressai em

relação à espécie trivalente (Melendez et al., 2011; Larios et al., 2012). Em samambaias hiperacumuladoras de As (*Pteris vittata* e *P. calomelanos*) crescidas na região do Quadrilátero Ferrífero, a principal espécie de As encontrada foi o arsenito, e esse mostrou-se mais expressivo nas folhas do que nas raízes (Daus et al., 2005). Em um estudo feito com 124 espécies de plantas, as formas inorgânicas, arsenito e arsenato, predominaram em todos os tecidos de plantas analisados. Além disso, o arsenito mostrou ser a espécie de As que predomina na parte aérea de plantas terrestres (Bergqvist; Greger, 2012).

Espécies metiladas de As, como MMA, DMA e TMAO, também têm sido encontradas em plantas (Bergqvist; Greger, 2012; Larios et al., 2012; Meharg; Whitaker, 2002; Mir et al., 2007; Zheng et al., 2003). A presença de arsenobetaína foi reportada em algas (Hsieh; Jiang, 2012; Sartal et al., 2012), sendo a espécie predominante em peixes e crustáceos, constituindo mais de 80% do teor total de As, destacando também que, outras espécies como arsenocolina e propionato de trimetilarsônio também estão presentes como constituintes menores em animais marinhos (Francesconi; Edmonds, 1996; Raber et al., 2012). Organismos marinhos acumulam arsênio preferencialmente em seus tecidos e órgãos (Morita; Edmonds, 1992).

O transporte e translocação de um elemento numa planta dependem principalmente da ocorrência molecular do elemento no solo e o compartimento da célula (Feldmann; Krupp, 2012). Pouco se conhece sobre o mecanismo de absorção e distribuição de arsênio ao longo das partes das plantas. Geralmente, assume-se que as raízes são responsáveis por acumular a maior parte do As (Bohari et al., 2002; Larios et al., 2012). Esse comportamento é normal para plantas não hiperacumuladoras de As, que não podem translocar As das raízes para a parte aérea, em grande extensão (Meharg; Whitaker, 2002). As plantas hiperacumuladoras são hábeis em translocar a maior parte do As para as partes aéreas (Ma et al., 2001; Tu et al., 2002; Wang et al., 2002). Essa absorção de As pelas plantas, pode ocorrer por meio de transportadores de fosfato, pois o íon fosfato apresenta comportamento similar ao íon arsenato (Lei et al., 2012; Wang et al., 2002). A maior proporção de As absorvido pelas plantas esta na forma de As (V), já que em solos aeróbicos arsenato é a espécie mais estável e dominante. Algumas plantas são capazes de reduzir arsenato a arsenito (Lei et al., 2012; Wang et al., 2002). Em um estudo sobre especiação de As na hiperacumuladora *Pteris vittata* e na não hiperacumuladora *Pteris ensiformis* L., expostas a As (V), foi observado que o As ficou concentrado principalmente nas folhas da *P. vittata* como As (III) e nas raízes da *P. ensiformis* como As (V) (Singh; Ma, 2006). Trabalhos mostram que independente da espécie que a planta foi exposta, As (III) ou As (V), arsenito é a espécie que predomina (Xue et al., 2012).

Para o mecanismo dessa redução, foi proposto que, quando a planta é exposta a arsênio, As (V) é rapidamente reduzido a As (III) e complexado por ligantes orgânicos, tais como tióis, para evitar danos para as células vegetais (Ma et al., 2001; Zhang et al., 2002). Até pouco tempo, não era bem conhecido se os compostos orgânicos de As eram simplesmente absorvidos como tal, a partir do solo, ou se eram convertidos, a partir de espécies inorgânicas em solos, para as formas metiladas nas plantas. Entretanto, em 2012, Lomax e colaboradores, sugeriram que as plantas não são capazes de metilar As inorgânico e, ao invés disso, absorvem As metilado produzido por micro-organismos.

Os fatores que podem influenciar as espécies de arsênio presentes em uma planta são: a capacidade da planta sintetizar as espécies de As presentes no solo, a capacidade dos compostos de As serem absorvidos pela planta, ativa ou passivamente, e a presença de espécies de As adsorvido à superfície das raízes das plantas (Meharg; Whitaker, 2002). Além desses fatores, aqueles que influenciam fortemente a acumulação de As em plantas é o *habitat*, ou seja, o grau de poluição do local, e a espécie de planta (Larios et al., 2012).

2.4. Especificação química

Há alguns anos, a determinação do teor total de elementos era considerada suficiente e única para questões ambientais. Embora a concentração total de contaminantes seja útil em muitas áreas, o interesse pela especificação química tem aumentado, já que a toxicidade, mobilidade e biodisponibilidade dos elementos são altamente dependentes da forma química na qual eles aparecem.

O termo especificação tem sido definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como “a distribuição de um elemento entre as espécies químicas definidas em um sistema”. A espécie química é definida como “a forma específica de um elemento químico em um sistema, ou seja, é função da composição isotópica, da estrutura molecular ou estado de oxidação”. Finalmente, análise de especificação é definida como a “atividade analítica de identificação e/ou medição da quantidade de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra” (Templeton et al., 2000).

A mais importante aplicação prática da especificação elementar é, sem dúvida, encontrada na área da toxicologia (Proust et al., 2005). Legisladores têm ficado cada vez mais conscientes sobre a importância da especificação química, porém, a implementação de limites máximos toleráveis de espécies químicas, para a maioria dos elementos, ainda está sob

investigação. Isso, em parte, é devido à falta de dados detalhados sobre o nível toxicológico das espécies, bem como de métodos analíticos confiáveis, validados e adequados para controle em análises de rotina (Hedegaard; Sloth, 2011).

Alguns elementos podem ser altamente tóxicos para as várias formas de vida, enquanto outros são considerados essenciais, mas podem se tornar tóxicos em altas doses. Muitos desses efeitos dependem fortemente da forma particular na qual o elemento está presente. Por exemplo, Cr (III) é um elemento essencial para o organismo, mas Cr (VI) é genotóxico e cancerígeno. Ao contrário do Cr, as espécies reduzidas de As são as mais tóxicas: arsina (AsH_3) > arsenito (As(III)) > arsenato (As(V)) (Templeton et al., 2000). Desse modo, a avaliação do impacto da presença de um elemento no meio ambiente não pode ser feita baseada somente na sua concentração total.

Devido às diferentes toxicidades das espécies de As, o desenvolvimento (ou mesmo o aperfeiçoamento) de métodos analíticos confiáveis é importante para realizar a especiação de As, visando melhor entendimento de suas vias metabólicas e da biotransformação que ocorre entre essas espécies, além de uma avaliação correta do impacto ambiental e do risco potencial.

2.5. Métodos analíticos para especiação

Com o interesse crescente pela especiação, ao longo dos anos, inúmeros pesquisadores têm relatado a especiação de As utilizando várias técnicas de separação e de detecção/quantificação (Barra et al., 2000; Mir et al., 2007; Nam et al., 2010; Suárez, 2010). Contudo, a especiação de As é ainda difícil por inúmeras razões. Durante o preparo das amostras, extração e armazenamento, a integridade das espécies de As deve ser mantida. Até o momento, poucos materiais de referência certificados têm sido desenvolvidos para as diversas espécies de As e, finalmente, não existe um método único de especiação de As satisfatório (Dietz et al., 2007; Nam et al., 2010; Rubio et al., 2010). Segundo Pétursdóttir e colaboradores (2012), sem um valor certificado de As não é possível avaliar a acurácia da concentração determinada e a eficiência do método de extração aplicado.

As etapas de amostragem e preparo das amostras, em grande parte dos trabalhos, têm sido negligenciadas, muito embora só essa última possa necessitar de até 60% do tempo gasto para executar uma análise e é responsável por até 50% dos erros oriundos do processo analítico. Esses percentuais podem ainda ser considerados mais elevados em análises de especiação, já que as matrizes são frequentemente complexas, as concentrações das espécies

são baixas e a distribuição, muitas vezes, é heterogênea (Dietz et al., 2007; Rubio et al., 2010).

O preparo de amostras sólidas para especiação geralmente pode incluir procedimentos tais como: liofilização, trituração, secagem, moagem, maceração, homogeneização, redução do tamanho de partícula e peneiração, seguidos pelos processos de extração (Gong et al., 2002). O procedimento utilizado na análise de especiação deve garantir que as espécies químicas de interesse não sofram nenhuma alteração durante as etapas de preparo das amostras. Se a distribuição original das espécies na amostra é alterada, o resultado da análise de especiação é questionável (Gong et al., 2012). Diante do exposto, um dos grandes desafios da química analítica atualmente é o preparo de amostras para fins de especiação.

2.6. Técnicas para separação e quantificação

A maioria dos métodos analíticos empregados para a especiação de As em amostras ambientais e biológicas envolve a hifenização de técnicas de separação, principalmente cromatografia líquida (HPLC) com detectores baseados em absorção atômica (AAS), emissão atômica (ICP OES) ou espectrometria de massas (MS) (Anawar, 2012; García-Salgado et al., 2012; Garcia-Sartal et al., 2012; Hsieh; Jiang, 2012; Mirandes et al., 2011). Outras técnicas como cromatografia gasosa (GC) (Campillo et al., 2008), cromatografia iônica (IC) (Kohlmeyer et al., 2003), eletroforese capilar (CE) (Meermann et al., 2008), espectrometria de fluorescência atômica (AFS) (Sanchez-Rodas et al., 2010; Zhang et al., 2002) e espectroscopia de absorção de raio-x (XANES e EXAFS) (Kachenko et al., 2010; Webb et al., 2003) também têm sido aplicadas para especiação de As. Um resumo sobre as principais técnicas analíticas utilizadas na especiação de As pode ser visto em Carey et al. (2012).

As técnicas que utilizam a espectrometria de absorção atômica, associada à geração de hidretos (HG-AAS), oferecem sensibilidade, baixo custo, seletividade e simplicidade na determinação de As e podem ser utilizadas para diferenciar espécies que formam hidretos voláteis. Em estudos de especiação, pode-se utilizar o acoplamento com cromatografia ou ICP-MS, os quais tem se mostrado uma ferramenta poderosa para a separação e determinação de várias espécies de As (Barra et al., 2000; Musil et al., 2014). Apesar de HG-AAS ser um método atrativo para especiação de As (Galazzi; Arruda, 2013), essa técnica é falha devido à determinação de espécies singulares e pelo laborioso preparo de amostras (Akter et al., 2005).

Além disso, nem todas as espécies de As formam hidretos e técnicas de decomposição são usualmente requeridas (Gong et al., 2002).

O espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS) é, sem dúvida, uma ferramenta atrativa para análises de especiação elementar. Essa técnica oferece um número de características únicas que incluem limites de detecção extremamente baixos para a maioria dos elementos, uma ampla faixa linear, alto poder de detecção e sensibilidade extremamente elevada. Quando acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), torna-se um sistema altamente seletivo e de alta sensibilidade para análises de especiação. HPLC-ICP-MS é uma técnica bem estabelecida para monitoramento de rotina de espécies de As (Szpunar; Lobinski, 2002). Uma das principais vantagens da combinação de HPLC com ICP-MS é que somente uma simples e direta interface entre essas duas técnicas é requerida. Além disso, separações com HPLC são usualmente conduzidas à temperatura ambiente ou apenas à temperaturas ligeiramente elevadas (30-40°C) (Popp et al., 2010). HPLC-ICP-MS com troca aniônica tem um bom potencial para análises de especiação de As. O modo de eluição isocrática e a baixa concentração de solvente orgânico e sólidos dissolvidos na fase móvel permite operação estável do ICP sem degradação na sensibilidade e pouca interferência de matriz (Szpunar; Lobinski, 2002).

Um complemento perfeito à técnica supracitada é a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), principalmente quando acoplada ao HPLC. Na técnica HPLC-ICP-MS a identificação de espécies pelo tempo de retenção requer padrões dos compostos de interesse, não sendo aplicável no caso de espécies desconhecidas. Além disso, a irreprodutibilidade dos tempos de retenção com os padrões é comum na presença da matriz da amostra e, também, a eficiência da separação na coluna, diminui lentamente com o número de corridas cromatográficas (Szpunar; Lobinski, 2002). Assim, essa lacuna pode ser preenchida pelo ESI-MS que pode ser utilizada na determinação da massa molecular e caracterização estrutural de moléculas, em nível de traço, em matrizes complexas. Com essa técnica analítica, o tempo de retenção do HPLC em combinação com espectro de massas fornece informações evidentes da identidade da espécie do analito. Desse modo, a análise de especiação frequentemente requer uma abordagem multi-técnica, onde não apenas mais de uma técnica é usada em paralelo ou em sequência, mas em uma abordagem integrada (European Virtual Institute for Speciation Analysis – EVISA, 2008).

Contudo, contrária a essas inúmeras vantagens, o uso de ICP-MS, como detector, além do seu alto custo, requer grandes quantidades de amostras que não são viáveis para amostras biológicas pequenas. Além disso, é um detector elementar altamente específico que não é

encontrado, comumente, em muitos laboratórios e também há restrições quanto à seleção da fase móvel usada no HPLC, já que essa não pode conter altas frações de solventes orgânicos (o que causa a diminuição ou extinção do plasma) e/ou elevadas concentrações de sais em soluções tampão (afetam a robustez do método) (Huang et al., 2008; Popp et al., 2010).

Desse modo, o estabelecimento de novas técnicas, mais simples, rápidas e com o mínimo preparo de amostra se faz necessário para estudos de especiação química.

2.7. Técnicas analíticas para análise direta em especiação química

Dentre as numerosas técnicas analíticas, a espectrometria de massas (MS) merece destaque especial, por apresentar elevadas sensibilidade, especificidade e velocidade de resposta. Para a maioria dos espectrômetros de massas, atualmente, espectros são adquiridos com tempo de 1 segundo; em contraste com outros métodos analíticos, utilizados na maioria dos laboratórios, que muitas vezes leva várias horas para completar uma análise qualitativa e/ou quantitativa (Chen et al., 2010).

Trabalhos sobre especiação química utilizando espectrometria de massas são muito escassos na literatura. Um dos pioneiros foi publicado em 1997, onde Florêncio e colaboradores trabalharam com espectrometria de massas com ionização por eletrospray para identificar compostos de As. Eles concluíram que essa técnica é adequada para a identificação de arsenobetaína, arsenocolina, ácido monometilarsônico, ácido dimetilarsínico, arsenito e arsenato, já que espectros de massas característicos desses compostos puderam ser obtidos. Além disso, naquela época, já se previa que essa técnica seria útil para a identificação de tais compostos em água e matrizes complexas, como extratos de plantas (Florêncio et al., 1997).

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), embora dotada de diversas vantagens, tem como principal limitação a necessidade de preparo da amostra e o fato de ser aplicada somente para amostras em solução. Nesse contexto, métodos da espectrometria de massas com ionização ambiente têm surgido como um avanço na aceleração e simplificação das análises (Libedev, 2015).

O termo “*ambient mass spectrometry*” foi introduzido em 2006 (Cooks et al., 2006). As técnicas da espectrometria de massas com ionização ambiente seguem três princípios: 1) as amostras não necessitam de pré-tratamento ou somente necessitam de um mínimo preparo; 2) íons são gerados sob pressão atmosférica e temperatura ambiente antes de sua introdução no espectrômetro de massas para análise; 3) os analitos são diretamente desorvidos/ionizados

da superfície da amostra de tal modo que instantaneamente as medições no espectrômetro de massas se tornam possíveis (Hsu e Dorrestein, 2015).

Devido sua simplicidade e eficiente informação molecular, o interesse por técnicas de ionização ambiente tem crescido cada vez mais, as quais têm sido usadas como novas ferramentas para análises de tecidos biológicos, incluindo plantas, drogas e amostras ambientais.

2.7.1. *Desorption electrospray ionization mass spectrometry* – DESI-MS

Em 2004, foi proposta, por Cooks e colaboradores, uma técnica denominada DESI (do inglês: *desorption electrospray ionization*), a qual representa um dos mais bem sucedidos avanços na espectrometria de massas (Takáts et al., 2004). DESI é uma excelente técnica para análise *in situ*, em tempo real, sob pressão atmosférica, à temperatura ambiente, com baixo consumo de amostra, sendo conduzida com nenhum ou com mínimo preparo de amostra (Chen et al., 2010).

No DESI, um jato de gotículas e íons carregados do solvente é direcionado à superfície de uma amostra sólida, líquida ou gasosa. O impacto do *spray* sobre a superfície da amostra desorve e ioniza moléculas presentes na amostra e os íons gerados são transferidos para o sistema de vácuo do espectrômetro de massas onde são analisados. O espectro de massas resultante é similar ao espectro de massas ESI, o qual mostra íons derivados dos analitos presentes na amostra (Takáts et al., 2004; Talaty et al., 2005). Desse modo, os espectros de massas ESI podem ser utilizados como referências para análise por DESI.

O princípio de funcionamento do DESI consiste em um solvente que entra por um tubo capilar no nebulizador; lateralmente a esse tubo, um jato de gás à alta pressão (geralmente nitrogênio) é introduzido, o qual produz pequenas gotículas do solvente. Entre o capilar e o espectrômetro de massas existe uma grande diferença de potencial que deixará as gotículas eletricamente carregadas (*electrospray*). Esse feixe de minúsculas gotas eletricamente carregadas é direcionado à amostra por um ângulo α . Os íons dessorvidos são direcionados para a entrada do espectrômetro de massas, à pressão atmosférica, que faz um ângulo β com a superfície da amostra (Figura 1). O suporte onde se encontra a amostra é livre para se movimentar e, desse modo, pode-se analisar várias porções de um mesmo material. Amostras sólidas podem ser analisadas como tal, amostras líquidas devem ser absorvidas em

algum material e amostras gasosas devem ser adsorvidas em uma superfície sólida (Lordeiro, 2011).

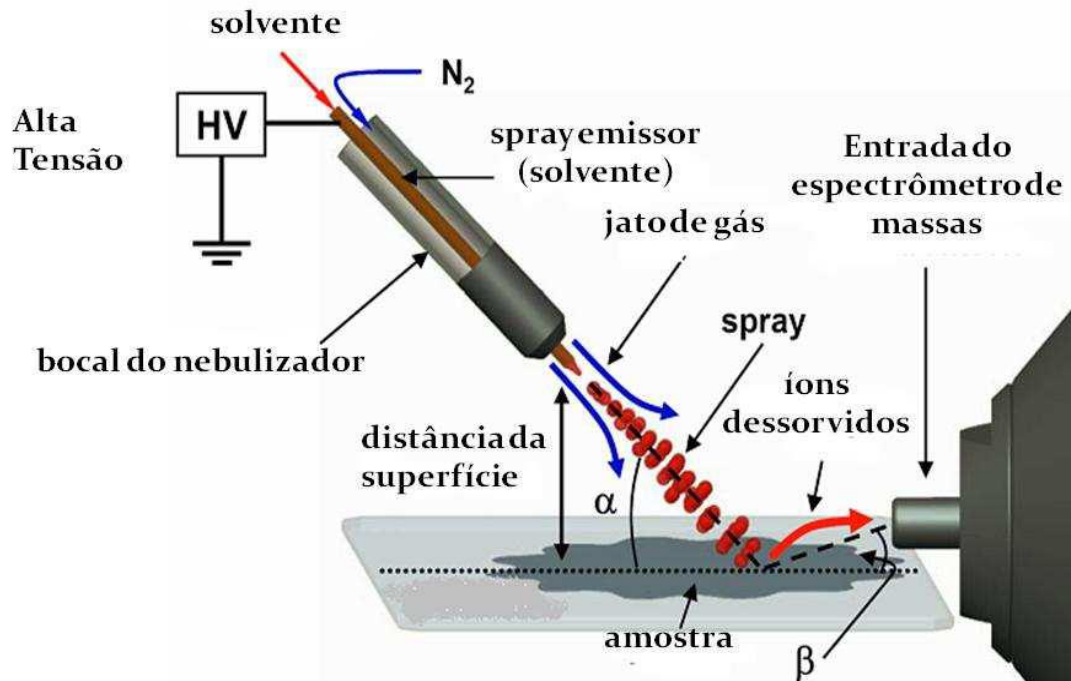


Figura 1. Diagrama esquemático da técnica DESI-MS (Lordeiro, 2011)

A performance desta técnica pode ser afetada por muitos parâmetros incluindo: os parâmetros de operação do DESI, como a pressão e o fluxo do gás nebulizador, o fluxo do solvente e a voltagem do eletrospray; parâmetros geométricos, como por exemplo as distâncias entre o nebulizador e a amostra, entre a amostra e a entrada do espectrômetro de massas e entre o nebulizador e a entrada do espectrômetro de massas, e os ângulos entre o nebulizador e a amostra e entre a amostra e a entrada do espectrômetro de massas; os parâmetros da solução, como por exemplo, a composição do solvente; e os parâmetros da superfície suporte, incluindo as propriedades químicas (por exemplo, teflon, papel, dentre outros), a temperatura e a voltagem aplicada na superfície (Chen et al., 2010).

O interesse pela técnica DESI é crescente e sua aplicação é voltada para diversas áreas, como: análise de proteínas (Takats et al., 2004; Yao, 2012; Dulay et al., 2015), análise de amostras biológicas, como por exemplo, tecido animal e humano (Dill et al., 2011 A; Gerbig et al., 2012; Laskin et al., 2012; Pirro et al., 2012; Vismeh et al., 2012; Lostun et al., 2015), análise de lipídeos (Suni et al., 2012), aplicações forense (Talaty et al., 2008; Morelato et al., 2012; Mirabelli et al., 2015), aplicações na área alimentícia (D'Aloise; Chen, 2012; Nielen et

al., 2011; Seró et al., 2015) e na área de saúde e farmacêutica (Nyadong et al., 2008; Campbell et al., 2011; Fabrizi et al., 2012; Thunig et al., 2012). No presente trabalho, o foco são as análises ambientais. Trabalhos têm mostrado que é possível a análise de tecidos de plantas via DESI-MS; por exemplo, em alguns trabalhos folhas são analisadas diretamente, sem qualquer pré-tratamento (Jackson et al., 2009; Kennedy; Wiseman, 2010; Li et al., 2011; Müller et al., 2011). Srimany e colaboradores (2011) e Talaty e colaboradores (2005), em trabalhos distintos, utilizaram a técnica DESI no estudo de alcalóides em plantas e concluíram que tais analitos podem ser identificados e confirmados por DESI-MS/MS sem qualquer pré-tratamento.

Apesar da vasta aplicação da técnica DESI, principalmente na análise de plantas, trabalhos que empregam essa técnica em estudos sobre a especiação de As em amostras vegetais ainda não foram descritos na literatura. No entanto, já foi demonstrado que esse tipo de matriz pode ser analisada, diretamente, por DESI-MS para detectar espécies de As, como ácido monometilarsônico, ácido dimetilarsínico, arsenobetaína, arsenocolina, roxarsone, nitarsona, ácido 4-hidroxifenilarsônio, arsenito e arsenato (Lin et al., 2010). No entanto, nesse trabalho, os autores doparam as plantas com diferentes espécies de As, as quais foram posteriormente analisadas, ou seja, as amostras de vegetais foram utilizadas somente como suporte para os sais de As.

2.7.2. Técnicas de imageamento por espectrometria de massas

Diferentes métodos da espectrometria de massas têm contribuído significativamente para a detecção, identificação e quantificação de importantes biomoléculas, biomarcadores e outros metabólitos (Hemalatha; Pradeep, 2013). Com a espectrometria de massas clássica é possível identificar vários compostos em uma amostra particular. Já com a espectrometria de massas por imagem, é possível determinar a distribuição de tais compostos sobre a superfície da amostra (Lebedev, 2015). Imagem molecular tem sido foco de grande interesse em espectrometria de massas, uma vez que esta técnica fornece uma enorme quantidade de informações químicas detalhadas.

Em décadas passadas, MS imaging foi dominada por duas técnicas de ionização, a espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) e dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI) (Lebedev, 2015). Além dessas, a técnica analítica de ablação a laser associada com um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-

MS) é uma técnica multielementar que tem sido utilizada para mapear a distribuição de elementos em amostras biológicas e ambientais (Nowinski, 2012). O advento de novas técnicas de ionização, somado à revolução da espectrometria de massas por imagem, forneceu meios para analisar amostras com pouco ou nenhum preparo. Esta expansão tem gerado expectativas sobre possíveis aplicações futuras, especialmente em medicina (Dill, 2011 B).

SIMS foi a primeira técnica de ionização aplicada à obtenção de imagem, seguida por MALDI, a qual é aplicável para biomoléculas maiores. Ambas as técnicas requerem que a amostra seja examinada sob vácuo, limitando manipulações e experimentos complementares, e são consideradas técnicas invasivas. Já a LA-ICP-MS é uma técnica de fácil manipulação e simples preparo de amostra, a qual tem sido utilizada para mapeamento de elementos em folhas (Kötschau et al., 2013; Silva; Arruda, 2013) . A técnica DESI *imaging* (DESI-MSI) foi introduzida em 2006 (Wiseman et al., 2006) e, quando comparada aos métodos que utilizam vácuo e matriz (MALDI e SIMS), DESI-MSI destaca-se pela simplicidade e pelo fato de sua fonte, relativamente de baixo custo, poder ser acoplada à maioria dos espectrômetros e massas; além disso, o pesquisador tem acesso à amostra durante todo o experimento. DESI-MSI tem a vantagem de requerer pouco ou nenhum preparo de amostras, nenhuma aplicação de matriz e possibilidade de analisar superfícies complexas (Li et al., 2013 A; Bjarnholt et al., 2014).

2.7.2.1. *Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging* – DESI-MSI

Os princípios da técnica DESI-MSI são os mesmos que aqueles de DESI-MS. Pela técnica DESI-MSI, moléculas são desorvidas de uma superfície e ionizadas utilizando um spray (de um solvente apropriado) de gotículas altamente carregadas (Lee et al., 2012). Nesse caso, o método envolve o registro de espectros de massas em pontos particulares da superfície da amostra, tendo como referência as coordenadas dos pontos. O conjunto de espectros de massas, após devido processamento, proporciona a verificação da distribuição (em duas dimensões) de vários compostos sobre a superfície da amostra estudada. O mapeamento da distribuição dos compostos é representado por cores de diferentes intensidades, as quais representam, ponto a ponto, a diferença de intensidade para um mesmo tipo de íon (Libedev, 2015).

DESI-MSI tem sido usado principalmente em análises de tecidos humanos (Lostun et al., 2015, Tata et al., 2015), alimentos (Garrett et al., 2016), e plantas (Li et al., 2013; Hemalatha e Praddep, 2013; Bjarnholt et al., 2014). É notável como poucos trabalhos envolvendo a aplicação de DESI-MSI em tecidos vegetais tem sido publicados em comparação com o vasto número de trabalhos com tecidos animais (Li et al., 2011). Um dos problemas com DESI-MSI em superfícies de plantas é a obtenção de um sinal estável o suficiente para gerar uma imagem (Thunig et al., 2011). O principal fator é a dificuldade de penetração do spray na camada cerosa das folhas, já que DESI apresenta melhores resultados em superfícies duras (Li et al., 2013 B). Uma alternativa está baseada na impressão da amostra sobre uma superfície porosa (PTFE, por exemplo) extraíndo assim os compostos da matriz e mantendo a integridade espacial da amostra (Thunig et al., 2011). Por exemplo, a intensidade do sinal melhorou após a transferência dos constituintes de folhas para uma superfície de PTFE (Müller et al., 2011). Uma metodologia similar tem sido aplicada em outros trabalhos, onde imagens indiretas de folhas de plantas tem sido obtidas pela distribuição espacial de fitoquímicos (Li et al., 2013 A; Li et al., 2013 B; Hemalatha e Pradeep, 2013; Müller et al., 2011; Thunig et al., 2011) e, mais recentemente, e pesticidas (Gerbig et al., 2015). É importante destacar que, até o momento, ainda não foram apresentados trabalhos sobre o estudo da especiação química em tecidos vegetais, principalmente sobre o estudo da distribuição e presença de arsênio e suas espécies nesse tipo de material.

2.7.3. Paper spray mass spectrometry – PS-MS

A espectrometria de massas com ionização ambiente tem sido alvo de interesse desde a introdução do DESI em 2004. Nos anos seguintes, uma série de novas técnicas de ionização que se inserem neste subgrupo da espectrometria de massas tem sido desenvolvidas (Klampf e Himmelsbach, 2015). Dentre essas novas técnicas de ionização ambiente, encontra-se o *paper spray mass spectrometry* (PS-MS), proposta por Wang e colaboradores, em 2010, como um método de análise rápido, qualitativo e quantitativo para análises em matrizes complexas. Pelo método é possível analisar desde moléculas orgânicas pequenas a grandes moléculas de biopolímeros.

O princípio do PS-MS se baseia na conexão de um papel triangular com um clipe de metal, posicionado em frente ao orifício de entrada do espectrômetro de massas, onde será

depositada a amostra. Por meio do clipe de metal é aplicada uma alta voltagem entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas e, assim, gotículas carregadas são emitidas da ponta do papel triangular para o espectrômetro de massas, levando à formação de íons similar ao processo ESI (Evard et al., 2015; Klampf e Himmelsbach, 2015). A Figura 2 ilustra uma representação esquemática da fonte PS. A estrutura dos poros e a propriedade hidrofílica do papel permitem o transporte do líquido sobre a superfície do papel. Quando uma alta voltagem é aplicada, gotas carregadas são geradas nas pontas do papel por causa do alto campo elétrico que é gerado em torno destes cantos. Com os ângulos das pontas do papel relativamente pequenos, um forte spray é formado em frente à entrada do espectrômetro de massas (Yang et al., 2012; Klampf e Himmelsbach, 2015).

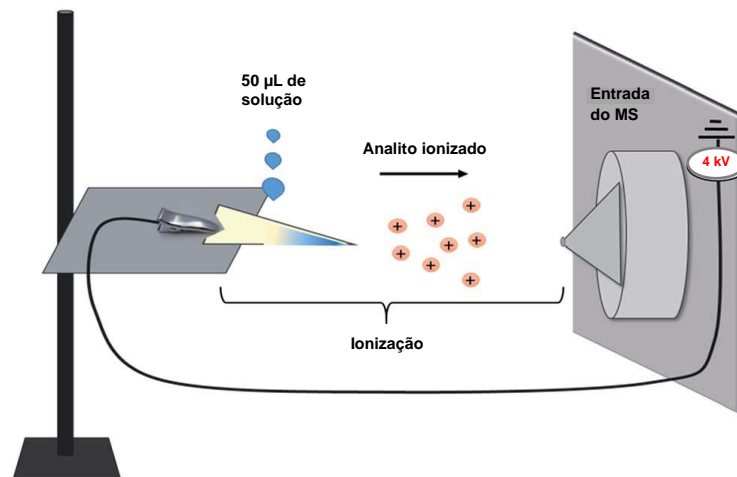


Figura 2. Representação esquemática da técnica PS-MS (Adaptado de Paula et al., 2015).

A eficiência da análise depende de muitos parâmetros. Para cada tamanho do papel triangular, há uma quantidade ótima da solução. As dimensões adequadas do papel são, aproximadamente, 5 mm de base e 10 mm de altura. Nesse caso, o volume ótimo da solução deve estar entre 10 a 50 μL . O ângulo da ponta do papel é de grande importância, já que quanto menor o ângulo maior a força do campo elétrico na ponta do *spray*. O maior fluxo do *spray* é atingido com o ângulo de ponta de 30° (Libedev, 2015). Além desses, a distância entre o papel triangular e a entrada do espectrômetro de massas também influencia na quantidade de íons que entram no equipamento. Uma vez que PS-MS não requer o uso de bomba, uma tarefa importante é a escolha correta do solvente para dissolver os compostos de interesse. Mais frequentemente, uma mistura metanol:água tem sido usada (Libedev, 2015). No entanto, outros solventes podem ser utilizados dependendo do analito estudado. Para a

determinação de pesticidas em frutas e vegetais, o solvente mais adequado é a acetonitrila (Evard et al., 2015). Liu e colaboradores (2011) realizaram um estudo sobre a avaliação do solvente mais adequado para a detecção de constituintes em plantas. Foi observado que, dentre os solventes estudados (metanol, diclorometano, hexano, acetonitrila, clorofórmio e acetona), o melhor solvente foi metanol para todos os tecidos vegetais testados.

A simplicidade dessa técnica fez com que surgisse uma variedade de aplicações, principalmente por causa da maior parte dos interferentes, comumente presentes em matrizes complexas, são retidos pelo papel com notável redução da supressão iônica. Além disso, é uma técnica de baixo custo e de fácil fabricação (Paula et al., 2015). O PS-MS tem inúmeras outras vantagens: é necessário somente um pequeno volume de amostra (em torno de 50 μ L), pouco ou nenhum preparo da amostra, é imune ao entupimento, eliminando a necessidade de filtragem da amostra contendo sólidos dispersos, dentre outras. Essa técnica serve como uma ferramenta complementar para métodos convencionais, como LC-MS, permitindo uma análise rápida, de baixo custo e com mínimo preparo da amostra (Reeber et al., 2015).

As principais aplicações do PS-MS encontram-se no campo de análises de tecidos biológicos (Wang et al., 2011), farmacêuticas, em especial análises de sangue (Shi et al., 2015; Espy et al., 2014; Wang et al., 2013), ambientais (Reeber et al., 2015; Evard et al., 2015) e forenses (Su et al., 2013; Li et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Paula et al., 2015). Assim como as demais técnicas de análise direta na espectrometria de massas, alguns trabalhos também envolvem a análise de constituintes de materiais vegetais. Nesses trabalhos, a folha fresca cortada em triângulo serve como suporte e amostra e, assim, um rápido *screening* pode ser realizado (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2012). No entanto, não há descrição do uso de PS-MS em estudos de especiação química em plantas.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade da espectrometria de massas com ionização ambiente como um método de *screening* eficiente na análise de especiação de arsênio em plantas terrestres.

3.1 Objetivos específicos

- Otimização dos parâmetros DESI-MS para análise de especiação de As;
- Identificação de arsenito [NaAsO_2 – As(III)], arsenato [KH_2AsO_4 – As(V)], ácido dimetilarsínico [$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$ – DMA] e ácido monometilarsônico [$\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 2\text{Na} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – MMA] em folhas de samambaias que foram expostas a soluções de tais compostos de As, empregando a técnica DESI-MS.
- Avaliação da distribuição espacial de íons dos compostos orgânicos e inorgânicos de As em folha de samambaia por DESI-MSI, empregando o método indireto,
- Análise direta de compostos orgânicos e inorgânicos de As em folhas de samambaia coletadas em locais contaminados por As, pela técnica PS-MS.
- Avaliação da performance analítica (figuras de mérito) pela técnica PS-MS.
- Determinação das espécies de As nas folhas de samambaia por LC-ICP-MS e ICP OES, para confirmação dos resultados obtidos por DESI-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais, Reagentes e Soluções

Todas as vidrarias e materiais usados foram descontaminados em banho contendo ácido nítrico 10 % v/v por pelo menos 24 horas. Posteriormente, as vidrarias e materiais foram lavados com água deionizada. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de alta pureza e água ultra pura produzida em sistema de purificação Milli-Q (resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore Direct-Q 3, Molsheim, França).

Os padrões das espécies de arsênio inorgânicas, arsenito de sódio (NaAsO_2) e dihidrogenoarsenato de potássio (KH_2AsO_4), foram provenientes da Sigma-Aldrich (Alemanha). Os padrões das espécies orgânicas de As, ácido dimetilarsínico [$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$] e dissódio metilarsenato hexahidratado ($\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 2\text{Na} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), foram da Chem Service (Estados Unidos). A partir destes reagentes foram preparadas soluções estoque individuais contendo 1000 mg L^{-1} de As. Essas soluções estoque foram usadas para o preparo das curvas de calibração e para as análises realizadas no DESI-MS, no DESI-MSI e no PS-MS. A solução de calibração do ICP-MS foi preparada pela diluição da solução estoque multielementar SCP33MS (SCP Science, Canadá) contendo 10 mg L^{-1} de As.

Fosfato de amônio (Merck, Alemanha), usado como fase móvel nas análises por LC-ICP-MS, foi preparado em água e então filtrado em filtro de membrana $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, França) antes do uso. O pH da fase móvel foi ajustado com hidróxido de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou de ácido nítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, preparados a partir de reagentes PA da Merck (Alemanha).

Os demais reagentes utilizados foram: metanol (grau HPLC, Merck, Alemanha), acetonitrila (Merck, Alemanha), ácido fórmico (P.A. 85%, Synth, Brasil), clorofórmio (Merck, Alemanha), formaldeído (P. A. Synth, Brasil), ácido clorídrico (Merck, Alemanha) e hexano (Merck, Alemanha).

4.2. Instrumentação

4.2.1. DESI-MS

Para as análises de especiação por DESI-MS, utilizou-se um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet (ThermoElectron, San Jose, CA), de baixa resolução, equipado com um software de controle e tratamento dos dados (Xcalibur), e uma fonte DESI de fabricação caseira (Figura 3). Os parâmetros físicos da fonte DESI, que serão descritos posteriormente, foram cuidadosamente otimizados para aumentar a intensidade do sinal dos analitos. O ângulo entre o capilar da fonte DESI com a superfície da amostra esteve em torno de 30°. A ponta do nebulizador foi colocada a aproximadamente 5 mm da superfície da amostra; a extremidade do capilar do espectrômetro de massas, aquecido, ficou a 3 mm da amostra. O spray gerado foi submetido a um jato de nitrogênio a uma pressão de 100 psi (6,80 atm). Os demais parâmetros, tais como, solvente, temperatura do capilar, voltagem do capilar e fluxo do solvente foram otimizados a fim de se obter a melhor intensidade dos íons das espécies de As. Uma placa de vidro foi utilizada como suporte para a amostra. Essa foi colocada em um suporte 3D, onde era possível a movimentação no plano x, y e z, o qual foi operado manualmente. Para o experimento MS/MS, selecionou-se a razão m/z de um dado íon precursor e procedeu-se a colisão com hélio dentro do *trap*. A energia de colisão foi ajustada para produzir íons filho com intensidades mensuráveis.



Figura 3. Vista frontal e lateral da fonte DESI acoplada ao espectrômetro de massas utilizados neste trabalho.

4.2.2. PS-MS

Para as análises de especiação por PS-MS, utilizou-se o mesmo espectrômetro de massas das análises por DESI-MS e uma fonte paper spray de fabricação caseira (Figura 4). Os parâmetros da fonte *paper spray* foram cuidadosamente otimizados para aumentar a intensidade do sinal dos analitos. Os principais parâmetros operacionais foram:

voltagem do *paper spray*, 4kV; temperatura do capilar, 250°C; voltagem do capilar, 55V; voltagem do *tube lens*, 25 V. A distância entre a ponta do papel e a entrada do espectrômetro de massas foi de aproximadamente 5mm. Os espectros de massas, no modo de varredura completa (*full scan*), foram recuperados medindo-se íons de m/z de 100 a 250. Da mesma forma que para o DESI-MS, para o experimento MS/MS, selecionou-se a razão m/z de um dado íon pai e colidiu-o com hélio dentro do *trap*. A energia de colisão foi ajustada para produzir íons filho com intensidades mensuráveis.



Figura 4. Vista frontal da fonte *paper spray* utilizada neste trabalho

4.2.3. DESI-MSI

Para a geração das imagens por DESI-MSI, utilizou-se um espectrômetro de massas modelo Q Exactive (ThermoElectron, San Jose, CA), de alta resolução, equipado com uma fonte DESI automática 2D da empresa Prosolia Inc. (Indianapolis, IN, EUA) (Figura 5). Os principais parâmetros operacionais foram: voltagem do spray, 5 kV; pressão do gás de nebulização (N_2), 120 psi; temperatura do capilar, 320°C; tempo de injeção, 50 ms; acúmulo de 1 microscan; e vazão do spray (metanol), $10 \mu L \cdot \text{min}^{-1}$. As imagens foram registradas usando uma placa automatizada, movida no plano x,y em relação ao capilar de ionização. As linhas foram escaneadas a uma velocidade de $740 \mu m \cdot s^{-1}$ e os espectros de massas foram recuperados no modo de varredura completa medindo-se íons de m/z de 50 a 250. O tempo gasto para a aquisição de uma imagem foi em torno de 3 horas. Os espectros de massas coletados foram processados com o software de conversão de dados FireFly (<http://www.prosolia.com/firefly.php>) e as imagens foram geradas usando o software Biomap

(<http://www.maldimsi.org>). As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas.

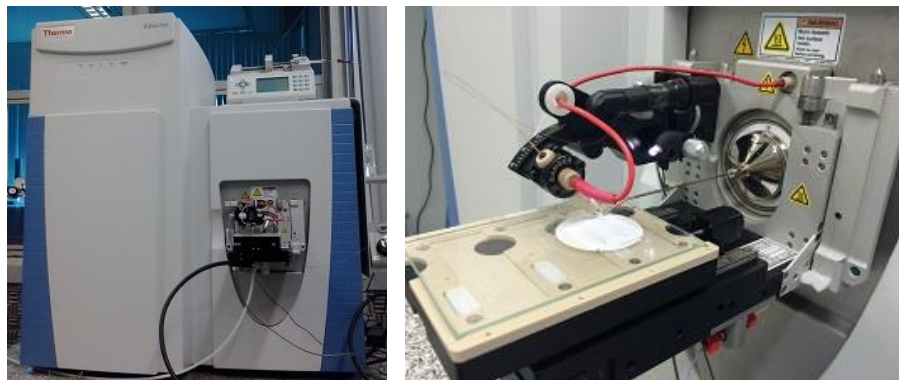


Figura 5. Vista frontal e lateral da fonte DESI *imaging* acoplada ao espectrômetro de massas utilizados neste trabalho.

4.2.4. LC-ICP-MS

Para a quantificação das espécies de As, foi utilizado um ICP-MS (PerkinElmer Sciex, Modelo Elan DRC II, Canadá), equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA), uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália) e uma tocha de quartzo com um tubo injetor de quartzo (2 mm d. i.). O fluxo do gás nebulizador, a voltagem da lente de íons e o alinhamento da tocha foram ajustados conforme as instruções do fabricante, usando nebulização convencional. O monitoramento único do íon de m/z 75 foi usado para adquirir o sinal de As. O sistema LC consistiu de uma bomba quaternária (Modelo Series 200, PerkinElmer) equipado com uma válvula injetora de seis portas Rheodyne (200 μ L de amostra) e uma coluna de troca aniônica (Hamilton, PRP-X100, 250 mm de comprimento e 4.1 mm d. i.). A saída da coluna foi conectada ao nebulizador pneumático do ICP-MS por meio de um tubo em PEEK. Todas as separações foram conduzidas à temperatura ambiente. As condições de operação do sistema LC-ICP-MS estão resumidas na Tabela 2.

4.2.5. ICP OES

A concentração total de As nas amostras de samambaia foi determinada usando um ICP OES Optima 4300 DV (Perkin Elmer, Shelton, EUA). Argônio de 99,996% de pureza (White Martins - Praxair, São Paulo, Brasil) foi usado para o plasma, gás auxiliar e gás de nebulização. O comprimento de onda selecionado para a determinação de As e parâmetros operacionais estão listados na Tabela 2. Condições instrumentais foram ajustadas como recomendado pela fabricante.

Tabela 2. Condições instrumentais para a determinação do teor total de As por ICP OES e determinação das espécies de As por LC-ICP-MS

Determinação total de As por ICP OES	
Potência RF, W	1500
Fluxo do gás do plasma, L.min ⁻¹	14
Fluxo do gás auxiliar, L.min ⁻¹	1,0
Fluxo do gás de nebulização, L.min ⁻¹	0,70
Spray da câmara	Duplo passo, tipo Scott
Nebulizador	Cross flow
Vista de observação do plasma	Axial
Comprimento de onda, nm	189,042
ICP-MS	
Potência RF, W	1400
Fluxo do gás do plasma, L.min ⁻¹	15
Fluxo do gás auxiliar, L.min ⁻¹	1,2
Fluxo do gás de nebulização, L.min ⁻¹	1,10
Amostrador e cone skimmer	Pt
<i>m/z</i> monitorada	75
Tempo de espera, ms	500
Especiação de As por LC-ICP-MS	
pH da fase móvel	6,0
Concentração da fase móvel, mmol.L ⁻¹	20
Volume de amostra, µL	200
Fluxo da fase móvel, mL.min ⁻¹	1,15
Fase móvel	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Programa do LC	0-5 min: 30%
	5-7 min: 70%
	7-11 min: 70%
	11-12 min: 80%
	12-15 min: 80%

*Análises realizadas na Universidade Federal de Santa Maria

4.2.6. Demais equipamentos

Foram utilizados também: um forno de micro-ondas Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Austria), usado para a digestão das amostras de samambaia e extração das espécies de As; uma centrífuga modelo 3k30 (Sigma, Osterode am Harz, Alemanha), usada para a centrifugação dos extratos; e uma balança analítica Shimadzu, modelo AX 200 (São Paulo, Brasil).

4.3. Amostras - Samambaias

Para a primeira parte do trabalho, samambaias da espécie *Pteris vittata* foram coletadas em áreas supostamente não contaminadas com arsênio, em Belo Horizonte. Essas foram lavadas com água corrente e posteriormente com água Milli-Q, para remoção de poeira. Para a contaminação das samambaias, essas foram colocadas em cerca de 100 mL de solução contendo aproximadamente 200 mg L⁻¹ de cada uma das seguintes espécies de As: As (III), As (V), DMA (V) e MMA (V). Foi realizada também a contaminação da samambaia com as quatro espécies simultaneamente, sendo a concentração de cada espécie de 50 mg L⁻¹. Uma amostra controle, obtida após contato das samambaias somente com água deionizada também foi realizada. As plantas ficaram em contato com as soluções de As por cerca de 24 horas.

Num segundo momento, samambaias das espécies *Pteris vittata* e *Pityrogramma calomelanos* foram coletas em Honório Bicalho e Mariana, Minas Gerais, regiões conhecidas por seus elevados teores de As em solos e plantas, para que os experimentos fossem realizados com plantas contaminadas naturalmente com As e assim verificar a aplicabilidade da técnica.

4.4. Análise de especiação de As por ESI-MS/MS

Para verificar o perfil de fragmentação de cada espécie de As, soluções padrão de tais espécies foram analisadas no espectrômetro de massas com fonte ESI-MS. Para isso, utilizou-se um espectrômetro de massas modelo LCQFleet (ThermoElectron, San Jose, CA), equipado com um software de controle e tratamento dos dados (Xcalibur). Os padrões das quatro diferentes espécies de As foram testados em dois diferentes meios, água e metanol:água (1:1),

na concentração de 1 mg L^{-1} . Para essas análises foram feitas infusões diretas dos compostos de As, na fonte de ionização, por meio de uma microseringa (Hamilton, $500 \mu\text{L}$), num fluxo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura do capilar foi de 275°C e o fluxo do gás secante (nitrogênio) foi de 10 L min^{-1} . Fez-se inicialmente uma varredura total de íons (*full scan*) medindo-se íons de m/z de 50 a 300, sendo avaliados os modos de ionização, positivo e negativo. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras (*scans*). Durante a análise foram selecionados os íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ ou $[\text{M}-\text{H}]^-$ de interesse e, em seguida, estes foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) e os íons resultantes (íons filho) analisados com o objetivo de se confirmar a identidade dos analitos. A voltagem da colisão variou de 13 a 18 (unidade do fabricante), dependendo do íon precursor analisado.

4.5. Análise de especiação de As por DESI-MS

Para verificar a possibilidade da análise de especiação de As utilizando a fonte DESI, foram analisados quatro padrões de diferentes espécies de As com concentração de 5 mg L^{-1} . Para tal, fixou-se um papel de filtro (aproximadamente 1 cm^2), por meio de fita dupla face em lâminas de vidro, e depositou-se de 10 a $50 \mu\text{L}$ de solução de As. Posteriormente, realizou-se a análise, obtendo-se como resultado 30 varreduras (*scans*). Foi feito também a análise do papel filtro sem a presença de compostos de As. Durante a análise, fez-se uma varredura total de íons (*full scan*), medindo íons de m/z de 50 a 300, sendo avaliados ambos os modos, positivo e negativo. Os íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ ou $[\text{M}-\text{H}]^-$ foram selecionados, de acordo com os resultados obtidos na análise ESI-MS, os quais foram fragmentados, na mesma condição avaliada anteriormente por ESI-MS.

Para a otimização dos parâmetros da técnica DESI-MS utilizou-se solução padrão de DMA na concentração de 5 mg L^{-1} depositada em papel filtro afixado em uma placa de vidro por meio de uma fita dupla-face. A placa de vidro foi colocada na posição de análise, ou seja, próximo à entrada do espectrômetro de massas e em frente à ponta do nebulizador. A seguir, foi observada a intensidade do sinal dos íons de interesse no espectrômetro de massas, medida pela grandeza NL, em função da variação dos parâmetros individuais. A escolha da condição analítica foi feita em função do maior valor de NL obtido.

Os parâmetros e condições avaliados foram:

- Voltagem do capilar (kV): 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5
- Temperatura do capilar ($^\circ\text{C}$): 100, 150, 200, 250, 275

- Fluxo do solvente – metanol:água ($\mu\text{L min}^{-1}$): 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17

Outros parâmetros tais como ângulo do nebulizador com a amostra, distância entre o nebulizador e a amostra e a distância entre a amostra e a entrada do espectrômetro de massas foram otimizados a cada análise até que se obtivesse o sinal do analito de interesse com uma intensidade significativa. Mas, de maneira geral, o ângulo do nebulizador com a amostra ficou em torno de 30° , a distância entre a amostra e o nebulizador em torno de 5 mm e a placa de vidro a 3 mm da entrada do espectrômetro de massas.

Da mesma forma que para otimização dos parâmetros voltagem, temperatura e fluxo, foi também avaliado qual seria o melhor solvente utilizado na ionização. Os solventes testados foram: acetonitrila:água (1:1), ácido fórmico (1%, v/v), hidróxido de amônio (1 mol L^{-1}), metanol: água (1:1), acetonitrila:ácido fórmico (1:1) e formiato de amônio (10 mmol L^{-1}). O experimento foi conduzido pela obtenção do espectro de massas nos modos íon positivo e/ou íon negativo da solução padrão de cada espécie de As (5 mg L^{-1}) depositada diretamente e separadamente em um papel filtro, enquanto media-se a intensidade absoluta dos íons das quatro espécies de As.

4.6. Análise de especiação de As por DESI-MS em samambaias contaminadas artificialmente com As

Para avaliar o desempenho do método, folhas de samambaias contaminadas com As (conforme descrito no item 4.3) foram analisadas. Para isso, após contato com a solução contendo as espécies de As por 24 horas, as partes das plantas que não ficaram em contato direto com a solução de As, foram lavadas em água corrente e posteriormente com água Milli-Q e algumas folhas, tomadas aleatoriamente, foram maceradas, *in natura*, em gral e pistilo.

A “pasta” obtida de cada samambaia (contaminada com cada espécie de As separadamente e o branco da planta) foi diretamente fixada, por meio de uma fita dupla face (área aproximadamente de 1 cm^2), em lâminas de vidro. Posteriormente, as espécies de As foram determinadas por DESI-MS/MS utilizando-se os parâmetros otimizados no item acima e obtendo-se 30 *scans*. Para confirmar a detecção de cada íon das diferentes espécies de As na amostra de samambaia, o espectro de fragmentação foi comparado com o espectro de fragmentação da solução padrão.

4.7. Análise de especiação de As por LC-ICP-MS em samambaias contaminadas artificialmente

Para confirmação dos resultados obtidos por DESI-MS, as mesmas amostras contaminadas artificialmente foram analisadas por método já estabelecido para a especiação de As em plantas, empregando a técnica LC-ICP-MS.

4.7.1. Procedimento de extração

Para proceder com a extração das espécies de As das plantas contaminadas artificialmente com este elemento, secou-se as amostras a 40°C por 3 dias, até peso constante, sendo as mesmas, posteriormente, maceradas em gral e pistilo e peneiradas em malha de 590 μm .

Para extrair as espécies de As, aproximadamente 200 mg das amostras foram pesadas e transferidas para os frascos do forno de micro-ondas, onde adicionou-se 6,0 mL de HNO_3 0,042 mol L^{-1} . O programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para a extração consistiu das seguintes etapas: *i*) 1000 W por 5 minutos (rampa de 20 minutos) e *ii*) 0 W por 20 minutos (resfriamento). A temperatura máxima foi fixada em 210° C. Depois do resfriamento, os extratos foram diluídos com água para 30,0 mL em um tubo de polipropileno e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana de seringa de 0,45 μm (Chromafil PTFE, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e, depois de apropriada diluição, injetado no sistema LC-ICP-MS (Moreira et al., 2011).

4.7.2. Quantificação das espécies de As

Foi usado um LC-ICP-MS para a análise de especiação de As nos extratos das amostras de samambaias contaminadas com esse elemento. A quantificação da concentração dos compostos de As nas amostras foi baseada na curva de calibração construída com solução padrão das multi-espécies feita depois de apropriada diluição das soluções estoques das espécies individuais. A concentração da curva de calibração variou de 0,25 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As. As condições instrumentais adotadas para a determinação de As estão listadas na Tabela 2. Os picos cromatográficos de As foram processados usando a área integrada.

4.8. Determinação do teor total de As em samambaias contaminadas artificialmente

Para a determinação do teor total de As, aproximadamente 0,08 g das amostras foram pesadas e transferidas para os frascos de forno de micro-ondas, onde adicionou-se 6,0 mL de HNO₃ concentrado. A digestão das amostras foi realizada em forno de micro-ondas empregando o seguinte programa de aquecimento: *i*) 1000 W por 5 minutos (rampa de 20 minutos) e *ii*) 0 W por 20 minutos (resfriamento). A temperatura máxima foi fixada em 210° C. Depois do resfriamento, os extratos foram diluídos com água para 30,0 mL em um tubo de polipropileno.

Para a determinação de As nas amostras digeridas, foi utilizado um ICP OES. A curva de calibração variando de 10 a 300 µg L⁻¹ de As em HNO₃ 5% (v/v) foi obtida por diluições da solução estoque (10 mg L⁻¹ of As) preparada a partir da solução de SCP33MS (SCP Science, Canadá). As condições instrumentais usadas para a determinação de As são mostradas na Tabela 4.

4.9. Análise de especiação de As por DESI-MSI

Para verificar o espectro de massas típico de cada espécie de As, inicialmente foram analisadas soluções padrão das quatro espécies desse elemento com concentração de 10 mg L⁻¹ e preparadas em metanol. Para tal, fixou-se um papel filtro de PTFE na lâmina de vidro utilizada na plataforma DESI e depositou-se uma pequena quantidade de solução de As. Esperou-se a gota secar e realizou-se a análise somente por DESI-MS. Durante a análise fez-se, inicialmente, uma varredura total de íons, medindo-se íons de *m/z* de 50 a 250, sendo utilizados os modos positivo e negativo.

Após esses testes preliminares, foi feita a impressão da folha de samambaia contaminada artificialmente e naturalmente com As. Para isso, tomou-se, aleatoriamente, uma folha da samambaia, cortou-a ao meio para que ela coubesse no papel filtro de PTFE (Allcrom, 0,45 µm de espessura e 47 mm de diâmetro). Com o auxílio de uma prensa de fabricação caseira, o conjunto folha mais papel de filtro foi pressionado por cerca de 15 minutos (Figura 6). Posteriormente, a amostra foi analisada por DESI-MSI utilizando os parâmetros mencionados no item acima e os espectros de massas foram obtidos no modo de

varredura completa, medindo-se íons de m/z de 50 a 250, tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Para confirmar a detecção de cada espécie de As na amostra de samambaia, foi calculado o erro estimado da massa para cada íon analisado.



Figura 6. A) Imagem óptica da folha de samambaia preparada para a impressão no papel de filtro; B) Prensa utilizada no procedimento de impressão.

4.10. Análise de especificação de As por PS-MS em samambaia contaminada naturalmente

As amostras de samambaia contaminadas naturalmente com As foram preparadas tomando-se aleatoriamente algumas folhas frescas da planta, as quais foram maceradas, em gral e pistilo, com uma pequena quantidade de metanol (relação de $0,12 \text{ g mL}^{-1}$). Separou-se o extrato obtido do resíduo da planta e logo em seguida realizou-se a análise de especificação no PS-MS.

Para a análise no PS-MS, adicionou-se cerca de $40 \mu\text{L}$ do extrato da samambaia no papel filtro cromatográfico (grau I, Whatman Internacional Ltd, Maidstone, England) cortado em triângulo (10 mm de altura e 5 mm de largura da base) e posicionado a 5 mm da entrada do espectrômetro de massas. Para isso, utilizou-se um clipe de cobre fixado a uma plataforma com movimento no plano x, y e z. Em seguida aplicou-se um potencial de 4,0 kV na base do papel por meio de um conector (tipo jacaré) de metal. Para evitar efeitos de memória, um novo triângulo de papel foi usado para cada análise no PS-MS. Em seguida, foi feita a análise no modo de varredura completa medindo-se íons de m/z de 100 a 250. Para o experimento MS/MS, selecionou-se a razão m/z de um dado íon pai e colidiu-o com hélio dentro do *trap*. A energia de colisão foi ajustada para produzir íons filho com intensidades mensuráveis. Para

confirmar a detecção de cada íon das diferentes espécies de As na amostra de samambaia, o espectro de fragmentação foi comparado com o espectro de fragmentação da solução padrão (10 mg L⁻¹ de cada espécie de As preparadas em metanol). Foi feita a análise do branco do papel filtro e o branco do papel filtro com metanol.

4.11. Figuras de mérito

As figuras de mérito para a técnica de PS-MS foram avaliadas de acordo com a precisão, limite de detecção e curva de calibração.

4.11.1. Precisão

Para a análise no PS-MS, adicionou-se 50 µL de solução padrão de cada espécie de As, separadamente, na concentração de 10 mg L⁻¹. Para cada espécie de As foram feitas 7 repetições e avaliou-se dois íons de cada, [M+H]⁺ e [M+H₃O]⁺. Foi utilizado o modo positivo do espectrômetro de massas, fazendo varredura total de íons e medindo-se íons de *m/z* de 100 a 200. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras (*scans*) e utilizando como resultado a intensidade média. Para evitar efeito de memória, o papel triangular foi trocado em cada repetição e, entre uma replicata e outra, foi feita a análise de um branco.

4.11.2. Limite de detecção do método

Para a análise no PS-MS, adicionou-se 50 µL de solução padrão de cada espécie de As, separadamente. As concentrações foram variáveis e decrescentes até que não se conseguisse mais diferenciar os espectros obtidos para o branco dos espectros obtidos para a solução padrão. Foi utilizado o modo positivo do espectrômetro de massas, fazendo varredura total de íons e medindo-se íons de *m/z* de 100 a 200. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras (*scans*) e utilizando como resultado a intensidade média.

4.11.3. Curva de calibração

Um experimento semi-quantitativo foi conduzido para as análises no PS-MS para as espécies inorgânicas de As, As (III) e As (V), utilizando-se o método de padrão interno. A concentração da curva de calibração variou de 5 a 40 mg L⁻¹ de As (III) e As (V) e utilizou-se como padrão interno a espécie orgânica de As, DMA, na concentração de 10 mg L⁻¹. Esse composto foi escolhido, uma vez que sua presença não foi detectada nas amostras de samambaia naturalmente contaminadas. Para isso, adicionou-se 50 µL de cada concentração da solução das espécies de As, separadamente, com o padrão interno no papel triangular. Foi utilizado o modo positivo do espectrômetro de massas, fazendo varredura total de íons e medindo-se íons de m/z de 100 a 200. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras (*scans*) e utilizando como resultado a intensidade média. Os pontos da curva de calibração foram obtidos usando a relação entre a intensidade média do sinal do analito (As (V) – íon de m/z 161 e As (III) – íon de m/z 127) pela intensidade média do sinal do padrão interno (DMA – íon de m/z 139). Cada ponto da curva de calibração corresponde à média de três replicatas. Para evitar efeito de memória, o papel triangular foi trocado em cada repetição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Especificação de arsênio por ESI-MS/MS

Para verificar o perfil de fragmentação de cada íon das diferentes espécies de As, soluções padrão de tais espécies foram analisadas no ESI-MS/MS. Para isso, foram feitas introduções diretas, das soluções dos compostos de As (1 mg L^{-1}), no espectrômetro de massas. Foram avaliados ambos os modos de ionização, íon positivo e íon negativo. Os padrões de As foram testados em dois diferentes meios, água e metanol:água (1:1), a fim de verificar se o meio influenciaria na ionização dos compostos. Não foi observada grande diferença na ionização dos compostos de As, quando se utilizou a mistura metanol:água ao invés da água, visto que a abundância de íons não apresentou diferenças significativas de um para outro (os espectros são apresentados nos ANEXOS A e B).

Todos os íons analisados por ESI-MS, à exceção do As (III) de m/z 107, apresentaram perfil característico de fragmentação, com a perda de uma molécula de H_2O , conforme esperado para cada molécula de As, mostrando que essa técnica se aplica bem para análise de especificação de As. A falta de fragmento para o íon de m/z 107, talvez se explique pelo fato da molécula estar na forma mais reduzida, sendo difícil a perda de um oxigênio para que haja fragmento. Dessa forma, para o estudo da especificação utilizando DESI-MS, os espectros foram baseados nos resultados de ESI-MS/MS. A Tabela 3 resume os principais íons e seus respectivos fragmentos analisados.

5.2. Otimização dos parâmetros DESI-MS

5.2.1. Fluxo do solvente, temperatura do capilar e voltagem do capilar

Para melhorar a eficiência de ionização dos compostos de As, foi necessário a otimização de alguns parâmetros do DESI-MS, tais como fluxo do solvente, temperatura do capilar e voltagem do capilar. Os experimentos foram realizados alterando univariadamente cada parâmetro e obtendo-se o espectro de massas no modo positivo da solução padrão de DMA (5 mg L^{-1}) depositada diretamente em um papel de filtro, o qual foi fixado em uma superfície de vidro por meio de uma fita dupla face (cerca de 1 cm^2 de área), enquanto media-

se a intensidade absoluta do íon de m/z 139, $[M+H]^+$ (resposta). A escolha do DMA como composto modelo para etapa de otimização foi baseada no trabalho de Lin et al. (2010). Foram feitas 30 varreduras (*scans*) para cada análise. Deve-se destacar que, pelo fato de ser uma fonte de fabricação caseira, os parâmetros ângulo do nebulizador com a amostra e distâncias entre o nebulizador e a amostra e entre a amostra e a entrada do espectrômetro de massas, não foram facilmente controlados.

Tabela 3. Espécies de As analisadas por ESI-MS/MS e seus respectivos íons - m/z

Espécie de As	Fórmula molecular	Massa exata do íon (Da)	Massa observada - m/z (modo)	Íon filho - m/z	Atribuição
As (V)	H_3AsO_4	140,91635	141 (-)	123	$[M-H]^-$
		142,93201	143 (+)	125	$[M+H]^+$
		160,94257	161 (+)	143	$[M+H_3O]^+$
As (III)	H_3AsO_3	106,91197	107 (-)	-	$[M-H_3O]^-$
		124,92254	125 (-)	107	$[M-H]^-$
		126,93709	127 (+)	109	$[M+H]^+$
		144,94766	145 (+)	127	$[M+H_3O]^+$
DMA	$(CH_3)_2AsO(OH)$	138,97348	139 (+)	121	$[M+H]^+$
		156,98404	157 (+)	139	$[M+H_3O]^+$
MMA	$CH_3AsO(OH)_2$	138,93819	139 (-)	121	$[M-H]^-$
		140,95274	141 (+)	123	$[M+H]^+$
		158,96331	159 (+)	141	$[M+H_3O]^+$

Os resultados obtidos na otimização são apresentados na Figura 7. A Figura 7A apresenta o comportamento do sinal do DMA (intensidade relativa) em função da voltagem. Em baixas voltagens, o grau de protonação do DMA é mínimo e uma alta proporção de DMA permanece neutro. Quando a voltagem é aumentada, o DMA começa a se ionizar e o íon característico é formado (Francesconi, 2002). Com isso, a voltagem que gerou maior abundância de íons foi de 3,0 kV (Figura 7A). Contudo, durante a manipulação da amostra na análise, observou-se que essa não seria a melhor voltagem visto que ao utilizá-la, essa provocava uma espécie de “descarga elétrica” na amostra, aumentando muito o valor da

corrente elétrica do equipamento, não sendo uma condição ideal para análise. Dessa forma, optou-se por utilizar a voltagem de 2,5 kV.

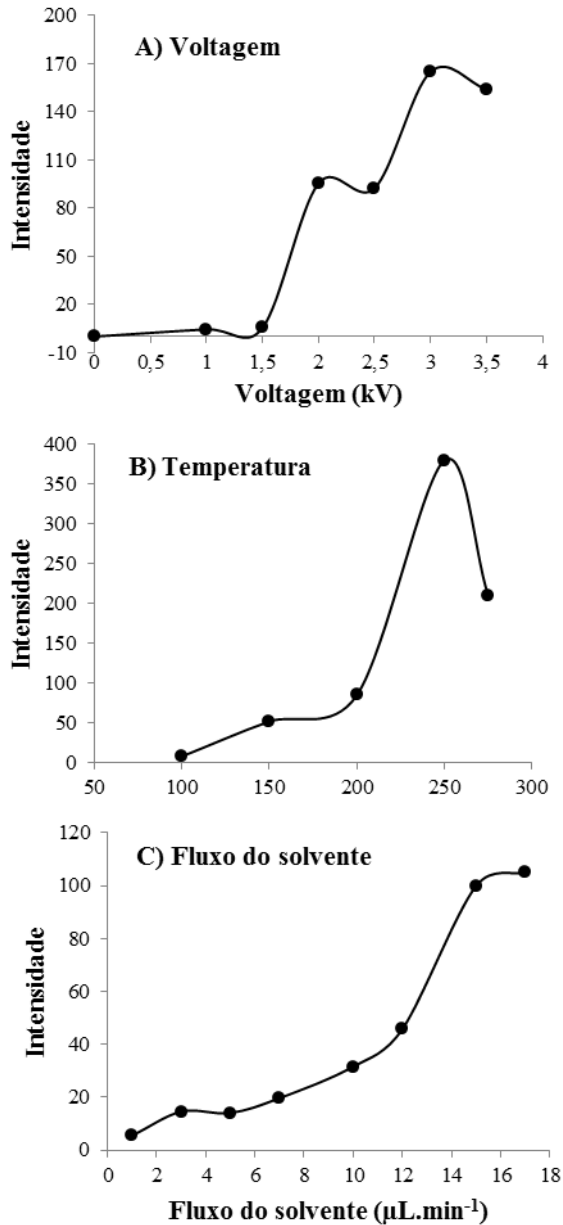


Figura 7. Resultados da otimização dos parâmetros A) voltagem do capilar; B) temperatura do capilar e C) fluxo do solvente

Alguns trabalhos da literatura, que têm feito a otimização dos parâmetros de DESI-MS, têm encontrado 4 kV como a voltagem ideal do capilar (Takáts et al., 2005; Talaty et al., 2005; Lin et al., 2010). Quando não se aplica voltagem, a corrente de íons é

consideravelmente menor e, assim, não é adequado para a ionização do DMA. Esse modo de operação – sem aplicação de voltagem – pode encontrar aplicações em áreas onde o uso de alta voltagem é inapropriado, por exemplo, em aplicações *in vivo* (Takáts et al., 2005).

A temperatura do capilar possui uma função importante no processo de ionização, auxiliando na dessolvatação. Esse parâmetro mostrou efeito bastante pronunciado na intensidade do sinal do DMA. A intensidade máxima foi observada para a temperatura do capilar a 250°C, já que antes há um aumento progressivo no número total de íons com o aumento da temperatura e, após o sinal começa a diminuir (Figura 7B). Esse resultado é consistente com dados reportados anteriormente (Takáts et al., 2005). Em trabalho com especiação de As, Lin e colaboradores (2010) obtiveram maior intensidade do sinal em 200°C; contudo, a temperatura do capilar de 225°C também resultou em boa intensidade. No trabalho de Talaty et al. (2005), foi observado a temperatura ideal de 275°C.

O fluxo do solvente possui efeito significativo sobre a distribuição do tamanho e sobre a carga transportada pelas gotículas. Em baixos fluxos do solvente, o tamanho da gotícula pode ser demasiadamente pequeno, o que impede uma ionização/ desorção eficiente dos analitos depositados na superfície. Elevados fluxos de solvente resultam na formação de gotículas maiores, o que pode causar dessolvatação ineficiente e, em alguns casos, a acumulação de líquido sobre a superfície (Takáts et al., 2005). Foi observado que o aumento do fluxo leva a um aumento da abundância de íons. Embora o fluxo de 17 $\mu\text{L min}^{-1}$ tenha resultado em um maior sinal analítico, essa condição não foi ideal devido à grande quantidade de líquido lançado sobre o papel de filtro, o qual ficou muito molhado após a análise. Desse modo, optou-se por utilizar o fluxo de 12 $\mu\text{L min}^{-1}$, onde obteve-se uma diferença significativa na intensidade do sinal, se comparado aos fluxos inferiores (Figura 7C), sem o problema de molhar muito o papel. Outros trabalhos têm sugerido fluxo do solvente inferiores ao observado neste trabalho, em torno de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Takáts, 2005; Talaty et al., 2005; Lin et al., 2010), demonstrando que esse fator deve ser avaliado em cada situação.

5.2.2. Solvente de ionização

Para obter espectros de massas de alta qualidade, deve-se levar em consideração a natureza do solvente, já que a intensidade do sinal depende fortemente da solubilidade do analito no *spray* do solvente (Lebedev, 2015). Desse modo, para verificar se o solvente utilizado como *spray* na ionização influenciaria na formação dos íons de As, foi feito um

estudo para a avaliação de diferentes solventes sobre cada íon de As. O experimento foi conduzido pela obtenção do espectro de massas nos modos íon positivo e/ou íon negativo da solução padrão de cada composto de As (5 mg L^{-1}) depositada diretamente e separadamente em um papel filtro, o qual foi fixado, como descrito anteriormente, enquanto media-se a intensidade absoluta dos íons: As (III), m/z 107 e 125, As (V), m/z 141, DMA, m/z 139 e 157, MMA, m/z 139, 141, 159. Os solventes avaliados foram: acetonitrila:água (1:1), ácido fórmico (1% v/v), hidróxido de amônio (1 mol L^{-1}), metanol: água (1:1), acetonitrila:ácido fórmico (1:1) e formiato de amônio (10 mmol L^{-1}) (Figura 8).

A utilização da acetonitrila:água como solvente de ionização apresentou espectros com intensidades muito baixas para todas as espécies de As (abaixo de 50). Portanto, esse solvente não se mostrou adequado para o uso em análises de especiação de As utilizando DESI-MS. Quando foi acrescentado ácido fórmico junto com acetonitrila, houve uma melhora nas intensidades dos íons, as quais, no entanto, continuaram baixas ($NL < 10^2$). O uso do ácido fórmico como solvente de ionização, também não proporcionou intensidades elevadas para as espécies de As. Contudo, pode-se observar que seu uso fez com que espécies carregadas positivamente (DMA: m/z 139, DMA: m/z 157, MMA: m/z 141 e MMA: m/z 159) apresentassem intensidades mais elevadas do que as espécies carregadas negativamente. Isso porque, na presença de um solvente prótico, em pH baixo, ocorre um aumento na intensidade do sinal das espécies de As protonadas em ESI positivo (Lopes et al., 2001). Analisando-se esses três solventes, observa-se que nenhum deles é adequado para o uso em análise de especiação de As por DESI-MS, visto que as intensidades apresentadas foram muito baixas.

Para os demais solventes, as intensidades dos espectros mostraram-se mais elevadas do que para os três primeiros solventes mencionados. Desse modo, o uso de formiato de amônio, hidróxido de amônio e metanol:água mostrou-se mais indicado para estudos de especiação de As utilizando DESI-MS. Ao contrário do uso do ácido fórmico – onde as espécies carregadas positivamente apresentaram maior intensidade do que aquelas carregadas negativamente – para o hidróxido de amônio era esperado que as espécies carregadas negativamente apresentassem maior intensidade do que as carregadas positivamente, já que o aumento do pH favorece as reações de desprotonação em moléculas de caráter mais ácido. Contudo, isso não foi observado para as espécies carregadas negativamente (As (V) m/z 141, As (III) m/z , 107, MMA m/z 139). Para o As (III), m/z 125, apresentou uma intensidade cerca de dez vezes maior que os demais.

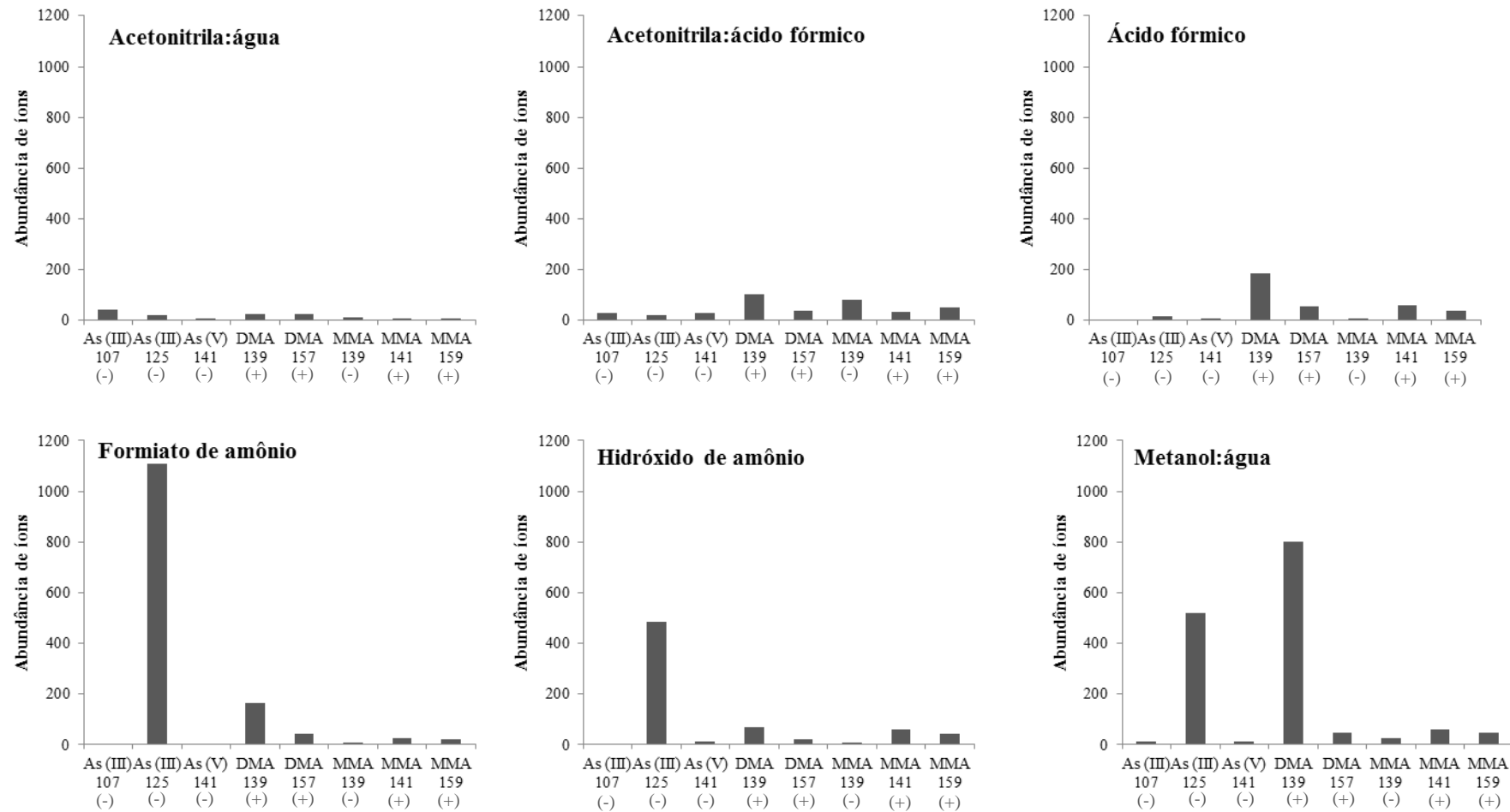


Figura 8. Abundância de íons para as diferentes espécies de As obtidas por DESI-MS/MS utilizando como solvente de ionização: acetonitrila:água, acetonitrila:ácido fórmico, ácido fórmico, formiato de amônio, hidróxido de amônio e metanol:água. Os símbolos (-) e (+) representam, respectivamente, modo negativo e modo positivo.

O solvente mais adequado para uma determinada análise pode variar dependendo do analito a ser estudado. Para a determinação de alcalóides em tecidos de plantas por DESI-MS, por exemplo, o uso de metanol:água aumentou a intensidade do sinal; contudo, o uso de hidróxido de amônio 1 mol L^{-1} aumentou ainda mais (Talaty et al., 2005). Neste trabalho, tomando-se os três solventes com as melhores intensidades e analisando-os de forma geral, para todos os íons das espécies de As, pode-se concluir que o solvente de ionização mais adequado foi metanol:água. Isso porque a mistura metanol:água, mesmo não apresentando intensidade excelente para todos os íons (o que também não foi observado para os outros solventes), proporcionou alguma ionização para todas as espécies de As e com isso fez com que suas intensidades, mesmo baixas para alguns íons, pudessem ser consideradas significantes. Misturas com metanol levam ao aumento da intensidade do sinal de íons de baixa massa molecular (Libedev, 2015). Além disso, o uso de metanol:água como solvente de ionização é amplamente utilizado em estudos com espectrometria de massas (Florêncio et al., 1997; Moraes; Lago, 2003; Lebedev, 2015) e, principalmente, em estudos com DESI-MS (Takáts et al., 2005; Jackson et al., 2009; Lin et al., 2010; Dill et al., 2011 A; Sokol et al., 2011). Isto por ser um solvente razoavelmente volátil, de fácil obtenção e preparo, além de permitir que o gás de secagem remova-o das gotículas carregadas formadas durante o processo ESI, favorecendo a condução necessária para o processo de ionização (Huang et al., 2008).

5.3. Especificação de arsênio utilizando DESI-MS/MS

5.3.1. Análise dos padrões de arsênio

São poucos os trabalhos disponíveis na literatura sobre especificação de As utilizando a espectrometria de massas sem acoplamento com outra técnica. Desses poucos, são utilizadas as técnicas ESI-MS (Florêncio et al., 1997; Yuan et al., 2008) e DESI-MS (Lin et al., 2010). Para aumentar a relação sinal ruído (S/N), nesses trabalhos foram utilizados espectrômetros de massas sequencial (MS/MS ou MS²). Dessa forma, os espectros de algumas espécies de arsênio, obtidos no presente trabalho por DESI-MS/MS, corroboram com os resultados dos trabalhos disponíveis na literatura. Outros espectros, que não constavam nos trabalhos, foram baseados nos resultados obtidos por ESI-MS (ANEXO A e B), sendo que, sempre que

possível, foram analisados os fragmentos (MS/MS) resultantes da CID dos íons $[M+H]^+$ e/ou $[M-H]^-$.

Após ter caracterizado o comportamento MS/MS das espécies de As obtidas por ESI-MS, verificou-se a aplicabilidade do método DESI-MS para estudos de especiação de As e se os espectros obtidos seriam similares aos obtidos por ESI-MS/MS. Para isso, foram feitas análises dos quatro compostos de As (As (V), As (III), DMA e MMA) depositados em papel de filtro. Foi feito também a análise do branco do papel de filtro para os íons das quatro espécies de As em estudo (ANEXO C).

Para análise das espécies inorgânicas de arsênio, As (III) e As (V), segundo Florêncio et al. (1997), o uso do modo positivo no espectrômetro de massas não parece ser adequado para a identificação dessas espécies, pois elas são prejudicadas pela presença de muito picos de origem desconhecida. Analisando-se os espectros obtidos no modo positivo por meio de ESI-MS (ANEXO A), para os íons dessas espécies observa-se alguns sinais de origem desconhecida; contudo, esses sinais possuem uma intensidade bem inferior aos íons de interesse. Esse fato também foi observado para as espécies orgânicas, DMA e MMA. Portanto, na tentativa de se obter a caracterização desses compostos, o experimento foi conduzido utilizando-se os modos íon positivo e íon negativo do espectrômetro de massas.

O espectro MS/MS do As (III), no modo negativo, é caracterizado pelo íon de m/z 107, $[As(O)_2]^-$ (Figura 9 A) e pelo íon de m/z 125, $[As(OH)_2O]^-$ (Figura 9B). Contudo, era esperado que esse último íon gerasse o fragmento de m/z 107 $[As(O)_2]^-$ (Florêncio et al., 1997), mas isso não foi observado. Outros espectros de massas que podem caracterizar o As (III), no modo positivo, é a detecção exclusiva dos cátions de m/z 127 (Figura 9C), $[H_3AsO_3 + H]^+$, que corresponde à molécula de As (III) protonada, e de m/z 145 (Figura 9D), $[H_3AsO_3 + H_2O + H]^+$, que corresponde ao aduto com água do As (III). Tais íons, de m/z 127 e m/z 145, possuem como fragmentos os íons de m/z 109 e m/z 127, respectivamente, os quais correspondem à perda de uma molécula de H_2O .

No modo negativo, o composto As (V) foi distinguido pela formação do ânion de m/z 141 ($[H_2AsO_4]^-$), o qual prontamente dissocia-se pela liberação de uma molécula de H_2O (m/z 123) (Figura 10A). Esse resultado é consistente com dados reportados anteriormente na literatura (Lin et al., 2010; Florêncio et al., 1997). No modo positivo, o composto As (V), foi detectado como cátion $[H_3AsO_4 + H]^+$, de m/z 143, e como $[H_3AsO_4 + H_2O + H]^+$, de m/z 161 (Figura 10 B e C). Tais íons, de m/z 143 e m/z 161, dissociam, principalmente, pela perda de uma molécula de H_2O para produzir íons de m/z 125 e m/z 143, respectivamente.

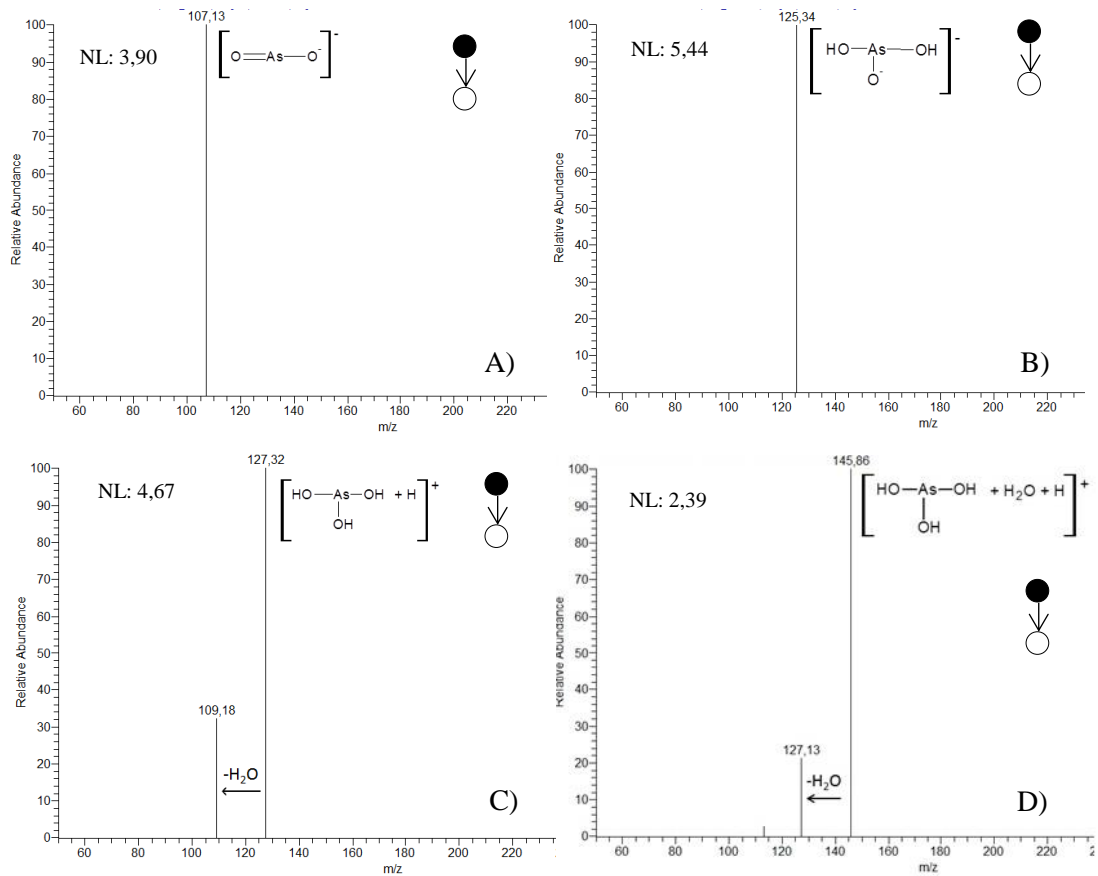


Figura 9. DESI(-)MS/MS para o íon As (III) de A) m/z 107; B) m/z 125; e DESI(+MS/MS para o íon As (III) de C) m/z 127; D) m/z 145. Todos os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de $NaAsO_2$ (5 mg.L^{-1}) depositada em papel filtro.

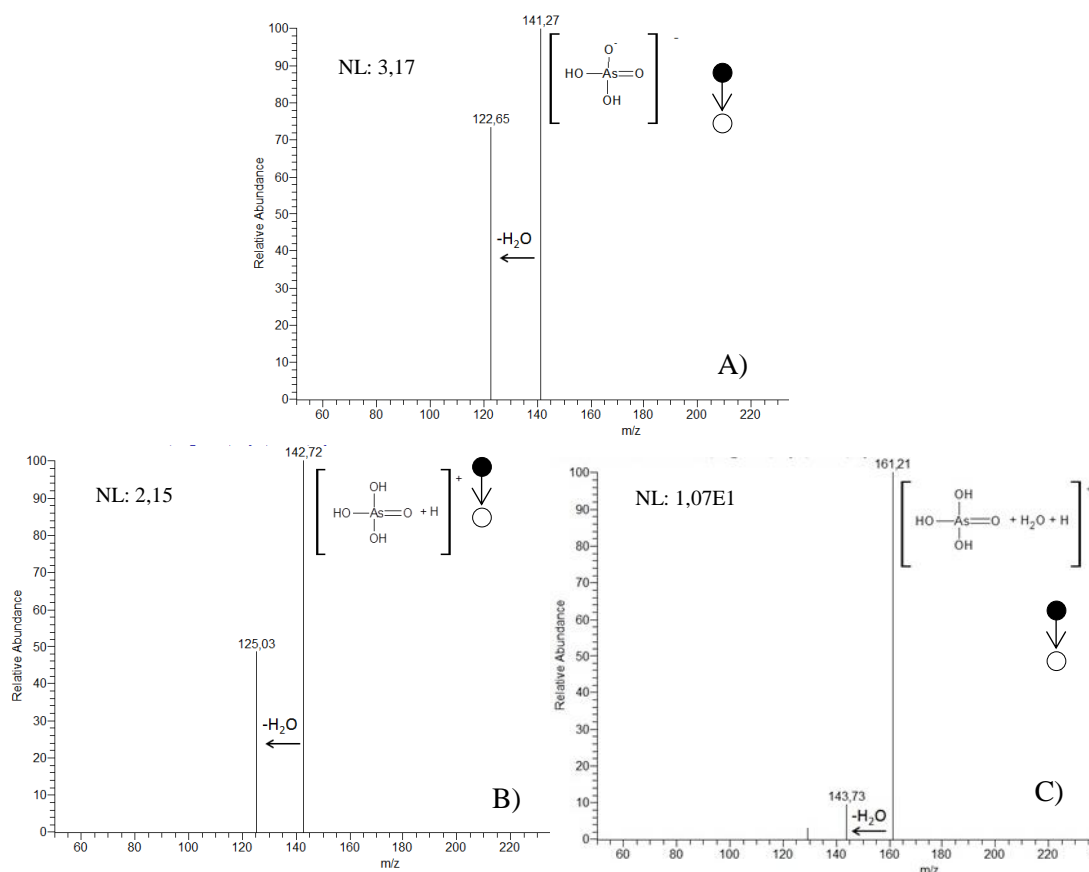


Figura 10. DESI(-)MS/MS para o íon As (V) de: A) m/z 141; e DESI(+)-MS/MS para o íon As(V) de: B) m/z 143 e C) m/z 161. Todos os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de KH_2AsO_4 (5 mg.L^{-1}) depositada em papel filtro.

No modo positivo, o composto DMA foi detectado na sua forma protonada $[(CH_3)_2AsO(OH) + H]^+$, de m/z 139, o qual dissocia-se, principalmente, pela perda de uma molécula de H_2O para produzir um íon de m/z 121 (Figura 11A), sendo essa uma fragmentação típica do DMA protonado (Lin et al., 2010). O DMA também foi detectado com a formação do aduto com a H_2O , $[(CH_3)_2AsO(OH) + H_2O + H]^+$ de m/z 157, o qual dissocia via perda de uma (m/z 139) ou duas (m/z 121) moléculas de H_2O (Figura 11B). Esses resultados são consistentes com dados anteriormente reportados na literatura (Lin et al., 2010; Florêncio et al., 1997).

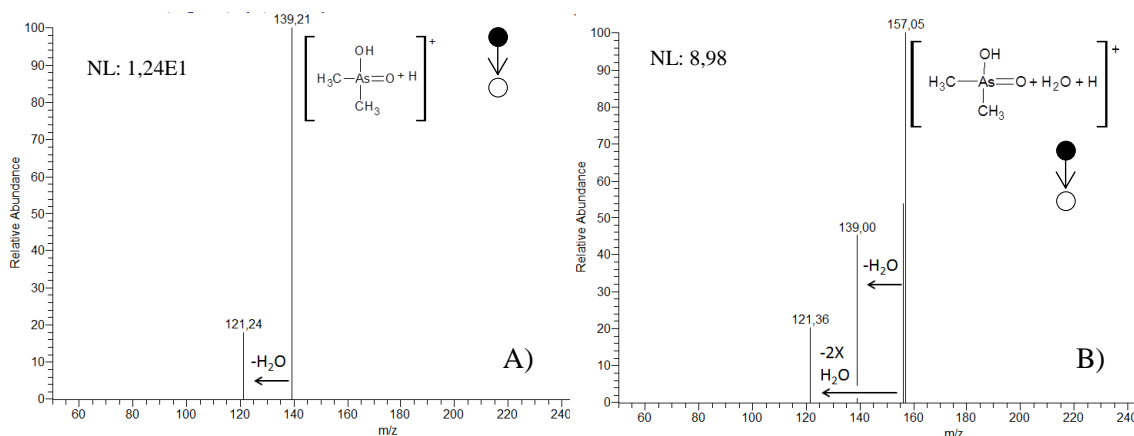


Figura 11. DESI(+)-MS/MS para o íon DMA de: A) m/z 139 e B) m/z 157. Todos os espectros foram gerados a partir de solução padrão de $(CH_3)_2As(O)OH$ ($5mg.L^{-1}$) depositada em papel filtro.

Assim como o DMA e as espécies inorgânicas de As, o espectro de massas do ácido monometilarsônico é caracterizado pela espécie protonada, m/z 141, $[CH_3AsO(OH)_2 + H]^+$ (Figura 12A), e pelo seu aduto com a água, m/z 159, $[CH_3AsO(OH)_2 + H_2O + H]^+$ (Figura 12B). Na fragmentação, ambos íons caracterizam-se, principalmente, pela perda de uma molécula de H_2O , m/z 123 e m/z 141, respectivamente. No modo negativo, foi verificada a formação dos íons de m/z 139, $[CH_3As(OH)O_2]^-$ (Figura 12C), o qual fragmenta-se via perda de uma molécula de H_2O , m/z 121, e pela perda de uma molécula de CH_2O , m/z 109.

A maioria dos espectros obtidos por meio de DESI-MS/MS (Figura 9 a Figura 12) para as quatro espécies de As estudadas foram similares aos espectros observados na análise por ESI-MS/MS (ANEXO A). A análise do branco em papel de filtro mostrou que esse não influenciou nos resultados obtidos para as quatro espécies de As visto que, para os íons analisados, quando os valores de m/z dos compostos de As eram isolado e fragmentado, o fragmento característico de cada íon não foi obtido e, dessa forma, não se caracteriza a presença de As (ANEXO C).

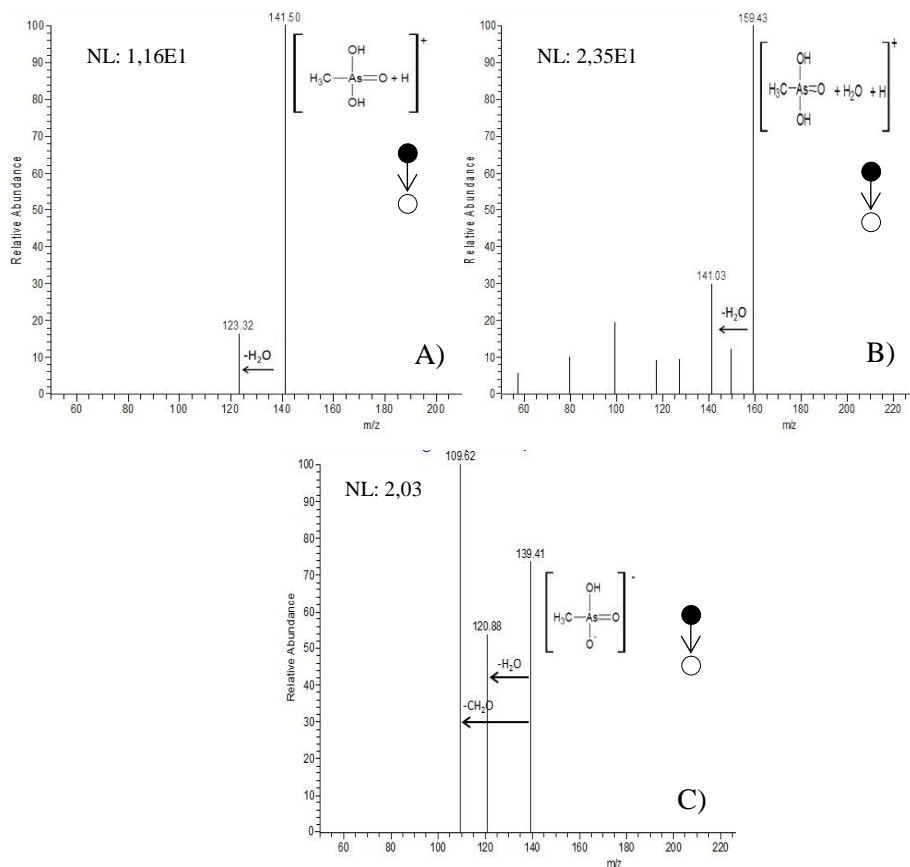


Figura 12. DESI(+)-MS/MS para íons derivados de MMA: A) m/z 141; B) m/z 159. C) DESI(-)-MS/MS para o íon de m/z 139 (MMA em sua forma desprotonada). Todos os espectros foram gerados a partir de solução padrão de $CH_3AsO_3 \cdot 2Na \cdot 6H_2O$ ($5mg \cdot L^{-1}$) depositada em papel filtro.

5.3.2. Especificação de As em folhas de samambaia contaminadas artificialmente

Após caracterização do comportamento DESI-MS/MS dos compostos de As, utilizando soluções padrão desse elemento, procedeu-se com a análise da performance do método utilizando-se folhas de samambaia contaminadas separadamente com as espécies As (III), As (V), DMA e MMA.

Para análise no DESI-MS, cada folha de samambaia (macerada) contaminada com as diferentes espécies de As, foi fixada em uma lâmina de vidro por meio de uma fita dupla face e analisada nos modos íon positivo e íon negativo, de acordo com o espectro de massas obtido por meio dos padrões de As para cada espécie. Foi feito também a análise da planta não

enriquecida com As (branco da samambaia). Tanto a análise da planta enriquecida com As quanto a análise do branco da planta foram feitas gerando-se 30 *scans* para cada íon de As e, apresentando como resultado, aquele de maior intensidade.

Na Figura 13 o espectro DESI-MS obtido para folhas de samambaia não enriquecidas com As mostra íons diagnósticos (indicados com seta) do As(III) (m/z 127 e 145), As(V) (m/z 143), DMA (m/z 139) e MMA (m/z 159). Alguns íons apresentam intensidades muito baixas, porém não se pode descartar a hipótese da presença desses compostos na planta não enriquecida com As. Essa hipótese será checada posteriormente por meio de análises dessas amostras por LC-ICP-MS.

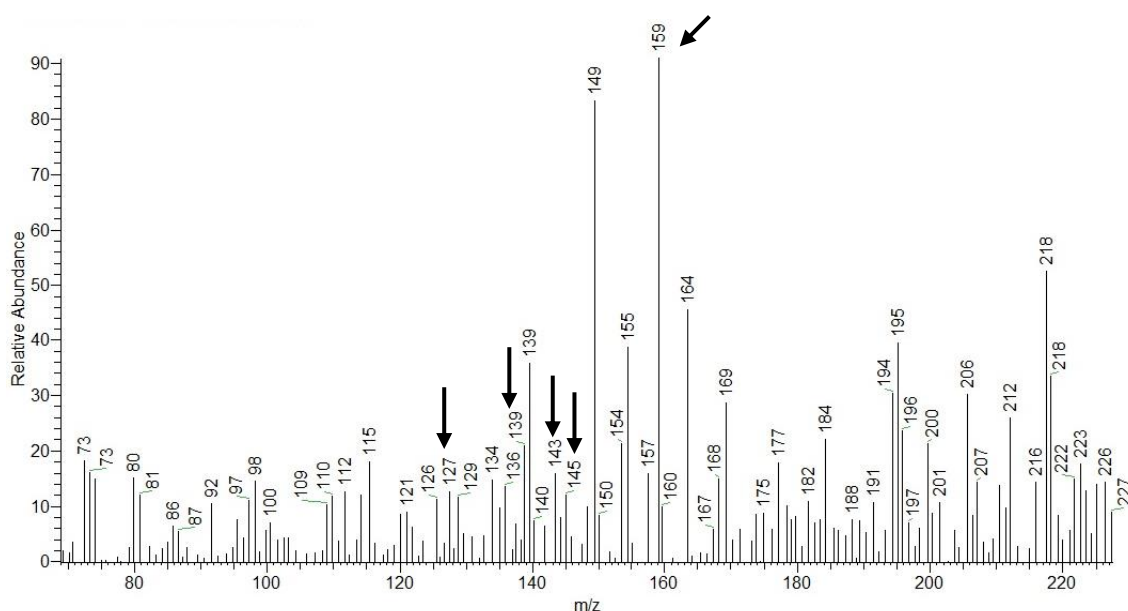


Figura 13. Espectro DESI(+)-MS para folhas de samambaia não enriquecidas com As.

Uma das plantas foi contaminada com as quatro espécies de As juntas (50 mg.L^{-1} de cada composto de As) e o espectro de massas (modo *full scan*) característico dessa planta pode ser visualizado na Figura 14. A presença de íons diagnósticos (marcados com seta) para DMA (m/z 139 e m/z 157), MMA (141), As(III) (m/z 127) e As(V) (m/z 143) podem ser vistos e a presença dessas espécies pode ser definitivamente confirmada pelos dados MS/MS.

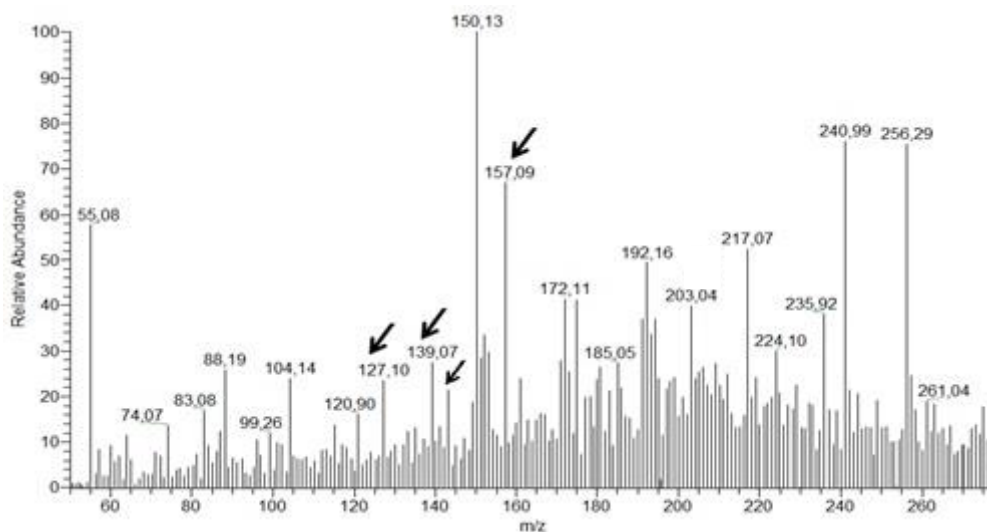


Figura 14. Espectro DESI(+)-MS para folhas de samambaia enriquecidas com As (III), As (V), DMA e MMA.

A análise da planta enriquecida com As (III), no modo negativo, apresentou o íon de m/z 107 característico dessa espécie (Figura 15A). Os outros espectros de massas característicos do As (III) – íons de m/z 127 (Figura 15C) e m/z 145 (Figura 15E) – no modo positivo, também apresentaram o mesmo comportamento observado para o padrão de As (III) e, desse modo, confirmam a presença da espécie As (III) na folha de samambaia. Ao analisar os espectros de massas obtidos para as plantas não enriquecidas com As (III), observa-se que esses apresentaram o perfil característico para os três íons (Figura 15 B, D e F). Isso indica que as plantas consideradas como não contaminadas com As, podem apresentar esse elemento em seus tecidos.

Os espectros obtidos para as plantas enriquecidas com As (V), tanto no modo negativo quanto no modo positivo, foram consoantes aos espectros obtidos para a análise do padrão de As (V) por DESI-MS/MS e, assim, os íons de m/z 141 (Figura 16A), m/z 143 (Figura 16C) e m/z 161 (Figura 16E) apresentaram seus perfis característicos de fragmentação. Conseqüentemente, a contaminação da samambaia por As (V), pôde ser confirmada. Os espectros de massas das plantas não enriquecidas com As (V) apresentaram os íons precursores de m/z 141 (Figura 16B), 143 (Figura 16D) e 161 (Figura 16F), sendo os dois primeiros com seus perfis de fragmentação típicos, indicando que provavelmente as plantas não contaminadas por As o possuíam em seus tecidos.

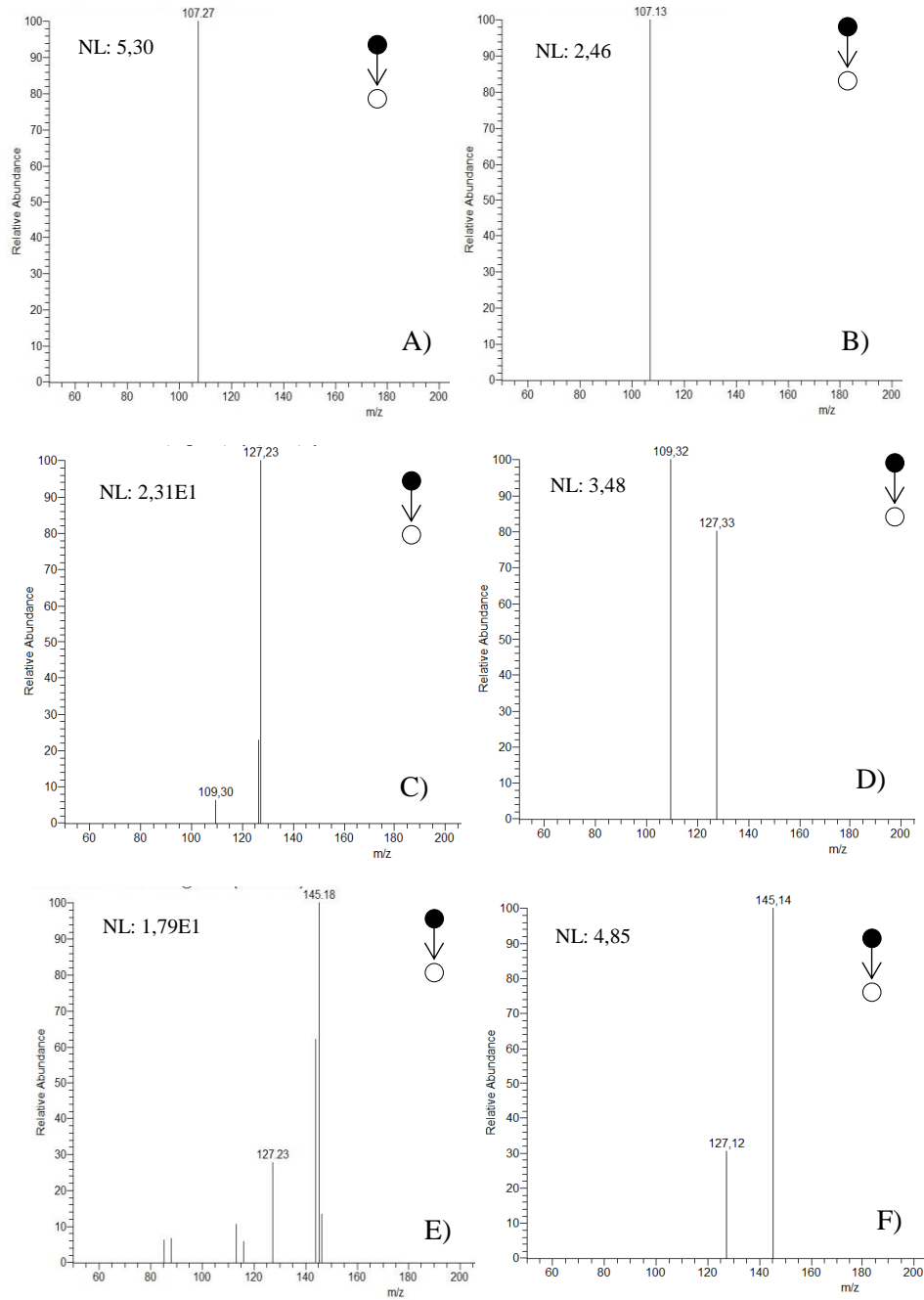


Figura 15. DESI(-)MS/MS para o íon As (III) de m/z 107: A) para a planta enriquecida com As (III) e B) branco da samambaia. DESI(+)-MS/MS para o íon As (III) de m/z 127 e 145 sendo C) e D) para a planta enriquecida com As(III) e D) e F) branco da samambaia.

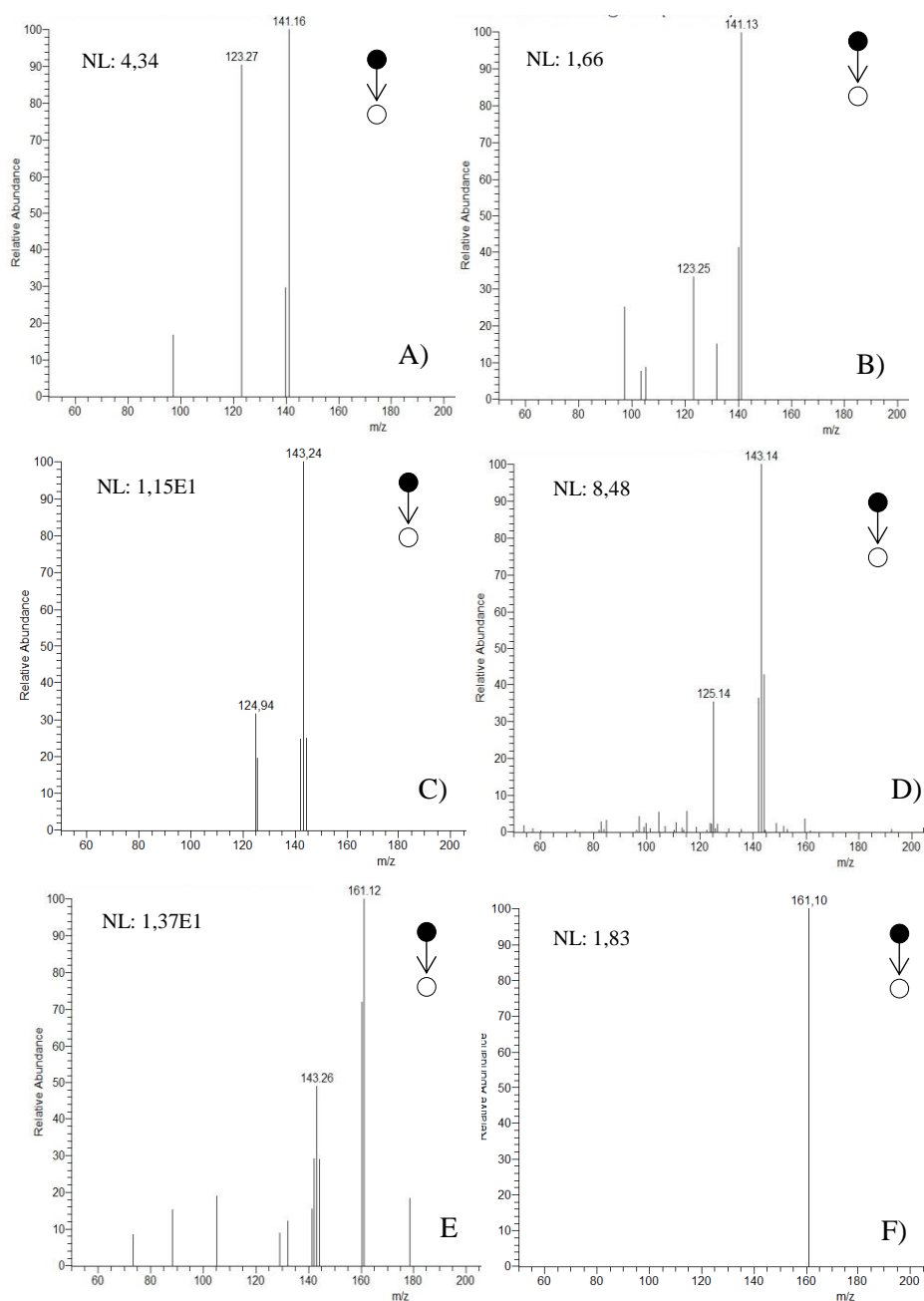


Figura 16. DESI(-)MS/MS para o íon As (V) de m/z 141: A) para a planta enriquecida com As (V) e B) branco da samambaia. DESI(+)MS/MS para o íon As (V) de m/z 143 e 161 sendo, respectivamente, C) e D) para a planta enriquecida com As(V) e D) e F) branco da samambaia.

A fragmentação característica do DMA – íon precursor de m/z 139 com fragmento de m/z 121 (Figura 17A) – pode ser observada na planta enriquecida com DMA. Além desse, o íon de m/z 157 e seus respectivos fragmentos de m/z 139 e m/z 121 também foram observados (Figura 17C), confirmando o enriquecimento da samambaia por DMA. Os espectros MS/MS

dos íons de m/z 139 e m/z 157 (Figura 17 B e D), para a planta não enriquecida com DMA, não apresentaram o perfil de fragmentação característico, observado para a planta contaminada e para o padrão de DMA, indicando a provável ausência desta espécie na samambaia sem contaminação.

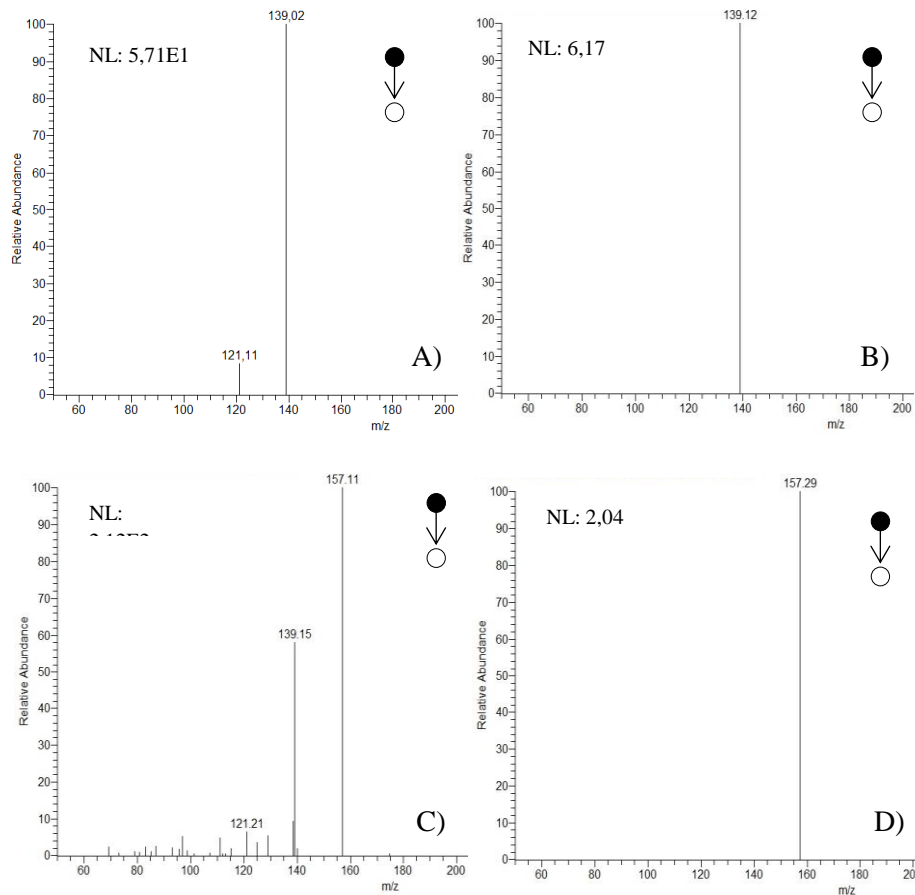


Figura 17. DESI(+) MS/MS para o íon derivado do DMA de m/z 139 e 157 sendo, respectivamente, A) e C) para planta enriquecida com DMA e B) e D) branco da samambaia.

Assim como para o DMA e para as espécies inorgânicas de As, os espectros de massas obtidos para os íons derivados do MMA, para as plantas contaminada com tal espécie, confirmaram a presença do MMA na samambaia. No modo positivo, os íons de m/z 141 (Figura 18C), m/z 159 (Figura 18E) apresentaram seus respectivos perfis de fragmentação. Contudo, no modo negativo, o íon de m/z 139 (Figura 18A) não apresentou o fragmento observado no espectro de massas do padrão MMA (m/z 121). Portanto, o modo negativo não foi adequado para análise do MMA em folhas de samambaia. Todos os espectros MS/MS

obtidos para estes íons para a planta não enriquecida por MMA não apresentaram o perfil típico de fragmentação para essa espécie (Figura 18 B, D, F e H) e assim, há grande possibilidade que a samambaia analisada (sem contaminação) não tenha essa espécie de As.

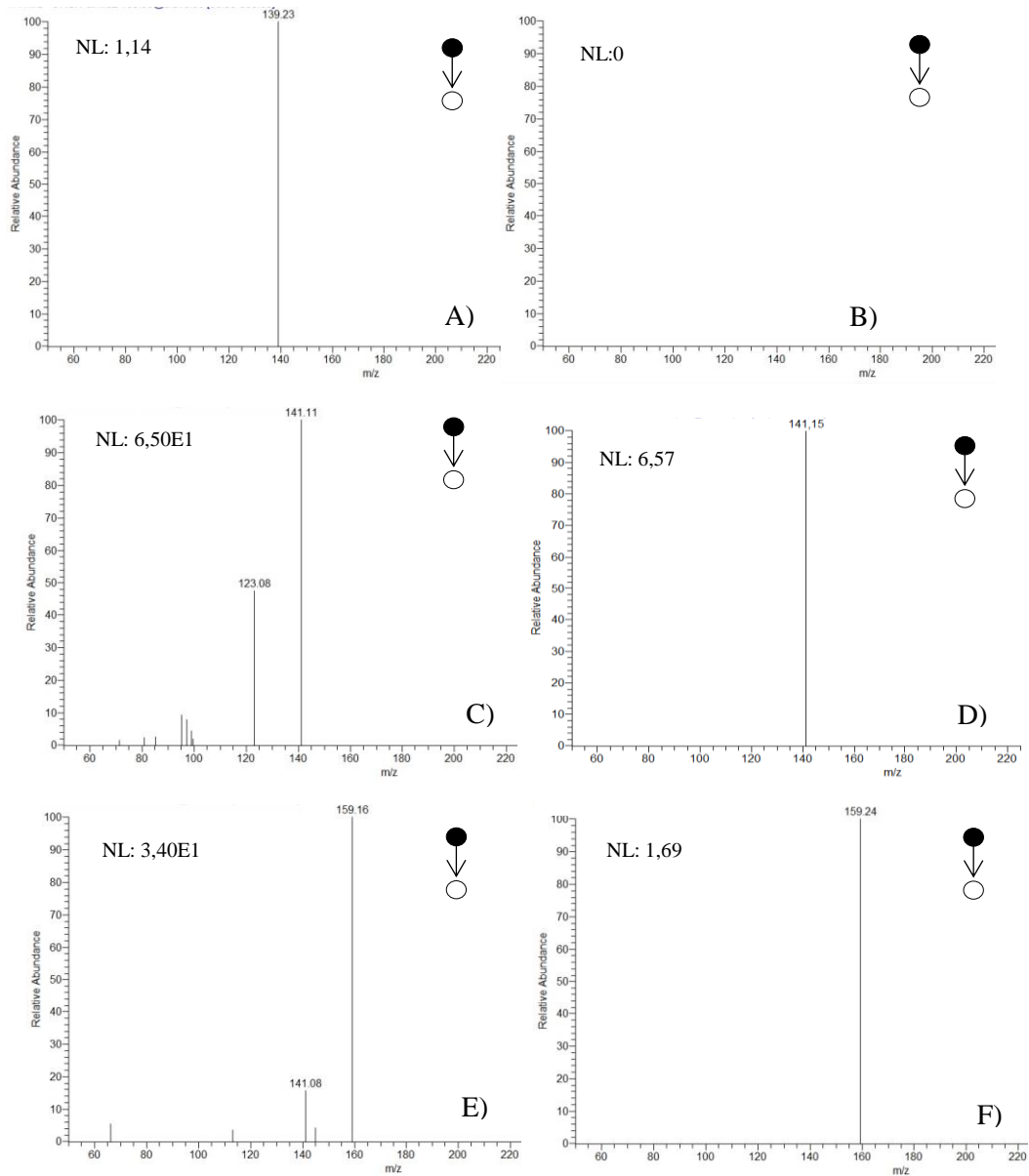


Figura 18. DESI(-)MS/MS para o íon MMA de m/z 139: A) para a samambaia enriquecida com MMA e B) branco da samambaia. DESI(+)-MS/MS para o íon MMA de m/z 141 e 159 sendo, respectivamente, C) e E) para a samambaia enriquecida com MMA e D) e F) branco da samambaia.

De acordo com os dados MS/MS, foi observada a ocorrência das espécies de As de acordo com a espécie que a planta foi contaminada. Os compostos de As são claramente reconhecidos nesses espectros de massas e a presença dessas espécies nas samambaias pôde ser definitivamente confirmada pelos dados MS/MS. O perfil de fragmentação de cada íon precursor mostrou ser similar àqueles observados para seus respectivos padrões. Desse modo, a técnica DESI-MS/MS se aplica bem para análises de especiação de As em matrizes complexas de forma simples e rápida.

5.4. Análise por ICP OES e LC-ICP-MS das samambaias

O teor total de As nas plantas contaminadas artificialmente e não contaminadas foi determinado por ICP OES e as espécies presentes nessas plantas foram quantificadas por LC-ICP-MS. O método aplicado neste trabalho foi proposto por Moreira e colaboradores (2011) para especiação de As. Folha de citrus (CRM, NIST 1572) foi analisada para verificar a acurácia e precisão do método.

A concentração total obtida por ICP OES foi usada para avaliar a eficiência do método de extração. A soma das concentrações obtidas por LC-ICP-MS e a concentração total obtida por ICP OES foram próximas, com recuperações variando de 92 a 102% (Tabela 4). Para o MRC, o qual tem uma baixa concentração de As, a recuperação foi de 82%. Esses resultados indicam que o uso de $0,042 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 para extração das espécies de As foi adequado.

A diferença na constante de dissociação das espécies de As determina os respectivos comportamentos cromatográficos. A ordem de eluição foi predita pelos seus valores de pKa e verificada experimentalmente pela injeção das quatro espécies de As individualmente. Com o pH da fase móvel igual a 6, As (III) esteve presente em sua forma neutra ($\text{pKa}=9,3$), o qual está totalmente protonado e não é retido pela coluna. Dessa forma, As (III) é eluído primeiro, junto com o volume morto. DMA ($\text{pKa}=6,2$) foi parcialmente ionizado em pH 6 e foi retido pela coluna um pouco mais do que As(III), e assim eluído um pouco depois. MMA ($\text{pKa}_1=3,6$) e As (V) ($\text{pKa}_1= 2,3$) foram completamente ionizados e se tornaram espécies aniônicas, ficando retidos por mais tempo na coluna. Porém, As(V) eluiu por último devido sua forte interação com a coluna. Portanto, a sequência de eluição foi: As (III), DMA, MMA e As (V), respectivamente (Chen et al., 2004) (Figura 19).

Tabela 4. Concentração de As total e As(V), As(III), DMA e MMA em MRC e folhas de *Pteris vittata* contaminadas e não contaminadas com As determinadas por LC-ICP-MS e ICP OES.

Espécie que a planta foi enriquecida	Concentração de cada espécie* (mg/kg)				Soma das concentrações (mg/kg)	Concentração total (mg/kg) ICP OES	Recuperação (%)
	As (III)	MMA	DMA	As (V)			
Não enriquecida	440,00 ± 34,07	<LD	<LD	149,34 ± 8,39	589,33	624,30 ± 70,97	94
MMA	197,87 ± 3,34	569,11 ± 34,41	<LD	74,12 ± 15,98	841,09	918,39 ± 57,76	92
DMA	195,45 ± 11,07	<LD	711,12 ± 20,36	74,87 ± 24,47	981,44	1042,95 ± 19,48	94
As (V)	739,80 ± 3,59	<LD	<LD	201,36 ± 15,53	941,16	923,34 ± 47,24	102
As (III)	719,66 ± 68,06	<LD	<LD	175,38 ± 23,30	895,05	883,42 ± 71,80	101
4 espécies	582,54 ± 6,68	111,07 ± 2,42	147,76 ± 0,92	73,28 ± 11,70	914,65	925,85 ± 56,25	99
Folha de citrus (NIST 1572)	2,00 ± 0,01	<LD	0,04 ± 0,01	0,49 ± 0,03	2,54	3,10 ± 0,3**	82

*concentração em matéria seca

**valor certificado

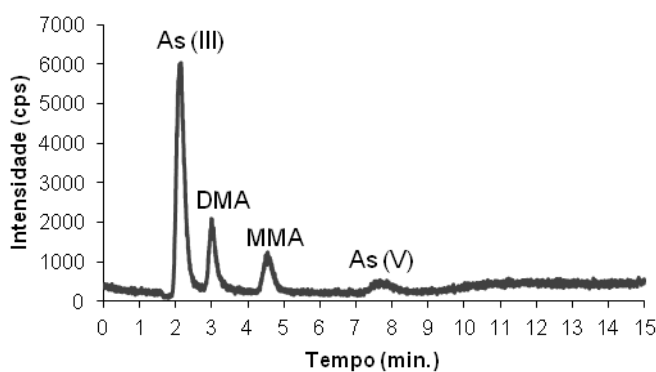


Figura 19. Cromatograma das quatro espécies de As presentes no extrato de folhas de samambaia enriquecidas com As

Após a extração das espécies de As com HNO_3 $0,042 \text{ mol L}^{-1}$ das plantas enriquecidas e não enriquecidas com os diferentes compostos de As, obteve-se, por meio do LC-ICP-MS, os cromatogramas para cada extrato de planta (Figura 20).

Na planta não contaminada com As, encontrou-se As (III) e As (V) (Figura 20E) e, dessa forma, todas as outras plantas, mesmo não contaminadas com tais espécies, também apresentaram ambas espécies. O que provavelmente tenha acontecido é que houve um equívoco quanto ao lugar onde as plantas foram coletadas. A princípio acreditava-se que naquele local não haveria As, mas pelas análises pode-se perceber que isso não é verdade. Esses resultados obtidos por LC-ICP-MS corroboram com os demais resultados obtidos por DESI-MS. Nas plantas que foram contaminadas com DMA e MMA, além do As (III) e As (V), também detectou-se o respectivo composto ao qual a planta foi contaminada (Figura 20A e B).

Altas concentrações de As (III) e As (V) foram encontradas nas folhas da samambaia não enriquecidas com As (Tabela 4). Esses resultados são esperados para plantas hiperacumuladoras, tal como a samambaia *Pteris vittata*. Altos teores também foram observados por Melendez et al. (2011), analisando as espécies *P. calomelanos* e *N. biserrata*, nas quais as concentrações de As chegaram a 2271 mg kg^{-1} , sendo essa distribuída entre As (III), As (V) e formas orgânicas.

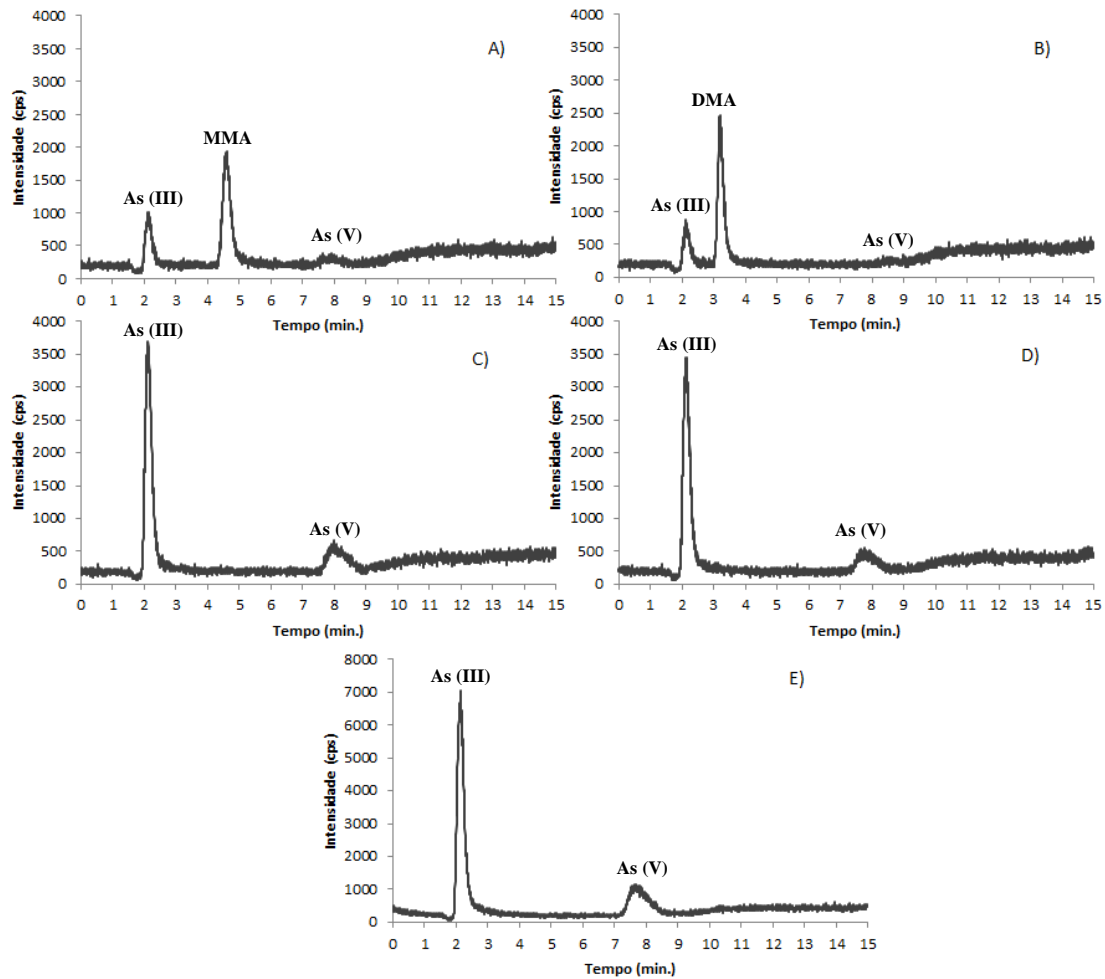


Figura 20. Cromatogramas das espécies de As em extratos de folhas de samambaia enriquecidas com: A) MMA; B) DMA; C) As (V); D) As (III) e E) extrato da folha de samambaia não enriquecida com As.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que, tanto para a planta não contaminada com As quanto para aquelas contaminadas com alguma espécie de As, a concentração de As (III) foi maior que a de As (V). Isso pode ter sido devido à redução de arsenato a arsenito nas folhas, o qual tem sido proposto como um mecanismo de desintoxicação na *P. vittata* (Lei et al., 2012; Ma et al., 2001; Zhang et al., 2002). Quando a planta foi exposta a As (III), DMA, MMA e As (V), a concentração das três primeiras espécies esteve sempre maior do que da última, indicando que, além da redução de As (V) a As (III), a absorção de DMA e MMA foi mais efetiva que daquela última, possivelmente por causa da menor toxicidade dessas espécies. O mesmo foi observado por Bergvist & Greger (2012) em plantas crescidas em diferentes *habitats*. Trabalhos mostram que, independente da espécie que a planta foi exposta,

As (III) ou As (V), arsenito é a espécie que predomina (Xue et al., 2012). Em um trabalho com a espécie hiperacumuladora *P. calomelanos*, exposta a As (V), foi observado que mais de 60% do As (V) absorvido, foi reduzido a As (III) (Kachenko et al., 2010). Em outro estudo, porém com a *P. vittata*, a qual também foi exposta a As (V), o arsênio ficou concentrado, principalmente, nas folhas dessa planta como As (III) (Singh; Ma, 2006).

Os resultados obtidos por técnicas bem estabelecidas, como LC-ICP-MS, corroboram com os resultados do DESI-MS. Deve-se notar que as concentrações apresentadas na Tabela 4 são em matéria seca e as amostras que foram analisadas no DESI-MS eram frescas. Essas concentrações são aproximadamente cinco vezes menores, considerando que as folhas de samambaia tem aproximadamente 80% de água.

Esse conjunto de resultados confirma a aplicabilidade do presente método na detecção de compostos de As em matrizes complexas. DESI-MS/MS pode ser uma técnica complementar para análise de plantas de áreas contaminadas com As e identificação de diferentes espécies, sendo assim uma importante ferramenta para o monitoramento ambiental.

5.5. Análise de especiação de As por DESI-MSI

Estudos que procuram compreender o metabolismo das plantas são importantes tanto para a nutrição humana e animal quanto para a fisiologia e toxicologia (Silva; Arruda, 2013). Com o intuito de verificar a presença e como ocorre a distribuição de compostos de As em folhas de samambaia, procedeu-se com análises por DESI-MSI. A identificação dos compostos de As responsáveis pelos íons observados nos espectros de massas foram baseadas nos experimentos MS/MS, reportados anteriormente, e confirmados por DESI-MS pela análise dos padrões depositados no papel filtro. No modo positivo, DMA foi monitorado como $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}]^+$, de m/z 138,97. No modo negativo, MMA foi monitorado como $[\text{CH}_3\text{AsO}_2\text{OH}]^-$, de m/z 138,94, As (V) foi monitorado como $[\text{H}_2\text{AsO}_4]^-$, de m/z 140,92, e As (III) foi monitorado como $[\text{AsO}_2]^-$, de m/z 106,91. Os compostos de As foram observados no espectro de massas no modo de varredura completa.

Inicialmente, tentou-se analisar as folhas de samambaia diretamente pelo DESI, ou seja, sem qualquer tratamento da amostra, como tem sido previamente reportado para outras espécies de plantas com experimentos DESI sem geração de imagem (Talaty et al., 2005; Jackson et al., 2009; Kennedy e Wiseman, 2010). A intensidade do sinal foi muito baixa e

com estabilidade insuficiente para gerar a imagem, mesmo depois de longa exposição ao *spray* do DESI. A insuficiente estabilidade do sinal é parcialmente relacionada a problemas de penetração na cutícula do tecido da planta, o qual dificulta a penetração do *spray* DESI, e, em parte, devido ao fato da natureza do material da planta ser macio e absorvente, já que DESI opera melhor em superfícies duras (Li et al, 2011; Thunig et al, 2011). Uma alternativa apresentada por Müller e colaboradores (2011) foi o pré-tratamento da superfície da folha com um solvente orgânico (por exemplo, clorofórmio), antes da análise, para a remoção da camada de cera. Em contraste com a análise direta da folha não tratada, o sinal foi mais intenso, mas não estável e confiável o suficiente para ser usado na geração de imagens.

A impressão da planta em uma superfície uniforme, dura e plana, como por exemplo poros de Teflon e placa de TLC, têm sido usada para melhorar a sensibilidade e estabilidade de imagens na espectrometria de massas (Müller et al., 2011; Li et al., 2011; Thunig et al, 2011; Hemalatha e Pradeep, 2013). Ao contrário da maioria dos trabalhos sobre especificação de As em plantas terrestres, os quais utilizam um laborioso preparo de amostras para análise química (Amaral et al., 2013; Chen et al., 2014), neste trabalho utilizou-se uma abordagem indireta, onde uma impressão do material vegetal fresco foi submetido a uma forte pressão contra um sanduíche de filtro de PTFE por 15 minutos. Filtros de PTFE são preferíveis porque eles fornecem impressões de boa qualidade além de absorver bem os compostos da planta, enquanto mantêm a integridade espacial da amostra (Thunig et al., 2011; Hemalatha e Pradeep, 2013). Antes da impressão as folhas foram tratadas com hexano.

A impressão das folhas contendo os compostos de As obtidos sobre a superfície do filtro de PTFE foi bastante simples, melhorando significativamente a intensidade e estabilidade do sinal no MS, comparado com aqueles obtidos na análise direta das folhas pelo DESI. Tal metodologia foi adotada, portanto, para as próximas análises. Resultados similares foram obtidos por Thunig e colaboradores (2011) em análises de metabólitos de plantas.

A princípio, para a detecção dos compostos de As, utilizou-se as samambaias (*Pteris vittata*) contaminadas naturalmente com esse elemento. Para a detecção de tais compostos, DESI-MSI foi realizado sobre a impressão das folhas (lavadas com hexano) medindo-se íons de m/z de 50 a 250, tanto no modo positivo quanto no modo negativo, de acordo com as análises pré-realizadas. Para confirmar a detecção de cada espécie de As na impressão da folha de samambaia foi calculado o erro estimado da massa para cada íon analisado. A folha foi cortada ao meio para que coubesse no filtro de PTFE. A Figura 21 mostra, do lado

esquerdo, a foto da folha de samambaia sendo preparada para a impressão e, do lado direito, a impressão sobre a superfície do filtro de PTFE.



Figura 21. Imagem da folha de samambaia (*Pteris vittata*). Lado esquerdo: imagem ótica da folha preparada para a impressão. Lado direito: imagem ótica da impressão na superfície do filtro de PTFE.

Uma imagem típica da folha correspondente ao íon As (III), de m/z 106,91, é mostrada na Figura 22 revelando a distribuição desse íon. Nessa figura é possível perceber que a distribuição do As (III) na folha de samambaia foi bastante homogênea, confirmando a presença dessa espécie de As na folha contaminada naturalmente com esse elemento. A diferença na intensidade das cores revela, ponto a ponto, a diferença entre as intensidades obtidas para o mesmo íon. Onde as cores estão mais intensas (vermelho) é que, muito provavelmente, há maior intensidade do íon As (III). Isso ficou mais evidente nas bordas e na região central da folha. No entanto, essas são as partes mais espessas da folha e assim talvez tenham sido mais pressionadas e liberadas maiores quantidades de As, causando falsa impressão de maior concentração. A Figura 23 mostra um dos espectros do íon de m/z 106,91 responsáveis pela geração da imagem. Como o íon As (III) é de baixa intensidade, na Figura 23, ele foi aumentado 50 vezes para que facilitasse sua visualização. Além disso, nesse espectro de massas é possível comparar a massa exata do As (III) com a massa teórica, podendo verificar que o erro foi relativamente baixo, $\Delta = -6,72501$ ppm, confirmando que o íon detectado é o $[\text{AsO}_2]^+$.

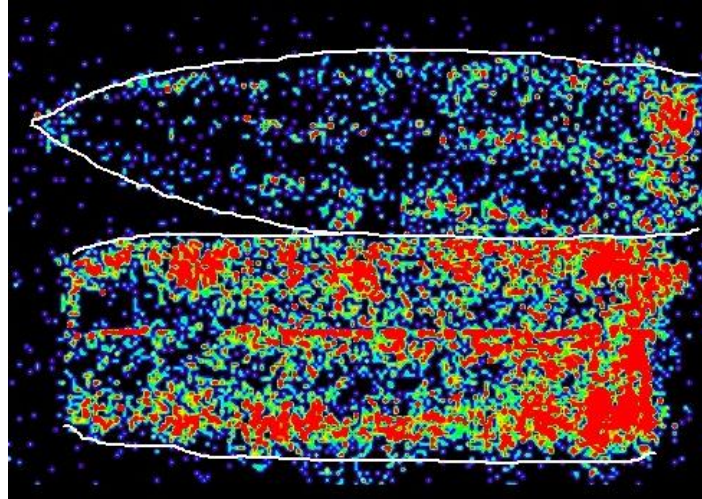


Figura 22. DESI(-)MSI do íon As (III) de m/z 106,91. Resolução espacial: 70 μm .

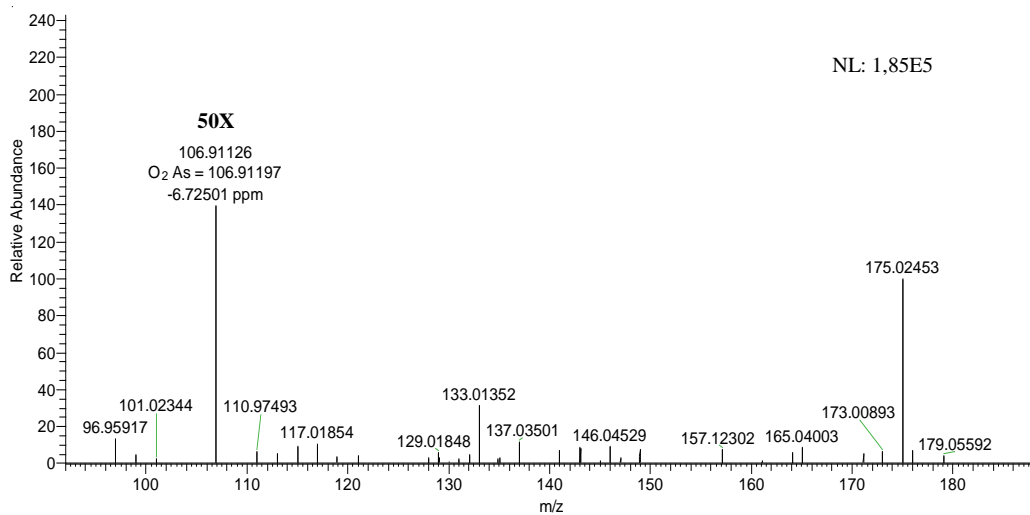


Figura 23. DESI(-)MS do íon As(III) de m/z 106,91 obtido na geração da imagem da folha de samambaia.

Para as demais espécies de As, As (V), DMA e MMA, não foi possível obter a imagem da folha com seus respectivos íons. No caso do As (V), durante a análise da impressão da folha por DESI-MS, foi possível detectar o íon As (V), de m/z 140,91636, na forma $[\text{H}_2\text{AsO}_4]^-$. No entanto, como esse íon é de baixa intensidade e estabilidade insuficiente, não foi possível gerar uma imagem nítida da folha. Na Figura 24 pode-se visualizar o espectro de massas obtido para esse íon mostrando que, assim como para o As

(III), a técnica DESI-MS pode ser aplicada na detecção de compostos inorgânicos de As em samambaias naturalmente contaminadas com tal elemento. Como o íon As (V) é de baixa intensidade, na Figura 24, ele foi aumentado 100 vezes para que facilitasse sua visualização. Além disso, nesse espectro de massas é possível comparar a massa exata do As(V) com a massa teórica, podendo verificar que o erro foi relativamente baixo, $\Delta = -4,02545$ ppm, confirmando que o íon detectado é o $[\text{H}_2\text{AsO}_4]^-$. Os dois compostos inorgânicos de As não apresentaram erros de massa tão baixos, porém foram considerados satisfatórios pelo fato de se tratarem de compostos de difícil ionização e detecção, numa matriz complexa sem praticamente nenhum tratamento prévio.

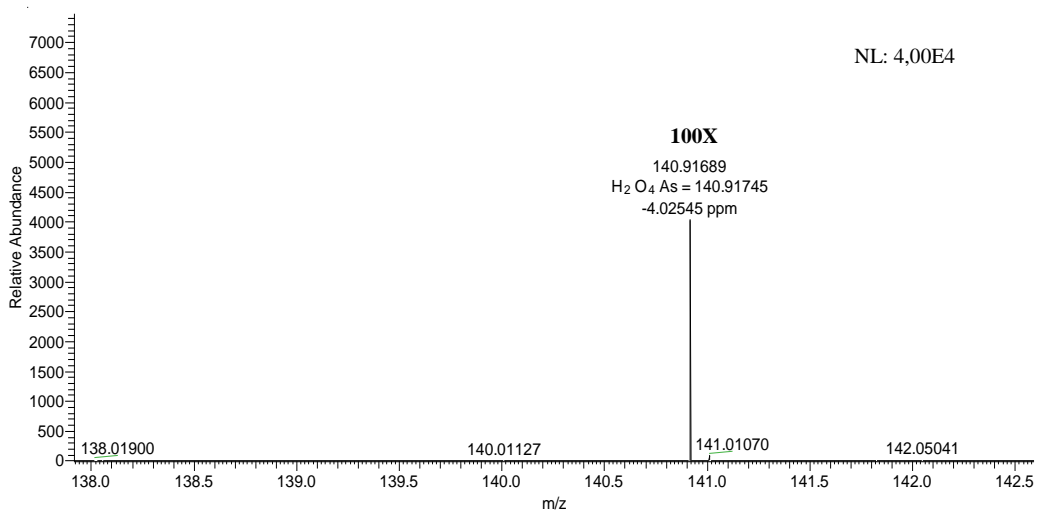


Figura 24. DESI(-)MS do íon As (V) de m/z 140,92

As espécies orgânicas de As, DMA e MMA, não foram detectadas porque as plantas não possuem essas espécies ou elas estão abaixo da capacidade de detecção da técnica. Isso foi confirmado pela análise utilizando LC-ICP-MS (Tabela 5). A ausência de compostos orgânicos de As em plantas terrestres é muito comum, visto que elas são mais frequentemente encontradas em organismos marinhos (Zmozinski et al., 2015). Em plantas terrestres as espécies de As que predominam são as inorgânicas, As (III) e As (V) (Singh; Ma, 2006).

Diante disso, com o intuito de verificar a aplicabilidade da técnica DESI-MS e/ou DESI-MSI na detecção de compostos orgânicos de As, samambaias da espécie *Pteris vittata*, crescidas em região supostamente não contaminada com As, foram enriquecidas com tais

espécies, separadamente, a fim de verificar se é possível a geração de imagens de compostos orgânicos de As em plantas terrestres.

Tabela 5. Concentração das espécies As (III), As (V), DMA e MMA em folhas de samambaias contaminadas naturalmente com As determinadas por LC-ICP-MS

Samambaia	Concentração de cada espécie de As (mg/kg)			
	As (III)	As (V)	DMA	MMA
<i>Pteris vittata</i>	836,3	742,1	< 0,21	< 0,17

Para a detecção dos compostos orgânicos, DMA e MMA, DESI-MSI foi conduzido sobre a impressão das folhas (lavadas com hexano), tanto no modo positivo quanto no modo negativo, monitorando íons de m/z de 100 a 300. A Figura 25A mostra a imagem da folha para o íon característico do DMA, $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}]^+$, de m/z 138,97 e a Figura 25B, mostra a imagem da folha para o íon característico de MMA, $[\text{CH}_3\text{AsO}_2\text{OH}]^-$, de m/z 138,94, revelando a distribuição desses íons.

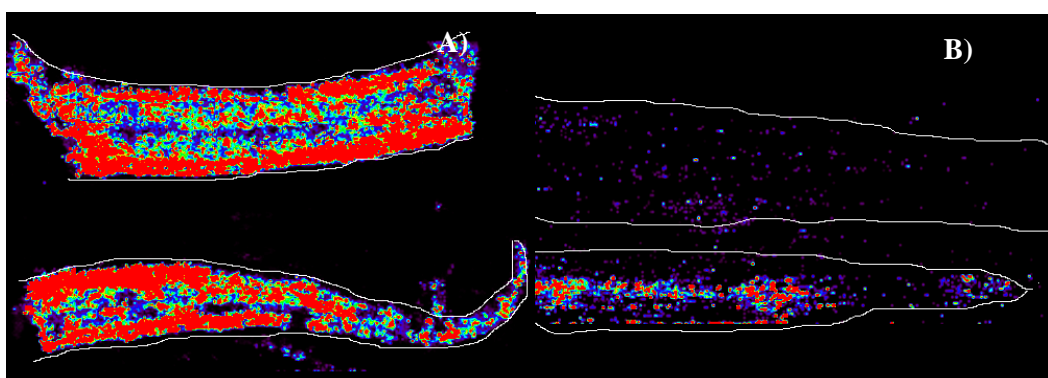


Figura 25. Imagem da folha da samambaia: A) DESI(+)-MSI do íon DMA de m/z 138,97; B) DESI(-)-MSI do íon MMA de m/z 138,94. A resolução espacial foi de 150 μm .

A Figura 25 mostra que a distribuição espacial do DMA e MMA nas folhas foi relativamente homogênea, confirmando a presença desses compostos de acordo com o

enriquecimento da planta com a espécie particular de As. Aparentemente, a presença do DMA foi mais intensa do que a do MMA, porém, a concentração predominante desses íons na folha não pode ser revelada pela intensidade da cor. Isso porque, durante a ionização, esses íons exibiram diferentes intensidades. O DMA ioniza mais facilmente que o MMA (Figura 26 e Figura 27), causando a falsa impressão que DMA está mais concentrado que MMA. Para confirmar os íons detectados, é possível comparar o valor da massa exata e da massa teórica para os íons DMA (Figura 26) e MMA (Figura 27). O erro obtido para o DMA e MMA foram bem pequenos, $\Delta = -0,79510$ ppm e $\Delta = 0,67907$ ppm, respectivamente, confirmando que os íons detectados são $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}]^+$ e $[\text{CH}_3\text{AsO}_2\text{OH}]^-$. Observando o espectro de massas no modo de varredura completa da planta que não foi contaminada com As (branco), pode-se verificar a ausência dos íons correspondentes ao DMA e ao MMA, confirmando que não há falso positivo (Figura 28).

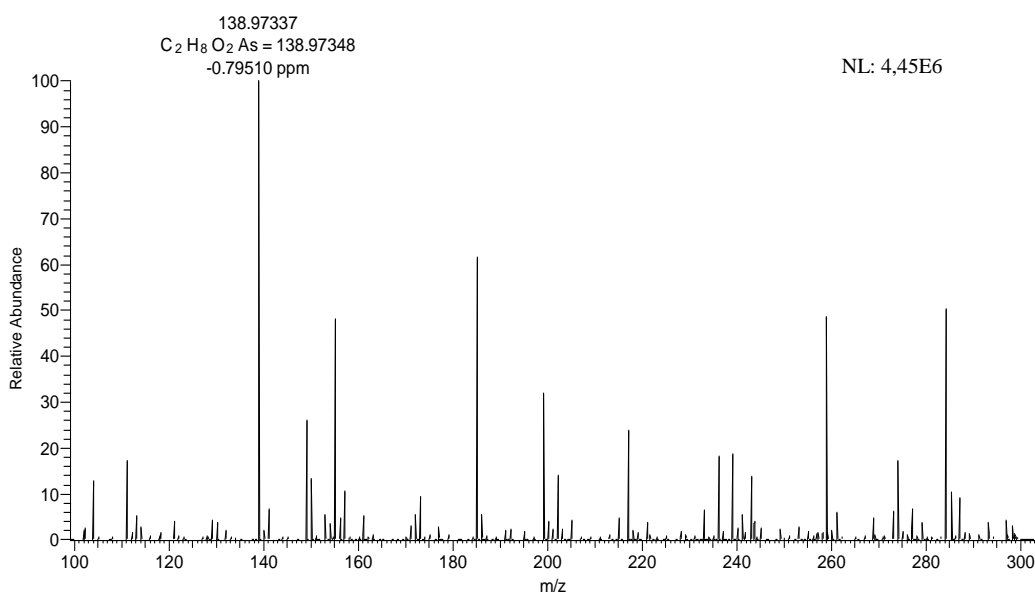


Figura 26. DESI(+))MS para o íon DMA de m/z 138,97.

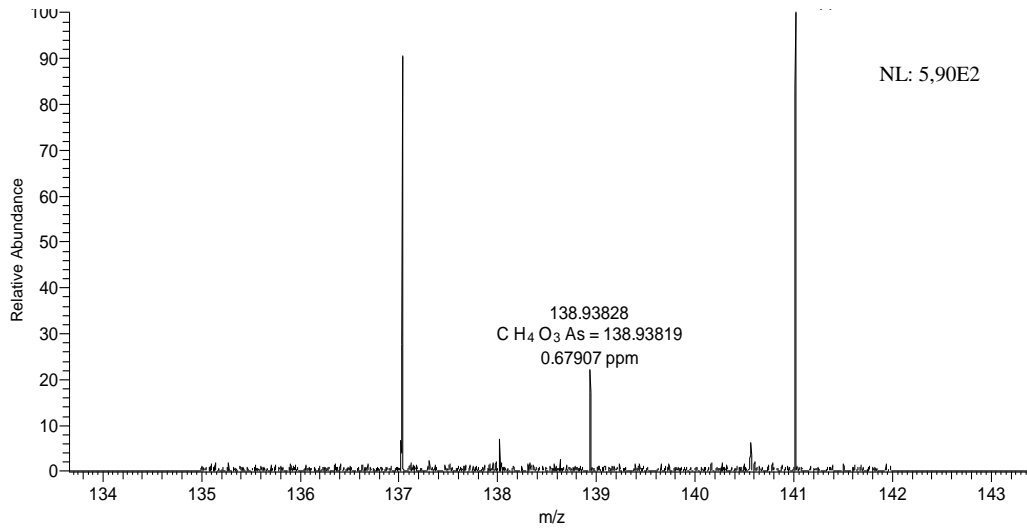


Figura 27. DESI(-)MS para o íon MMA de m/z 138,94.

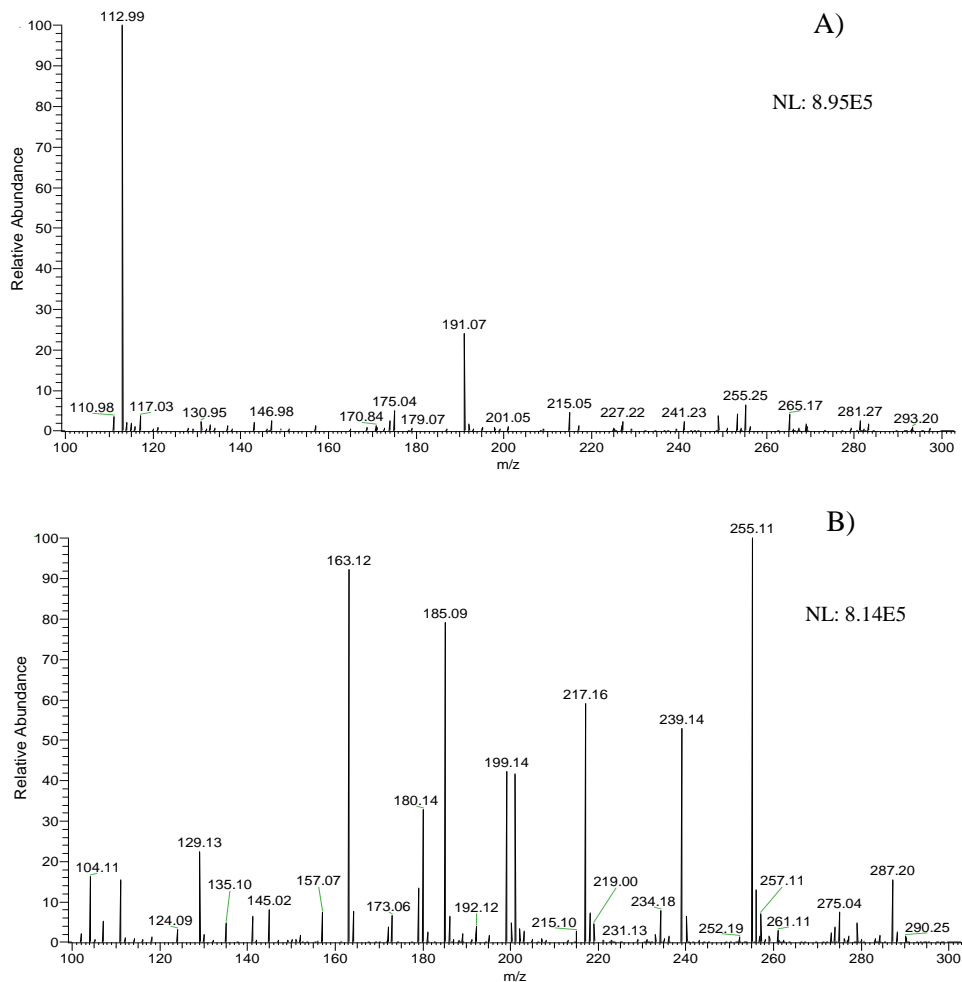


Figura 28. DESI-MS de varredura completa sobre a impressão da folha de samambaia, em filtro de PTFE, não enriquecida com As (branco): A) modo positivo; B) modo negativo. NL indica o nível de normalização em unidade arbitrária.

As espécies de As analisadas no DESI-MS no espectrômetro de massas de alta resolução apresentaram baixa intensidade, confirmando o que foi observado no espectrômetro de massas de baixa resolução, mostrando que essa é uma característica das espécies de As. A exceção nos dois equipamentos é o DMA que ioniza bem e por isso apresenta intensidade mais elevada que as demais espécies.

Neste trabalho, foi demonstrado que a especiação química de As em samambaia é um exemplo de análise direta da planta que não pode ser determinada diretamente com DESI-MS, como tem sido mostrado em alguns trabalhos para outras plantas e outros analitos (Talaty et al., 2005; Jackson et al., 2009; Kennedy e Wiseman, 2010), mas pode ser analisada com DESI-MS de modo indireto. Também ficou demonstrado que DESI-MS é capaz de não somente detectar espécies de As, mas, também, de gerar a imagem referente à distribuição dessas espécies em plantas.

É importante destacar que essa é a primeira vez que DESI-MS e DESI-MSI são empregados para especiação de arsênio em plantas, tanto naturalmente quanto após contaminação. Este trabalho demonstra a capacidade da técnica DESI-MSI para análise uma análise simples beneficiando a etapa de preparo de amostra e com alta estabilidade do sinal para estudos de especiação química. É um grande avanço científico nessa área, pois permite a obtenção de informações sobre a distribuição de diferentes espécies químicas em uma planta, de maneira simples e com uma técnica cada vez mais acessível em laboratórios do mundo todo. Vale ressaltar que já existem trabalhos na literatura que tratam da distribuição espacial de espécies de As em plantas usando as técnicas de XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) (Kachenko et al., 2010; Kopittke et al., 2014). Entretanto, o acesso a essa técnica é mais difícil. Desta forma, acredita-se que esse trabalho abra novas possibilidades para análises de especiação química.

5.6. Análise de especiação de As por PS-MS em samambaias contaminadas naturalmente

Para testar a capacidade do PS-MS em identificar os compostos de As, a princípio foram feitas análises dos padrões de tais compostos (10 mg L^{-1}). Para isso, 10 a 50 μL da solução padrão foram adicionadas sobre o papel triangular, em frente à entrada do

espectrômetro de massas e aplicada uma alta voltagem no papel. Após a adição da solução no papel, selecionou-se a razão m/z do íon de interesse e promoveu-se a fragmentação do íon por colisão com hélio dentro do *trap*, para verificar se o fragmento obtido concordava com os demais resultados obtidos neste trabalho. O modo positivo apresentou melhores resultados do que o modo negativo e, desse modo, optou-se por trabalhar somente nesse modo. Foram feitos testes com soluções padrões de As preparadas em água e em metanol, e observou-se que padrões preparados em metanol apresentam melhora significativa na intensidade do sinal, e, com isso, tal solvente foi escolhido para ser utilizado em todo experimento.

Para se alcançar boa qualidade dos espectros de massas, com intensidade e estabilidade do sinal adequadas, além das condições já otimizadas acima, os seguintes parâmetros foram otimizados: volume de extrato adicionado na superfície do papel (40 μL), voltagem aplicada na base do papel (4 kV) e distância entre o papel e a entrada no espectrômetro de massas (5 mm).

A possibilidade de identificar espécies de As em extratos de planta com o mínimo preparo de amostra foi avaliada a fim de se verificar a aplicabilidade da técnica PS-MS em estudos de especiação química. Diante disso, samambaias contaminadas naturalmente com As de duas diferentes espécies, *Pteris vitatta* e *Pityrogramma calomelanos*, foram analisadas por PS-MS. Para isso, 40 μL do extrato foram depositados no papel filtro cortado em triângulo, disposto em frente à entrada do espectrômetro de massas e aplicada uma alta voltagem (4 kV). Os espectros de massas, no primeiro momento, foram recuperados no modo de varredura completa e, em seguida, selecionou-se a razão m/z do íon de interesse e colidiu-o com hélio dentro do *trap*, para confirmar a identidade do íon analisado.

De acordo com o espectro de massas para a samambaia da espécie *Pteris vitatta* (Figura 29), pode-se inferir que nela estão presentes os compostos inorgânicos de As, As (III) e As (V), de m/z 127 e 143, respectivamente, os quais estão claramente visíveis no espectro de massas de varredura completa (Figura 29A) e foram confirmados com a geração dos fragmentos característicos de cada espécie (Figura 29 B e C). Os íons referentes aos compostos orgânicos, DMA e MMA, de m/z 139 e 141, respectivamente, não apresentaram a fragmentação esperada e assim não foi possível confirmar a presença destes compostos na samambaia (Figura 29 D e E).

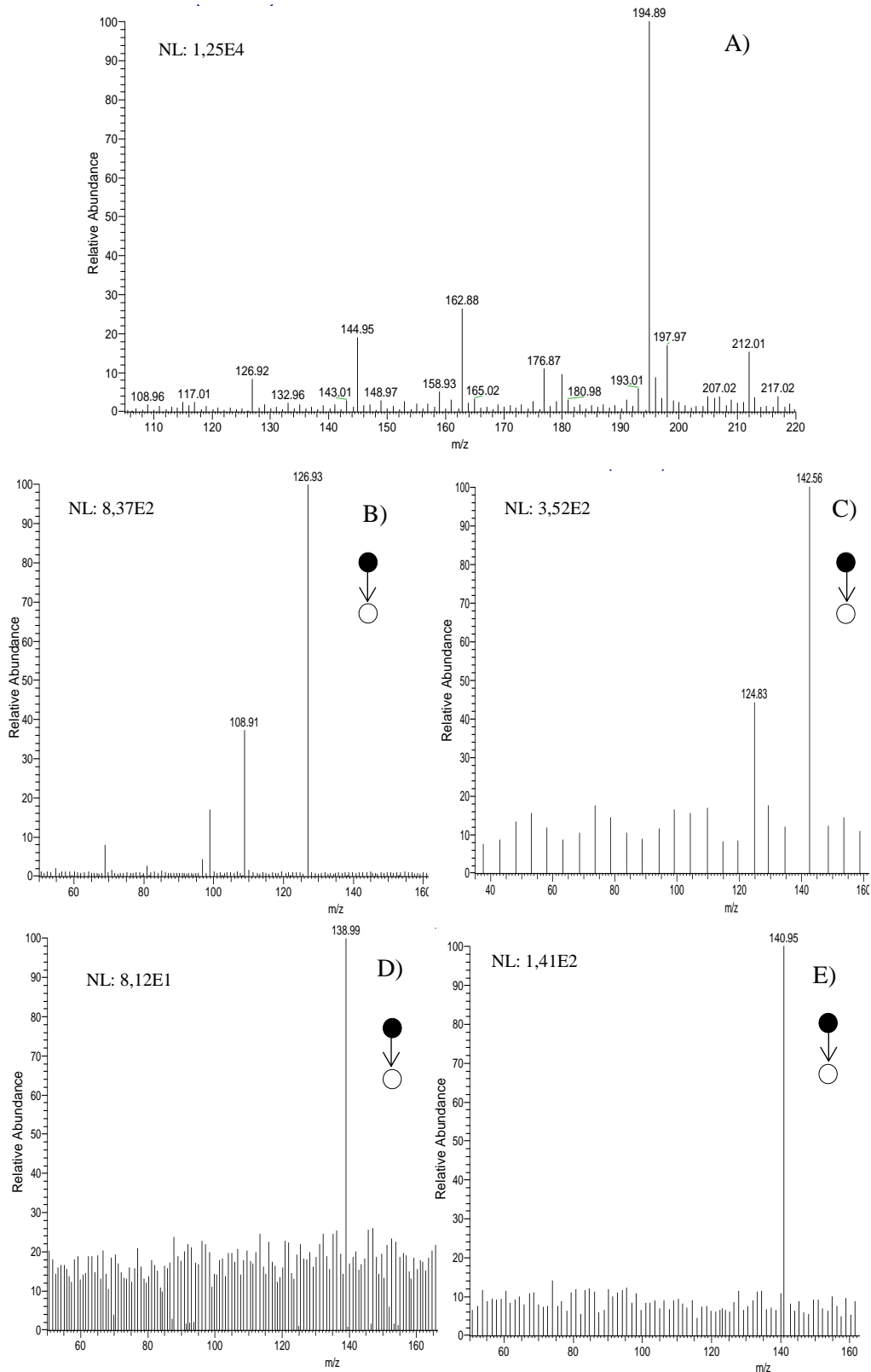


Figura 29. A) PS(+)⁺MS para o extrato da samambaia *Pteris vitatta*; PS(+)⁺MS/MS do extrato da samambaia para B) As (III), íon de m/z 127; C) As (V), íon de m/z 143; D) DMA, íon de m/z 139 e E) MMA, íon de m/z 141.

Para a espécie *Pityrogramma calomelanos* a análise no PS-MS também detectou a presença dos compostos inorgânicos de As, como pode ser visualizado no espectro de massas de varredura completa (Figura 30 A), sendo confirmados por PS-MS/MS de cada espécie (Figura 30B e C). Para os compostos orgânicos, assim como para a *Pteris vittata*, a presença do DMA e MMA não pôde ser confirmada, uma vez que seu perfil característico de fragmentação não foi obtido (Figura 30 D e E).

Análises por LC-ICP-MS foram realizadas a fim de se confirmar os resultados obtidos por PS-MS (Tabela 6), os quais estão em conformidade.

Tabela 6. Concentrações das espécies As (III), As (V), DMA, MMA em folhas de samambaias de duas diferentes espécies contaminadas naturalmente com As determinadas por LC-ICP-MS.

Espécies de As (mg/kg)	Concentração de As em samambaia contaminada naturalmente (mg/kg)	
	<i>Pteris vittata</i>	<i>Pityrogramma calomelanos</i>
As (III)	60,7	25,9
As (V)	742,1	3,2
DMA	< 0,21	< 0,21
MMA	< 0,17	< 0,17

A ionização das espécies de As observadas no PS-MS, assim como para as demais análises realizadas ao longo deste trabalho, apresentaram baixa intensidade, confirmando mais uma vez que a ionização das espécies de As determinadas pelos métodos diretos em espectrometria de massas não é eficiente.

As análises realizadas neste trabalho demonstram a aplicabilidade do PS-MS como um método de varredura rápido e eficiente que pode fornecer informações úteis sobre a presença das espécies de As em plantas, além de servir como complemento para análises futuras em outros métodos analíticos quantitativos de especiação química. Como exemplo, tal varredura permitirá, dentro de um conjunto de amostras, a seleção daquelas que contêm As, como uma pré-análise para métodos analíticos quantitativos, como LC-ICP-MS, diminuindo os recursos e tempo necessário para o lote inteiro.

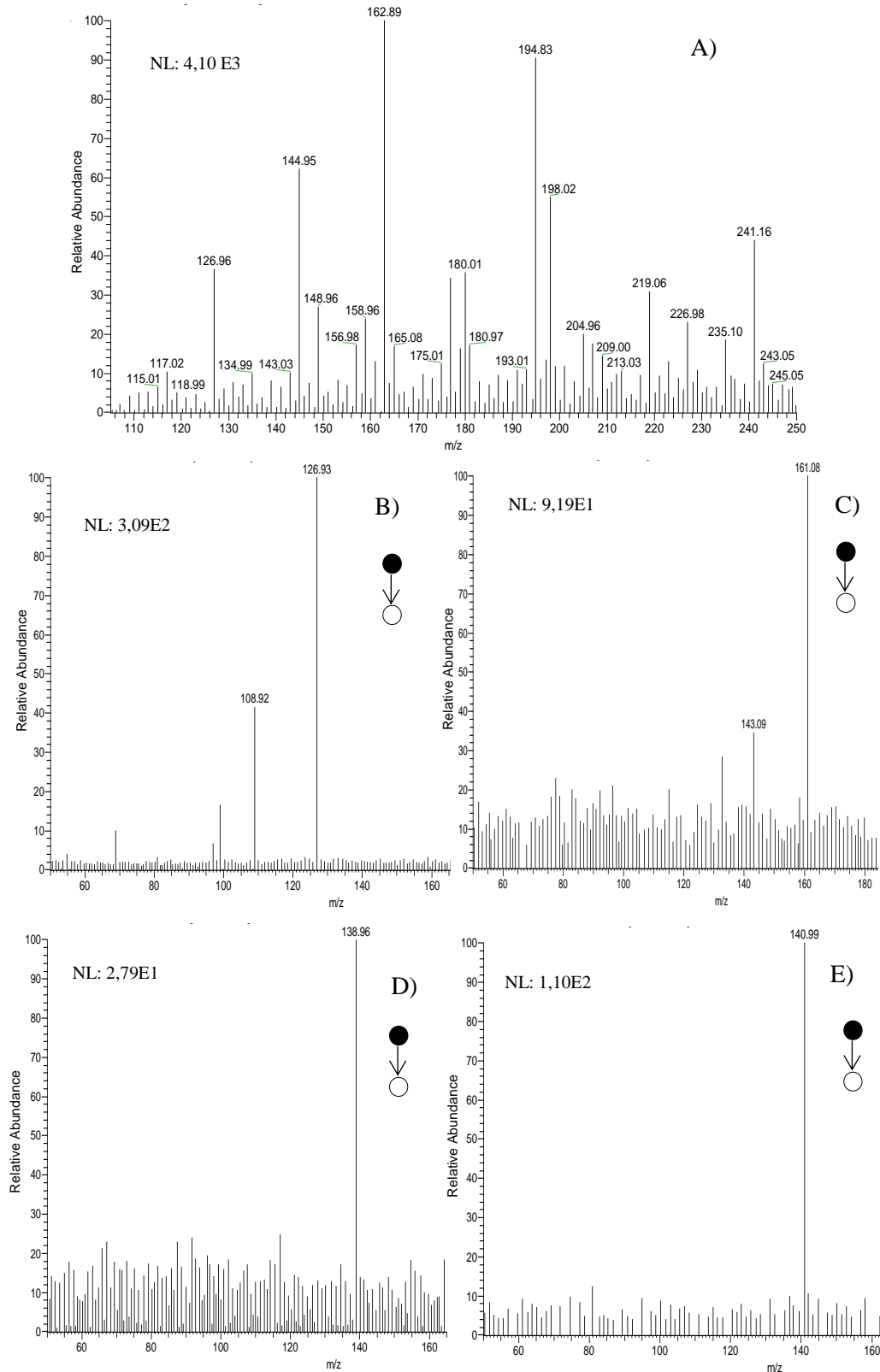


Figura 30. A) PS(+)-MS para o extrato da samambaia *Pityrogramma calomelanos*; PS(+)-MS/MS do extrato da samambaia para B) As (III), íon de m/z 127; C) As (V), íon de m/z 143; D) DMA, íon de m/z 139 e E) MMA, íon de m/z 141.

Além das medições rápidas que permitem a detecção da presença e/ou ausência dos compostos de As, PS-MS é também ambientalmente adequado. Comparando o método convencional de análise de especiação por LC-ICP-MS, utilizada neste trabalho, com o PS-MS, reduziu-se drasticamente o tempo de preparo da amostra, análise e consumo de energia, uma vez que são necessários até 3 dias de secagem da amostra, tempo de digestão das amostras, tempo de resfriamento, tempo de centrifugação e tempo de análise do LC-ICP-MS. Além disso, o consumo de reagentes e gás também foi bastante reduzido, uma vez que no método convencional é necessário o uso de ácido forte, reagente para a fase móvel no cromatógrafo e alto consumo de argônio.

5.6.1. Avaliação da performance analítica por PS-MS

Dentre as técnicas de ionização direta, PS-MS é a que mais tem sido aplicada na geração de dados quantitativos ou semi-quantitativos (Zhang et al., 2012; Paula et al., 2015; Reeber et al., 2015; Klampfl, M. Himmelsbach, 2015). É importante destacar que análises de especiação química quantitativas de plantas por PS-MS não são triviais, uma vez que a representatividade da amostra deve ser garantida. No caso da samambaia, deve-se realizar um estudo para avaliar se todas as folhas tem uma concentração média próxima e qual seria o número necessário de pequenas folhas para garantir a representatividade do material. Deve-se notar que a maioria dos estudos com espectrometria de massas por ionização ambiente é de natureza qualitativa ou incluem estimativas grosseiras (Lebedev, 2015).

Devido às inúmeras variáveis que podem afetar a sensibilidade das análises em PS-MS, dentre elas a distância entre o papel triangular e a entrada do espectrômetro de massas, as dimensões do papel triangular, e o volume da amostra adicionada no papel, o melhor caminho a seguir para melhorar a qualidade dos resultados quantitativos em PS-MS é a adição de um padrão interno. Vários métodos têm sido aplicados para a adição de padrão interno em ionização por PS-MS. Idealmente, o padrão interno deve ser adicionado à amostra antes de qualquer processo de preparo (Reeber et al., 2015). Isso é o que tem sido feito para quantificação de drogas em análises forenses (Paula et al., 2015). No entanto, como isso não é sempre possível de forma simples, diferentes caminhos têm sido investigados para a aplicação de padrão interno em PS-MS (Klampfl e Himmelsbach, 2015). Em análises de herbicidas, o melhor a ser feito é uma aproximação do método onde o padrão interno é adicionado no papel

triangular depois da aplicação da amostra (Reeber et al., 2015). Em análise direta de glicosídeos em folhas o padrão interno é depositado diretamente sobre o triângulo da folha (Zhang et al., 2012).

Neste trabalho, foi checada a possibilidade da adição do padrão interno junto à amostra, antes do preparo. No entanto, devido à forte interferência da matriz, as intensidades do analito e do padrão interno no espectro de massas foram prejudicadas. Desse modo, optou-se por preparar uma curva de calibração e, junto a essa, adicionar o padrão interno. Como o composto orgânico de As, DMA, ioniza facilmente e não foi detectado nas samambaias naturalmente contaminadas, ele foi escolhido como padrão interno na concentração de 10 mg L⁻¹. Além disso, optou-se por traçar a curva somente para os compostos inorgânicos, As (III) e As (V), porque essas são as espécies principalmente encontradas em plantas terrestres.

Os pontos da curva foram obtidos usando a relação da intensidade do analito pela intensidade do padrão interno, sendo que as concentrações para As (III) e As (V), separadamente, foram: 0, 5, 10, 20, 40 mg L⁻¹. Como foi adicionado ao papel triangular 50 µL da solução, a massa real de As analisada foi: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg de As. Foi utilizado o modo positivo do espectrômetro de massas, fazendo varredura total de íons e medindo-se íons de m/z de 100 a 200. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras (*scans*) e utilizando como resultado a intensidade média. Para o As (V), monitorou-se o íon de m/z 161, $[\text{H}_3\text{AsO}_4+\text{H}_3\text{O}]^+$, e para o As (III) monitorou-se o íon de m/z 127, $[\text{H}_3\text{AsO}_3+\text{H}]^+$, e o padrão interno foi monitorado pelo íon de m/z 139, $[(\text{CH}_3)_2\text{AsOOH}+\text{H}]^+$. Os pontos da curva de calibração, para As (III) e As (V), apresentaram boa linearidade com R² igual a 0,996 e 0,995, respectivamente (Figura 31). Cada ponto é referente à média de três replicatas. É importante mencionar que os altos desvios observados em alguns pontos possa ser devido ao fato de ser uma técnica manual e de difícil controle e padronização de todos parâmetros.

Avaliou-se também a precisão e o limite de detecção do método. A precisão foi expressa por meio da repetitividade, usualmente expressa pelo desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. A repetitividade foi caracterizada utilizando-se o mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento sob mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo (INMETRO, 2011). Para isso utilizou-se soluções padrão das quatro espécies de As na concentração de 10 mg.L⁻¹ (0,5µg de As). Foi utilizado o modo positivo do espectrômetro de massas, fazendo varredura total de íons e medindo-se íons de m/z de 100 a 200. Os resultados foram gerados obtendo-se 30 varreduras

(*scans*) e utilizando como resultado a intensidade média. Para cada espécie de As foram monitorados dois íons, $[M+H]^+$ e $[M+H_3O]^+$, e foram feitas 7 repetições.

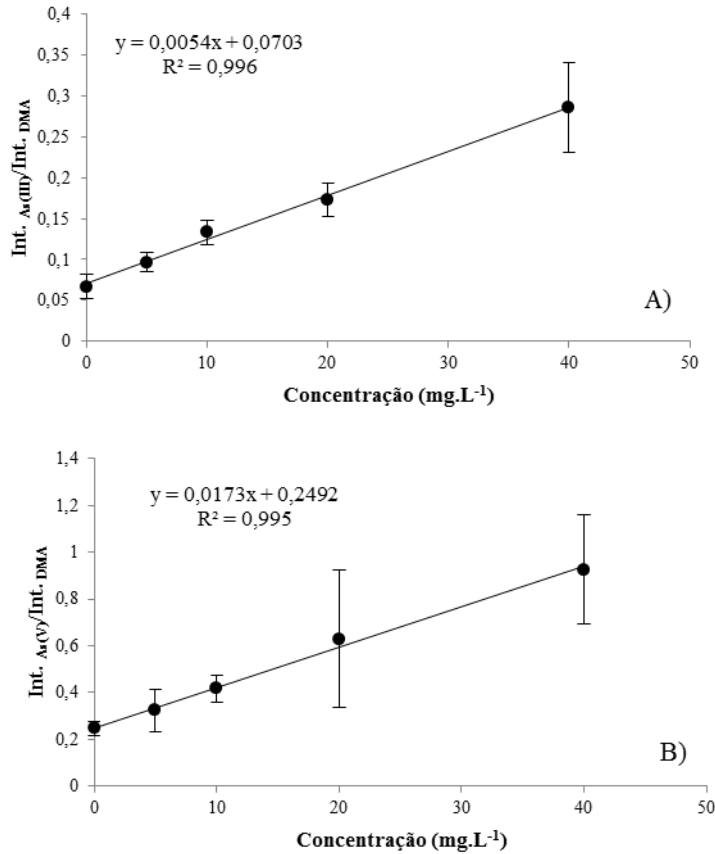


Figura 31. Curva de concentração-resposta para soluções padrões de A) As (III) e B) As (V). Padrão interno: DMA 10 mg.L⁻¹.

Conforme esperado, a precisão obtida pelo PS-MS foi inferior a de outras técnicas bem estabelecidas para especiação química, variando de 11 a 28% (Tabela 7). Conforme discutido, o PS-MS é uma técnica de comandos manuais e de difícil controle, podendo ser influenciada por inúmeras variáveis.

O limite de detecção da técnica, determinado medindo-se separadamente concentrações decrescentes de cada espécie de As até não ser mais possível diferenciar o branco dos padrões, apresentou baixos valores (Tabela 7). Os compostos orgânicos de As, os quais ionizam-se mais facilmente, apresentaram limites de detecção de 2,5 pg de As. Esses

valores são menores do que os apresentados para os compostos inorgânicos, 5 pg de As, pois se ionizam menos em relação aos primeiros.

Tabela 7. Performance analítica do PS-MS para especificação química de As

Íons das espécies de As (<i>m/z</i>)		Figuras de mérito			
		Limite de detecção	Faixa linear	R ²	Precisão
As(III)	127	5 pg	0,25-2 µg de As	0,996	15%
	145				12%
As(V)	143	5 pg	0,25-2 µg de As	0,995	28%
	161				26%
DMA	139	2,5 pg			17%
	157				11%
MMA	141	2,5 pg			28%
	159				21%

A fim de verificar a exatidão da técnica, uma planta foi fortificada com As (III) e As (V) e o extrato obtido foi analisado por PS-MS. No entanto, devido à forte interferência da matriz, os resultados não foram satisfatórios, com recuperações baixas. Outros estudos seriam necessários para tentar minimizar o efeito de matriz, como o preparo de uma curva matrizada, por exemplo. Portanto, apesar da técnica apresentar boa linearidade e limites de detecção baixos, a quantificação dos teores de As em plantas ainda não foi viável. De qualquer maneira, essa técnica se aplica bem para análises qualitativas, podendo ser usada como método de varredura para outras técnicas bem estabelecidas em especificação química.

Apesar de ter sido demonstrada a aplicabilidade e as inúmeras vantagens do PS-MS em análises de especificação química, os desafios da técnica nesse tipo de análise permanecem, principalmente em relação à melhoria na sensibilidade e na reprodutibilidade, mas o seu potencial como complemento para técnicas analíticas convencionais é excelente.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que as técnicas DESI-MS/MS, DESI-MSI e PS-MS/MS podem ser usadas para especiação de compostos orgânicos e inorgânicos de As; uma vez que espectros de massas característicos desses compostos puderam ser obtidos. A aplicação para análise direta de padrões de As e análises de folhas de planta, com o mínimo preparo da amostra, foi demonstrado e confirmado por LC-ICP-MS. Devido às suas características únicas, DESI-MS, PS-MS e DESI-MSI são alternativas atrativas para a identificação de As (III), As(V), DMA e MMA em matrizes complexas.

As das principais características favoráveis dos métodos incluem a velocidade de análise, simplicidade e capacidade de análises *in situ*. A grande vantagem dos métodos é a redução das etapas de pré-tratamento da amostra, o qual reduz possíveis erros analíticos e, para análise de especiação, previne problemas tais como a interconversão de espécies geradas durante o preparo da amostra. Além disso, são excelentes métodos de varredura para técnicas analíticas convencionais de análise de especiação. Porém, possíveis inconvenientes estão presentes, como aqueles relacionados à ocorrência de efeito de matriz, problemas com a homogeneidade da amostra e dificuldades relacionadas com a realização de análises quantitativas. Além desses, vale destacar que dificuldades foram encontradas para a realização deste trabalho, visto que esse era dependente de variações nos equipamentos e ajustes adequados da fonte DESI e *paper spray*. As intensidades obtidas para os íons estudados também não foram altas, dificultando as análises. Um dos motivos é que por serem fonte de fabricação caseira, os ajustes não são de fácil controle e, também, o equipamento utilizado não é o mais sensível. No entanto, trabalhando com espectrômetro de massas mais sensível nas análises no DESI-MSI, pode-se confirmar que é característico das espécies de As a baixa intensidade do sinal, indicando que, à exceção do DMA, os compostos de As são de difícil ionização.

De maneira geral, pode-se concluir que, apesar das inúmeras vantagens e da comprovação do uso das técnicas de ionização ambiente para análises de especiação, DESI-MS, PS-MS e DESI-MSI são técnicas recentes para esse tipo de estudo, sendo esse um dos trabalhos pioneiros na área, o qual ainda está sujeito a muitos aperfeiçoamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. Public Health Statement for Arsenic. Agosto, 2007a. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2-c1-b.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2012.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. The Priority List of Hazardous Substances. 2011. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/l/>>. Acesso em: 30 maio 2012.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. Toxicological profile for arsenic. Atlanta, Georgia, 2007b. 499 p. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2010.

AKTER, k. f.; CHENA, 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**, v. 68, p. 406–415, 2005.

AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants—A review. **Talanta**, v. 115, p. 291–299, 2013.

ANAWAR, H. M. Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 88, p. 30-42, 2012.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. de la. Especificação de arsênio – uma revisão. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 58-70, 2000.

BERGQVIST, C.; GREGER, M. Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats. **Applied Geochemistry**, v. 27, p. 615–622, 2012.

CAMPBELL, I.S.; TON, A.T.; MULLIGAN, C.C. Direct Detection of Pharmaceuticals and Personal Care Products from Aqueous Samples with Thermally-Assisted Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1285-1293, 2011.

CAMPILLO, N.; PEÑALVER, R.; VIÑAS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection. **Talanta**, v. 77, p. 793–799, 2008.

CAMPOS, N. V.; ARCANJO-SILVA, S.; VIANA, I. B.; BATISTA, B. L.; BARBOSA, F.; LOUREIRO, M. E.; RIBEIRO, C.; AZEVEDO, A. A. Arsenic-induced responses in *Pityrogramma calomelanos* (L.): Arsenic speciation, mineral nutrition and antioxidant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 28-35, 2015.

CAREY, A. M.; LOMBI, E.; DONNER, E.; JONGE, M. D.; PUNSHON, T.; JACKSON, B. P.; GUERINOT, M. L.; PRICE, A. H.; MEHARG, A. A. A review of recent developments in

the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3275–3286, 2012.

CHEN, H. W.; HU, B.; ZHANG, X. Principle and Application of Ambient Mass Spectrometry for Direct Analysis of Complex Samples. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1069–1088, 2010.

CHEN, M. L.; MA, L. Y.; CHEN, X. W. New procedures for arsenic speciation: A review. **Talanta**, v. 125, p. 78–86, 2014.

CHEN, R.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D.; TU, M. S.; KERTULIS, G.; MA, L. Q. Arsenic speciation in Chinese brake fern by ion-pair high-performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 199–207, 2004.

CIMINELLI, V. S. T.; SALUM, M. J. G.; RUBIO, J.; PERES, A. E. C. Águas e mineração. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 3. ed. São Paulo: Escrituras, 1999. cap. 13, p. 433–460.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. Decisão de Diretoria n. 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo - 2005, em substituição aos valores orientadores de 2001, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 31 maio 2012.

COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M. Ambient Mass Spectrometry. **Science**, v. 311, p. 1566–1570, 2006.

D'ALOISE, P.; CHEN, H. Rapid determination of flunitrazepam in alcoholic beverages by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. **Science & Justice**, v. 52, p. 2–8, 2012.

DAUS, B.; WENNRICH, R.; MORGENSTERN, P.; WEISS, H.; PALMIERI, H. E. L.; NALINI, H. A.; LEONEL, L. V.; MONTEIRO, R. P. G.; MOREIRA, R. M. Arsenic Speciation in Plant Samples from the Iron Quadrangle, Minas Gerais, Brazil. **Microchimica Acta**, v. 151, p. 175–180, 2005.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T. Natural occurrence of arsenic compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science**, v. 165, p. 1177–1192, 2003.

DEMESMAY, C.; OLLE, M.; PORTHAULT, M. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 348, p. 205–210, 1994.

DESCHAMPS, E.; MELLO, J. Compartimentos ambientais: solos e sedimentos. In: DESCHAMPS, E.; MATSCHULLAT, J. **Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero**. Belo Horizonte: Fundação estadual do meio ambiente, 2007, 330p.

DIETZ, C.; SANZ, J.; SANZ, E.; OLIVAS, R. M.; CÁMARA, C. Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, p. 114–129, 2007.

DILL, A. L.; EBERLIN, L. S.; COSTA, A. B.; IFA, D. R.; COOKS, R. G. Data quality in tissue analysis using desorption electrospray ionization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, July, 2011 A.

DILL, A. L.; EBERLIN, L. S.; IFA, D. R.; COOKS, R. G. Perspectives in imaging using mass spectrometry, v. 47, p. 2741–2746, 2011 B.

DULAY, M. T.; EBERLIN, L. S.; ZARE, R. N. Protein Analysis by Ambient Ionization Mass Spectrometry Using Trypsin-Immobilized Organosiloxane Polymer Surfaces. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 12324–12330, 2015.

ESPY, R. D.; TEUNISSEN, S. F.; MANICKE, N. E.; REN, Y.; OUYANG, Z.; ASTEN, A. V.; COOKS, R. G. Paper Spray and Extraction Spray Mass Spectrometry for the Direct and Simultaneous Quantification of Eight Drugs of Abuse in Whole Blood. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 7712–7718, 2014.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Arsenic compounds, 2000. Disponível em: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/arsenic.html3N_1_>. Acesso em: 31 maio 2012.

EUROPEAN VIRTUAL INSTITUTE FOR SPECIATION ANALYSIS - EVISA. **ESI-MS: The tool for the identification of chemical species**. 2008. Disponível em: <<http://www.speciation.net/Public/Document/2008/10/08/3848.html>>. Acesso em: 03 set. 2012.

EVARD, H.; KRUVE, A.; LÖHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry: Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 221–225, 2015.
FABRIZI, G.; FIORETTI, M.; ROCCA, L.M.; CURINI, R. DESI-MS2: a rapid and innovative method for trace analysis of six cytostatic drugs in health care setting. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, p. 973–983, 2012.

FERREIRA, P. S.; SILVA, D. F. A.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, p. 811–819, 2015.

FELDMANN, J.; KRUPP, E. Elemental imaging and speciation in plant Science. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3261–3262, 2012.

FLORÊNCIO, M. H.; DUARTE, M. F.; BETTENCOURT, A. M. M.; GOMES, M. L.; VILAS BOAS, L. F.. Electrospray Mass Spectra of Arsenic Compounds. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 11, p. 469–473, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series, No. 696, 1983. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_696.pdf>. Acesso em: 08 de novembro de 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Committee on Food Additives and Contaminants. 31st session, Poison Paper on Arsenic. CX/FAC, Alimentarius Commission, Food Standard Programme. Rome, 1999. Disponível em: <https://apps.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/Arsenic99_22e.pdf>. Acesso em: 08 de novembro de 2012.

FRANCESCONI, K. A. Applications of liquid chromatography-electrospray ionization-single quadrupole mass spectrometry for determining arsenic compounds in biological samples. **Applied organometallic chemistry**, v. 16, p. 437-445, 2002.

FRANCESCONI, K.A.; EDMONDS, J.S. Arsenic and marine organisms. **Advances in Inorganic chemistry**, v. 44, p. 147-189, 1997.

FRANCESCONI, K.; VISOOTTIVISETH, P.; SRIDOKCHAN, W.; GOESSLER, W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **The Science of the Total Environment**, v. 284, p. 27-35, 2002.

GALAZZI, R. M.; ARRUDA, M. A. Z. Optimization of a hydride generation metallic furnace atomic absorption spectrometry (HG-MF-AAS) method for tin determination: Analytical and morphological parameters of a metallic atomizer. **Talanta**, v. 117, n.15, p. 543-548, 2013.

GARCÍA-SALGADO, S.; QUIJANO, M. A.; BONILLA, M. M. Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. **Analitycal Chimica Acta**, v. 714, p. 38-46, 2012.

GARCIA-SARTAL, C.; TAEBUNPAKUL, S.; STOKES, E.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; BERMEJO-BARRERA, P.; GOENAGA-INFANTE, H. Two-dimensional HPLC coupled to ICP-MS and electrospray ionisation (ESI)-MS/MS for investigating the bioavailability in vitro of arsenic species from edible seaweed. **Analitycal and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3359-369, 2012.

GARRETT, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R. Revealing the spatial distribution of chlorogenic acids and sucrose across coffee bean endosperm by desorption electrospray ionization-mass spectrometry imagin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 711–717, 2016.

GERBIG, S.; GOLF, O.; BALOG, J.; DENES, J.; BARANYAI, Z.; ZARAND, A.; RASO, E.; TIMAR, J.; TAKATS, Z. Analysis of colorectal adenocarcinoma tissue by desorption

electrospray ionization mass spectrometric imaging. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2315-2325, 2012.

GERBIG, S.; BRUNN, H. E.; SPENGLER, B.; SCHULZ, S. Spatially resolved investigation of systemic and contact pesticides in plant material by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7379–7389, 2015.

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

GONZALVEZ, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; GUARDIA M. de la. A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, p. 129–157, 2009.

HEDEGAARD, R. V.; SLOTH, J. J. Speciation of arsenic and mercury in feed: why and how? **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 15, n. S1, p. 45-51, 2011

HEMALATHA, R. G.; PRADEEP, T. Understanding the Molecular Signatures in Leaves and Flowers by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI MS) Imaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7477–7487, 2013.

HSIEH, Y. J.; JIANG, S. J. Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS Procedures for Arsenic Speciation in Seaweeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2083–2089, 2012.

HSU, C. C.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing life with ambiente mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 31, p. 24-34, 2015.

HUANG, M.; WANG, Y. T.; HO, P. C. Quantification of arsenic compounds using derivatization, solvent extraction and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1381–1391, 2008.

HUANG, J.-H.; HU, K.-N.; DECKER, B. Organic arsenic in the soil environment: speciation, occurrence, transformation, and adsorption behavior. **Water Air Soil Pollut**, v. 219, p. 401-415, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 04. 19 páginas, jul, 2011.

JACKSON, A. U.; TATA, A.; WU, C.; PERRY, R. H.; HAAS, G.; WEST, L.; COOKS, R. G. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 134, p. 867–874, 2009.

- KACHENKO, A. G.; GRÄFE, M.; SINGH, B.; HEALD, S. M. Arsenic speciation in tissues of the hyperaccumulator *P. Calomelanos* var. *Austroamericana* using X-ray absorption spectroscopy. **Environmental Science Technology**, v. 44, p. 4735-4740, 2010.
- KENNEDY, J. H.; WISEMAN, J. M. Direct analysis of *Salvia divinorum* leaves for salvinorin A by thin layer chromatography and desorption electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 24, p. 1305–1311, 2010.
- KHAN, B. I.; SOLO-GABRIELE, H. M.; TOWNSEND, T. G.; CAI, Y. Release of Arsenic to the Environment from CCA-Treated Wood. 1. Leaching and Speciation during Service. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 988-993, 2006.
- KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 44-59, 2015.
- 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**, v. 377, p. 6–13, 2003.
- KOPITTKE, P. M.; JONGE, M. D.; WANG, P.; MCKENNA, B. A.; LOMBI, E.; PATERSON, D. J.; HOWARD, D. L.; JAMES, S. A.; SPIERS, K. M.; RYAN, C. G.; JOHNSON, A. A. T.; MENZIES, N. W. Laterally resolved speciation of arsenic in roots of wheat and rice using fluorescence-XANES imaging. **New Phytologist**, v. 201, p. 1251–1262, 2014.
- KUMARESAN, M.; RIYAZUDDIN, P. Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current science*, v. 80, n. 7, abril, 2001.
- LARIOS, R.; MARTÍNEZ, R. F.; LEHECHO, I.; RUCANDIO, I. A methodological approach to evaluate arsenic speciation and bioaccumulation in different plant species from two highly polluted mining areas. **Science of the Total Environment**, v. 414, p. 600–607, 2012.
- LASKIN, J.; HEATH, B. S.; ROACH, P. J.; CAZARES, L.; SEMMES, O. J. Tissue Imaging Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 141–148, 2012.
- LI, B.; BJARNHOLT, N.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, p. 1241–1246, 2011.
- LI, B.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 348, p. 15–22, 2013 A.
- LI, B.; KNUDSEN, C.; HANSEN, N. K.; JØRGENSEN, K.; KANNANGARA, R.; BAK, S.; TAKOS, A.; ROOK, F.; HANSEN, S. H.; MØLLER, B. L.; JANFELT, C. BJARNHOLT, N.

Visualizing metabolite distribution and enzymatic conversion in plant tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. **The Plant Journal**, v. 74, p. 1059–1071, 2013. **B**

LI, M.; ZHANG, J.; JIANG, J.; ZHANG, J.; GAO, J.; QIAO, .X. Rapid, in situ detection of cocaine residues based on paper spray ionization coupled with ion mobility spectrometry. **Analyst**, , v. 139, 1687-1691, 2014.

LIN, Z.; ZHAO, M.; ZHANG, S.; YANG, C.; ZHANG, X. In situ arsenic speciation on solid surfaces by desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, p. 1268–1275, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 83, p. 7608–7613, 2011.

LEBEDEV, A. T. Ambient ionization mass spectrometry. **Russian Chemical Reviews**, v. 84, p.665-692, 2015.

LEI, M.; WAN, X. M.; HUANG, Z. C.; CHEN, T. B.; LI, X. W.; LIU, Y. R. First evidence on different transportation modes of arsenic and phosphorus in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 1-7, 2012.

LOMAX, C.; LIU, W. J.; WU, L.; XUE, K.; XIONG, J.; ZHOU, J.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A.; MILLER, A. J.; ZHAO, F. J. Methylated arsenic species in plants originate from soil Microorganisms. **New Phytologist**, v. 193, p. 665–672, 2012.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. **Analyst**, v.126, p. 1630-1632, 2001.

LORDEIRO, R. A. **Construção de uma fonte EASI-MS (easy ambient sonic-spray ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense**. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

LOSTUN, D.; PEREZ, C. J.; LICENCE, P.; BARRETT, D. A.; IFA, D. R. Reactive DESI-MS Imaging of Biological Tissues with Dicationic Ion-Pairing Compounds. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 3286–3293, 2015.

MA, L. Q.; KOMAR, K. M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E. D. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, v. 409, p. 579, 2001.

MATHEWS, S.; MA, L. Q.; RATHINASABAPATHI, B.; NATARAJAN, S.; SAHA, U. K. Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8024–8030, 2010.

- MEERMANN, B.; BARTEL, M.; SCHEFFER, A.; TRÜMPLER, S.; KARST, U. Capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometric and electrospray time of flight mass spectrometric detection for the determination of arsenic species in fish samples. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2731–2737, 2008.
- MEHARG, A. A.; WHITAKER, J. H. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, v. 154: 29–43, 2002.
- MELLENDEZ L.B.; SILVA-FILHO, E. V.; MIEKELEY, N.; VIEIRA, F. A.; SELLA, S. M. Determination of Arsenic Species in *P. calomelanos* and *N. biserrata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1961-1967, 2011.
- KÖTSCHAU, A.; BÜCHEL, G.; EINAX, J. W.; FISCHER, C.; VON TÜMPLING, W.; MERTEN, D. Mapping of macro and micro elements in the leaves of sunflower (*Helianthus annuus*) by Laser Ablation–ICP–MS. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 783–789, 2013.
- MIR, K. A.; RUTTER, A.; KOCH, I.; SMITH, P.; REIMER, K. J.; POLAND, J. S. Extraction and speciation of arsenic in plants grown on arsenic contaminated soils. **Talanta**, v. 72, p. 1507–1518, 2007.
- MIRABELLI, M. F.; IFA, D. R.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Analysis of sexual assault evidence: statistical classification of condoms by ambient mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, p. 749–755, 2015.
- MIRANDES, T. L.; CHANCHO, M. J. R.; BARBERO, M.; RUBIO, R.; SANCHEZ, J. F. L. Determination of Water-Soluble Arsenic Compounds in Commercial Edible Seaweed by LC-ICPMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12963–12968, 2011.
- MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.
- MOREIRA, C. M.; DUARTE, F. A.; LEBHERZ, J.; POZEBON, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Arsenic speciation in white wine by LC–ICP–MS. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1406-1411, 2011.
- MORELATO, M; BEAVIS, A; OGLE, A; DOBLE, P; KIRKBRIDE, P; ROUX, C. Screening of gunshot residues using desorption electrospray ionisation-mass spectrometry (DESI-MS). **Forensic science international**, v. 217, p. 101-106, 2012.
- MORITA, M.; EDMONDS, J. S. Determination of arsenic species in environmental and biological samples, **Pure Applied Chemistry**, v. 64, p. 575–590, 1992.
- MÜLLER, T.; ORADU, S.; IFA, D. R.; COOKS, R. G.; KRÄUTLER, B. Direct Plant Tissue Analysis and Imprint Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 5754–5761, 2011.

MUSIL, S.; PÉTURSDÓTTIR, A. H.; RAAB, A.; GUNNLAUGSDÓTTIR, H.; KRUPP, E.; FELDMANN, J. Speciation without Chromatography Using Selective Hydride Generation: Inorganic Arsenic in Rice and Samples of Marine Origin. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 993–999, 2014.

NAM, S. H.; OH, H. J.; MIN, H. S.; LEE, J. H. A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC–ICP-MS. *Microchemical Journal*, v. 95, p. 20–24, 2010.

NIAZI, N. K.; SINGH, B.; ZWIETEN, L. V.; KACHENKO, A. G. Phytoremediation of an arsenic-contaminated site using *Pteris vittata L.* and *Pityrogramma calomelanos var. austroamericana*: a long-term study. **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, p. 3506–3515, 2012.

NIELEN, M.W.F.; HOOIJERINK, H.; ZOMER, P.; MOL, J.G.J. Desorption electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of chemical food contaminants in food. **Trends in analytical chemistry**, v. 30, p. 165-180, 2011.

NOGUEIRA, M. Os elementos da Morte. *Superinteressante*, v. 218, out., 2005. Disponível em: <http://super.abril.com.br/ciencia/elementos-morte-446035.shtml>. Acesso em: 25/07/2012.

NYADONG, L.; LATE, S.; GREEN, M. D.; BANGA, A.; FERNÁNDEZ, F. M. Direct Quantitation of Active Ingredients in Solid Artesunate Antimalarials by Noncovalent Complex Forming Reactive Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, p. 380–388, 2008.

PALMIERI, H. E. L. Distribuição, especiação e transferência Hg e As para a biota em áreas do sudeste do Quadrilátero Ferrífero, MG. 2006. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2006.

PAULA, C. C. A.; LORDEIRO, R. A.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry applied to the detection of cocaine in simulated samples. **Analytical Methods**, v. 7, p. 9145–9149, 2015.

PÉTURSDÓTTIR, A. H.; GUNNLAUGSDÓTTIR, H.; JÖRUNDSÓTTIR, H.; RAAB, A.; KRUPP, E. M.; FELDMANN, J. Determination of inorganic arsenic in seafood: emphasizing the need for certified reference materials. **Pure Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 191-202, 2012.

PIRRO, V.; EBERLIN, L. S.; OLIVERI, P.; COOKS, R.G. Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections. **Analyst**, v. 137, p. 2374-2380, 2012

POPP, M.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 114–129, 2010.

PROHASKA, T.; STINGEDER, G. Speciation of Arsenic. In: CORNELIS, R.; CREWS, H.; CARUSO, J.; HEUMANN, K. G. **Handbook of elemental speciation II: species in the**

environment, food, medicine and occupational speciation. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. cap. 2.4. p. 69-85.

PROUST N.; BUSCHER W.; SPERLING M. Speciation and the emerging legislation. In: CORNELIS, R.; CREWS, H.; CARUSO, J.; HEUMANN, K. G. **Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational speciation.** Chichester: John Wiley & Sons, 2005. cap. 4. p.737-744.

RABER, G.; STOCK, N.; HANEL, P.; MURKO, M.; NAVRATILOVA, J.; FRANCESCONI, K. A. An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. **Food Chemistry**, v. 134, p. 524–532, 2012.

REEBER, S. L.; GADI, S.; HUANGB, S. B.; GLISH, G. L. Direct analysis of herbicides by paper spray ionization mass spectrometry. **Analitical Methods**, v. 7, p. 9808–9816, 2015.

REZENDE, P. S.; COSTA, L. M.; WINDMÖLLER, C. C. Arsenic Mobility in Sediments from Paracatu River Basin, MG, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 588–602, 2015.

RUBIO, R.; RUIZ-CHANCHO, M. J.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 53-69, 2010.

SALGADO, S. G.; CASILLAS, D. G.; QUIJANO-NIETO, A.; SIMÓN, M. B. Arsenic and Heavy Metal Uptake and Accumulation in Native Plant Species from Soils Polluted by Mining Activities. **Water Air Soil Pollution**, v. 223, p. 559–572, 2012.

SANCHEZ-RODAS, D.; CORNS, W. T.; CHEN, B.; STOCKWELL, P. B. Atomic Fluorescence Spectrometry: a suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 933-946, 2010.

SARTAL, C. G.; TAEBUNPAKUL, S.; STOKES, E.; ALONSO, M. C. B.; BARRERA, P. B.; INFANTE, H. G.

Two-dimensional HPLC coupled to ICP-MS and electrospray ionisation (ESI)-MS/MS for investigating the bioavailability in vitro of arsenic species from edible seaweed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3359–3369, 2012.

SERÓ, R.; NÚÑEZ, O.; BOSCH, J.; GRASES, J. M.; RODRÍGUEZ, P.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Desorption electrospray ionization-high resolution mass spectrometry for the screening of veterinary drugs in cross-contaminated feedstuffs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7369–7378, 2015.

SHI, R. Z.; GIERARI, E. T. M. E.; MANICKE, N. E.; FAIX, J. D. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry (PS-MS/MS). **Clinica Chimica Acta**, v. 441, p. 99–104, 2015.

SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z. Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves. **Metallomics**, v. 5, p. 62-67, 2013.

SINGH, N.; MA, L. Q. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L.. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 238-246, 2006.

SOKOL, E.; JACKSON, A. U.; COOKS, R. G. Trace detection of inorganic oxidants using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, n. 5, p., 790-797, 2011.

SRIMANY, A.; IFA, D. R.; NAIK, H. R.; BHAT, V.; COOKS, R. G.; PRADEEP, T. Direct analysis of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). **Analyst**, v. 136, p. 3066-3068, 2011.

SU, Y.; WANG, H.; LIU, J.; WEI, P.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. **Analyst**, v. 138, p. 4443-4447, 2013.

SUÁREZ, C. A. Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar como detectores atômicos. 2010. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SUNI, N. M.; AALTO, H.; KAUPPILA, T. J.; KOTIAHO, T.; KOSTIAINEN, R. Analysis of lipids with desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS). **Journal of Mass spectrometry**, v. 47, p. 611-619, 2012.

SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Hyphenated Techniques in Speciation Analysis. In: **The Concept of Speciation Analysis and Hyphenated Techniques**. Loughborough: RSC Chromatography Monographs, 2002. cap. 1, p. 2-13.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. **Science**, v. 306, p. 471-473, 2004.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. **Journal of mass spectrometry**, v. 40, p. 1261-1275, 2005.

TALATY, N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. **Analyst**, v. 130, p. 1624-1633, 2005.

TALATY, N.; MULLIGAN, C. C.; JUSTES, D. R.; JACKSON, A. U.; NOLL, R. J.; COOKS, R. G. Fabric analysis by ambient mass spectrometry for explosives and drugs. **Analyst**, v.133, p. 1532-1540, 2008.

TATA, A.; ZHENG, J.; GINSBERG, H. J.; JAFFRAY, D. A.; IFA, D. R.; A. ZARRINE-AFSAR. Contrast Agent Mass Spectrometry Imaging Reveals Tumor Heterogeneity. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 7683-7689, 2015.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P.; ŁOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

THUNIG, J.; FLO, L.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HANSEN, S.H.; JANFELT, C. Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 26, p. 133-140, 2012.

THUNIG, J.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Analysis of Secondary Plant Metabolites by Indirect Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3256–3259, 2011.

TU, C.; MA, L. Q.; BONDADA, B. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese Brake (*Pteris vittata* L.) and its utilization potential for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 1671–1675, 2002.

VACLAVIKOVA, M.; GALLIOS, G.P.; HREDZAK, S.; JAKABSKY, S. Removal of arsenic from water streams: an overview of available techniques. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 10, p. 89–95, 2008.

VASCONCELOS, O.; PALMIERI, H.; MATSCHULLAT, J.; DESCHAMPS, E. Compartimentos ambientais: biosfera. In: DESCHAMPS, E.; MATSCHULLAT, J. **Arsênio antropogênico e natural: um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero**. Belo Horizonte: Fundação estadual do meio ambiente, 2007, 330p.

VETTERLEIN, D.; WESENBERG, D.; NATHAN, P.; BRAUTIGAM, A.; SCHIERHORN, A.; MATTUSCH, J.; JAHN, R. *Pteris vittata* – Revisited: Uptake of As and its speciation, impact of P, role of phytochelatins and S. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3016–3024, 2009.

VISMEH, R.; WALDON, D. J.; TEFFERA, Y.; ZHAO, Z. Localization and Quantification of Drugs in Animal Tissues by Use of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 12, p. 5439–5445, 2012.

XUE, P.; YAN, C.; SUN, G.; LUO, Z. Arsenic accumulation and speciation in the submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, p. 3969–3976, 2012.

WANG, J.; ZHAO, F. J.; MEHARG, A. A.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MCGRATH, S.P. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1552–1561, 2002.

WANG, H.; REN, Y.; MCLUCKEY, M. N.; MANICKE, N. E.; PARK, J.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct Quantitative Analysis of Nicotine Alkaloids from Biofluid Samples using Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 11540–11544, 2013.

- WANG, H.; MANICKE, N. E.; YANG, Q.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct Analysis of Biological Tissue by Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1197–1201, 2011.
- WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 49, p. 877–880, 2010.
- WEBB, S. M.; GAILLARD, J. F.; MA, L. Q.; TU, C. XAS speciation of arsenic in a hyper-accumulating fern. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 754-760, 2003.
- WISEMAN, J. M.; IFA, D. R.; SONG, Q. Y.; COOKS, R. G. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 7188–7192, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Environmental Health Criteria 224 for arsenic and arsenic compounds. Second edition, Geneva, 2001. Disponível em: < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>>. Acesso em: 30 maio 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Exposure to arsenic: A major public health concern, 2010. Disponível em: < <http://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf>>. Acesso em : 30 maio 2012.
- YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPELL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal Mass Spectrometry**, v. 312, p. 201-207, 2012.
- YAO, Z. P. Characterization of proteins by ambient mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, p. 437–447, 2012.
- YUAN, C.; LU, X.; ORO, N.; WANG, Z.; XIA, Y.; WADE, T. J.; MUMFORD, J.; LE, X. C. Arsenic Speciation Analysis in Human Saliva. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 163–171, 2008.
- ZHANG, W.; YONG, C.; TU, C.; MA, L. Q. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. **The Science of the Total Environment**, v. 300, p. 167–177, 2002.
- ZHANG, J. I.; LI, X.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Direct analysis of steviol glycosides from Stevia leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. **Analyst**, v. 137, p. 3091–3098, 2012.
- ZHENG, J.; HINTELMANN, H.; DIMOCK, B.; DZURKO, M. S.. Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP–MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 14–24, 2003.
- ZMOZINSKI, A. V.; LLORENTE-MIRANDES, T.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J. F.; SILVA, M. M. Establishment of a method for determination of arsenic species in seafood by LC-ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1073–1082, 2015.

ANEXOS

ANEXO A

**Espectros dos íons dos padrões das espécies As (III), As (V), DMA e MMA, em água,
determinadas por ESI-MS**

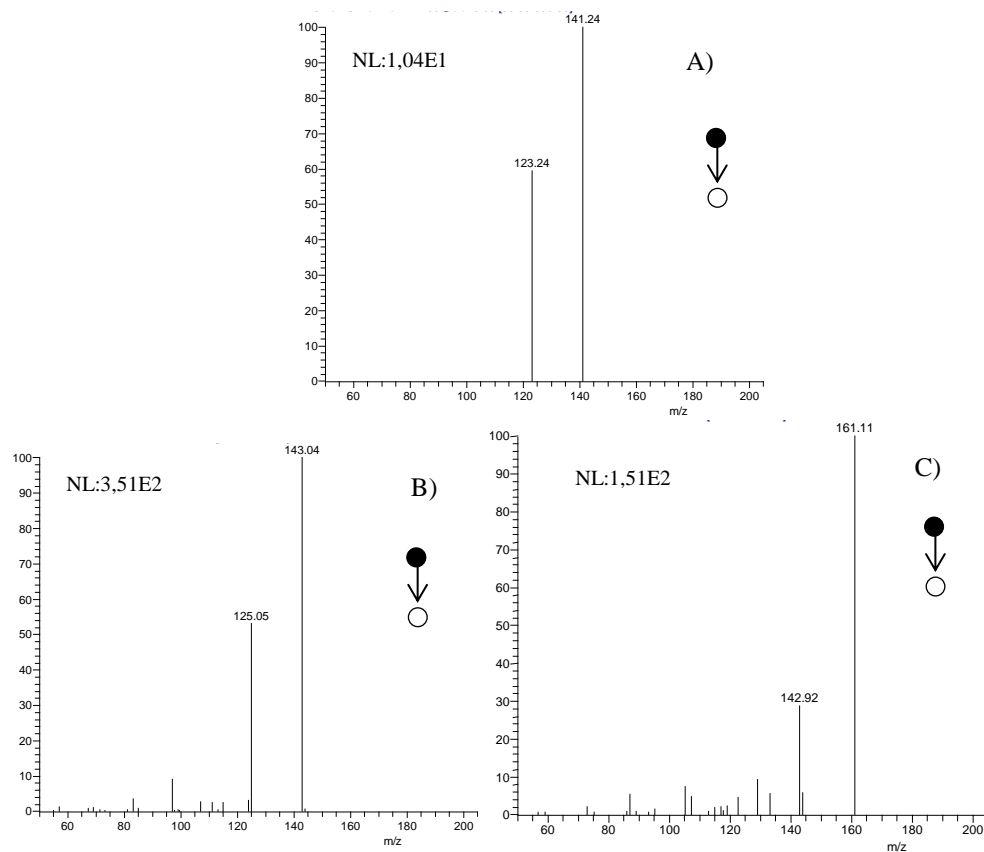


Figura A1. A) ESI(-)MS/MS para o íon As (V) de m/z 141; ESI(+)-MS/MS para o íon As (V) de B) m/z 143 e C) m/z 161. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em água.

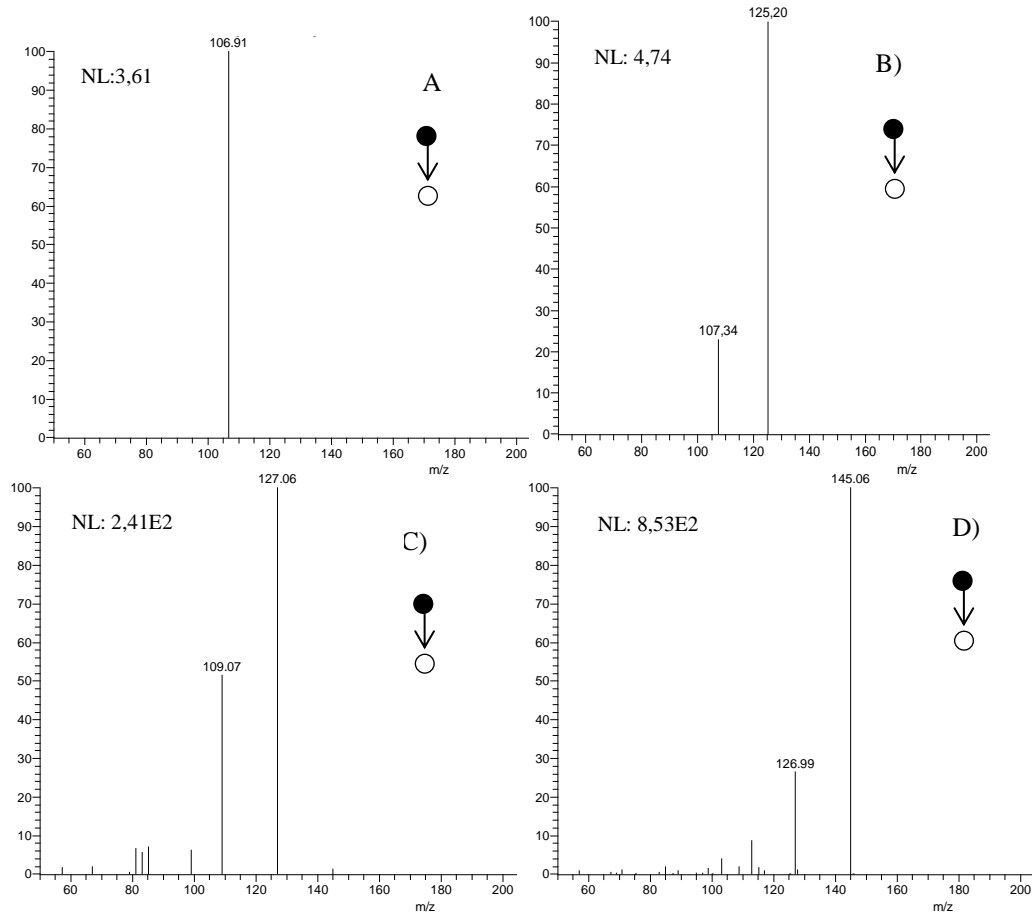


Figura A2. ESI(-)MS/MS para o íon As (III) de A) m/z 107 e B) m/z 125; ESI(+)-MS/MS para o íon As (III) de B) m/z 125 e C) m/z 145. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em água.

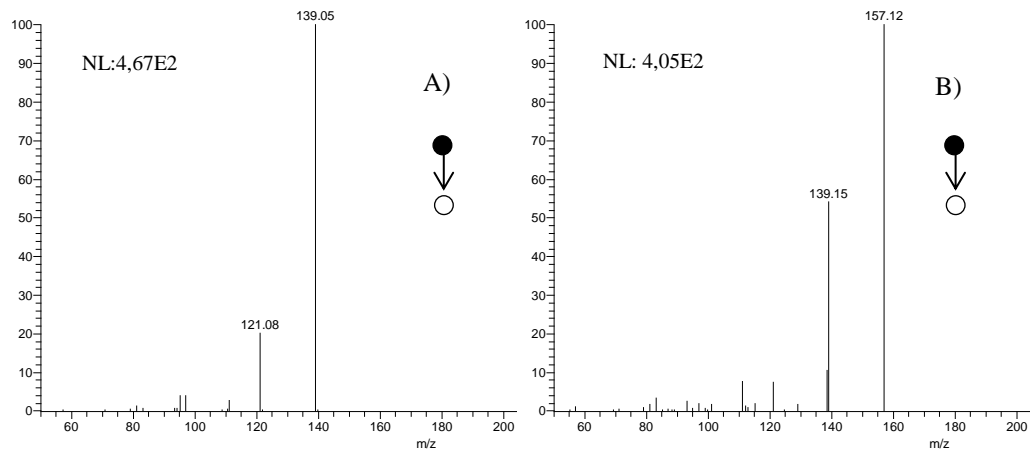


Figura A3. ESI(+)-MS/MS para o íon DMA de A) m/z 139 e B) m/z 157. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em água.

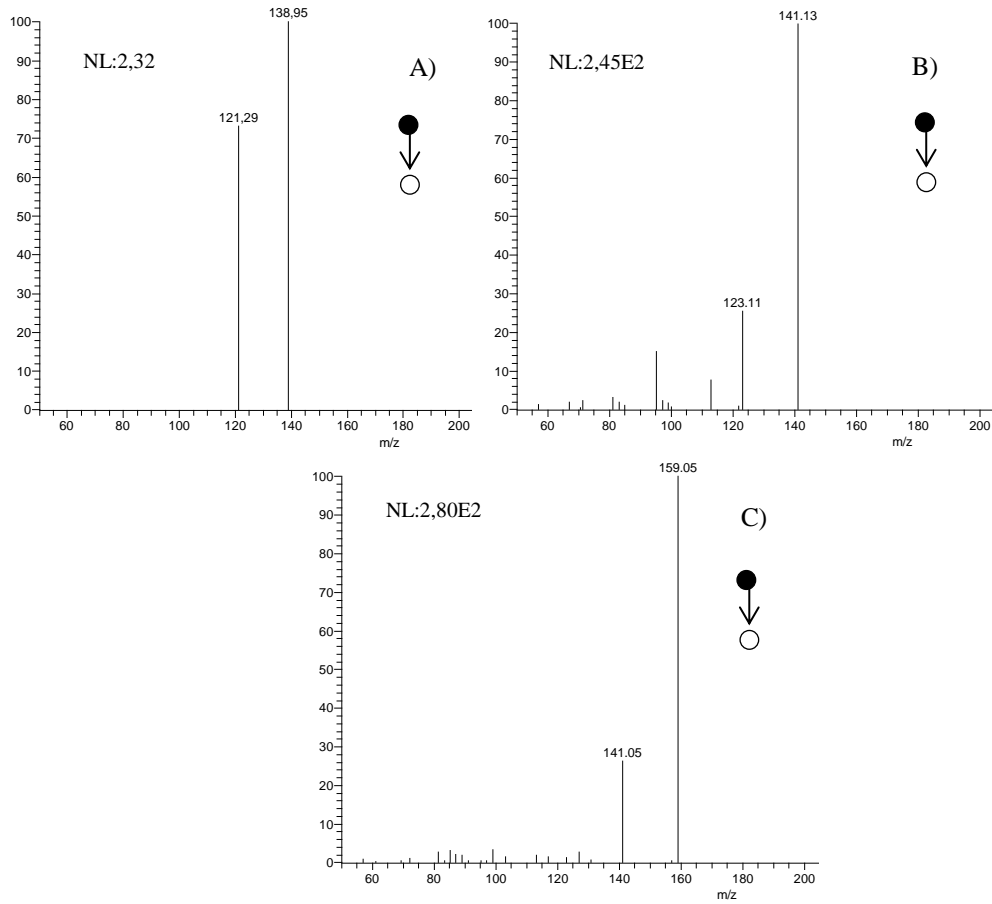


Figura A4. ESI(-)MS/MS para o íon MMA de A) m/z 139; ESI(+)-MS/MS para o íon MMA de B) m/z 141 e C) m/z 159. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em água.

ANEXO B

Espectros dos íons dos padrões das espécies As (III), As (V), DMA e MMA, em metanol:água, determinadas por ESI-MS

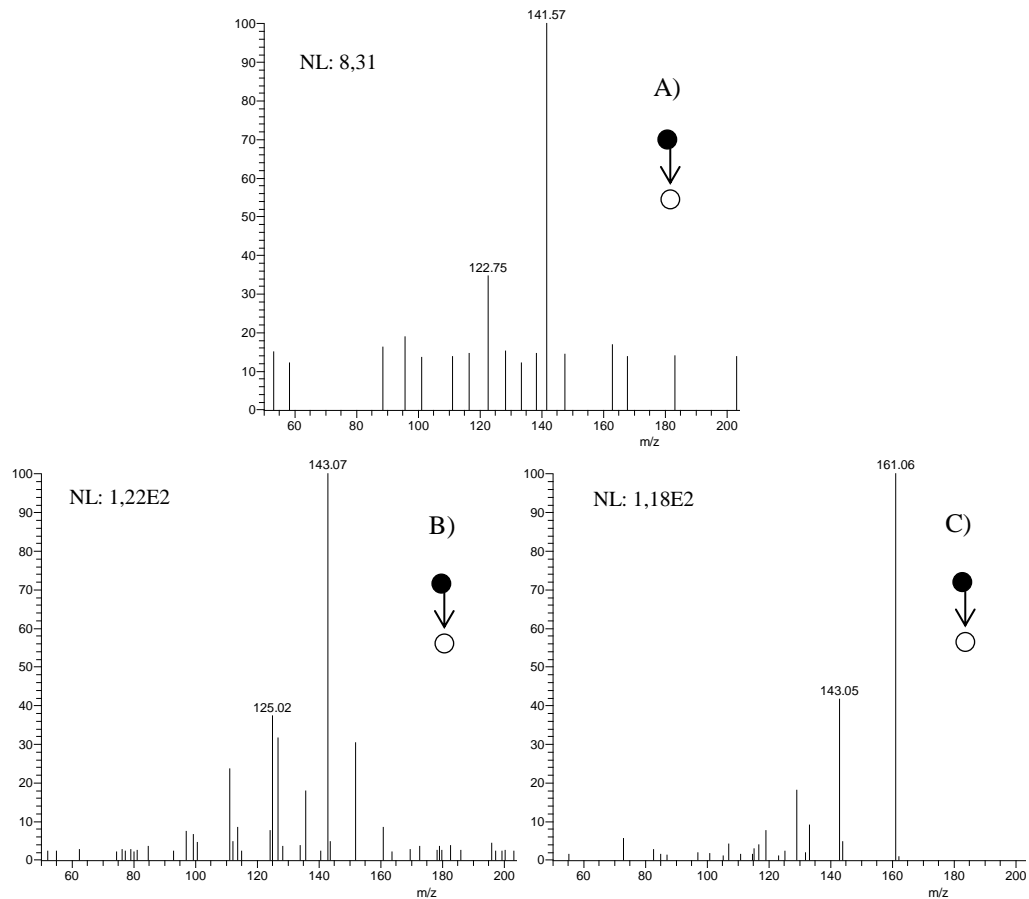


Figura B1. A) ESI(-)MS/MS para o íon As (V) de m/z 141; ESI(+)-MS/MS para o íon As (V) de B) m/z 143 e C) m/z 161. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em metanol:água.

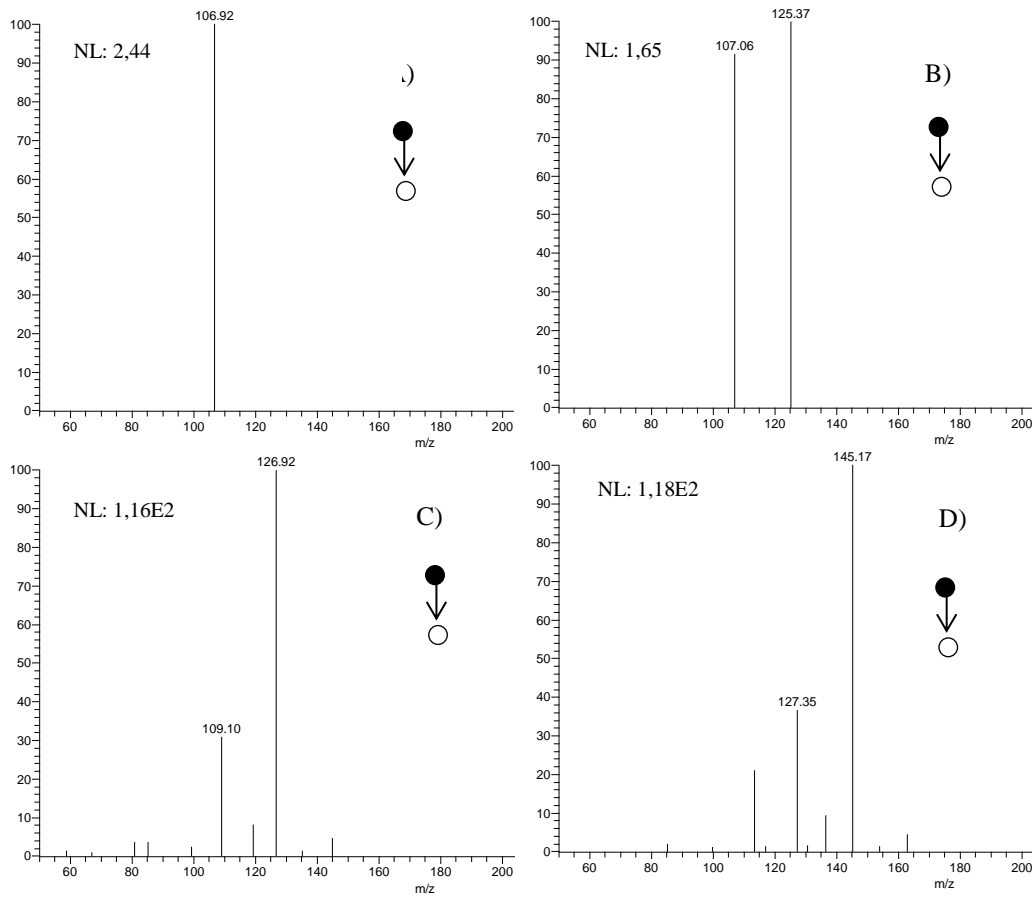


Figura B2. ESI(-)MS/MS para o íon As (III) de A) m/z 107 e B) m/z 125; ESI(+)-MS/MS para o íon As (III) de B) m/z 127 e C) m/z 145. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em metanol:água.

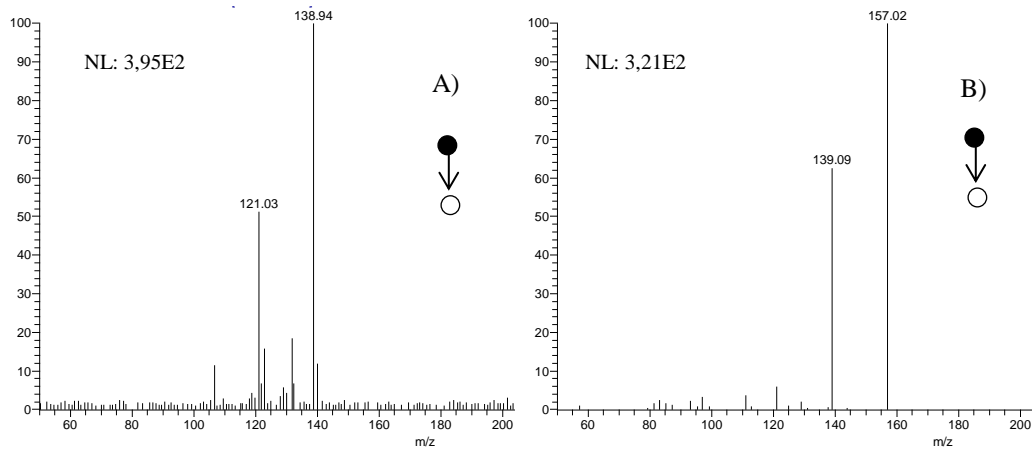


Figura B3. ESI(+)-MS/MS para o íon DMA de A) m/z 139 e B) m/z 157. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em metanol:água.

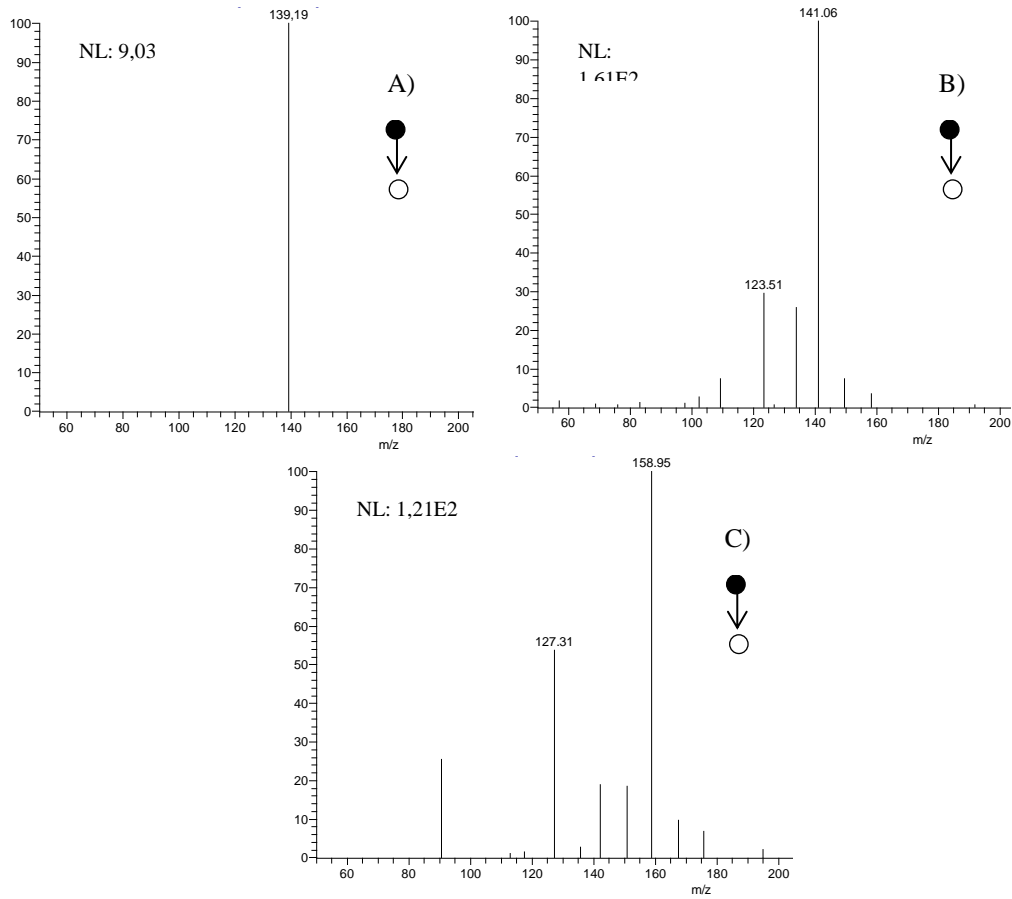


Figura B4. A) ESI(-)MS/MS para o íon MMA de m/z 139; ESI(+)MS/MS para o íon MMA de B) m/z 141 e C) m/z 149. A concentração da solução foi de 1 mg.L^{-1} em metanol:água.

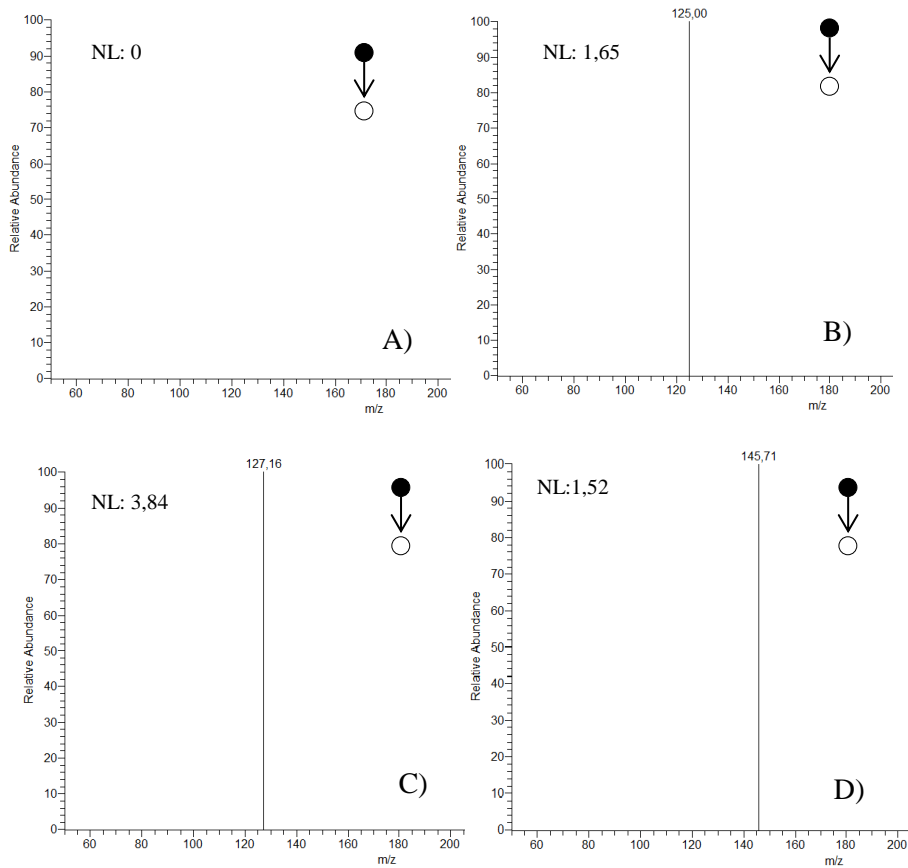
ANEXO C**Espectros de massas para o branco do papel para as quatro espécies de As estudadas**

Figura C1. DESI(-)MS/MS do papel utilizado nas análises para o íon As (III) de A) m/z 107; B) m/z 125; e DESI(+)MS/MS para o íon As (III) de C) m/z 127; D) m/z 145.

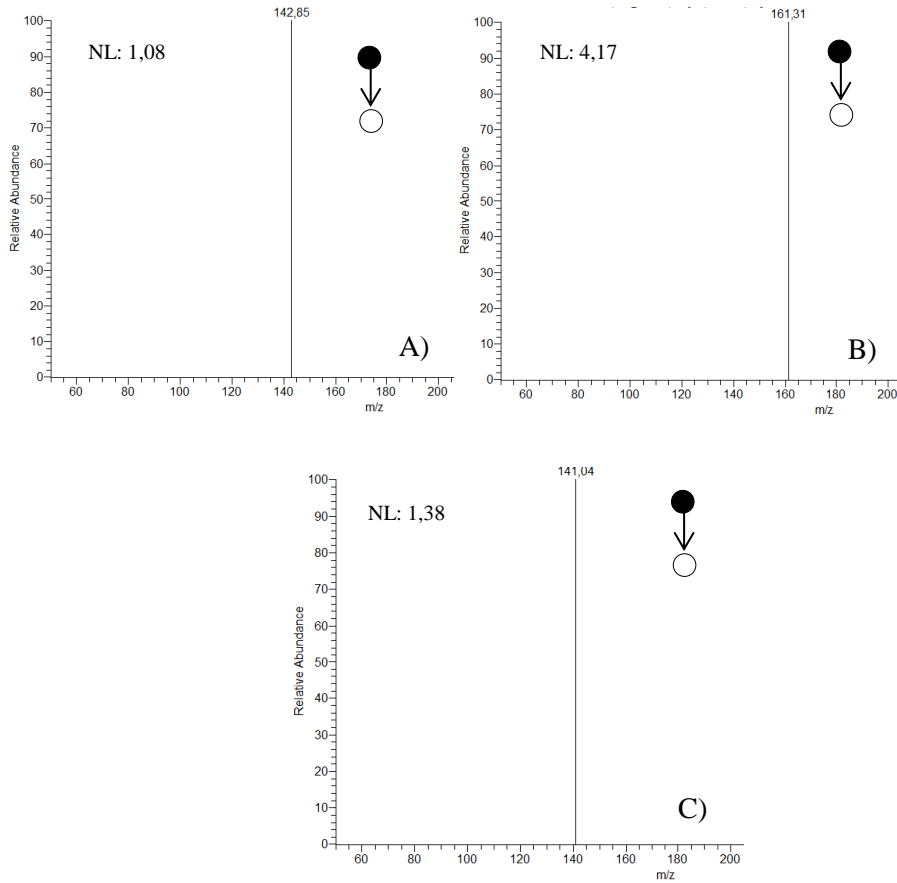


Figura C2. DESI(+)-MS/MS do papel utilizado nas análises para o íon As (V) de A) m/z 143; B) m/z 161; e DESI(-)-MS/MS para o íon As (V) de C) m/z 141.

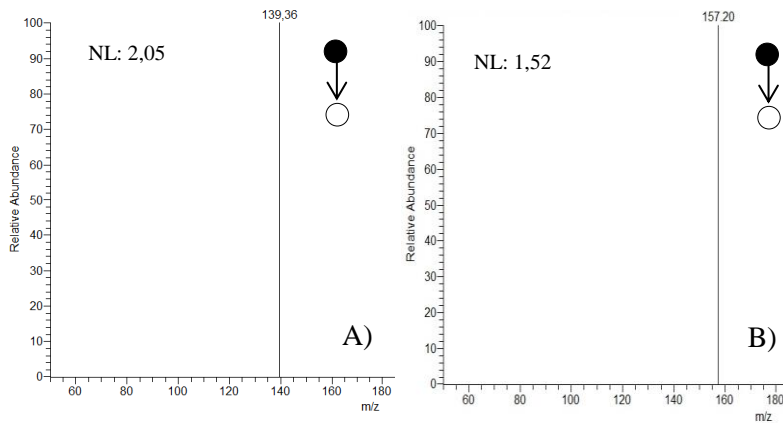


Figura C3. DESI(+)-MS/MS do papel utilizado nas análises para o íon DMA de A) m/z 139 e B) m/z 157.

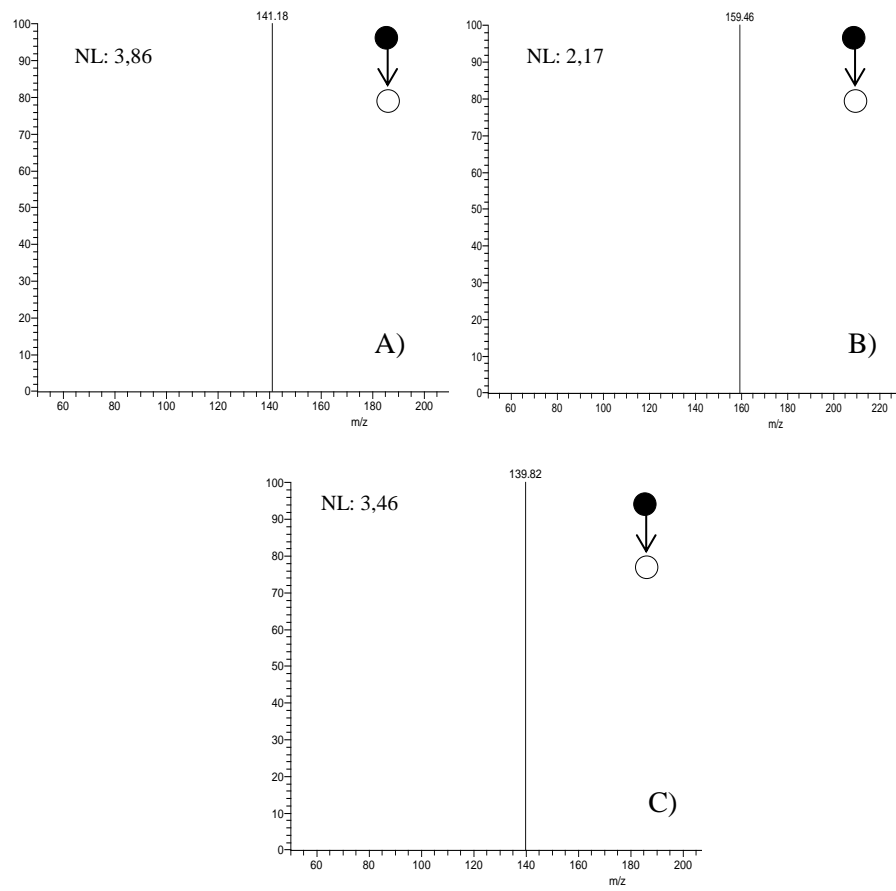


Figura C4. DESI(+)-MS/MS do papel utilizado nas análises para o íon MMA de A) m/z 141 e B) m/z 159; e DESI(-)-MS/MS para o íon MMA de C) m/z 139.