

Alexandre Martins Moniz de Bettencourt

Biogeoquímica
Tejo

ESPECIAÇÃO E BIOGEOQUÍMICA DO ARSÊNIO
NO ESTUÁRIO DO TEJO

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciências do Ambiente (Biogeoquímica
Ambiental) pela Universidade de Évora

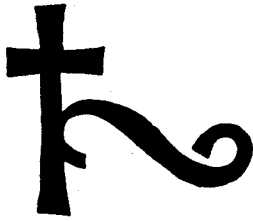


51984

ÉVORA

577.44
BET e
ex. 1

1990



Arsenic

«Ce serai ma propre faute si je ne voyais qu'une simple apparence dans ce que je devrais regarder comme un phénomène»

I. Kant, «Crítica da Razão Pura» (Trad. TP, p. 87)

«As blind men we stand before the future; however, we feel out a path, and we know that if we can find any way at all through the future, it will come to pass by feeling our way along this path»

H. Reichenbach, «Wahrscheinlichkeitslehre» (Leiden, 1935)

«O homem é a medida de todas as coisas; das que são do que são, enquanto são; das que não são de que não são»

(Protágoras in Platão, Theaetetus, 151e-152c)

SUMÁRIO

Neste trabalho foi aprofundada a questão da especiação do arsénio em meio estuarino e analisados os possíveis mecanismos biogeoquímicos que a controlam.

Em particular procurou estudar-se, no estuário do Tejo, a distribuição de As^{3+} , As^{5+} , MMA e DMA em diferentes épocas do ano e para diferentes condições hidrodinâmicas.

Neste contexto detectaram-se e quantificaram-se, pela primeira vez em águas naturais marinhas, formas trimetiladas de arsénio (TMA).

Os esforços desenvolvidos para esclarecer a origem das formas trimetiladas permitiram ainda a detecção e quantificação de duas fracções desconhecidas de arsénio dissolvido refractárias à produção de arseninas e que se distinguem entre si pela diferente sensibilidade à digestão alcalina.

Procurou caracterizar-se física e quimicamente essas fracções e nomeadamente proceder à identificação da sua estrutura química. Resultou daí a identificação por fragmentometria de massa, de arsenocolina num extracto em metanol de uma fracção aquosa purificada por troca iónica.

Foi também recolhida evidência que sugere a presença, nas águas do estuário, de arsenobetaina e de tetrametilarsónio.

Com base nestes resultados reexaminou-se o conjunto de mecanismos responsáveis pela biotransformação e reciclagem do arsénio em meio estuarino retirando-se consequências nomeadamente no que respeita ao esclarecimento da origem da arsenobetaina nos tecidos de animais marinhos e ao significado tóxicológico e ecotóxicológico das novas fracções encontradas.

SUMMARY

In this work it has been investigated the question of arsenic speciation in the estuarine environment and of the biogeochemical mechanisms that eventually control it.

Particularly we have tried to study, in the Tagus estuary, the distribution of As^{3+} , As^{5+} , MMA and DMA for different seasonal and hydrodynamic conditions.

In this connection trimethylated forms of arsenic (TMA) were detected and quantified for the first time in natural sea water.

The attempt to identify the source of the trimethylated forms still allowed the detection and quantification of two unknown fractions of dissolved arsenic, refractory to the production of arsines. These fractions can be distinguished through their different sensivity to alkaline digestion.

We have further tried to characterize physically and chemically these two refractory fractions and particularly proceed to the identification of their chemical structure.

From these efforts it has followed the identification, through mass fragmentometry, of arsenocholine, in a methanol extract of a water fraction, purified by ion-exchange.

Evidence that suggests the presence, in estuarine waters, of arsenobetaine and of the tetramethylarsonium ion has also been collected.

On these grounds the set of mechanisms responsible for the biotransformation and cycling of arsenic in the estuarine environment was reexamined. Particularly new suggestions are presented to clarify the question of the origin of arsenobetaine, in the tissue of marine animals.

The toxicological and ecotoxicological significance of the new refractory fractions found are also analysed and discussed.

Agradecimentos

Não teria sido possível realizar este trabalho sem a ajuda desinteressada de um certo número de pessoas e o apoio de várias instituições a quem é devido aqui um sincero agradecimento.

No plano científico há a referir, em primeiro lugar, o apoio e orientação que recebi da parte do meu supervisor, Sr. Prof. Dr. Jean-Marie Martin do Institut de Biogéochimie Marine da École Normale Supérieure, em Paris. A ele se fica a dever em grande parte o tema desta dissertação.

Ao Sr. Prof. Dr. Meinrat Andreae, director do Departamento de Biogeoquímica do Max Planck Institut fuer Chemie (Otto-Hahn Institut), devo a familiarização com o método por ele desenvolvido e sem a qual grande parte dos resultados aqui apresentados não teria sido obtida. Devo também um apoio desinteressado e altamente qualificado.

À generosidade do Sr. Dr. Harald Norin e do Sr. Dr. Alexandros Christakopoulos fica a dever-se a disponibilização dos indispensáveis padrões sintéticos de organoarsenicais e, em geral, apoio científico desinteressado.

Ao Sr. Prof. Dr. Luís Filipe Vilas Boas, do Laboratório de Química Analítica do Instituto Superior Técnico, e à Sr^{as} Prof^{as} Dr^{as} Maria Helena Florêncio, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa devo a orientação do processamento de amostras por Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) e Espectrometria de Massa de Impacto Electrónico (EI-MSS) respectivamente. A ambos devo ainda apoio construtivo e qualificado.

À Sr^{as} Dr^{as} Regina Tavares da Rosa, do Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial devo importantes esclarecimentos relativos à digeribilidade dos organoarsenicais e respectivos mecanismos.

Ao Sr. Prof. Dr. Andrew Benson, da Scripps Institution of Oceanography, Universidade da Califórnia, San Diego, e ao Sr. Prof. Dr. Kurt Irgolic, do Institut fuer Analytische Chemie da Universidade de Gratz, fica a dever-se também a discussão, na fase final da sua elaboração, do conjunto de sugestões que resultam desta dissertação e bem assim o acesso a importantes resultados não publicados.

O Sr. Dr. Robert Clarke, do Plymouth Marine Laboratory, devemos ainda importantes sugestões relativas a testes de significância.

A meu Pai Dr. Jacinto Moniz de Bettencourt Prof. Cat. Jubilado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa devo sobretudo o seu exemplo de investigador insigne. Devo no entanto também a revisão crítica e construtiva das primeiras versões do texto desta dissertação.

Ao Sr. Prof. Eng^o Eduardo Cruz de Carvalho, orientador do Departamento de Ecologia da Universidade de Évora, devo a amizade e apoio permanentemente manifestados ao longo de todo o período de execução desta investigação.

Este trabalho não teria no entanto tido lugar no estuário do Tejo se o Sr. Eng^o Tomás Espírito Santo e a Sr^{as}

Eng^a Teresa Ruano Pera, responsáveis ao tempo respectivamente do Estudo Ambiental do Estuário do Tejo e do Grupo de Geoquímica do Serviço de Estudos do Ambiente, não nos tivessem convencido da sua exequibilidade e oportunidade.

O apoio da Direcção-Geral da Qualidade do Ambiente e da Direcção-Geral dos Recursos Naturais manteve-se ao longo de todo o período da investigação. Desse facto estamos particularmente agradecidos aos Sr.s Eng^{os} Artur Ascenso Pires, João Luís Vilalobos e Margarida Cardoso da Silva.

Um agradecimento muito particular é devido a todo o pessoal afecto ao Estudo Ambiental do Estuário do Tejo e Laboratório do PGIRH/T, com especial destaque para a Sr^a Eng^a Gabriela Lisboa Santos e para a Dr^a Margarida Corte-Real cuja competência e disponibilidade foram da maior utilidade no laboratório.

O apoio da Universidade de Évora na pessoa dos seus responsáveis máximos os Reitores Sr. Prof. Dr. Eng^o Ário Lobo de Azevedo e Sr. Prof. Dr. Eng^o António Gonçalves dos Santos Júnior foi também da maior importância e sem ele este trabalho não teria sido realizado.

Este trabalho integra resultados obtidos no âmbito do projecto JNICT Mar/87251 pelo que foi parcialmente subsidiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica.

À competência das Sr^{as} Madalena Mesquita, Paula Vasconcellos e Raquel Nogueira Jordão devo ainda a dactilografia, desenho e composição final desta dissertação.

Finalmente devo à infinita paciência de minha mulher Maria Helena e dos meus filhos Jacinto, Maria, Alexandre e Mariana, a maior parte dos quais nasceu durante a sua execução, ter sido possível chegar ao termo deste trabalho. A todos estou naturalmente imensamente grato.

Índice

	pág.
1. Introdução Geral	1
2. Orientação da Presente Investigação	3
3. O Arsénio no Ambiente	5
3.1. Antecedentes históricos	5
3.2. Propriedades físicas e químicas	8
3.3. Usos actuais e emissões	14
3.4. Distribuição e geoquímica	22
3.4.1. Ciclo biogeoquímico global	22
3.4.2. Transformações no ambiente	28
3.4.2.1. Reações Redox	28
3.4.2.2. Interações com a fase sólida	30
3.4.2.3. Biometilação/demetilação	34
3.4.2.4. Trocas com a atmosfera	42
3.4.3. Biogeoquímica estuarina do arsénio	44
3.5. Toxicidade e toxicologia do arsénio	57
3.5.1. Mecanismos bioquímicos da acção tóxica	58
3.5.2. Toxicidade "in vivo"	62
3.5.3. Classificação dos compostos de arsénio do ponto de vista da sua toxicidade	66
4. O Estuário do Tejo	69
4.1. Fisiografia, hidrodinâmica, sedimentologia	69
4.2. Produção primária, flora e fauna	73
4.3. Emissões e qualidade do ambiente estuarino	79

5. Material e Métodos	85
5.1. Colheita das amostras	85
5.2. Preservação das amostras	87
5.3. Método analítico principal para o arsénio	87
5.3.1. Princípio do método e condições operacionais	87
5.3.2. Passivação das superfícies	90
5.3.3. Calibração, limites de detecção e coeficientes de variação	91
5.4. Testes de significância	94
5.5. Métodos analíticos complementares	96
5.5.1. Câmara de grafite	96
5.5.2. Nutrientes e pigmentos	97
5.6. Cálculo do "Input" de Arsénio	98
5.7. Digestão básica e fotooxidação	98
5.8. Digestão total	100
5.9. Fraccionamento moléculas por ultrafiltração	100
5.10. Concentração, extracção com solventes e purificação por troca iónica	102
5.10.1. Fluxograma I	102
5.10.2. Fluxograma II	106
5.10.3. Investigação de um artefacto	109
5.11. Cromatografia de camada fina (TLC)	110
5.12. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	111
5.13. Espectrometria de massa de impacto electrónico (EI-MSS)	112
5.14. Fragmentometria de massa	113
5.15. Reagentes e padrões	114

5.16. Filtros, material de vidro e plástico	115
5.17. Outros parâmetros	116
6. Resultados e Discussão	117
6.1. Distribuição das espécies conhecidas de arsénio no estuário do Tejo	117
6.2. A presença de formas trimetiladas	133
6.3. Arsénio refractário "digerível", ARD	143
6.4. Arsénio refractário "indigerível", ARI	155
6.5. Caracterização físico-química do arsénio refractário	163
6.5.1. Fraccionamento moléculas por ultrafiltração	167
6.5.2. Extração com solventes e purificação por troca iónica	181
6.5.3. Cromatografia de camada fina, TLC	197
6.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC	200
6.5.5. Espectrometria e fragmentometria de massa	203
7. Discussão Geral	203
7.1. A questão da especiação	203
7.1.1. Importância e significado	
7.1.2. A especiação conhecida em meio marinho	205
7.1.3. Questões de método	212
7.2. Da origem da arsenobetaina em animais marinhos	216
7.3. A nova evidência disponível	223
7.3.1. Presença de arsenocolina	224

7.3.2. Evidência a favor da presença de arsenobetaina	226
7.3.3. Presença de outros compostos de arsênio não identificados	232
7.4. Novas prespectivas no domínio da biogeoquímica do arsênio	240
7.4.1. Da biotransformação do arsênio em meio estuarino	240
7.4.2. O arsênio refractário e a origem da arsenobetaina	251
7.5. Significado toxicológico e ecotoxicológico	259
7.6. Limitações e dificuldades que se mantêm	263
8. Conclusões	267
9. Bibliografia	
Anexos	

LISTA DOS QUADROS

	pág.
3-1 - Propriedades físicas e químicas do arsénio	10
3-2 - Classes de compostos orgânicos do arsénio	13
3-3 - Compostos de arsénio usados como aditivos alimentares	19
3-4 - Emissões de arsénio para o ambiente	21
3-5 - Fluxos de arsénio entre reservatórios geoquímicos	24
3-6 - Tempos de residência do arsénio	26
3-7 - Arsénio nos diferentes compartimentos geoquímicos	27
3-8 - Arsénio e fósforo ao longo da cadeia trófica	52
3-9 - Toxicidade relativa dos compostos de arsénio	59
4-1 - Características do Estuário do Tejo	73
4-2 - Cargas poluentes domésticas e industriais	82
4-3 - Cargas poluentes no Estuário do Tejo	82
5-1 - Condições operacionais para o sistema HGC-QFAAS	91
5-2 - Limites de detecção	94
5-3 - Condições operacionais da ultrafiltração	101
6-1 - Resultados da campanha I	120
6-2 - Dados complementares da campanha I	121
6-3 - Resultados da campanha III	124
6-4 - Dados complementares da campanha III	125
6-5 - Input de arsénio no Estuário do Tejo	131
6-6 - Resultados da campanha IV	135
6-7 - Dados complementares da campanha IV	135
6-8 - Resultados da campanha II	138
6-9 - TMA no Estuário do Tejo	142

	pág.
6-10 - Digestão básica, praia de Algés	144
6-11 - Arsinas geradas a partir de compostos sintéticos de arsénio	149
6-12 - Digestão alcalina de padrões	155
6-13 - Rendimento da foto-oxidação	156
6-14 - Resultados da digestão total	158
6-15 - Fraccionamento da amostra G ₀₀	158
6-16 - Fraccionamento molecular por ultrafiltração	165
6-17 - Digestão total e fraccionamento de fracções da ultrafiltração	167
6-18 - Digestão básica das fracções FF	171
6-19 - Digestão dos extractos (FF/M)	172
6-20 - Digestão básica das fracções e extractos GG	174
6-21 - Balanço das fracções GG	175
6-22 - Resultados do cromatograma G _{5/M} -TG	182
6-23 - Resultados da cromatograma G _{5/M} -TG'	182
6-24 - Resultados da cromatograma G _{9/M} -TH	188
6-25 - Resultados da cromatograma G _{9/M} -Ti	188
6-26 - Ensaio branco TLC	193
6-27 - Resultados da TLC	196
6-28 - Arsénio processado por cromatografia	199
7-1 - Compostos de arsénio conhecidos em meio marinho	211
7-2 - Compatibilidades da fracção ARD (G _{5/M})	231
7-3 - Compatibilidades da fracção (G _{9/M})	238
7-4 - Arsina, metilarsina, dimetilarsina e trimetilarsina identificadas em extratos de metanol de organismos marinhos na sequência da digestão alcalina	254

LISTA DAS FIGURAS

	pág.
Fig.1 - Consumo de As_2O_3 nos EUA (1981)	15
Fig.2 - Ciclo global	25
Fig.3 - Mecanismo de biometilação (I)	37
Fig.4 - Mecanismo de biometilação (II)	38
Fig.5 - Compostos metiladores do arsénio	39
Fig.6 - Mecanismo eventual da biometilação Humana	41
Fig.7 - Reciclagem biogeoquímica do arsénio na Baía da Georgia	56
Fig.8 - a) limites geográficos do Estuário do Tejo b) Localização do Estuário do Tejo na costa da Península Ibérica	71
Fig.9 - Variação de clorofila <i>a</i> , nitrato e fosfato na estação 2.0 durante o ano de 1981	76
Fig.10 - Esquema da rede trófica no Estuário do Tejo	80
Fig.11 - Concentrações de As no sedimento do Estuário do Tejo	83
Fig.12 - Localização das estações de amostragem	86
Fig.13 - Arranjo instrumental do sistema HGC-QFAAS	89
Fig.14 - Ultrafiltração em cascata	101
Fig.15 - Extracção e purificação das amostras FF	105
Fig.16 - Extracção e purificação das amostras GG	107
Fig.17 - Estracção e purificação de uma coluna reduzida para investigação de um eventual artefacto no Fluxograma I	110
Fig.18 - Distribuição de a) Arsenito (As^{3+}) e b) Arsénio Inorgânico Total ($As^{3+} + As^{5+}$) em função da salinidade na campanha I	122
Fig.19 - Distribuição de a) Monometilarsénio (MMA) e b) Dimetilarsénio (DMA) em função da salinidade na campanha I	123
Fig.20 - Distribuição de a) Arsenito (As^{3+}) e b) Arsénio Inorgânico Total ($As^{5+} + As^{3+}$) em função da salinidade na campanha III	126

	pág.
Fig.21 - Distribuição de a) Monometilarsénio (MMA) e b) Dimetilarsénio (DMA) em função da salinidade na campanha IV	127
Fig.22 - Distribuição longitudinal (salinidade) do "ratio" $As^{3+}/As_{i\text{tot}}$ em a) campanha I (18-19/07/83) e b) campanha II (5-12/11/83)	129
Fig.23 - Distribuição das concentrações As em excesso em função da salinidade, para a) Campanha I (18-19/07/83) e b) Campanha II (25-26/11/83)	132
Fig.24 - Distribuição das concentrações As em excesso em função da salinidade, para a campanha IV (9-13/08/84)	133
Fig.25 - Distribuição de a) Arsénio Inorgânico Total ($As_i\text{ tot}$), b) Monometilarsénio (MMA), c) Dimetilarsénio (DMA) e d) Trimetilarsénio (TMA) na campanha IV, em função da salinidade	137
Fig.26 - Distribuição de a) Arsénio Inorgânico Total ($As_i\text{ tot}$) e b) Monometilarsénio (MMA), em função da salinidade e da distância a montante (Km), durante a campanha II (25-26/11/83)	139
Fig.27 - Distribuição de a) Dimetilarsénio (DMA) e b) Trimetilarsénio (TMA) em função da salinidade e da distância a montante (Km), durante a campanha II (25-26/11/83)	140
Fig.28 - Registos típicos de trimetilarsénio (TMA)	141
Fig.29 - Registo das espécies de arsénio doseadas nas fracções ΔG_1 e ΔG_5 digeridas e indigeridas	148
Fig.30 - Mecanismo proposto para a digestão alcalina (OHNa) dos arsenoribosidos dimetilados (Esquema I)	151
Fig.31 - Mecanismo proposto para a digestão alcalina da arsenobetaina (Esquema II)	151
Fig.32 - Interconversão eventual das espécies de arsénio durante a digestão alcalina	152
Fig.33 - Fraccionamento da amostra G_{00} nos seus diferentes componentes	161
Fig.34 - Extracção e purificação das amostras FF	169
Fig.35 - Extracção e purificação das amostras GG	170

	pág.
Fig.36 - Esquema de eluição de uma coluna reduzida para investigação de um artefacto (reproduzido da Fig.17)	180
Fig.37 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G ₅ /M-T _{GG}	183
Fig.38 - Cromatograma G ₅ /M-T _{GG}	184
Fig.39 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G ₅ /M-T _{GG} '	185
Fig.40 - Cromatograma G ₅ /M-T _{GG} '	187
Fig.41 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G ₉ /M-T _{HH}	189
Fig.42 - Cromatograma G ₉ /M-T _{HH}	190
Fig.43 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G ₉ /M-T _{ii}	191
Fig.44 - Cromatograma G ₉ /M-T _{ii}	192
Fig.45 - Arranjo da placa TLC no ensaio branco TB _{GG}	194
Fig.46 - Cromatograma TB _{GG}	194
Fig.47 - Arranjo da placa TLC no ensaio branco TB _{ii}	195
Fig.48 - Cromatograma TB _{ii}	195
Fig.49 - Cromatograma TLC de extractos lípidos marcados com As ⁷⁴ e P ³² (Klumpp (1979))	197
Fig.50 - Cromatograma HPLC do extracto TH ₃ -G ₉ /M	198
Fig.51 - Fragmentograma de massa da arsenocolina na amostra A	202
Fig.52 - Fragmentograma de massa de acetilarsenocolina na amostra A	202
Fig.53 - a) Arsenobetaina ; b) arsenocolina ; c) acetilarsenocolina	207
Fig.54 - Dimetilarsenolibosidos	208
Fig.55 - Arsenolibosidos trimetilados	209
Fig.56 - Dimetilarsenolípido (Knowles e Benson)	210

	pág.
Fig.57 - Complexo MMA/Fe/Húmico	214
Fig.58 - Biossíntese dos arsenoribosidos segundo Edmonds e Francesconi	219
Fig.59 - Degradação dos dimetilarsenoribosidos a dimetiloxarsiletanol	220
Fig.60 - Conversão do dimetiloxarsiletanol a arsenobetaina	221
Fig.61 - Mecanismo sugerido para a digestão alcalina dos arsenoribosidos trimetilados	229
Fig.62 - Eventual formação de um intermediário tetralquilado	242
Fig.63 - Degradação dos arsenoribosidos trimetilados a arsenobetaina	243
Fig.64 - Descarboxilação do trimetilarsênio lactato a arsenocolina	244
Fig.65 - Conversão da arsenocolina a arsenobetaina, acetilarsenocolina, TMAO e TMA	247
Fig.66 - Estrutura possível para um arsenolípido trimetilado	248
Fig.67 - Esquema global proposto para a biotransformação do arsênio em meio estuarino	250
Fig.68 - Distribuição das concentrações do As ⁵⁺ , da clorofila <i>a</i>	261

LISTA DAS ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria da Absorção Atômica
AB	Arsenobetaina
ACA	Arseniato Amoniacal de Cobre
ADL	Limite de Detecção Absoluto
As _{ITOT}	Arsénio Inorgânico Total
AK	Arsenocolina
ARD	Arsénio Refractário Digerível
ARI	Arsénio Refractário Indigerível
ART	Arsénio Refractário Total
CCA	Arseniato Cromatado de Cobre
CV	Coefficiente de Variação
D	Dalton
DB	Digestão Alcalina
DMA	Dimetilarsénio
DMAA	Ácido Dimetilarsínico
DMOAE	Dimetiloxarsiletanol
DSMA	Disódiomonometilarsénio
DT	Digestão Total
EI-MSS	Espectrometria de Massa de Impacto Electrónico
GC-MSS	Cromatografia de Fase Gasosa/Espectrometria de Massa
GF-AAS	Espectrometria de Absorção Atômica c/ Câmara de Grafite
HGC-QF/AAS	Hidretos/Cromatografia Gasosa/Queimador de Quartzo/ Absorção Atômica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC	Cromatografia de Troca Iônica
LC	Cromatografia Líquida
LD50	Dose Limite Correspondente a Efeitos Tóxicos Agudos em 50% da população

MMA	Monometilarsénio
MMAA	Ácido Monometilarsónico
MSMA	Monosódio Monometilarsénio
m/z	Quociente Massa/Carga
NA	Não Analizável
ND	Não Detectável
NMR	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear
NMWL	Limite Nominal de Peso Molecular (cut-off)
R, R'-	Cadeias Orgânicas
R	Caudal do Rio
RDL	Limite de Detecção Relativo
R _{ff}	Factor de Retenção
TMA	Trimetilarsina
TMAO	Trimetilarsénio Óxido
TMAL	Trimetilarsónio Lactado

Prefácio

A maioria dos resultados apresentados foram obtidos pelo autor no laboratório do PGIRH/T.

Há a referir no entanto a execução, pelo Dr. Alexandros Christakopoulos nos laboratórios do National Institute for Environmental Medicine, Karolinska Institutet, das determinações por Fragmentometria de Massa.

O processamento de amostras por Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) e Espectrometria de Massa de Impacto Electrónico (EI-MSS) foi efectuado, com a assistência do autor, pela Sr^a Dr^a Maria Lucília Raimundo Pedro e pelo Sr. Indalécio Cardoso Marques, respectivamente. Utilizaram-se nestas determinações as instalações do Laboratório de Química do Centro de Biotecnologia em Oeiras e do Centro de Espectrometria de Massa do Complexo Interdisciplinar de Lisboa.

A Sr^a Eng^a Fátima Santos procedeu amavelmente a análises de nutrientes. As concentrações de clorofila e feopigmentos e restantes nutrientes foram obtidas nos laboratórios do Instituto Hidrográfico.

Os laboratórios de Química da Direcção-Geral de Protecção da Produção Agrícola e do Instituto Nacional de Investigação das Pescas facultaram a utilização de equipamento de laboratório para silanização de colunas.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O arsénio é um elemento tóxico tradicionalmente considerado como o agente homicida por excelência. É também referido, na literatura da especialidade, eventualmente, como carcinogéneo.

No entanto a dependência da acção tóxica deste elemento da forma físico-química em que se apresenta é, no mínimo, paradigmática (Bernhard et al., 1986). A toxicidade aguda e subaguda dos seus compostos pode, com efeito, variar de várias ordens de grandeza.

Acontece também que a própria natureza tóxica desta acção é controversa tendo sido apresentada na literatura evidência a favor do seu carácter de nutriente essencial ou mesmo de agente carcinoestático, nalgumas das suas formas.

As formas actuais que reveste a especiação do arsénio em sistemas naturais assumem assim um carácter fundamental na avaliação do seu potencial tóxico no ambiente.

Por outro lado a gravidade duma situação de contaminação depende, na sua circunstância concreta, de vários factores, nomeadamente das características do meio receptor imediato e da sua capacidade de autodepuração e reciclagem dos elementos e compostos que o contaminam. Em particular, no caso do arsénio, tem merecido a permanente atenção dos especialistas a questão da origem, no tecido animal marinho, de compostos de arsénio praticamente não tóxicos como a arsenobetaina, origem que, no

entanto, até ao início da presente investigação, não foi objecto de uma explicação razoável (Edmonds & Francesconi 1988a).

A compreensão do conjunto de mecanismos e processos envolvidos na reciclagem do arsénio em meio estuarino adquire assim um interesse particular quer em termos da gestão da sua qualidade, quer do ponto de vista do controle das variáveis que determinam a exposição das populações humanas directamente ou através das cadeias alimentares. Estas questões estão no entanto também muito longe de se encontrar esclarecidas (Irgolic, 1988).

Por outro lado o processamento, durante décadas, de consideráveis tonelagens de arsenopirite na margem sul do estuário do Tejo (Quimigal), criou uma situação crónica de contaminação em que o arsénio surge, entre outros metais pesados e metaloides, como poluente de primeira importância (Bettencourt et al., 1980b).

Esta situação, naturalmente preocupante do ponto de vista da qualidade de um dos mais importantes estuários europeus, é, no entanto, paradoxalmente, favorável no que respeita à elucidação de aspectos menos conhecidos da biogeoquímica estuarina do arsénio e nomeadamente das formas concretas da sua especiação.

Pareceu assim útil, possível e necessário proceder ao estudo destas questões no estuário do Tejo.

2 - ORIENTAÇÃO DA PRESENTE INVESTIGAÇÃO

A detecção de uma fracção arsenical desconhecida e refractária ao método analítico principal retira sentido à ideia de balanço geoquímico e, naturalmente, desvaloriza os resultados obtidos para as espécies conhecidas.

A orientação adoptada centra assim o esforço de investigação a desenvolver na caracterização física e química dessa fracção e, nomeadamente, na tentativa de identificação dos compostos de arsénio que a constituem.

Assim para além da distribuição das diferentes espécies de arsénio quantificáveis pelo métodos disponíveis, este trabalho procura reequacionar a difícil questão da especiação do arsénio em águas naturais a partir da nova evidência recolhida.

Os objectivos prosseguidos podem sistematizar-se como segue:

1. Estudo da distribuição das espécies conhecidas de arsénio nas águas do estuário do Tejo, em diferentes épocas e para diferentes condições.
2. Estudo mais aprofundado da especiação do arsénio na fase líquida em meio estuarino e nomeadamente caracterização dos novos componentes detectados.
3. Análise das novas perspectivas decorrentes dos resultados obtidos no domínio do comportamento biogeoquímico do arsénio em

meio estuarino.

4. Enquadramento da informação recolhida na óptica da gestão e controle da qualidade do estuário nomeadamente do ponto de vista ecotoxicológico e da saúde pública.

3 - O ARSÊNIO NO AMBIENTE

3.1 - Antecedentes históricos

Utilizado há 2 ou 3.000 anos em medicina no oriente, conhecido de assírios, egípcios, gregos, romanos e árabes (Mello Breyner, 1918, Klumpp, 1979, Newland, 1982, Seyler, 1985) sobretudo nas suas formas sulfuradas de ouro-pigmento e rosalgar, o arsénio viria a desempenhar um papel de considerável importância no âmbito do movimento alquimista sendo a descoberta da sua forma elementar correntemente atribuída a Alberto Magno (1206-1280) (Schroeder & Ballassa, 1966, Newland, 1982, Nelson, 1983).

O grego "Arsenikos", deriva, segundo alguns autores, do árabe "Az-Zennikh" e é atribuído a Pedarios Dioscorides (50 A.D.) (Schroeder & Ballassa, 1966). Significa, no entanto, "masculino", pelo que se pensa poder estar relacionado com o princípio alquímico do antagonismo dos elementos e a facilidade com que o arsénio se liga a elementos "fêmea" para formar ligas brancas que, à época, se presumiam ser de prata (Seyler, 1985). O signo que o representa na simbologia alquímica, uma cruz e uma serpente enrolada, parece indicar também que, desde muito cedo, terá havido um claro entendimento da ambivalência das suas propriedades químicas (Koch, 1930). O arsénio foi, com efeito, até há muito pouco tempo, considerado, no campo dos venenos, como o agente homicida por excelência atribuindo-se-lhe numerosos crimes, alguns tão ilustres quanto controversos, como a doença de Napoleão na Ilha de St^a Helena (Forshufvud et al., 1961) e, entre nós a morte de D. João II

(Bento de Sousa, 1894).

Mais tarde em 1723, terá sido redescoberto por Brandt (Mello Breyner, 1918).

Em 1760 Cadet de Gassicourt realiza a primeira síntese laboratorial dum composto organometálico produzindo uma mistura complexa basicamente constituída por $((\text{CH}_3)_2\text{As})_2\text{O}$. Berzelius, Dumas, Benson e Bayer interessam-se por esta mistura a que chamam o "líquido fumante de Cadet" mas só muito depois, em função de envenenamentos acidentais ocorridos na Alemanha e em Inglaterra, a química dos compostos orgânicos do arsénio veio a adquirir um novo impulso (Andreae, 1986a). O composto tóxico produzido por fungos que metabolizavam pigmentos ricos em arsénio (Schweinfurt green), veio a ser identificado por Challenger como sendo trimetilarsina, facto de que decorre directamente a investigação clássica, produzida por aquele autor, sobre a metilação dos metais por microrganismos (Challenger, 1945).

No século passado as aplicações do arsénio foram alargadas à agricultura com a introdução, no Colorado, do acetoarsinato de cobre (Paris green) para profilaxia do escaravelho da batata (Klumpp, 1979).

Em 1910, na sequência dos trabalhos de Koch, Hallopeau e outros, Paul Erlich demonstrou as aplicações práticas do arsénio, na forma de arsfenamina, na terapêutica da doença do sono, facto da maior importância que viria a estar na base do

emprego generalizado de arsenicais no tratamento da sífilis e de outras doenças (Mello Breyner, 1918, Squibb & Fowler, 1983, Andreae, 1986a). Outras preparações à base de arsénio foram ainda adoptadas pela medicina da época incluindo a solução de Fowler (solução a 1% de arseniato de potássio), a solução de Donovan (solução de arsénio e pimenta preta), a solução de Valagin (licor de cloreto de arsénio) e cacodilato de sódio (Vallee et al., 1960). Estas preparações eram usadas pelos seus efeitos tónicos e no tratamento de doenças de pele (psoríasis), anemia, leucémia e certas doenças pulmonares (bronquite asmática).

Finalmente durante a I Guerra Mundial desenvolveram-se, com objectivos militares, formulações à base de arsénio. Estas incluíam arsínas monosubstituídas ($RAsCl_2$ em que R = metil, etil ou propil) e fumos arsenicais que dispersavam derivados sólidos do arsénio nomeadamente difenilcloroarsina, difenilarsinacloroarsina, difenilcianoarsina e difenilaminacianoarsina. O mais conhecido destes produtos, a Lewisite (clorovinildicloroarsina), é um poderoso agente vesicante, irritante local e respiratório e um veneno sistémico. Contra ele foi desenvolvido um dos antídotos mais eficazes contra a intoxicação pelo arsénio até hoje conhecidos, precisamente a British Anti Lewisite, BAL, (2,3,dimercaptopropanol).

3.2 - Propriedades físicas e químicas

O arsénio é um metalóide que ocorre em pelo menos três variedades alotrópicas: a cinzenta, a amarela e a negra (Luh et al., 1973).

O produto mais vendido comercialmente é a forma γ cristalina (hexagonal-rômbica). O seu brilho cinzento metálico inicial perde-se por oxidação ao ar dando lugar a uma espessa camada negra que é facilmente abradida. É um bom condutor de calor e da electricidade e muito friável. A forma α , amarela, é metaestável e apresenta estrutura cristalina cúbica. O arsénio β , é amorfo, negro, vítreo e gelatinoso como obsidiana. É um não condutor e muito friável. Tem apesar disso grande resistência à oxidação (Partington, 1950, Fowler et al., 1979, Willarson, 1983, Seyler, 1985). As formas α e β são instáveis a altas temperaturas e convertem-se na γ a 360°C (Partington, 1950, Willarson, 1983).

O arsénio é um elemento do V grupo da tabela periódica, na qual sucede ao azoto e ao fósforo, elementos tipicamente não metálicos, e precede o antimónio e o bismuto nos quais o carácter metálico se acentua.

Como o azoto e o fósforo o arsénio apresenta, para além do estado elementar metálico, três estados de oxidação fundamentais: -3, +3 e +5. Além disso forma hidretos.

O arsénio pode aliás substituir o azoto numa variedade de compostos orgânicos nomeadamente a betaina, a colina e a acetilcolina (ver adiante 7.1, Figs.50a) e 50b)). A arsenocolina assim formada pode ser incorporada na lecitina mantendo as propriedades lipotrópicas e antihemorrágicas do composto azotado (Polonovski, 1941, Vallee et al., 1960).

Por outro lado o arsénio e o fósforo têm electronegatividades muito próximas e, para ambos, as espécies mais estáveis são as pentavalentes. O arseniato e o fosfato são análogos isoestéricos e isoelectrónicos podendo o arseniato substituir-se ao fosfato em reacções de grande significado bioquímico (ver adiante 3-5).

As suas propriedades físicas e físico-químicas mais importantes indicam-se no Quadro 3-1.

O arsénio metal, As, é raro e ocorre normalmente associado a outros metais em rochas cristalinas e xistos (Luh et al., 1973). No entanto como elemento de transição o arsénio apresenta uma química complexa (Klumpp, 1979).

Os seus derivados com grupos orgânicos, oxigénio, enxofre e selénio são particularmente significativos do ponto de vista ambiental (Irgolic, 1986).

Sobretudo a demonstrada afinidade do arsénio para o enxofre parece da maior importância na medida em que determina o seu comportamento bioquímico (ver adiante 3-5) e geoquímico. Os

sulfuretos são, com efeito, pouco solúveis em condições anaeróbias e redutoras (ou na presença de SH_2) embora sejam solúveis em condições alcalinas formando tioarsenitos e tioarseniatos (Klumpp, 1979). Os mais frequentes são o realgar, o ouropimento e o pentassulfureto de arsénio (NAS, 1977).

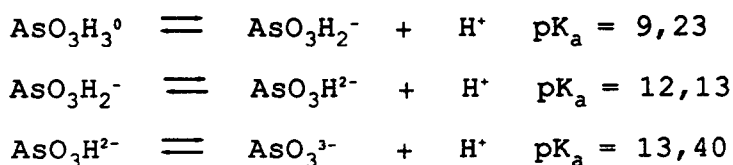
QUADRO 3-1
PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO ARSÉNIO

peso atómico	74,9216
número atómico	33
isótopo natural	75
isótopos artificiais	de 68 a 80
camada electrónica externa	$4s^2 4p^3$
variedades alotrópicas	
<i>cinzenta (hexagonal-rômbica) variedade γ</i>	
densidade	5,727 (25°C/4°C)
distância As-As	2,51 a 3,15 Å
ponto de fusão	818°C (36 ATm)
ponto de ebulição (sublimação)	615°C
tensão de vapor	1mg de Hg (372°C)
condutividade eléctrica	256 $\mu\text{mho cm}^{-1}$
<i>amarela (cúbica) metaestável variedade α</i>	
densidade	1,97 - 2,026/18°C
distância As-As	2,44 Å
ponto de fusão (com pressão adicional)	815°C
<i>negra (amorfa) variedade β</i>	
densidade	4,71
ponto de fusão	200°C
electronegatividade de Pauling	2,0
raio do ião As^{3+}	0,58 Å
raio do ião As^{5+}	0,46 Å
raio covalente	1,21 Å

(adaptado de Partington, 1950, Newland, 1982,
Seyler, 1985, Ishinishi et al., 1986)

O arsénio comercial na forma de As_2O_3 é sobretudo um sub-produto do processamento industrial de arseniatos e arseno-sulfuretos metálicos.

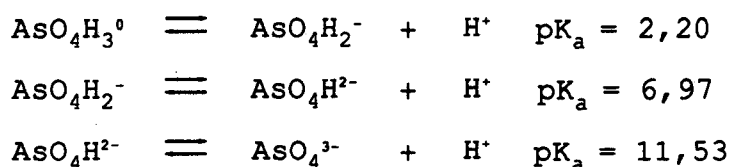
O As_2O_3 é muito pouco solúvel na água. Em teoria a sua dissolução produz ácido arsenoso AsO_3H_3 . Os seus sais, os arsenitos dissociam-se em condições alcalinas segundo as reacções:



(NAS, 1977, Braman, 1983b)

Em condições acídicas só a espécie indissociada $\text{As}(\text{OH})_3$ é detectada.

A oxidação do arsénio elementar ou do As_2O_3 com ácido nítrico produz ácido arsénio, AsO_4H_3 que por sua vez se dissocia segundo o esquema:



(Braman, 1983b)

O arsénio combina-se facilmente com o Carbono, o Hidrogénio e o Oxigénio e pode ligar-se a grupos alifáticos ou aromáticos, de

um a cinco, dando lugar a uma grande variedade de compostos orgânicos de síntese (Klumpp, 1979, Irgolic, 1986). No Quadro 3-2 indicam-se as classes mais significativas dos compostos orgânicos de arsénio conhecidos.

Os mais importantes do ponto de vista ambiental são os compostos metilados, os que contêm derivados aromáticos (usados como aditivos alimentares e em veterinária) e os que intervêm nos ciclos biológicos (NAS, 1977).

O ácido monometilarsónico, o ácido dimetilarsínico e respectivos sais são agentes herbicidas importantes (ver adiante 3-3). O DMAA é dibásico formando sais tanto com ácidos como com bases (Klump, 1979). É um composto extremamente estável mesmo na presença de NO_3H fumante, de água régia ou de MnO_4K . As ligações As-C são no entanto destruídas por digestão básica (Raiziss & Gavron, 1923).

O arsénio é reduzido, em condições ácidas e na presença de hidrogénio, a arsina AsH_3 (B.P. - 55°C) um dos compostos mais tóxicos que se conhecem (Blackwell & Robbins, 1979, Squibb & Fowler, 1983). Esta reacção constitui a base do método dos hidretos adiante descrito com mais detalhe (5.3.1).

Os compostos orgânicos de arsénio, apenas com um átomo de As, dão também, por redução, as correspondentes arsinas. Assim os metilados dão monometilarsina, CH_3AsH_2 (B.P. 2°C), os

dimetilados dimetilarsina, $(\text{CH}_3)_2 \text{As}$ (B.P.36°C) e os trimetilados trimetilarsina, $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ (B.P.70°C), respectivamente (Braman, 1983b). A primeira é uma base muito fraca e um gás à temperatura ambiente, enquanto que a segunda tem propriedades fortemente básicas e é um líquido volátil espontâneamente inflamável ao ar (Klumpp, 1979). A terceira é uma base fraca de Lewis (Ayllet, 1979) e volátil (tensão de vapor 322 Torr a 298°C) oxidando-se lentamente ao ar (Parris & Brinkman, 1976).

QUADRO 3-2
CLASSES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO ARSÊNIO

RAsX_2	}	X = H, halogênio, NR_2 , OR, SR, SeR, alcali, pseudohalogênio
R_2AsX		
R_3As		Triorganilarsina
$[\text{R}_4\text{As}]^+\text{X}^-$		Sal tetraorganilarsonio (X = anião uninegativo)
R_3As		Pentaorganil arsénico
$(\text{RAsY})_n$		Y = O, S, NH, NR
$\text{R}_2\text{As-X-AsR}_2$		X = O, S, Se, NR
R_3AsY		Y = O, S, Se, Te, NR
R_3AsX_2		X = Halogênio
RAsO(OH)_2		Ácido arsónico
$\text{R}_2\text{AsO(OH)}$		Ácido diorganilarsínico

(Reproduzido de NAS, 1977)

As alquilarsinas dão em solução aquosa ácidos arsónicos do tipo $\text{RAs} = \text{O(OH)}_2$, ácidos relativamente fortes com constantes de

dissociação entre 10^{-4} e 10^{-9} , e as dialquilarinas, ácidos arsínicos como o ácido cacodílico $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$, ácidos fracos cujas constantes de dissociação não ultrapassam 10^{-7} (Seyler, 1985).

3.3 - Usos actuais e emissões

Industrialmente o arsénio é sobretudo um sub-produto da metalurgia dos metais não-ferrosos (Cu, Pb, Zn, Au e Co).

Assim os compostos de arsénio mais usados, o As_2O_5 e o próprio As metal são obtidos a partir do As_2O_3 . A produção mundial deste óxido atingiu um máximo em 1970 de cerca de 77.000 ton caindo para menos de 40.000 ton em 1980 (Fitzgerald, 1983). Portugal colocava no mercado cerca de 1.000 ton deste composto básico em 1970.

Atribui-se esta quebra por um lado ao rigoroso controle a que passaram a estar sujeitos os usos comerciais e industriais de arsénio do ponto de vista dos seus efeitos no ambiente e da segurança, e, por outro, à competição de compostos de síntese (Fitzgerald, 1983).

Actualmente as principais aplicações do arsénio são na agricultura, nas ligas metálicas e na electrónica, na indústria do vidro, na pecuária e em medicina veterinária, na indústria das madeiras e dos curtumes, na indústria têxtil, como "antifouling", etc.

A ASARCO dá a seguinte repartição do consumo de As_2O_3 nos E.U.A. em 1981:

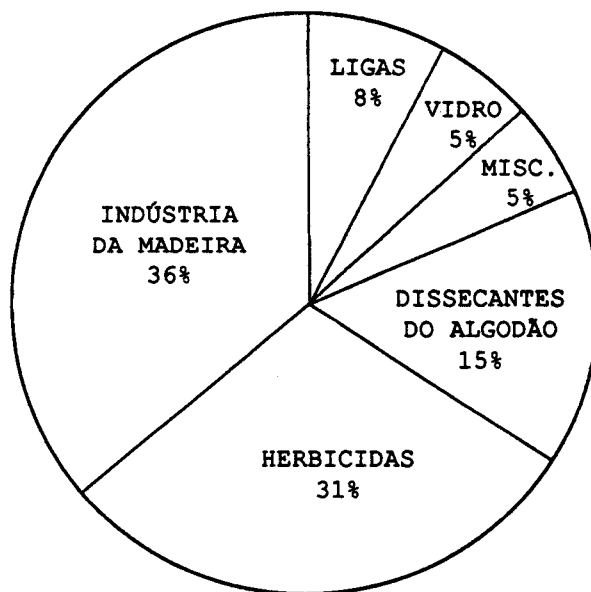


Fig. 1 - Consumo de As_2O_3 nos EUA (1981)

Usos agrícolas

Embora com algumas oscilações devidas sobretudo a substituições, mantém-se o uso de pesticidas e herbicidas de base arsenical na agricultura, constituindo cerca de 77% da utilização total do arsénio na actualidade (IARC Monograph, 1980). Com efeito aumentou recentemente o consumo de arseniato de chumbo (regulador de acidez dos citrinos) e recuperam os consumos de arseniato de cálcio (regulador de acidez, herbicida, insecticida e vermícida) e de arseniato de sódio (Alden, 1983). A produção dos dois primeiros nos EUA será actualmente de 150.000 Kg/ano e 1.000.000 Kg respectivamente (Alden, 1983). O arseniato de sódio com uma produção nos EUA calculada em 41.000 Kg é usado sobretudo no combate a doenças

específicas da videira ("bexigas" e "dead arm") e no controle da febre da carraça (Alden, 1983).

Os principais arsenicais utilizados na agricultura são, no entanto, o monosódionometilarsénico, MSMA, o dissódionometilarsénico, DSMA, o ácido arsénio e o ácido cacodílico. A produção actual nos EUA dos dois primeiros é estimada em cerca de 11 milhões de Kg e a sua principal utilização é na produção de algodão, como herbicidas específicos ou combinados (Alden, 1983). As suas propriedades dissecantes e desfolhantes são essenciais à utilização da moderna maquinaria de colheita (stripers). O ácido arsénio e o ácido cacodílico, com produções calculadas respectivamente em 3.6 e 0.27 milhões de Kg/ano são utilizados como dissecante e herbicida foliar respectivamente.

Ligas metálicas e electrónica

O arsénio metal é usado em ligas de chumbo e chumbo/antimónio cujas principais aplicações são no chumbo de caça e em baterias, respectivamente. A produção nos EUA era em 1983 de cerca de 1.000 ton/ano. As ligas amorfas do arsénio com selénio têm também um papel importante em electrofotografia (Willarson, 1983). A indústria dos semicondutores é, no entanto, o mercado mais recente mas também com maior potencial para o arsénio metálico. O arsénio (e o P) são, com efeito utilizados para conferir conductividade tipo-n ao silício e ao germânio. Usam-se, nesta aplicação, arsénio e silício de alta pureza mas o seu consumo anual é apenas (EUA) de umas dezenas de Kg

(Willarson, 1983). O arsênio é também utilizado na produção de semicondutores com base em elementos dos grupos III e V nomeadamente o GaAs, o InAs e o AlAs por ordem decrescente de importância comercial. As suas aplicações são variadas e incluem díodos emissores de luz (LEDS), células solares, díodos de laser (fibras ópticas), circuitos integrados de micro-ondas e superfícies fotoemissivas (fotomultiplicadores). Prevê-se que este tipo de aplicações venha a ter crescente importância num futuro próximo nomeadamente para o processamento ultrarápido de dados pela nova geração de supercomputadores (Willarson, 1983, Oikawa, 1988). A sua produção requer, em todo o caso, técnicas sofisticadas como as de deposição epitaxial a partir de vapor, procedimentos que põem problemas particulares de segurança devido à necessidade de manipular arsina (Oikawa, 1988).

Indústria do vidro

A indústria dos vidros especiais requer arsênio na forma de óxido ou mais recentemente de ácido arsénico de alta qualidade (Bauer, 1983).

O arsênio pentavalente é com efeito praticamente o único agente de "fining" utilizável acima de 1400°C . É também muito importante no controle da oxidação-redução de elementos como o Fe, o Ni, o Co e as Terras Raras, (que, em pequenas quantidades, dão cor ao vidro em pelo menos um dos seus estados redox) e na regulação da tensão superficial e interfacial durante o processo de crescimento dos cristais (Bauer, 1983).

É ainda utilizado incorporado na rede cristalina de lentes ópticas em que se requer grandes comprimentos de onda (azuis) ou grande permeabilidade na zona dos infravermelhos (Bauer, 1983).

Pecuária e medicina veterinária

A partir de 1950 foi autorizado pela US Food & Drug Administration, a introdução de um certo número de compostos orgânicos do arsénio pentavalente como aditivos alimentares em pecuária (Newland, 1982, Andreae, 1986a). Apresentam-se no Quadro 4-3 bem como as características principais e objectivos específicos da sua aplicação. Em França este tipo de utilizações do arsénio não é permitido (Newland, 1982).

O mecanismo da acção destes compostos não está esclarecido. É, no entanto, claro que a sua acção estimulante é distinta da acção bioquímica do arsénio pentavalente inorgânico e provavelmente resultado de efeitos indirectos sobre a microflora intestinal (NAS, 1977).

Regista-se ainda o uso do arsénio sob a forma de arsenito de potássio (Solução de Fowler) no tratamento do enfisema pulmonar, anemia, doenças de pele crónicas e catarro de cavalos, gado vacum e cães (IARC Monograph, 1980).

Indústria da madeira

O arsénio sob a forma de arseniato cromatado de cobre (CCA) e

de arseniato amoniaco de cobre (ACA) tem vindo a ter crescente aplicação como preservativo da madeira. Este consumo que se cifrou, em 1979, em 150 milhões de pés cúbicos de madeira tratada representa actualmente cerca de 99% do uso de preservativos da madeira nos EUA (Baldwin, 1983).

Esta preferência explica-se pela formação de precipitados altamente insolúveis por reacção com os açúcares presentes na fibra vegetal o que aumenta consideravelmente a resistência à lixiviação e a durabilidade.

QUADRO 3-3
COMPOSTOS DE ARSÉNIO USADOS COMO ADITIVOS ALIMENTARES

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO NO ALIMENTO COMPLETO %	ESPÉCIE	OBJECTIVO
Ácido arsanílico	0,005 - 0,01	Frangos	Aumenta o crescimento e a eficiência alimentar
		Perús em engorda	Melhora a pigmentação
		Postura	Aumenta a produção de ovos
		Porcos	Melhora a taxa de crescimento e a eficiência alimentar; evita a desinteria
	0,025 - 0,04	Frangos até 8 dias	Evita a coccidiose
		Perús 5-6 dias	Controla a desinteria
Ácido-3-Nitro-Hidro-xifenilarsónico	0,0025 - 0,005	Porcos e perús	Melhora a taxa de crescimento e a eficiência alimentar
	0,0025 - 0,0075	Porcos	Melhora a taxa de crescimento e a eficiência alimentar
	0,02	Porcos 5-6 dias	Controla a desinteria
Ácido-4-Nitrofenil-arsónico	0,01875	Engorda de perús e frangos	Evita a "blackhead"
Ácido p-Ureido fenilarsónico	0,0375	Engorda de perús	Evita a "blackhead" e aumenta a taxa de crescimento

(Reproduzido de NAS, 1977)

Outros usos

O uso de arsenicais em medicina foi consideravelmente reduzido devido, sobretudo, a problemas de toxicidade e ao desenvolvimento de outros medicamentos competitivos. Assim, dum modo geral, o seu uso clínico está actualmente confinado ao tratamento de casos avançados da doença do sono (tripanosomiase) e, ocasionalmente, como componente em drogas antiparasitárias (Squibb & Fowler, 1983). Em Portugal regista-se no "simpósio terapeutico" de 1980 apenas o anidrido arsenioso proposto como antígenésico e abortivo.

O arsénio é ainda utilizado na indústria dos curtumes, na indústria têxtil (pigmentos e impressão) e na indústria naval (algicidas) (Luh, Baker & Henley, 1973).

Emissões

A metalurgia dos metais não ferrosos e a produção de energia a partir de combustíveis fósseis são considerados os dois processos industriais dominantes na mobilização antropogénica do arsénio. Há que acrescentar, em todo o caso a estes processos de carácter involuntário, a mobilização que resulta de processos intencionais como a manufactura e aplicação de pesticidas, herbicidas e preservativos da madeira. No Quadro 3-4, reproduzido de Piver (Piver, 1983) apresenta-se uma perspectiva das principais actividades mobilizadoras e respectivos fluxos. Todas estas actividades envolvem a mobilização de quantidades consideráveis de arsénio em zonas

localizadas e representam portanto um potencial substancial de exposição para o homem (Piver, 1983).

QUADRO 3-4
EMISSÕES DE ARSÊNIO PARA O AMBIENTE (1974)

FLUXOS DE ARSÊNIO (tons)	
Actividades Não Intencionais:	
Emissões atmosféricas	
metalurgia do cobre	5.300
metalurgia de outros metais não ferrosos	1.200
combustão do carvão	720
Emissões para o meio aquático	
detergentes fosfatados	120
Distribuição ou dissipação no terreno	
licores da lixiviação do cobre	9.700
outros	2.070
Actividades Intencionais:	
Emissões atmosféricas	
aplicação aérea de pesticidas	2.540
Distribuição ou dissipação no terreno	
aplicação de pesticidas nos solos	11.560

(Reproduzido de Piver, 1983)

Verifica-se entretanto o desenvolvimento de novas tecnologias de aproveitamento energético a partir de combustíveis fósseis que podem aumentar sensivelmente o peso desta componente na emissão total. É o caso da conversão de xistos betuminosos e das centrais de energia geotérmica. Para a primeira estima-se

com efeito, só nos EUA, uma emissão total de 16.000 ton/ano (Chappell & Runnells, 1977). Para as segundas e embora com consideráveis variações caso a caso o valor médio estimado de 60 Kg/dia por MW produzido é consideravelmente superior às taxas de emissão que se verificam nas centrais clássicas a carvão (Piver, 1983).

3.4 - Distribuição e geoquímica

3.4.1 - Ciclo biogeoquímico global

Mackenzie e colaboradores com base numa metodologia própria, estabeleceram uma primeira versão do ciclo biogeoquímico global do arsénio (Mackenzie et al., 1979). Esquematiza-se na Fig. 2. No Quadro 3-5 apresentam-se os fluxos estimados entre os principais reservatórios e no Quadro 3-6 os tempos de residência correspondentes.

A importância das trocas com a atmosfera, que resulta quer da volatilidade de algumas das suas formas mais correntes quer da facilidade com que a precipitação líquida as recicla para a superfície do globo, permite a sua classificação na categoria dos ciclos biogeoquímicos "atmofílicos" (Mackenzie et al., 1979).

De acordo com esta análise as modificações introduzidas pela actividade humana recente traduzem-se basicamente numa perda considerável de arsénio para o reservatório sedimentar ($1,189 \times 10^8$ g/ano) e num ganho líquido para os reservatórios terrestre

(litoesfera) e oceânico (660 e 565,8 x 10⁸ g/ano respectivamente).

A perda sedimentar é, fundamentalmente, o resultado da mineração e processamento de matérias primas utilizadas na metalurgia dos metais não ferrosos, na produção de cimento e na queima de combustíveis fósseis (Woolson, 1983a,b). A acumulação no reservatório terrestre decorre por outro lado, aparentemente, da deposição no campo próximo ou da rápida reciclagem atmosférica das emissões correspondentes (779,3 x 10⁸ g/ano) acrescidas dos efeitos da aplicação de pesticidas de base arsenical. Calcula-se que o valor actual destas emissões seja aproximadamente 3 vezes o fluxo natural de arsénio a partir da superfície terrestre (Mackenzie et al., 1979).

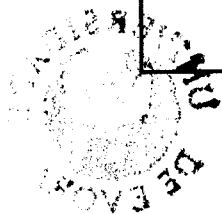
Por outro lado a acumulação no oceano parece ser fundamentalmente influenciada pela actual taxa de destruição do coberto vegetal induzida por actividades agrícolas e de desflorestação e consequente mobilização de materiais. A este efeito há ainda a adicionar o que resulta da reciclagem, sobre a superfície oceânica, das emissões produzidas à superfície dos continentes (Mackenzie et al., 1979).

A atmosfera, aparentemente, não ganha nem perde arsénio mantendo-se num estado estacionário apesar do incremento dos fluxos entre ela e outros reservatórios. Esta hipótese parece razoável uma vez que o arsénio emitido, sobretudo na forma de vapor (10-40%), é susceptível de rápida dissolução e reciclagem pela precipitação. O seu tempo de residência na atmosfera,

calculado em 9 dias, (Lantzy & Mackenzie, 1979), reforça esta perspectiva já que é muito próximo do tempo de residência conhecido para a água (10 dias) (Garrels, Mackenzie & Hunt, 1979).

QUADRO 3-5
FLUXOS DE ARSÊNIO ENTRE RESERVATÓRIOS GEOQUÍMICOS

FLUXO	MAGNITUDE 10^8 g/ano
de Terra para:	
biota terrestre	282,8
atmosfera (vapor)	210
atmosfera (poeira continental)	25
oceano (fluvial suspenso)	2.380
oceano (fluvial dissolvido)	612
atmosfera (emissão)	779,3
da Atmosfera para:	
terra (chuva)	970
terra (poeiras)	8
oceano (chuva)	1.970
oceano (poeiras)	17
do Oceano para:	
atmosfera	1.947,9
No oceano	
esqueletos para os sedimentos	29,4
dissolvido para os biota	1.080
biota para partículas	38,9
biota para dissolvido	1.041,1
dissolvido para esqueletos	344,5
esqueletos para dissolvido	315,1
particulado para o sedimento	2.435,9
Terrestre	
biota para a terra	292,8
Vulcânico para:	
atmosfera (vapor)	0,1
atmosfera (poeira)	2,7
sedimentos (oceânicos)	40
terra	54
dos Sedimentos para:	
terra	2.400
Míneração	455



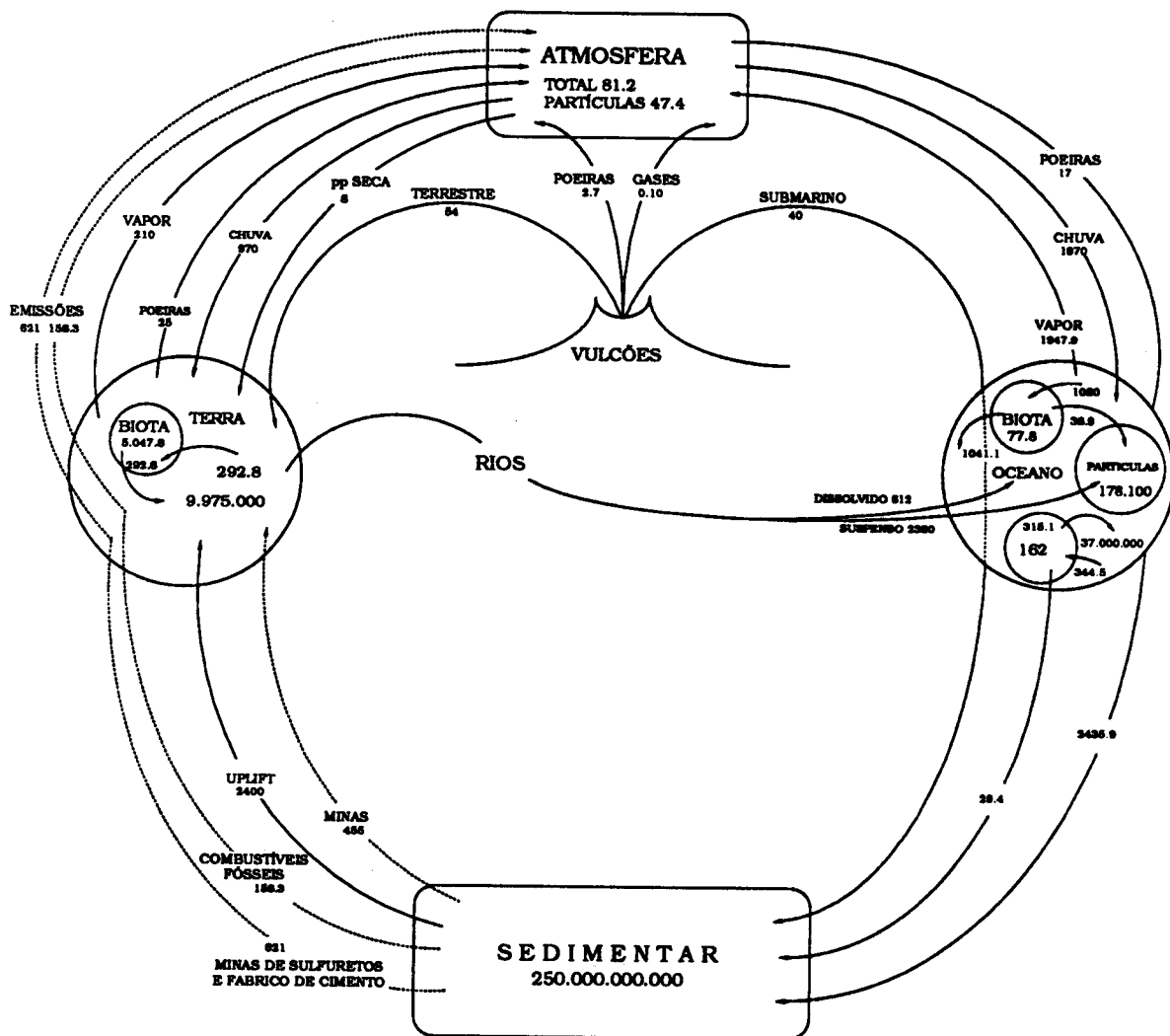


Fig. 2 - Ciclo Biogeoquímico Global

Os fluxos apresentados (10^8 /ano) são globais, não distinguem entre diferentes formas de arsénio e incluem tanto fontes antropogénias como origens naturais.

(Reproduzido de Mackenzie et al., 1979)



QUADRO 3-6

TEMPOS DE RESIDÊNCIA DO ARSÊNIO

RESERVATÓRIO GEOQUÍMICO	ANOS
Sedimentos	99.800.00
Oceano (dissolvido)	9.400
Terra	2.400
Biota terrestre	17
Biota oceânico	0.07
Atmosfera (TOTAL)	0.03

(Reproduzido de MacKenzie et al., 1979)

O vulcanismo adiciona uma quantidade insignificante à atmosfera uma vez que grande parte do arsênio com esta origem acompanha o material sedimentar marinho (vulcanismo submarino) e terrestre (Fig. 2).

O tempo de residência do arsênio nos organismos terrestres e marinhos é da mesma ordem de grandeza do tempo de residência do carbono orgânico nestes reservatórios (Whittaker & Likens, 1973, Mackenzie et al., 1979), o que implica, como corrolário, que o As não é, em termos geoquímicos, significativamente acumulado pelos organismos vivos (Mackenzie et al., 1979). Uma análise dos fluxos, tempos de residência e "stocks" de arsênio presentes em cada reservatório geoquímico, evidencia aliás a fraca probabilidade de uma rápida acumulação deste elemento até níveis tóxicos, à escala global (Woolson, 1983b).

QUADRO 3-7

ARSÊNIO NOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS GEOQUÍMICOS

COMPARTIMENTO	GAMA DE VARIAÇÃO	MÉDIA	REFERÊNCIAS
ATMOSFERA			
A r	1.5 - 190	1.6	Bowen, 1979
Chuva e Neve	0.01 - 13.9	1.52	Kanamori et al., 1965
Partículas	0.012 - 80		Bowen, 1979
SOLOS			
	0.1 - 40	6	Bowen, 1979
ÁGUA DOCE			
Rios (não poluídos)			
Água	0.1 - 25	1.7	Kanamori, 1965, Tanaka, 1988
Partículas		5.5	Seyler, 1985
Sedimentos	2.4 - 3.1	2.8	Tanaka, 1988
Lagos			
Água	0.16 - 54.5	8.98	Tanaka, 1988
Sedimentos	< 0.5 - 3.500		Fowler, 1983
Aquíferos	0.01 - 800	17.96	Tanaka, 1988
Drenagem de Minas	3 - 400.000		Tanaka, 1988
"Hot Springs"	0.00 - 137.000	8.47	Tanaka, 1988, Onhishi, 1967
Petróleo e Gás	0.00 - 243.000	63.3	Tanaka, 1988
Calote Polar	0.60 - 3.8	0.67	Kanamori et al., 1965, Woolson, 1983
OCEANOS E MARES			
Água	0.0056 - 11.24	1.7	Seyler, 1985
Partículas		0.12×10^{-6}	Seyler, 1985
Sedimento costeiro	3 - 15	7.7	Bowen, 1979
Sedimento profundo		40	Creelius, 1974
BIOTA			
Terrestre			
Plantas	0.002 - 10	0.45	Tanaka, 1988
Plantas em Solos Contaminados	< 1 - 10.000		Tanaka, 1988
Animais	0.001 - 10		Tanaka, 1988
Dulçaquícolas			
Fitoplâncton	2.9 - 21.74		Fowler, 1983
Macrófitos	8 - 1450		Fowler, 1983
Invertebrados	0.41 - 2.400		Fowler, 1983
Peixes	< 1 - 35		Fowler, 1983
Marinhos			
Fitoplâncton		9.0	Seyler, 1985
Zooplâncton	3 - 6		Seyler, 1985
Macrófitos	1 - 35.8	3.6	Seyler, 1985, Tanaka, 1988
Moluscos	1 - 30		Seyler, 1985
Crustáceos	1 - 61		Seyler, 1985
Peixes	2,6 - 400		Seyler, 1985
Mamíferos		0.2	Bowen, 1979

(ar ng.m^{-3} ; Águas $\mu\text{.Kg}^{-1}$; Partículas, Solos, Material Vivo mg.Kg^{-1} e peso seco)

Crosta terrestre e outros compartimentos

O arsénio é um elemento relativamente raro na crosta terrestre, onde detém o vigésimo lugar na escala de abundância relativa. Fora das zonas de mineração, os seus teores, variam entre 1,5 e 2,0 ppm.

É no entanto um macro-constituente de pelo menos 245 minerais diferentes em que ocorre frequentemente associado com o enxofre. Estes incluem ligas (4 minerais), arseniatos (27 minerais), sulfuretos (13 minerais), sulfossais (65 minerais) e os correlativos produtos de oxidação (2 óxidos, 11 arsenitos, 116 arseniatos e 7 silicatos) (Woolson, 1983b).

Apresentam-se no Quadro 3-7 concentrações médias e gamas de variação para as concentrações de arsénio em diferentes compartimentos do ciclo geoquímico global.

3.4.2 - Transformações no ambiente

O arsénio é um dos elementos mais versáteis que se conhecem e a sua reactividade determina um conjunto diversificado de formas e transformações no ambiente (Irgolic, 1986). Tem-se assim:

3.4.2.1 - Reacções redox

A geoquímica do arsénio, envolve, parafraseando Goldschmidt (1958), "um certo número de complicações causadas pela valência variável do elemento".

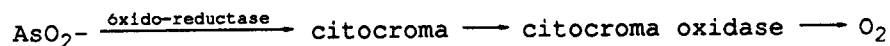
Segundo alguns autores, as suas reacções redox estritamente químicas são controladas, no solo, pelo teor em Fe e pelo pH (Keaton & Kardos, 1940). Parece claro, no entanto, que as reacções de oxidação/redução no solo e nos sedimentos e, nomeadamente, a interconversão $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$ podem resultar de processos químicos e microbiológicos combinados ou não. Em particular a oxidação do arsenito pode ser mediada pelas bactérias do solo. Esta reacção é importante porque o arsenito é cerca de 10 vezes mais tóxico para as plantas que o arseniato (Woolson, 1983b). Oscarson e colaboradores estabeleceram, no entanto, em sedimento lacustre, por um lado, a clara predominância, do Mn^{4+} na oxidação do arsenito, e, por outro, o carácter fundamentalmente abiótico desta reacção (Oscarson et al., 1980, 1981, Huang et al., 1982).

O arseniato é, como se poderia esperar, predominante em solos aeróbios sendo o arseniato de manganés a sua forma mais estável (Hess & Blanchard, 1976). O arsenito pode, no entanto, formar-se em solos de pH = 4-8 a partir de Eh < 300 mV. A quantidade de arsénio mobilizável aumenta com a redução do Eh.

Estirpes de *Pilchia guillermondii* e *Micrococcus* sp., isoladas em solos, são também descritas na literatura como susceptíveis de converter o arseniato a arsenito (Bautista & Alexander, 1972). É ainda observada, em condições anaeróbias, a redução do As^{5+} a As^{3+} , por intervenção de fungos presentes em sedimentos dulçaquícolas (Freeman et al., 1986).

Uma vez formado o As^{3+} tende a ser reoxidado a arseniato por intervenção de microrganismos do tipo *Alcaligenes* ou *Pseudomonas* nomeadamente *Pseudomonas fluorescens-arsenoxydans* e *Pseudomonas acidovorans-arsenoxydans* (Osborne & Ehrlich, 1976, Woolson, 1983b).

Admite-se, no primeiro caso (*Alcaligenes*), o envolvimento, na oxidação, de uma cadeia de transporte electrónico do tipo:



A biometilação redutiva e a demetilação discutem-se adiante em 3.4.2.3.

3.4.2.2 - Interações com a fase sólida

A interacção com solos e sedimentos constitui, sem dúvida, um processo chave na translocação das diferentes formas de arsénio no ambiente.

A sua distribuição depende, neste compartimento, da especiação do arsénio, da composição do material sólido e, secundariamente, do pH e teor em matéria orgânica respectivo (Abdelghani et al., 1979).

De um modo geral compostos como o arseniato, o arsenito, o metanoarsenato e o cacodilato tendem a formar complexos insolúveis, no solo, reagindo com os oxi-hidróxidos que

revestem as argilas (coatings) ou com os catiões da solução intersticial (Woolson, 1983b).

O arseniato pode ser retido, nas areias, pelas partículas de goethite que também retêm o fósforo (Fordham & Norrish, 1974). Por outro lado os minerais de mica têm tendência a absorver quantidades crescentes de arseniato à medida que são erodidos (Stewart et al., 1975).

De um modo geral a adsorção parece ser função do espaçamento da malha cristalina das argilas e do teor em hidróxido de alumínio e sesquióxido de ferro. A ligação à fracção férrica é no entanto dominante (Jacobs et al., 1970, Woolson & Kearney, 1973).

Depende também do tipo de argila e da textura (Woolson, 1983b). A ordem de afinidades, (Abdelghani et al., 1979), será:

oxihidróxidos de ferro — oxihidróxidos de alumínio — caulinite (pH = 5-7)
— illite — montmorilonite — caulinite (pH = 9)

O arseniato apresenta ainda afinidade marcada para o grupo funcional amina, mas não para os grupos carboxilo, sulfidrilo ou alquilo (Abdelghani et al., 1979).

A pH constante, a adsorção do arseniato por muitos componentes do solo incluindo óxidos de Fe, alumina, óxidos de Mn^{4+} , caulinite e montmorilonite parece respeitar a isotérmica de

Langmuir (Anderson et al., 1976; Malokty & Anderson, 1976; Gupta & Chen, 1978; Oscarson et al., 1981; Pierce & Moore, 1982).

A fixação do arsenito nos solos e sedimentos é também função do teor destes em Fe^{3+} , mas sofre a competição do arseniato; apresenta um máximo a $pH = 7$ (Misra & Tiwari, 1963, Pierce & Moore, 1982, Woolson, 1983b). A hierarquia de afinidades estabelecida por Abdelghani e colaboradores para esta espécie é:

óxidos de Fe^{3+} → illite → montmorilonite → caulinite

O arsenito não manifesta afinidade para os grupos carboxilo ou amino (Abdelghani et al., 1979).

Os organoarsenicais absorvem também nos hidróxidos de Fe à superfície das argilas nos mesmos sítios do fosfato (Wauchope, 1975, Fassbender 1975) embora a força desta ligação seja função da espécie de arsénio. A ordem, segundo alguns autores, (Wauchope, 1975, Woolson, 1983b) será:

metilarsonato - arseniato → cacodilato → fosfato

O MSMA (Monossódiometilarsénio), exhibe também afinidade para a adsorção pelas aminas. A afinidade para argilas e areias finas é, no entanto, inferior à do arseniato e do arsenito (Abdelghani et al., 1979).

O arseniato e o fosfato, adsorvendo, de modo análogo, nos componentes do solo competem, naturalmente, para os mesmos sítios; qualquer deles pode ser usado para deslocar o outro (Barrow, 1974, Woolson, 1973).

Em concentrações muito altas e $\text{pH} > 6$ os arsenicais apresentam, no entanto, uma preferência secundária pelo Ca ao contrário do fósforo que apresenta uma preferência secundária pelo alumínio. O arseniato pode, em todo o caso, coprecipitar com o fosfato e o alumínio (Fassbender, 1975, Wauchope, 1983, Thanabalasingam & Pickering, 1986). O fosfato desloca também o metanoarsonato (Schweizer, 1967).

A desorção do arsénio, por outro lado, é também função da espécie em que se apresenta e dos constituintes do solo sendo mínima, a $\text{pH} = 7$, para o arseniato e máxima para o MSMA e as argilas montmorillonite e caulinite. Não se observa desorção a partir dos óxidos de Fe para nenhuma espécie de arsénio (Abdelghani et al., 1979).

Uma vez desorvido o arsénio pode ser lixiviado; naturalmente, o transporte ao longo do perfil edáfico depende da quantidade de arsénio presente e do volume de água que o drena. No entanto, devido à sua resistência à lixiviação é pouco provável, que o arsénio contamine o freático a não ser em solos arenosos ou quando as quantidades aplicadas são de tal ordem que é de esperar a saturação dos sítios de adsorção disponíveis (Woolson, 1983b).

Menos clara é a interferência da matéria orgânica presente na fase líquida. Trabalhos recentes sugerem, no entanto, que os ácidos fúlvicos, quer por adsorção à superfície das partículas de alumina quer por complexação directa do arsénio V, podem ter uma interferência negativa significativa no processo de adsorção (Xu et al., 1988). Os ácidos húmicos ao contrário, aparentemente, pela afinidade existente para os grupos amino podem eventualmente assistir na imobilização, na fase sólida, do arsénio dissolvido (Thanabalasingam & Pickering, 1986).

3.4.2.3 - Biometilação/Demetilação

a) Biometilação

A capacidade de transformar arsénio inorgânico em compostos orgânicos do arsénio é generalizada na natureza e a formação de alquilarinas, uma das suas variantes, tem sido proposta como etapa significativa do seu ciclo biogeoquímico (McBride & Wolfe, 1971, Wood 1974, Sandberg & Allen, 1975, Woolson, 1976, Braman et al., 1977).

Esta transformação decorre, aparentemente, da metilação biótica por etapas sucessivas, de certo número de substratos - arsenito, arseniato, ácidos metanoarsónico e cacodílico entre outros - por acção de uma grande variedade de organismos vivos. Efectivamente, essa capacidade foi demonstrada, para fungos e bactérias, com relevância entre os primeiros para:

Scopulariopsis brevicaulis (Gosio, 1893, Pool, 1912, Challenger

et al., 1933), *Monilia sitophila* saccardo (Pool, 1912), *Aspergillus glaucus*, *A. virens*, *A. fisheri*, *A. sydowii*, *Mucor mucedo*, *Fusarium* spp. (Thom & Raper, 1932), *Penicillium* sp. (Thom & Raper, 1932; Bird et al., 1948; Cox & Alexander, 1973) *Candida humicola* e *Glicocladium roseum* (Cox & Alexander, 1973; Cullen et al., 1977, 1979, 1984b), *Tricophyllum rubrum* (Zussman et al., 1961),

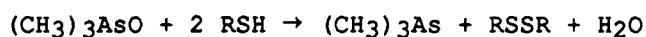
e entre as segundas para:

Aerobacter niger (Bird et al., 1948), *A. versicolor*, *A. glaucus* (Zussman et al., 1961) *Metanobacterium* (McBride & Wolfe, 1971), *Aeromonas* sp., *Flaviobacterium* sp. e *Escherichia coli* (Wong et al., 1977) *Pseudomonas* e *Alcaligenes* sp. (Cheng & Focht, 1979).

A biometilação do As pode ocorrer em condições aeróbicas ou anaeróbicas e prosseguir até à formação de trimetilsarsina ou dimetilsarsina respectivamente (Challenger, 1945, McBride & Wolfe, 1971).

Dos trabalhos de Challenger, em particular, resulta não só a identificação da trimetilsarsina como produto final da biometilação do arsénio, como também a sugestão de um mecanismo para esta transformação. Este envolve o ataque nucleófilo de um derivado de As^{3+} a um ião metilcarbónio incipiente (CH_3^+), numa adição oxidativa de que resulta a formação de um composto metilado de As^{5+} . A novas reduções, indispensáveis uma vez que os compostos de arsénio pentavalente não são susceptíveis de metilação, seguem-se adições sucessivas de grupos metilo

(Challenger, 1933, 1945). Este mecanismo relacionado com a reacção de Meyer (Cullen et al., 1977, Cullen & Reimer, 1989), é esquematicamente representado na Fig.3. Challenger postula o envolvimento da S-adenosilmetionina (SAM) como dador do ião carbónio que se transfere para um par de electrões isolados do arsénio trivalente (Challenger, 1945). Esta sugestão é corroborada pelo trabalho de Cullen e colaboradores (Cullen et al., 1977, 1979, 1984a) que propõe ainda o envolvimento de tiois orgânicos como fonte de electrões para a etapa final da redução, através do seguinte mecanismo:



É, no entanto, pouco claro que a S-adenosilmetionina seja a única fonte de metilos "in vivo" e que outros compostos metilados de enxofre não possam ter um papel semelhante (António et al., 1979).

Em condições anaeróbicas a biometilação procede, no entanto, apenas até a formação de dimetilarsina tendo, o respectivo dador de metilo, sido inicialmente identificado como metilcobalamina ($\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$), em vez de SAM (McBride & Wolfe, 1971).

O mecanismo proposto neste caso envolve a transferência de um metilcarbanião (CH_3^-) em vez de um ião metilcarbónio (CH_3^+), segundo o esquema da Fig. 4.

A analogia com a metilação de outros metais e metalóides como o mercúrio, o chumbo, o selênio e o estanho parece reforçar a verossimilhança deste mecanismo (Halpern & Maher et al., 1964; Wood et al., 1968, De Simone et al., 1973, Wood, 1975, Ridley et al., 1977).

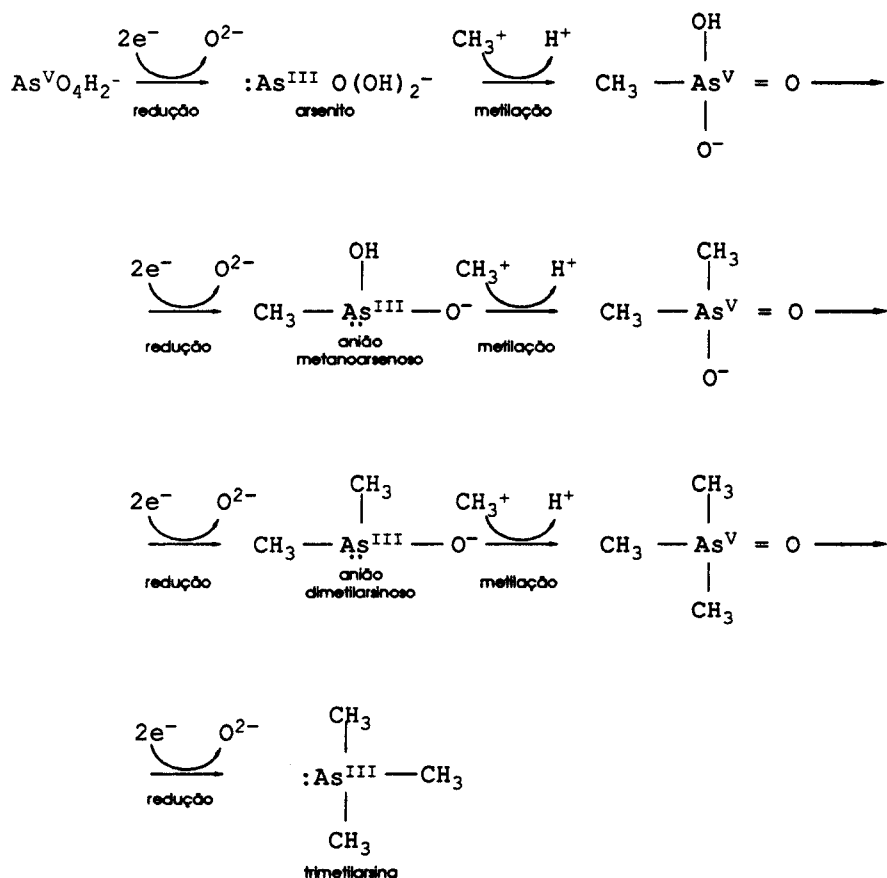


Fig. 3 - Mecanismo de biometilação (I)

(Adaptado de Challenger, 1945)

Trabalhos recentes indicam contudo que um coenzima-M, o ácido 2-mercaptoetanosulfônico ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{OH}$), será, por transferência da metilcobalamina, o efectivo dador de metilo ao arsenito, "in vivo" (McBride & Wolfe, 1971, Taylor & Wolfe, 1974).

Outros compostos como o ácido tetrahidrofólico e seus derivados (Fig. 5) têm também sido propostos como eventuais metiladores do arsênio (Wood *et al.*, 1977, Irgolic, 1986).

Acresce que não terá sido possível a McBride e colaboradores isolar e identificar a própria metilcobalamina em células de *Methanobacterium* (Andreae, 1983b).

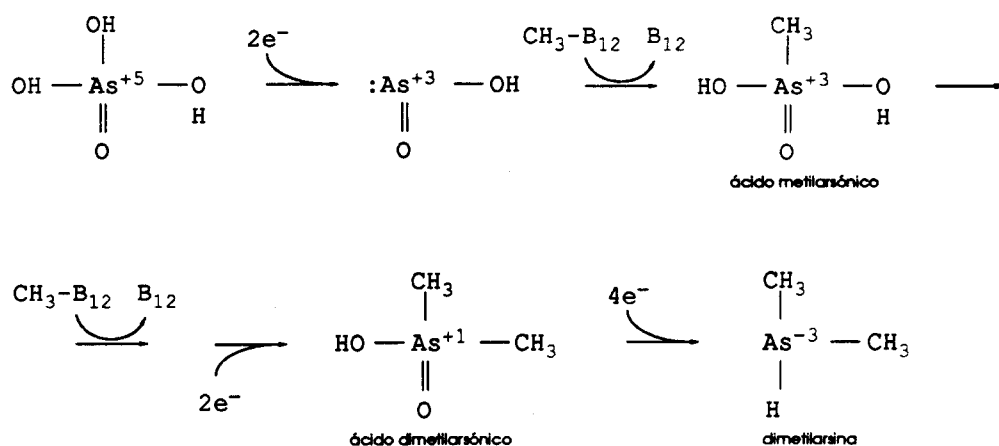
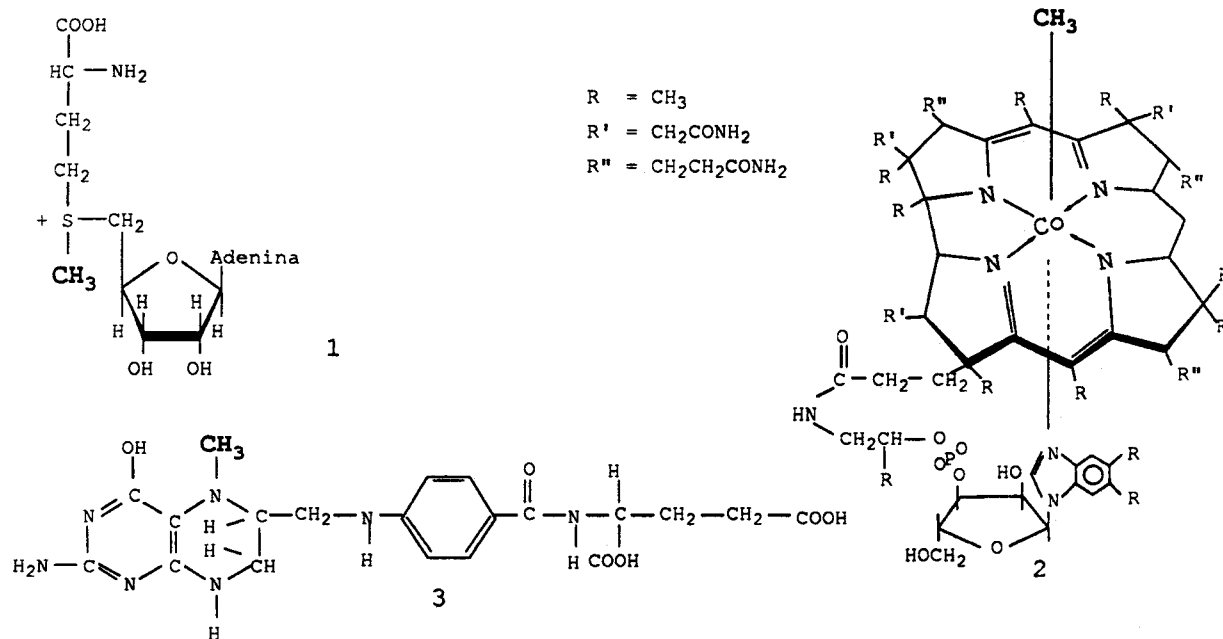


Fig.4 - Mecanismo de biometilação (II)

(Reproduzido de McBride & Wolfe, 1971)

Aparentemente as reacções de biometilação são mais complexas do que inicialmente se pensava (Irgolic, 1981, 1986, Cullen & Reimer, 1989).

Os substratos susceptíveis de metilação são também variados e incluem, além dos referidos, um certo número de compostos orgânicos de arsênio com substituições alifáticas (e.g. ácidos etil-, propil-, etilpropil-, butil- e benzeno arsônicos) (Cullen *et al.*, 1977, Andreae, 1983b).



- 1 - S-Adenosilmetionina
 2 - Metilcobalamina
 3 - Ácido Tetrahidrofólico

Fig. 5 - Compostos metiladores do arsénio

Verifica-se por outro lado, que a capacidade de biometilar o arsénio não é exclusiva de fungos e bactérias estendendo-se a plantas terrestres e animais superiores incluindo o Homem.

Detectada por Braman e Foreback na urina humana (Braman & Foreback, 1973) a biometilação em mamíferos tem, com efeito, vindo a ser estudada por um grupo variado de investigadores (Lasko & Peoples 1975; Marafante et al., 1982, 1984; Foá et al., 1984). Demonstrou-se a irrelevância da presença de bactérias intestinais para este processo (Vather & Gustafsson, 1980). O metabolismo do arsénio no Homem e nomeadamente a

produção de compostos metilados foi também estudada por um grupo numeroso de investigadores (Braman & Foreback, 1973, Crecelius, 1977, Tam et al., 1979b, Yamauchi & Yamamura, 1979, Buchet et al., 1981, Marafante et al., 1987, Yamato, 1988). Muito recentemente constatou-se (Vather & Marafante, 1988) que um composto metilado de arsénio, o DMA, é susceptível de metilação, pelo organismo humano, a TMA. O arsénio inorgânico é também metilado pelo Homem. Um mecanismo possível para este processo é o indicado na Fig.6 em que complexos de ácido arsenoso (indissociado) com os tiois adjacentes dos enzimas, são reduzidos, metilados por etapas e finalmente, depois da adição do 2º grupo metilo, descomplexados e oxidados (Braman, 1983b). Foi também posta em evidência a produção de organoarseniacaais simples como MMAA, e DMAA a partir do arsénio inorgânico por plantas como *Lycopersicon esculentum* Mill c.v. Better boy (Nissen & Benson, 1982).

b) Demetilação

Os compostos metilados de arsénio mais frequentes em águas naturais, o MMA e o DMA, são extremamente estáveis e resistentes ao ataque químico e biológico. Em consequência não foi até hoje observada a sua degradação, por demetilação, em plantas terrestres ou animais (Crecelius, 1977, Stevens et al., 1977). Constata-se além disso que os compostos orgânicos de arsénio presentes em organismos marinhos, que integram dietas correntes, atravessam o corpo humano aparentemente sem alteração. É óbvio no entanto que a demetilação deve ocorrer no ambiente. Constitui, com efeito, evidência indirecta deste

processo o facto de as formas metiladas de arsénio não serem facilmente detectadas nos aquíferos mais profundos nem nas amostras de sedimentos abaixo da interface água/sedimento (Braman, 1983b). Os perfis obtidos no sedimento do rio Menominee, Wisconsin, altamente contaminados com pesticidas arsenicais, sugerem também a demetilação (Holm et al., 1980).

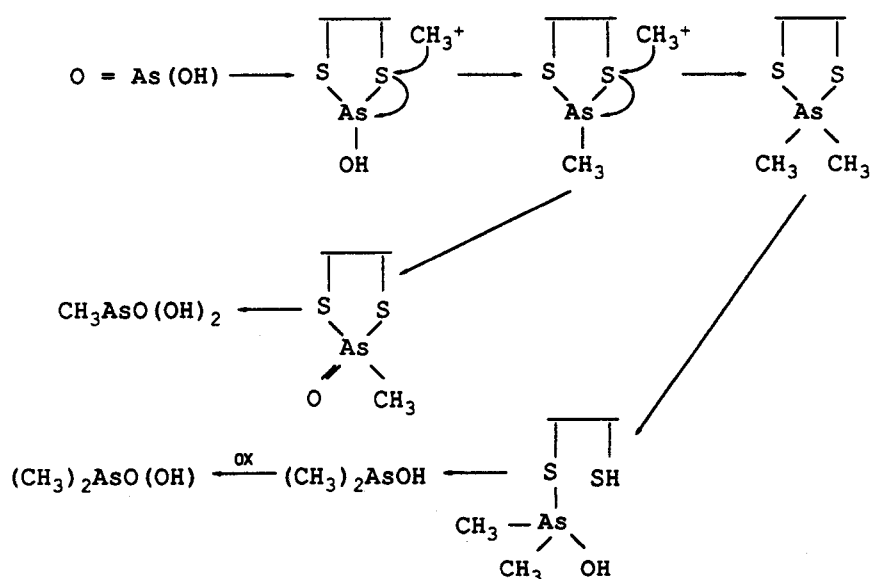


Fig. 6 - Mecanismo eventual da biometilação Humana

(Reproduzido de Fowler, 1983)

Mas sobretudo as populações bacterianas manifestam a capacidade para demetilar os compostos orgânicos do arsénio, no laboratório e também no solo e em meio aquático (Creelius, 1977, Andreae, 1978, Sanders, 1979b, Cullen et al., 1979). Com efeito, os compostos metilados do arsénio podem, em condições aeróbias, ser oxidados no solo a arsénio inorgânico e dióxido de carbono, em vez de metilados (Woolson & Kearney, 1973, Braman, 1975). A clara associação da sua degradação com

indicadores da actividade microbiológica geral sugere, no caso do MAA (ácido metanoarsónico), que a decomposição é coincidente com o metabolismo da matéria orgânica do solo (Woolson, 1983).

Esta capacidade oxidante parece além disso relativamente generalizada entre as bactérias do solo tendo sido observada para *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. (Shariatpanahi et al., 1981). Um fungo e dois actinomicetes são também descritos na literatura como eventuais agentes dessa degradação (Von Endt et al., 1968, Abdelghani et al., 1977).

Comparativamente a demetilação parece ser o mecanismo de perda mais importante dos organoarsenicais metilados em solos aeróbios (Andreae, 1986a).

3.4.2.4 - Trocas com a atmosfera

As arsinas produzidas são voláteis (vide 3.2), e demonstrou-se, ao estudar a sua estabilidade em ambiente oxigenado, que a trimelarsina se volatiliza mais depressa do que é oxidada pelo que pode ser transportada a grandes distâncias sem alteração química significativa (Parris & Brinkmann, 1976).

Os trabalhos de Braman e de Woolson e Kearney provaram, por outro lado, que a formação destes compostos em concentrações mensuráveis, na atmosfera, é possível nas condições correntes de aplicação de pesticidas de arsénio mono e dimetilados (Woolson & Kearney, 1973, Braman, 1975). Tal produção pode

aliás ocorrer no ambiente em quantidades suficientes para constituir risco de intoxicação aguda letal para o Homem (Blackwell & Robbins, 1979, Parrish et al. 1979).

No entanto, se estes factos demonstraram a possibilidade de a biometilação constituir uma fonte de arsénio para a atmosfera, significativa em situações localizadas, só por si não o estabelecem de um modo inequívoco. Walsh e colaboradores observaram, com efeito, que apenas uma muito pequena percentagem de arsénio atmosférico se encontra sob a forma de gás e ainda que a maior parte dessa fracção aparenta carácter inorgânico (Walsh et al., 1979).

Andreae, por outro lado, num extenso estudo da especiação do arsénio na água da chuva e em aerossóis regista apenas formas inorgânicas não metiladas (Andreae, 1980b).

Esses resultados são ainda reforçados pelo facto de os balanços estabelecidos por Walsh e colaboradores não comportarem a ocorrência de fontes significativas de arsénio para a atmosfera, de origem oceânica (Walsh et al., 1979).

Estudos recentes indicam, no entanto, que cerca de 10% do arsénio presente nas partículas atmosféricas pode ser constituído por formas metiladas, com particular relevância para o TMAO (Mukai et al., 1986, 1987, Matsuzono et al., 1989). Parece assim admissível que, independentemente do seu significado em meio marinho, este fluxo tenha sido até agora subestimado no balanço geral do arsénio.

3.4.3 - Biogeoquímica estuarina do arsénio

Em estuários que não estão sujeitos ou quase não estão sujeitos a contribuições de origem antropogénea o arsénio total tende a comportar-se de um modo conservativo (Waslenchuk, 1977, 1979, Andreae, 1983).

No entanto é também um facto bem estabelecido que o arsénio apresenta em estuários e águas costeiras um espectro variado de formas químicas reduzidas e oxidadas em função da riqueza da sua química natural e da reactividade biogeoquímica daquelas áreas.

Sabe-se com efeito, na sequência dos trabalhos de Braman (Braman et al., 1972, 1977, Johnson & Pilson, 1972, Andreae, 1977, 1978, Waslenchuck, 1979, Peterson & Carpenter, 1983) que tanto o arseniato, AsO_4H_3 , como o arsenito, AsO_3H_3 , ocorrem na fase líquida daqueles sistemas sendo o primeiro largamente dominante em relação ao segundo, em águas oxigenadas (Ferguson & Gavis, 1972, Lowenthal et al., 1977). O valor médio tendencial, obtido com base num conjunto bastante representativo de determinações, para o "ratio" $\text{As}^{5+}/\text{As}^{3+}$ é, no entanto, apenas de 10:2 (Sugawara & Kanamori, 1964), muito inferior ao que decorre de previsões termodinâmicas e que é de $10^{15} - 10^{26}:1$ (N.A.Science, 1977, Andreae, 1979a).

Todavia a situação pode apresentar-se muito diferente nas áreas restritas em que se dá a formação duma redoxclina. Peterson e Carpenter, observaram efectivamente no Saanich Inlet

(Vancouver) uma completa inversão da especiação ao longo da redoxclina passando o "ratio" As^{5+}/As^{3+} de 15/1 para 1/12 e atingindo as formas reduzidas cerca de 80% do teor total de arsénio determinado no "hypolimnion" anóxico (≈ 2 ppb) (Peterson & Carpenter, 1983). Os perfis verticais obtidos por Andreae e colaboradores no Báltico e no Escalda são semelhantes embora menos acentuados (Andreae & Froelich, 1984; Andreae & Andreae, 1986).

No entanto, em ambientes anóxicos em que as formas reduzidas de arsénio deveriam predominar, as previsões termodinâmicas também não são sempre respeitadas. Na baía de Sta. Bárbara, por exemplo, uma fracção considerável da água intersticial do sedimento anóxico, cerca de 80%, está presente sob a forma de arseniato (Andreae, 1978).

Admite-se que este afastamento do equilíbrio termodinâmico resulte de um modo geral, em grande parte, da actividade biológica.

Ensaio de laboratório sugerem com efeito que a cinética de oxidação do arsenito é insusceptível, em meio marinho, de impedir a sua completa oxidação a arseniato. Assim, a presença de As^{3+} em águas oxigenadas pode ser atribuída ao equilíbrio dinâmico entre a pura oxidação química do arsenito e a redução biótica "in situ" do arseniato (Peterson & Carpenter, 1983). É um facto bem estabelecido, no entanto, que a oxidação abiótica de As^{3+} a As^{5+} , processo lento na água oligotrófica do oceano (Johnson & Pilson, 1975; Scudlark & Johnson, 1982), pode ser

consideravelmente acelerado pela intervenção de populações bacterianas (Turner, 1949; Scudlark & Johnson, 1982), pela presença de partículas ricas em Mn e ainda pelo incremento de factores que correntemente controlam a actividade biótica como nutrientes e temperatura (Peterson & Carpenter, 1983). Essa capacidade oxidante, atribuída ao bacterioplâncton, parece resultar de enzimas específicos induzidos pela presença do arsenito (Scudlark & Johnson, 1982). As concentrações de arsenito encontradas na água do mar, pese embora o seu carácter errático, devem portanto ser atribuídas à existência de fontes de As^{3+} significativas a nível global (Johnson & Pilson, 1975; Peterson & Carpenter, 1983) que, em todo o caso, se verifica não poderem ser as emissões fluviais, atmosféricas e vulcânicas submarinas conhecidas, no seu conjunto (Li 1981).

A hipótese de produção activa do As^{3+} por mecanismos bióticos tem assim vindo a adquirir crescente aceitação (Andreae, 1983c).

A redução do arseniato por algas de água doce (*Chlorella* spp.) foi, com efeito, demonstrada por Blasco (Blasco et al., 1971). A redução do As^{5+} a As^{3+} por bactérias (Johnson, 1972; Johnson & Pilson, 1975, Vidal & Vidal, 1980), corais (Pilson, 1974), fitoplâncton (Johnson & Burke, 1978, Andreae, 1979b, Sanders & Windom, 1980), membros da comunidade *Sargassum* (Blake & Johnson, 1976), e tecido biótico morto (Uthe & Reincke, 1975) foi também comprovada em águas marinhas.

No caso do fitoplâncton marinho o mecanismo actuante parece ser

activado por baixos valores do quociente $PO_4 : AsO_4$ na fase logarítmica do crescimento populacional e, na medida em que contraria a substituição do fosfato pelo arseniato, constituirá um mecanismo de desintoxicação (Johnson & Burke, 1978, Andreae, 1978, Scudlark & Johnson, 1982). Não é claro, por outro lado, que a observada redução do As^{5+} a As^{3+} seja operada directamente pelo coral *Pocillopora verrucosa*, admitindo-se que em parte seja mediada pelas zooxantellae associadas (Pilson, 1974). Já a redução efectuada por tecido biótico não-vivo parece resultar, na medida em que se mantém activo mesmo depois de esterilizado, fundamentalmente de um mecanismo abiótico (Uthe & Reincke, 1975).

Este conjunto de mecanismos bióticos e abióticos parece em todo o caso susceptível de acelerar significativamente a redução do As^{5+} inorgânico em estuários e águas costeiras adjacentes.

Não é aliás inteiramente claro que a redução do arsénio inorgânico pentavalente conduza sempre à formação de arsenito. Andreae sugere, com efeito, com base numa análise pH-Eh e em evidência laboratorial, que em águas intersticiais, na zona de estabilidade do SH^- , a forma reduzida predominante seja o tioarsenito, AsS^{2-} , indistinguível, pelos métodos analíticos disponíveis (hidretos), do As^{3+} (Andreae, 1979a, Andreae & Froelich, 1984).

Peterson e Carpenter no entanto, partindo também de previsões termodinâmicas mas calculando a actividade total do SH^- a

partir das concentrações medidas para o SH_2 total junto à interface água/sedimento, contestam a presença do tioarsenito em concentrações significativas (Peterson & Carpenter, 1983).

Conhece-se, por outro lado, a presença ubíqua de formas metiladas de arsénio, mono e dimetil, em algas e também em águas estuarinas e marinhas (Braman e Foreback, 1973, Johnson & Braman, 1975, Braman et al., 1977, Andreae, 1977, 1978, 1983c, Waslenchuk, 1977, 1979, Howard & Arbab-Zavar, 1981, Howard et al., 1982, Apte et al., 1986).

Parece assim razoável admitir que a biometilação redutiva demonstrada, numa escala limitada, para o meio terrestre (3.4.2.2) possa estar também activa no meio marinho. Nesse sentido Wood sugere, por analogia com o ciclo do mercúrio, a produção, no sedimento anóxico, de alquilarsinas que, na sequência da sua difusão em meio aeróbico, dariam os oxoácidos metilados que se detectam na fase líquida, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ e $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (Wood, 1974). No entanto, Andreae não encontrou qualquer forma metilada de arsénio abaixo da zona eufótica da coluna de água (camada anóxica) nem na água intersticial da baía de Santa Bárbara, Califórnia (Andreae, 1978, 1979a). Ensaios de laboratório com vasa marinha conduzem a resultados semelhantes (McBride et al., 1978). Riedl e colaboradores também não detectam formas metiladas de arsénio na água intersticial do sedimento da Chesapeake Bay que, no entanto, sujeito a cargas mais elevadas de arseniato as produz no laboratório (Riedl et al., 1987).

Estudos sistemáticos conduzidos por Andreae, com esse objectivo, em meio marinho aeróbico e anaeróbico, águas intersticiais costeiras e oceânicas e ainda em algas bentónicas e fitoplâncton não permitiram nunca detectar arsinas livres, acima dos limites de detecção praticados (0.2-10 ppt) (Andreae, 1979a,b). Outros autores também não observam qualquer produção de arsinas a partir de culturas de fitoplâncton (Sanders & Windom, 1980).

A situação é menos clara no Báltico onde um máximo secundário, perto da redoxclina, se observa nos perfis verticais das formas metiladas (Andreae & Froelich, 1984). Recentemente foram também detectados MMA, DMA e TMAO em águas intersticiais e sedimentos (Ebdon et al., 1987, 1988, Reimer & Thompson, 1988). Em particular Reimer & Thompson (1988) apresentam resultados que apontam no sentido da biometilação "in situ" do arsénio, em águas intersticiais marinhas.

No entanto as formas metiladas presentes na camada superior da coluna de água, em águas costeiras e oceânicas, apresentam uma estreita e geral correlação com indicadores da actividade fitoplânctónica como a concentração de clorofila a e a assimilação do C^{14} (Andreae, 1978, 1979b, Andreae & Froelich, 1984). Em estuários esta correlação mantém-se tanto para medições de produtividade acopladas a medições da taxa de redução do As^{5+} (Sanders & Windom, 1980) como para estimativas da biomassa fitoplânctónica (Sanders, 1983).

A biometilação redutiva, sedimentar, como fonte principal das formas metiladas de arsénio presentes na coluna de água, parece assim não dispôr por enquanto de fundamento empírico consistente, e a evidência recolhida sugere, ao contrário, a sua produção por biossíntese (e subsequente degradação), seja directamente pelas algas seja por heterotrofos estreitamente associados aos produtores primários (Andreae, 1978; Apte et al., 1986).

O arseniato compete, com efeito, com o fosfato para a assimilação pelo fitoplâncton e talvez por outros organismos (Sanders, 1979a, Benson & Summons, 1981, Nissen & Benson, 1982) embora eventualmente por um mecanismo independente (Edmonds & Francesconi, 1987a). Aparentemente, há considerável variação interespecífica na capacidade de discriminar entre fosfato e arseniato por parte do fitoplâncton marinho, embora a assimilação seja, dum modo geral, controlada pelos níveis de fosfato (Sanders & Windom, 1980, Andreae & Klumpp, 1979, Morris et al., 1984, Apte et al., 1986). Há também considerável variação interespecífica na proporção relativa dos As^{3+} , MMA e DMA produzidos.

Uma vez na célula o arseniato absorvido é reduzido e biotransformado, incorporando-se uma pequena porção sob a forma de resíduo (<10%) e sendo o restante constituído por compostos orgânicos do arsénio insuficientemente caracterizados mas que incluem quase sempre uma fracção lipídica significativa. Em princípio estes compostos são sensivelmente menos tóxicos que as formas inorgânicas, pelo que a sua produção metabólica

parece resultar da necessidade de controlar os níveis de arseniato impedindo a sua interferência com a fosforilação oxidativa (ver adiante 3.5).

Baker e colaboradores obtiveram também dados que apontam no sentido da metilação no arsenito pelo fitoplancton de água doce produzindo-se, curiosamente, além de MMA e DMA também TMAO (Baker et al., 1983).

O "stock" de arsénio processado pelo fitoplâncton é, em todo o caso, considerável uma vez que as algas podem atingir nos tecidos concentrações de arsénio 1000 x superiores às da água circundante (Sanders & Windom, 1980).

Por outro lado os perfis verticais observados, apresentando uma redução substancial das formas metiladas imediatamente abaixo da zona eufótica, sugerem a libertação destes compostos directamente pelas células vivas (Andreae, 1983c).

As macroalgas parecem, de um modo geral, assimilar também as formas inorgânicas do arsénio a partir da água convertendo-as activamente, em compostos orgânicos do arsénio muito estáveis (Klumpp, 1979, Sanders, 1979c, Klumpp & Peterson, 1981, Andreae, 1986a). As halófitas (*Spartina* spp.) do mesmo modo, assimilam activamente o As inorgânico. Não está, no entanto, clarificado o papel exacto do filme bacteriano aderente à superfície das plantas; o arsénio absorvido não será por outro lado, aparentemente, biotransformado em compostos orgânicos, como no caso das algas (Sanders & Osman, 1985). A importância

relativa deste reservatório na reciclagem total do arsênio no sistema estuarino pode, no entanto, ser também considerável.

As cadeias tróficas aparentemente discriminam o arsênio em relação ao fósforo diminuindo o "ratio" As : P com a progressão ao longo da cadeia. Ilustra-se essa tendência no Quadro 3-8:

QUADRO 3-8
ARSÊNIO E FÓSFORO AO LONGO DA CADEIA TRÓFICA

	As	P	P/As
Água do mar (superfície)	0,0015	0,016	11
Algas marinhas	25	4.250	170
Crustáceos	1,5	9.000	6.000
Peixes	1,7	18.000	10.600
Mamíferos	0,2	43.000	215.000

Concentrações em $\mu\text{g g}^{-1}$ para a água do mar e mg Kg^{-1} para o material biótico.

(Reproduzido de Andreae, 1986a)

A absorpção de certas formas de arsênio por organismos estuarinos, determina, em todo o caso, para além da sua eventual biotransformação, o transporte desse arsênio associado ao transporte do seu suporte biótico.

Assim o arsênio retido no material fitoplanctónico, macrófito ou halófito deixa de comportar-se conservativamente e, de um modo geral, tende a aumentar o seu tempo de residência no sistema estuarino em relação às formas dissolvidas não assimiladas. Esta tendência será ainda mais marcada para o



arsénio que se incorpora nos níveis tróficos superiores (Sanders, 1986; Show, 1980).

O material particulado e o arsénio nele retido acabarão também por sedimentar dentro ou fora dos limites do estuário o que se traduz num ganho em arsénio do compartimento sedimentar em detrimento do reservatório dissolvido.

O arsénio associado à fase sólida em meio estuarino é, no entanto, controlado não só pelos mecanismos sedimentares característicos do sistema mas também pelo conjunto de processos descritos atrás em 3.4.3.2.

Assim, a absorpção à superfície das argilas e a coprecipitação com os óxidos hidratados de Fe e Mn tendem a ser privilegiados como mecanismos de remoção do arsénio na fase líquida, em detrimento de processos mais lentos (Holm et al., 1979).

Em estuários que recebem consideráveis afluxos fluviais este efeito apreciável pode traduzir-se numa remoção do arsénio dissolvido coincidente, aproximadamente, com a hidratação dos iões de Fe^{3+} e a coagulação dos coloides fluviais de Fe, ou seja, na região em que se verifica uma variação sensível da força iónica e do pH (interface água doce/água salgada) (Langston et al., 1983).

Não é inteiramente claro que este efeito seja igualmente efectivo para o As^{3+} e para o As^{5+} e também não é líquido que a matéria orgânica dissolvida, nomeadamente os ácidos húmicos,



não tenha um papel importante neste processo (Sholkovitz, 1976, Boyle et al., 1977, Moore et al., 1979).

Verifica-se, contudo, que a correlação entre As e Fe é muito estreita, ao contrário do que sucede com o Mn que floclula as salinidades mais baixas (Langston et al., 1983, Wollast, 1979).

Em pleno estuário outros autores sugerem a importância do mecanismo equivalente controlado pelos óxidos de Mn (Peterson & Carpenter, 1986).

Em qualquer caso a coprecipitação com as fases sólidas ricas em Fe e Mn é considerada como o mais importante mecanismo de remoção do arsénio dissolvido, em meio estuarino (Creclius, 1975).

No sedimento sedimentado o arsénio particulado apresenta uma distribuição que é simultaneamente função da concentração (antropogénea) e diluição com sedimentos mais pobres em arsénio e consequência de processos de reciclagem diagenética local (Creclius, 1975, Peterson & Carpenter, 1986, Riedl et al., 1987). As contribuições antropogéneas identificam-se pelos elevados valores dos "ratios" As/Mn e As/Al (Creclius, 1974, Peterson & Carpenter, 1986).

Por outro lado, em águas oxigenadas, é frequente ocorrerem concentrações máximas sub-superficiais do teor total de arsénio na fase sólida do sedimento, máximos que são acompanhados de máximos do arsénio total dissolvido na água intersticial, no

horizonte imediatamente inferior. Este enriquecimento pode explicar-se pela mobilização e difusão vertical de As inorgânico e de Mn^{2+} e sua adsorção/coprecipitação simultânea na interface redox do sedimento (Peterson & Carpenter, 1986).

Peterson e Carpenter encontraram também, na água intersticial de sedimento marinho, perfis verticais que apresentam uma redução brusca do teor de arsênio total dissolvido, abaixo da transição redox. Isto parece indicar uma incorporação significativa do arsênio na fase sólida. Aqueles autores sugerem a formação de soluções sólidas deste elemento com sulfuretos de Fe e Mn (Peterson & Carpenter, 1986).

O mecanismo proposto para o enriquecimento superficial do sedimento em arsênio só será, em todo o caso, efectivo se a taxa de difusão intersticial for significativa comparada com o tempo de residência das partículas de sedimento na camada superficial misturada (SML) (Peterson & Carpenter, 1986). Os processos com mais probabilidades de influenciar esse tempo de residência são a ressuspensão física e a bioturvação (Carpenter et al., 1984) em que organismos como *Scoloplos* spp., *Macoma balthica* e *Nereis succinea* serão particularmente eficazes (Riedl et al., 1987). Assim quando a captação pelos óxidos hidratados de Fe e Mn se não dá perto da superfície do sedimento, o enriquecimento em arsênio dá lugar à sua difusão para a coluna de água sobrenadante, fluxo que poderá ser significativo (Langston et al., 1983; Peterson & Carpenter, 1986).

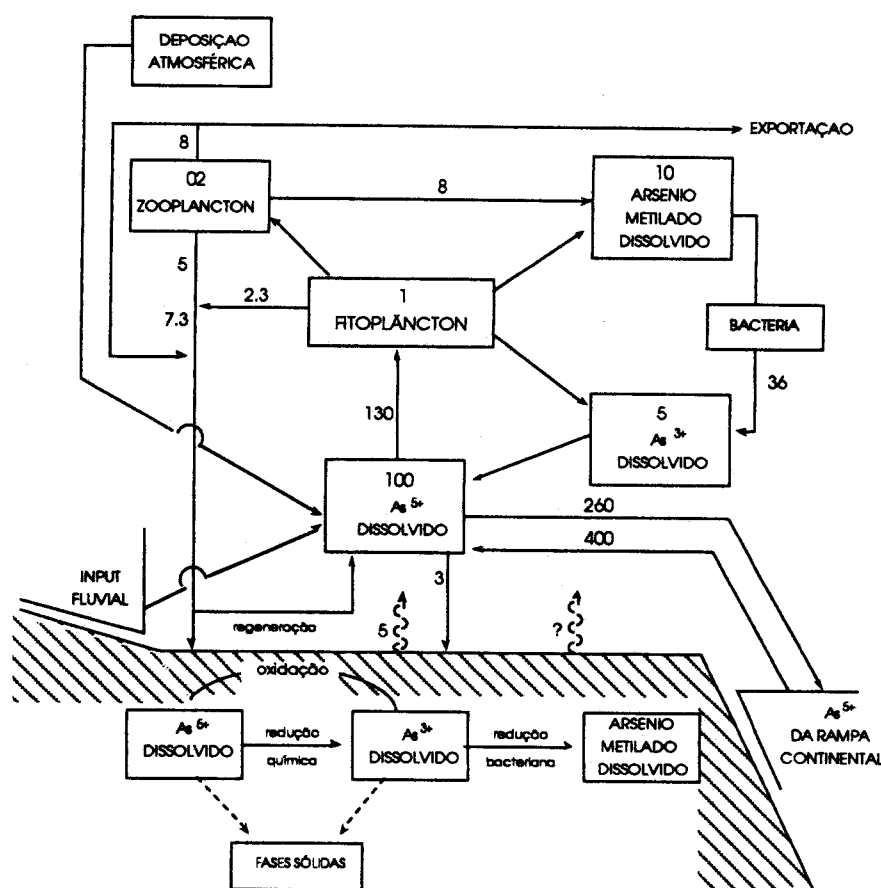


Fig. 7 - Reciclagem biogeoquímica do Arsênio na Baía da Geórgia (reservatórios em 10^4 Kg de As, fluxos em 10^4 Kg ano⁻¹)

(Reproduzido de Sanders, 1980)

Finalmente os compostos organoarsenicais presentes no material particulado, de origem biótica, são também reciclados por demetilação na coluna de água ou no sedimento. Sanders observou, com efeito, a demetilação do ácido dimetilarsínico a arseniato em culturas microbianas de água de estuário (Sanders, 1979b).

Trabalhos recentes comprovam também a demetilação microbiana de compostos metilados (MMA, DMA, TMAO) e ainda organoarsenicais

mais pesados como a arsenobetaina. Esta demetila a TMAO e deste a TMA, DMA, MMA, As^{3+} e As^{5+} , (Hanaoka et al., 1987c, Kaise et al., 1987, Hanaoka et al., 1988, Christakopoulos, 1988, Hanaoka e Tagawa, 1989).

A reciclagem local do arsénio em meio estuarino e costeiro é assim assegurada por um conjunto complexo de mecanismos geofísicos, geoquímicos e biogeoquímicos interdependentes.

Na Fig. 7 apresenta-se esquematicamente este ciclo local, tal como proposto por Sanders para a baía da Georgia (Sanders, 1980).

3.5 - Toxicidade e toxicologia do arsénio

Independentemente de dificuldades que se discutirão adiante em 7.1 a toxicologia tem vindo a acumular informação pertinente relativa à toxicidade das formas químicas mais conhecidas do arsénio.

Assim, no Quadro 3-9 apresentam-se os LD_{50} (ratos) relativos a alguns compostos de arsénio sendo notória a grande diferença de toxicidade entre eles. Este facto parece reflectir tanto a dependência da acção tóxica relativamente à estrutura molecular, como o facto de os compostos orgânicos do arsénio, relativamente inócuos, não serem, regra geral, convertidos metabolicamente nas espécies inorgânicas, mais tóxicas (Andreae, 1986a).

No entanto a própria natureza tóxica desta acção mantém-se, de certo modo, controversa tendo sido apresentada na literatura evidência a favor do seu carácter de nutriente essencial para diversas espécies animais incluindo o Homem (Nielsen & Shuler, 1978, Uthus *et al.*, 1983, 1987, NAS, 1983, O'Connor & Campbell 1985, EPA, 1985).

As presumidas propriedades carcinogêneas do arsénio não estão também bem estabelecidas. Com efeito embora descrito anteriormente como correlacionando estreitamente com o cancro da pele, do pulmão, do fígado e do sistema linfático (Shen & Chen, 1964, Lee & Fraumeni, 1969, Ott *et al.*, 1974, Wildenberg, 1978, IARC, 1980), revisões recentes, nesta matéria, põem em evidência resultados contraditórios e consideram-no um mero co-factor no desenvolvimento daqueles tumores (Harding-Barlow, 1983; Furst, 1983; Squibb & Fowler. 1983). Por outro lado as propriedades carcinoestáticas demonstradas por compostos do tipo $R-S-As(CH_3)_2$ contra a leucémia linfoide em ratos e outras neoplasias (Daniel & Zingaro, 1978; Banks *et al.*, 1979) ajudam à complexidade da situação.

a) Mecanismos bioquímicos da acção tóxica

Parece em todo o caso bem estabelecido que o mecanismo da acção tóxica do arsénio depende da valência do elemento (Fowler, 1983, Pershagen e Vather, 1979). Pode, aliás, pela equação de Kaiser (1979), antecipar-se teoricamente, o distinto comportamento tóxico dos iões As^{3+} e As^{5+} .

QUADRO 3-9

TOXIDADE RELATIVA DE COMPOSTOS DE ARSÊNIO

Arsina	3
Trióxido de arsénio	20
Arsenito de potássio	14
Arseniato de cálcio	20
Ácido monometilarsónico	700 - 1.800
Ácido dimetilarsónico (cacodílico)	700 - 2.600
Trimetilarsénio óxido	10.600*
Ácido fenilarsónico	50
Ácido arsânico	216 - 1.000
Arsenobetaina	≥ 10.000*
Tetrametilarsónio	530 - 980
Arsenocolina	≥ 1% da dieta*
Atoxil	75
Arsfenamina	100
Melarsoprol	250
Estriquinina	16
Aspirina	1.000 - 1.600

LD₅₀ em ratos, mgKg⁻¹

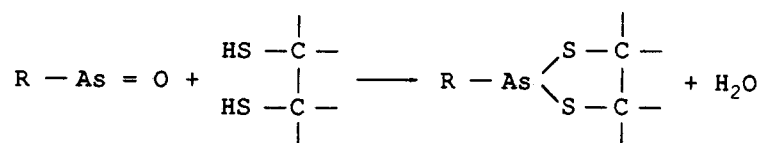
* Ratinhos

(Adaptado de Squibb & Fowler, 1983, Andreae, 1986a, Shiomi, et al., 1988, Kaise et al., 1989)

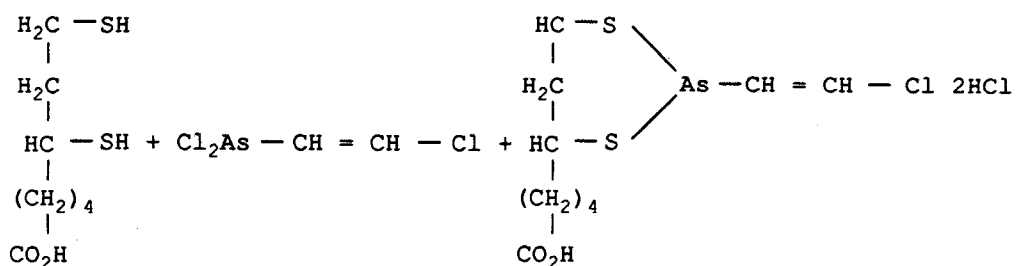
Quer como arsenito quer sob a forma de compostos orgânicos a toxicidade do arsénio trivalente explica-se, em termos bioquímicos, pela sua grande afinidade para os grupos sulfidrilo presentes nos centros activos dos enzimas (Voegtlin et al., 1924; Klumpp, 1979; Squibb & Fowler, 1983).

Este efeito será particularmente acentuado nos enzimas cuja estrutura apresenta dois grupos tiol adjacentes o que permite

ligações cruzadas e a formação de compostos heterocíclicos de arsénio (Peters, 1955; Andraea, 1986a), segundo o esquema:



ou ainda segundo o mecanismo:



A semelhança entre a avitaminose B1 e a intoxicação pelo As^{3+} , referida por diversos autores (Stockten & Thompson, 1949), seria assim explicada pela interferência do arsénio com a dehidrogenase pirúvica (Schiller et al., 1977, Klumpp, 1979).

Por outro lado os compostos orgânicos trivalentes do arsénio apresentam um espectro de acção muito lato interferindo com uma grande variedade de funções biológicas importantes (Shroeder & Ballassa, 1966). As arseninas, as formas de arsénio mais tóxicas conhecidas, são poderosos agentes hemolíticos actuando, aparentemente, pela inibição da cataláse dos eritrocitos (Kensler et al., 1946, Vallee et al., 1960, Wilkinson et al., 1975). O arsénio trivalente pode ainda inibir, indirectamente, os enzimas quer reagindo com os grupos sulfidriilo de substractos e intermediários, quer por interacção competitiva de organoarsenicais estruturalmente semelhantes, quer ainda por

efeitos aniônicos não específicos (Squibb & Fowler, 1983).

O mecanismo tóxico do arsénio pentavalente é menos bem compreendido (Klumpp, 1979; Squibb & Fowler, 1983).

Tem sido sugerido que é reduzido "in vivo" a arsénio trivalente actuando então pelos mecanismos acima referidos (Vallee et al., 1960, Borst Pauwels et al., 1965).

Presume-se, em todo o caso, que actue directamente por arsenólise ou seja pela substituição do fosfato na síntese do ATP, conduzindo à formação de ésteres arsenicais instáveis, até agora, no entanto, não identificados positivamente (Gesser, 1981, Zingaro & Bottino, 1983, Andreae, 1986a). Estes ésteres hidrolizam não enzimaticamente pelo que a sua energia de ligação não é recuperada dando-se a desciclagem da fosforilação oxidativa com queda do metabolismo energético (Ter Welle & Slater, 1964, Gesser, 1981, Andreae 1986a).

Este diferente comportamento bioquímico traduz-se em distintos processos metabólicos sendo o As^{5+} rapidamente excretado pelos animais ao contrário do As^{3+} que acumula nos tecidos queratinizados (Klumpp, 1979).

Foi ainda proposto recentemente um mecanismo em que tanto o arsénio trivalente como o arsénio pentavalente são reduzidos "in vivo" a ácido arsenoso $HAs(OH)_2$ ou ao seu análogo orgânico $RAs(OH)_2$ que seriam as espécies efectivamente inibidoras dos

enzimas (Knowles & Benson, 1983); este mecanismo, em todo o caso, carece de confirmação experimental (Andreae, 1986a).

b) Toxicidade "in vivo"

Os efeitos tóxicos "in vivo" do arsénio são, como se poderia esperar, muito variados e dependem da sua forma química, da concentração, das condições de exposição e do organismo intoxicado.

A toxicidade aguda das formas inorgânicas do arsénio, em mamíferos e no próprio Homem, está relativamente bem caracterizada (Squibb & Fowler, 1983).

Em ratos, a dose letal LD₅₀, varia entre 15 a 293 mg/Kg e é função do estado de oxidação do composto e da via de administração. No Homem a dose fatal (As₂O₃) varia entre 70 e 180 mg (Pershagen & Vahter, 1979).

O quadro mórbido inclui (independente do estado de oxidação do composto) profundas perturbações gastro-intestinais com vômitos e diarreias; dores musculares, vasodilatação com hiperémia (particularmente do pâncreas (Hanna & MacHugo, 1960)), edema, queda da pressão arterial e, eventualmente, choque (Pershagen & Vahter, 1979; Squibb & Fowler, 1983).

Podem também observar-se perturbações cardíacas e renais. A oligúria é característica do envenenamento pelo arsénio (Buck

et al., 1973). Há ainda perda do movimento voluntário com eventual paralisia da respiração (Squibb & Fowler, 1983).

Os compostos orgânicos de arsénio de origem antropogénea são, em geral, menos tóxicos para mamíferos que os compostos inorgânicos (Quadro 3-9); em todo o caso os sintomas de intoxicação aguda são semelhantes aos das intoxicação pelo arsenito (Squibb & Fowler, 1983).

No Homem a intoxicação sub-aguda e crónica está também bem documentada (Webb, 1966, Pershagen, 1983).

Envolve de um modo geral o desenvolvimento de dermatoses de vários tipos com hiperpigmentação, hiperkeratóse, descamação e queda do cabelo; depressão hematopoiética, lesão do fígado caracterizado por icterícia, cirrose do tipo portal e ascites; inclui também perturbações sensoriais e nevrites periféricas, anorexia e perda de peso (Webb, 1966). A perfuração do septo nasal no prazo de 1-2 semanas é característica (Pershagen & Vahter, 1979).

Um aspecto interessante é o efeito sobre o sistema imunológico. Gainer e colaboradores apresentam com efeito observações que indicam uma diminuição da resistência à infecção viral em resultado da exposição ao arsénio inorgânico, a níveis sub-letais. Esta exposição inibirá a acção defensiva do "interferon" (Gainer & Pry, 1972).

Numerosos trabalhos comprovam também a sua toxicidade transplacentar (Squibb & Fowler, 1983).

A questão da carcinogenicidade do arsénio mantém-se, como referido, em aberto.

Um aspecto até certo ponto inquietante que resulta de estudos recentes (Bennett, 1981) é o de que, aparentemente, não haver uma clara margem de segurança entre os níveis de exposição actuais a que estão sujeitas as populações humanas e os níveis sub-letais.

A resposta dos diversos grupos de organismos à acção tóxica do arsénio em meio aquático é diferenciada.

Nos microorganismos, o mecanismo geral, parece ter uma estreita relação com a permeabilidade da célula; assim a sensibilidade dos micróbios depende mais do tipo de molécula que da valência do elemento (Klumpp, 1979).

O fitoplâncton, por outro lado, parece ser mais sensível ao As^{5+} que ao As^{3+} (Planas & Healey, 1978, Sanders, 1979a, Zingaro & Bottino, 1983) verificando-se para as suas formas marinhas, a inibição da produção primária a partir de concentrações 67 nM de arseniato. Neste nível de concentrações o arsénio dimetilado não terá qualquer efeito sensível. Este efeito do arseniato pode, no entanto, ser contrariado por altos níveis de fosfato (Sanders, 1979a, Sanders & Cibik, 1985).

Os macrófitos dulçaquícolas ou marinhos acumulam arsénio a níveis muito altos aparentemente sem efeitos negativos (Sanders 1979c). Do mesmo modo os invertebrados e peixes apresentam concentrações totais de arsénio que implicariam certamente efeitos tóxicos agudos se fossem unicamente constituídas pelas espécies inorgânicas mais frequentes nas águas naturais (ver Quadro 3-7). A incorporação do átomo de arsénio em estruturas tetralquiladas do tipo arsenobetaina ou arsenocolina (ver adiante 7.1 Fig. 53a) e b)) parece traduzir-se, com efeito, numa inaptidão para a ligação aos grupos tiol e numa acrescida resistência à sua conversão metabólica nas formas mais tóxicas (Andreae, 1986a).

Nas algas parece ter um efeito semelhante a conversão das espécies inorgânicas em espécies metiladas ou estruturas mais pesadas do tipo arsenoribosidos (ver adiante 7-1).

A toxicidade dos compostos organoarsenicais é, com efeito, dum modo geral, várias ordens de grandeza mais baixa que a das espécies inorgânicas (Quadro 3-9) e, particularmente, no caso dos compostos acima referidos. Assim (pese embora o conjunto de incertezas que se mantêm no que respeita à sua identidade e ao seu processo de síntese e bioacumulação (ver adiante 7.2)), a ocorrência de compostos organoarsenicais em proporções consideráveis nos organismos aquáticos parece reflectir a intervenção de um mecanismo de desintoxicação tanto mais significativo quanto generalizado (Thayer, 1984; Andreae, 1986a). Uma excepção é constituída pelos sais de tetrametilarsónio que serão consideravelmente mais tóxicos que

a arsenobetaina (Quadro 3-9).

c) Classificação dos compostos de arsénio sob o ponto de vista da toxicidade

Penrose e Woolson sistematizam por ordem decrescente de toxicidade, da arsina ao arsénio metal, os grupos de compostos de arsénio conhecidos (Penrose & Woolson, 1974). A série é a seguinte:

arsina > arsenito > arsenóxidos (trivalentes com ligação dupla ao oxigénio) > arseniato > arsenicais pentavalentes (e.g. ácidos arsónicos) > compostos de arsónio (tetralquilados com carga positiva no átomo de As) > arsénio metal.

Mais recentemente Zielhuis e Wibowo (1984), com base na revisão das suas propriedades físico-químicas, da sua toxicocinética e da sua toxicodinâmica, sugerem a classificação dos compostos de arsénio em três grupos:

1 - Compostos inorgânicos solúveis na água (As-a): fluoreto, trióxido, pentóxido, arsenitos de Mg/Na/K, arseniato de Na/K;

2 - Compostos inorgânicos pouco solúveis/insolúveis na água (As-b): arsénio metal, seleneto e sulfureto de arsénio, arseneto de Cd/Cr/Co/Mn/Ni/Ti/Zn, arsenito de Pb/Ni, arseniato de Fe/Pb/Mg/Hg/Ni/Zn;

3 - Compostos orgânicos de arsénio (As-c):

3.1 - Em organismos marinhos e eventualmente como metabolitos noutros alimentos (As-cl)

3.2 - De origem antropogénica (drogas, pesticidas) (As-c2)

Os compostos As-a e As-b são correlacionados com o cancro de pele e o cancro ocupacional do pulmão, respectivamente. Os compostos As-cl não apresentam praticamente potencial tóxico significativo para o Homem (W.H.O, 1967, 1973).

Para todos os efeitos e como para outros elementos a toxicidade das diferentes espécies de arsénio parece variar na razão inversa da sua estabilidade química e bioquímica, (Schroeder & Ballassa, 1966).

Em todo o caso (independentemente do bem fundado dos sistemas de classificação elaborados) parece evidente, a importância fundamental que assume o conhecimento da especiação actual deste elemento no meio ambiente natural para a toxicologia ambiental humana e para a ecotoxicologia.



(Costa, 1957, 1965).

A fisiografia, própria dum espriado pouco profundo, contribui também para diminuir localmente as condições de dispersão quer pelo aumento do tempo de mistura transversal, quer, aparentemente, pelo enfraquecimento das correntes de maré e da circulação gravitacional. Ao contrário a maior exposição aos ventos dominantes combinada com o referido abrandamento da circulação forçada parece aumentar, nessa zona menos profunda, a influência da atmosfera na circulação residual, a turbulência induzida pelo vento e ainda, naturalmente, a mistura na vertical da coluna da água. As condições de rearejamento são excelentes (Bettencourt et al., 1980a).

Em qualquer caso a onda de maré, que parece situar-se numa posição intermédia entre um sistema estacionário e uma onda progressiva, (sendo a componente estacionária, em todo o caso, a mais importante), dominará, quer em termos de advecção, quer em termos de transporte dispersivo, quer ainda como factor determinante da estrutura vertical do estuário, a sua circulação. As correntes de maré assumem um carácter acentuadamente longitudinal que é compensado por revessas nas zonas de menor circulação (Oliveira, 1941; Costa, 1957, 1965). A excursão de maré varia entre 6.500m e 20.600 m (Oliveira, 1941; Costa, 1957; Bettencourt et al., 1980a). A velocidade da água pode ultrapassar os 2,3 m/s no canal de vazante junto à margem sul (Bettencourt et al., 1980a).

4 - O ESTUÁRIO DO TEJO

4.1 - **Fisiografia, hidrodinâmica, sedimentologia**

O rio Tejo nasce na serra de Albarracin, em Espanha, e apresenta um desenvolvimento de cerca de 1070 Km da nascente até à foz.

O seu estuário, um dos mais importantes da costa atlântica europeia, (Fig. 8b) tem o seu limite, a montante, no termo da propagação normal da maré dinâmica, perto de Muge, e, a jusante, de um modo menos definido, no limite da pluma salobra que se desenha nas águas da zona costeira adjacente (Fig. 8a). A secção Beato-Montijo permite distinguir "grosso modo" dois troços; o primeiro, a montante, parece corresponder ao ajustamento da erosão e da sedimentação num estuário mais antigo (Dyer, 1973); o segundo a jusante decorrerá da erosão de extractos terciários em período mais recente (Andrade, 1933; Carvalho, 1968).

No conjunto as características notáveis no estuário são determinadas sobretudo pela sua fisiografia peculiar dominada pela extraordinária capacidade de armazenamento das zonas menos profundas do Mar da Palha e do delta interior (85% da área e e 4/5 do prisma de maré), pela extensão da zona entremarés que excede 40% da sua superfície total e ainda por notáveis descontinuidades como a existente na secção Cacilhas-Cais do Sodré, testemunhas da origem tectónica do actual estuário e responsáveis por particularidades complexas da sua circulação

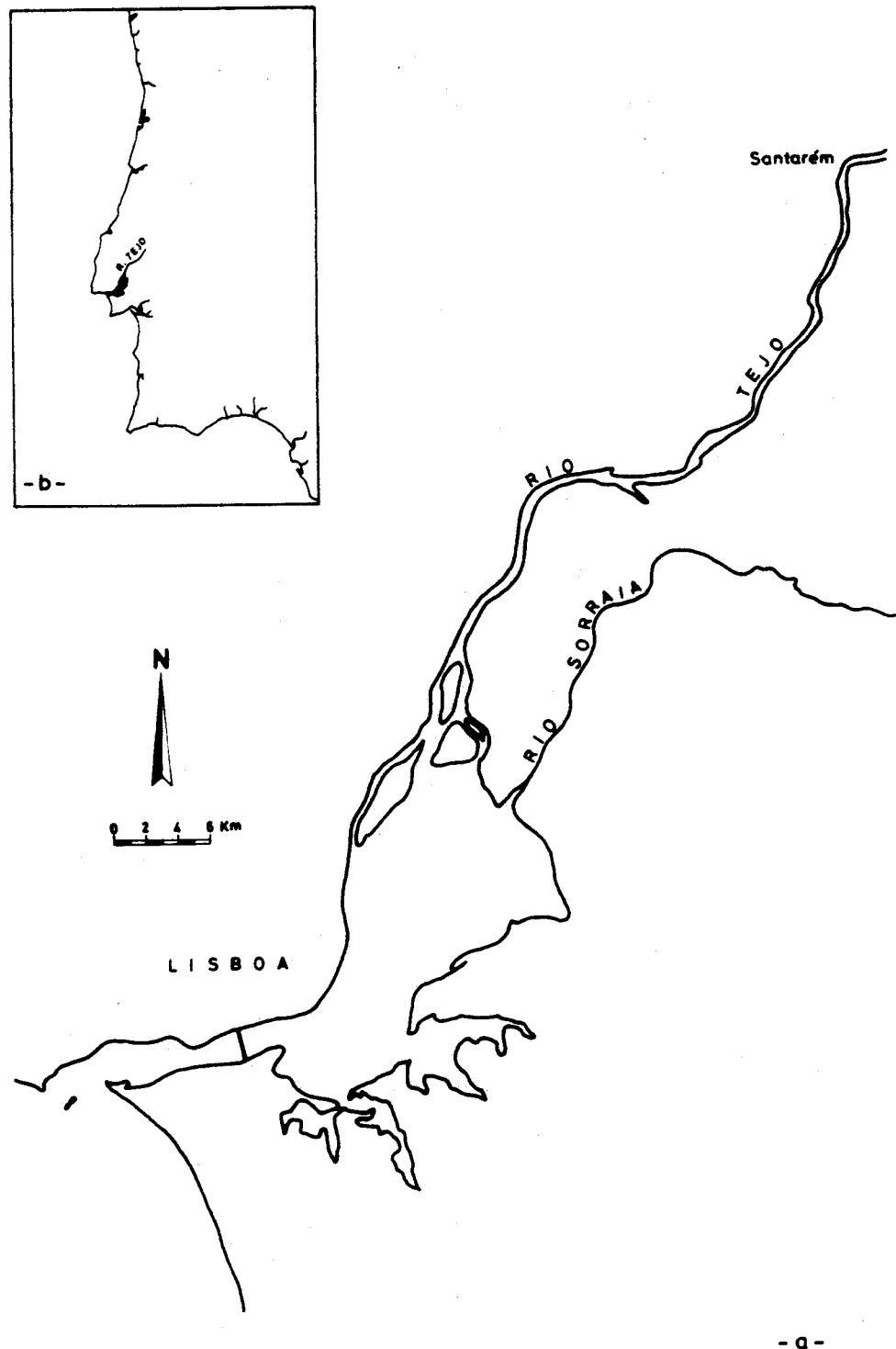


Fig. 8 - a) Limites geográficos do estuário do Tejo b) Localização do estuário do Tejo na costa da Península Ibérica.

Esta situação traduz-se na ocorrência de condições favoráveis de dispersão e escoamento de poluentes nas águas do estuário sobretudo à medida que nos aproximamos da Barra. Assim determinam-se coeficientes de dispersão logitudinais, K_{xx} , que variam entre 130 e 2.000 m^2/s , caudais de escoamento, Q_d , entre 180 e 7.100 m^3/s e tempos de residência da água doce, t_f , entre 8,5 e 50 dias (CNA, 1979, Bettencourt et al., 1980a, Costa & Bettencourt, 1980).

A circulação residual, por outro lado, sugere a localização do máximo de turbidez um pouco a montante da secção Beato-Montijo o que parece coerente com a distribuição da matéria em suspensão e com a natureza dos fundos (Bettencourt et al., 1980a, Castanheiro, 1982, 1985).

No entanto, o sistema parece, do ponto de vista sedimentar, determinado fundamentalmente por acontecimentos excepcionais como cheias e temporais. Com efeito se a maré se pode considerar como o factor dominante em relação ao transporte da água o mesmo já não acontece em relação ao sedimento em que o rio Tejo e a sua cheia, com um contribuição calculada em $1-5 \times 10^6$ toneladas por ano aparecem claramente como os factores determinantes do balanço geral (Bettencourt, 1980a, 1984).

A amplitude de maré observada e as características geomórficas da sua foz, a montante como a jusante, permitem incluir o estuário do Tejo na classe de estuários mesotidais (Hayes, 1976).

Da aplicação da razão de fluxos ou do diagrama de Hansen e Rattray o estuário do Tejo resulta também, dum modo geral, incluído na categoria dos estuários parcialmente estratificados (Fiadeiro, 1979; Bettencourt et al., 1980a).

No Quadro 4-1 indicam-se, entre outras, as principais características fisiográficas do estuário do Tejo tomando como limite jusante a secção S. Julião da Barra-Bugio.

4.2 - Produção primária, flora e fauna

O regime de nutrientes do estuário do Tejo é mal conhecido (Bettencourt et al., 1980b, Martins et al., 1982). Parece claro, no entanto, que as formas oxidadas de azoto ($N-NO_3+NO_2$) observam uma distribuição linear conservativa, com mínimos no verão e máximos no inverno e primavera, aparentemente em resposta à contribuição fluvial de nitratos.

O silicato dissolvido apresenta também um comportamento notavelmente conservativo (Bettencourt et al., 1980b).

O fosfato, todavia, dependente de mecanismos geoquímicos mais complexos apresenta uma notável invariância nas zonas menos profundas e uma inflexão descendente no troço terminal junto ao mar. Este comportamento parece indicar a existência de mecanismos reguladores da concentração deste nutriente na coluna de água a partir dos sedimentos, como sucede noutros estuários (Nixon et al., 1980; Martins et al., 1982).

QUADRO 4-1

CARACTERÍSTICAS DO ESTUÁRIO DO TEJO

Área da bacia	80 630 Km ²
Precipitação média anual na bacia	700 mm
Comprimento do rio	1 070 Km
Caudal do rio (interanual)	400 m ³ /s
Caudal do rio (gama)	100 - ≥ 2.000m ³ /s
Área total do estuário	325 Km ²
Comprimento do estuário	50 Km
Área intertidal	130 Km ²
Largura máxima	15 160 m
Largura média	4 040 m
Profundidade (hidráulica) máxima	32 m
Profundidade (hidráulica) média	10,6 m
Volume total médio (NM)	1890 x 10 ⁶ m ³
Prisma de maré médio	600 x 10 ⁶ m ³
Excursão de maré	6 - 20 Km
Tempo de residência da água doce	8 - 50 dias
Afluxo de sedimento fluvial	1 - 5 x 10 ⁶ Ton/ano

O fosfato não correlaciona assim com o nitrato e o silicato que, no entanto, apresentam estreita correlação entre si (Bettencourt et al., 1980b).

A distribuição das espécies fitoplanctónicas, sua produção e ecologia também não são bem conhecidas no estuário do Tejo (Rodrigues & Moita, 1980, Moita, 1982b). Admite-se no entanto que o "stock" de fitoplacton estuarino, em período vegetativo, seja estreitamente dependente da produção primária do rio com maré, ou seja, fundamentalmente aloctónico (Silva et al., 1969, Bettencourt et al., 1980b, Moita, 1982a).

A já referida morfologia peculiar do estuário, a existência de uma barreira de salinidade selectiva em relação à maioria das formas de água doce, e o controle correntemente exercido pelas populações de zooplâncton e pela turbidez explicarão, em parte, o relativo empobrecimento do fitoplâncton da zona do delta interior (Monteiro, 1971, Bettencourt et al., 1980b, Moita, 1982) que será assim de carácter fundamentalmente detritico (Martins et al., 1982).

A jusante do Mar da Palha as populações de fitoplâncton recuperam com espécies caracteristicamente estuarinas ou eurihalinas quando não registam "blooms" espectaculares (Cabeçadas et al., 1983). No conjunto registam-se máximos de produção em Abril, Junho, Julho e Agosto e picos secundários em Setembro, Outubro e Novembro (Silva et al., 1969, Rodrigues & Moita, 1980, Moita, 1982a) sendo as populações, dum modo geral, dominadas por diatomáceas como *Cyclotella meneghiniana*, *Fragilaria crotonensis*, *Skeletonema costatum*, *Stephanodiscus tenuis* e *Melosira granulata* (Rodrigues & Moita, 1980, Moita, 1982b).

Análises preliminares sugerem que esta produção será na generalidade das situações limitada pelo azoto (Bettencourt et al., 1980b).

Estimativas preliminares sugerem ainda que o valor líquido médio desta produção poderá ser da mesma ordem de grandeza da produção do sapal, estimada em cerca de 12.500 ton de C/ano, sendo aparentemente indecível, neste momento, da existência

de uma cadeia trófica dominante no estuário do Tejo (Bettencourt et al., 1980b).

O sapal com cerca de 1.300 ha de formações de angiospérmicas é constituído sobretudo por *Spartina stricta*, *Athrocnemum fruticosum*, *Atriplex portulacoides* e *Phragmites comunis* (Ramos & Catarino, 1979).

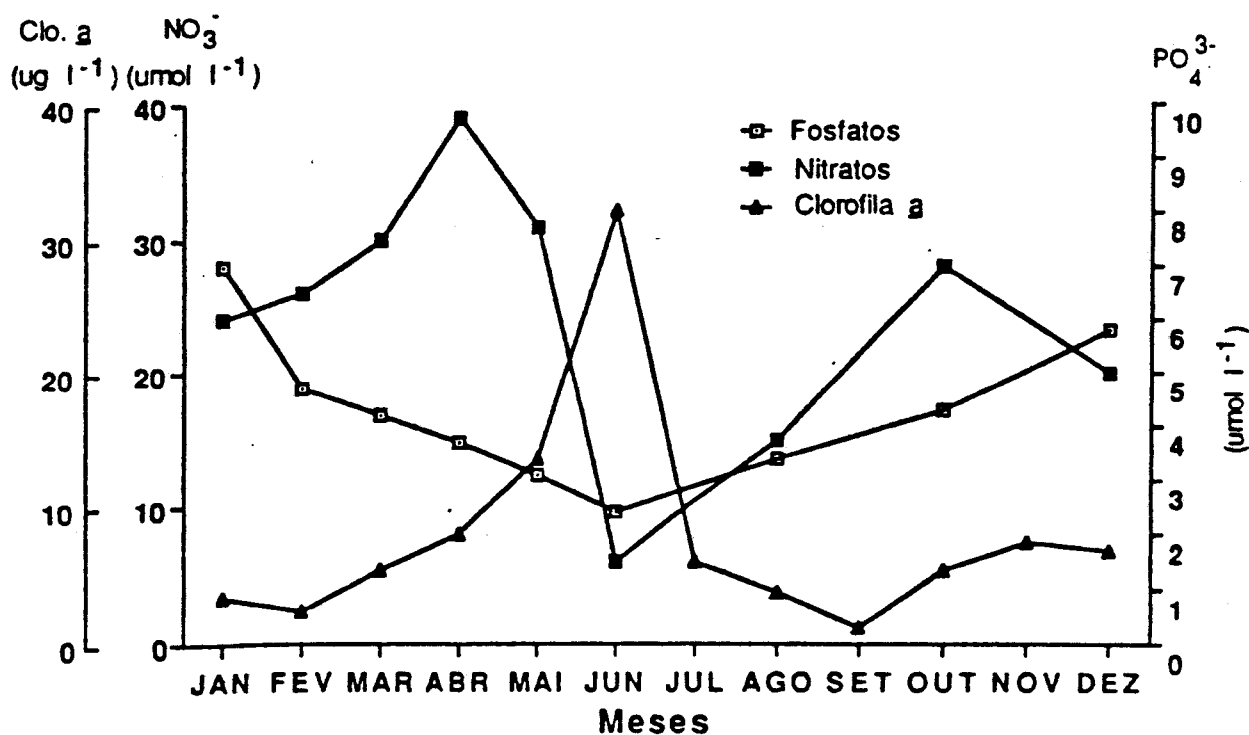


Fig. 9 - Variação de clorofila *a*, nitrato e fosfato na estação #2.0, durante o ano de 1981. Valores de superfície em preia-mar, extraídos de Martins et al., 1981. (Os valores de clorofila *a* de Setembro a Novembro são de 1980, por inexistência de resultados em 1981, devendo portanto ser considerados somente como indicativos da possível variação desse parâmetro em 1981).

(Reproduzido de Ferreira, J.G 1988)

Por outro lado a zona entre marés é colonizada por várias espécies de algas macrófitas com particular relevância para *Fucus vesiculosus* L., *Ulva lactuca* L., *Gracilaria verrucosa*

(Huds.) *Pappenfuss* e *Polysiphonia* sp.. O valor bruto desta produção é estimado, por sua vez, em cerca de 5.000 ton/ano (Ferreira, 1988).

O zooplâncton apresenta um padrão de distribuição aparentemente correlacionado com o que se conhece do fitoplâncton, com populações dominadas por espécies de água doce como *Bosmina longirostis* (Cladocera), *Calanipeda aquaedulcis* e *Acanthocyclops robustus* (Copepoda) nas estações do rio sujeito a maré e um máximo de biomassa na região central do estuário constituído sobretudo por espécies como *Mesopodopsis slabberi* (Mysidacea), *Acartia tonsa*, *A. clausi*, *Euterpina acutifrons* e *Centropages hamatus* (Copepoda) (Sobral, 1982).

Já a ocorrência de altos valores de biomassa durante o inverno é difícil de explicar exclusivamente com base na cadeia trófica a partir do fitoplâncton (Sobral, 1982; Turner, 1982).

Também não se pode dizer que os níveis mais elevados da pirâmide trófica sejam suficientemente conhecidos no estuário do Tejo apesar dos esforços recentemente efectuados (Reis, 1980, Saldanha, 1980, Costa, 1980, 1982, 1986).

No conjunto registam-se cerca de 150 espécies de macroinvertebrados, incluindo 6 Cnidaria, 41 Annelida, 61 Molusca, 40 Arthropoda e 2 Echinodermata (Reis, 1980). Registam-se também um total de 77 espécies de peixes das quais uma de Ciclostomata, 9 de Elasmobranchi e 67 de Actinopterygii (Costa, 1980).

Este conjunto entretêm entre si e com as outras componentes do sistema uma rede complexa de relações eventualmente importante na reciclagem biogeoquímica de elementos como o arsénio, mas só parcialmente elucidada.

Explorando a ecologia alimentar de um número considerável de espécies ícticas Costa estabeleceu, com efeito, recentemente, um conjunto de relações tróficas detalhado que se apresenta esquematicamente na Fig. 10 (Costa, 1988).

Nele é possível destacar, por um lado, o peso dominante em termos de biomassa do grupo detritívoro constituído pelos mugilídeos *Mugil cephalus*, *Chellon labrosus*, *Liza aurata* e *Liza ramada*, e, por outro, o papel central desempenhado pelos decápodes e pelos poliquetas na rede de relações estabelecida, com especial destaque para *Crangon crangon* e para *Nereis diversicolor* (Costa, 1988).

Admite-se que estas espécies desempenhem um papel relevante na economia do arsénio no estuário.

O estuário do Tejo e a sua Reserva Natural constituem ainda um sistema de importância internacional para limícolas invernantes. É o caso de *Recurvirostra avoceta* (50% da população europeia), *Pluviatillia squatarola*, *Limosa limosa* e *Calidris alpina* (Rufino, 1989). Algumas destas espécies são indicadas na literatura como acumuladores de arsénio (Goede & Bruin, 1985). Não se dispõe no entanto de dados relativos à sua contaminação por metais e metalóides, neste estuário.

4.3 - Emissões e qualidade do ambiente estuarino

Embora não se observem situações características de anoxia e de eutrofização à distribuição do oxigénio dissolvido e nutrientes essenciais no corpo central do estuário sobrepõem-se incrementos de amónia, BOD, fosfato, silicato e coliformes fecais, sobretudo nas zonas marginais e facilmente correlacionáveis com descargas de efluente urbano e industrial sem tratamento (Costa, 1965, Bettencourt et al., 1980b).

Em particular, a contaminação bacteriana, em resposta simultaneamente às características da circulação marginal e ao efeito de mortalidade natural, confina-se predominantemente a áreas marginais (Bettencourt & Costa, 1983, Costa, 1988).

No Quadro 4-2 apresentam-se as cargas poluentes domésticas e industriais equivalentes, estimadas em OD, para cada bacia afluenta ao estuário do Tejo.

No Quadro 4-3 apresenta-se ainda a comparação das cargas introduzidas pelo rio e pelo esgoto urbano marginal em BOD, sólidos suspensos, azoto e fósforo total (Bettencourt, 1984), sendo evidente a importância da contribuição urbana, de que Lisboa constitui cerca de 50%, em termos de BOD e P_{total} .

A contaminação por metais pesados e compostos organoclorados persistentes embora sensivelmente mais dispersa observa também gradientes localizados sobretudo na margem sul, onde aparentemente se regista uma estreita correlação entre as zonas

identificadas como quimicamente poluídas e as zonas correspondentes a povoadamentos bentónicos empobrecidos (Bettencourt et al., 1980b).

CADEIA TRÓFICA

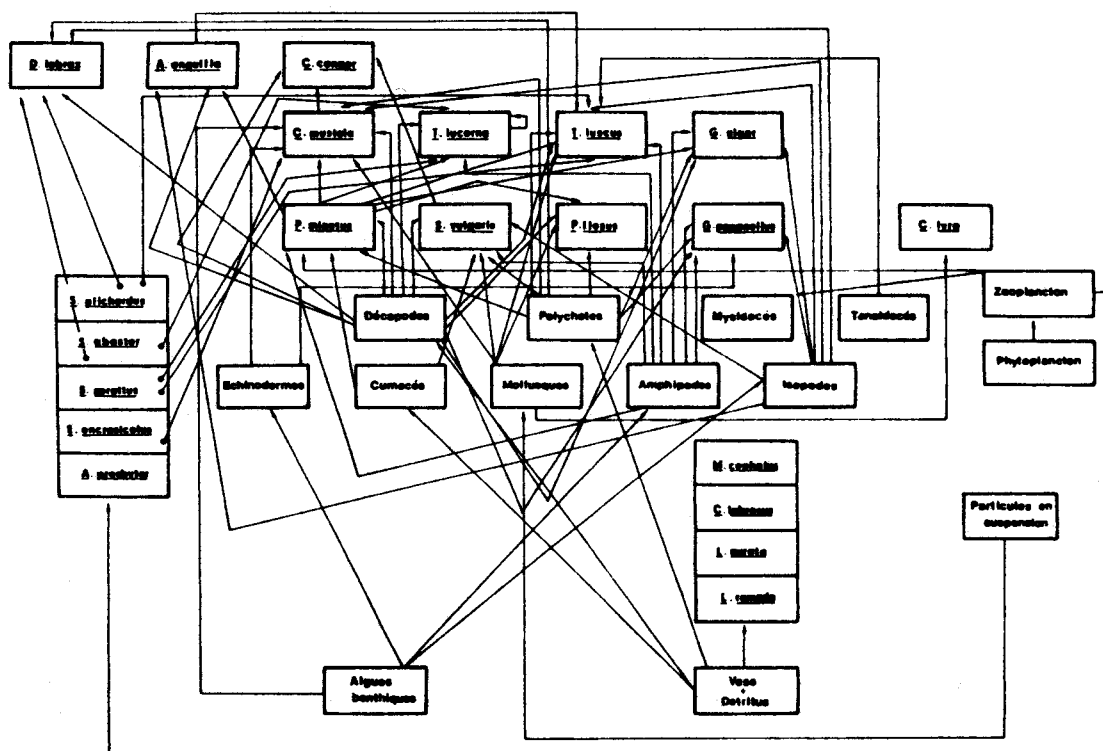


Fig. 10 - Esquema da rede trófica no estuário do Tejo

(Reproduzido de M.J. Costa, 1988)

Um resultado importante anteriormente estabelecido (Bettencourt et al., 1980b) é a identificação dos níveis atingidos nos sedimentos da região do Barreiro por alguns metais pesados e metalóides de estatuto toxicológico conhecido. Sobretudo para o Pb, o As, o Hg, o Cu e o Zn estes níveis podem considerar-se alarmantes. Para alguns destes elementos e nomeadamente para o

As, é também evidente uma clara correlação com as principais descargas industriais da região.

Na Fig. 11 apresenta-se a distribuição do As nos sedimentos do estuário tal como resulta das campanhas por nós efectuadas em 1978, e por Martin e colaboradores em 1981 e 1982 (Bettencourt, 1978, Martin, 1981, 1984). O valor médio cerca de 252 ppm, (mediana 110 ppm) aumenta para 557 ppm, (mediana 230 ppm) na vizinhança do Barreiro. As concentrações máximas atingem 2-3.000 ppm (Bettencourt et al., 1980b). Um pico de cerca de 300 ppm é também detectável não muito longe da Soda Póvoa (Martin, 1984).

Martin constata que o nível geral de contaminação dos sedimentos do Tejo pelo arsénio é duas ordens de grandeza superior aos valores naturais encontrados em meio fluvial e estuarino (Quadro 3-7).

Este autor calcula a emissão total de As indirectamente a partir do quociente As/Hg nos sedimentos e dos valores disponíveis para a descarga de mercúrio (Janeiro, 1981) obtendo o valor de 650 Kg/dia (Martin, 1984).

Andreae, por outro lado, partindo das concentrações medidas para o conjunto de espécies de arsénio conhecidas na água do Tejo (Andreae et al., 1983b) recorrendo a um modelo de mistura simples (Kaul e Froelich 1984) e ainda à emissão calculada de Sb e a um quociente As/Sb de 8.1 (Germani et al., 1981) estima essa emissão em 541 ± 124 Kg/dia (Andreae, 1983b).

QUADRO 4-2

CARGAS POLUENTES DOMÉSTICAS E INDUSTRIAIS

BACIA	HAB.	HAB. EQUIV.	% IND.	BOD. Kg/dia
Vinhas	46 137	6 435	12,2	2 858
Lage	90 173	46 530	34	7 522
Barcarena	55 973	31 065	35,7	4 793
Jamor	119 351	75 735	28,8	10 762
Trancão	153 970	197 362	56,2	19 564
Rio Frio	24 194	8 265	25,5	1 778
Moita	45 000	12 950	21,7	3 141
Malpique	33 812	18 055	24,6	2 456
Coína	112 775	40 360	26,4	8 390
Judeu	30 505	8 025	20,8	2 105
Sto. Estevão	16 881			912
Lisboa	1 068 276	582 520	35,3	90 890
Sta. Marta	155 474	155 440	50	17 256
Vila Franca	112 962	552 870	83	37 614
Caparide	104 676	9 855	8,6	6 214

(Reproduzido de Bettencourt, 1984)

QUADRO 4-3

CARGAS POLUENTES NO ESTUÁRIO DO TEJO (Ton/ano)

	BOD.	SÓLIDOS S.	AZOTO TOTAL	FÓSFORO TOTAL
Rio Tejo	> 30 000	$1 - 5 \times 10^6$	> 30 000 - - 40 000	> 2 200
Esgotos Lisboa s/ tratamento 1980	26 000	26 100	5 900	1 000
Total descargas domésticas s/ tratamento 1980 2010	51 800 81 000	50 140 68 000	9 120 14 000	1 830 2 920

(Reproduzido de Bettencourt, 1984)

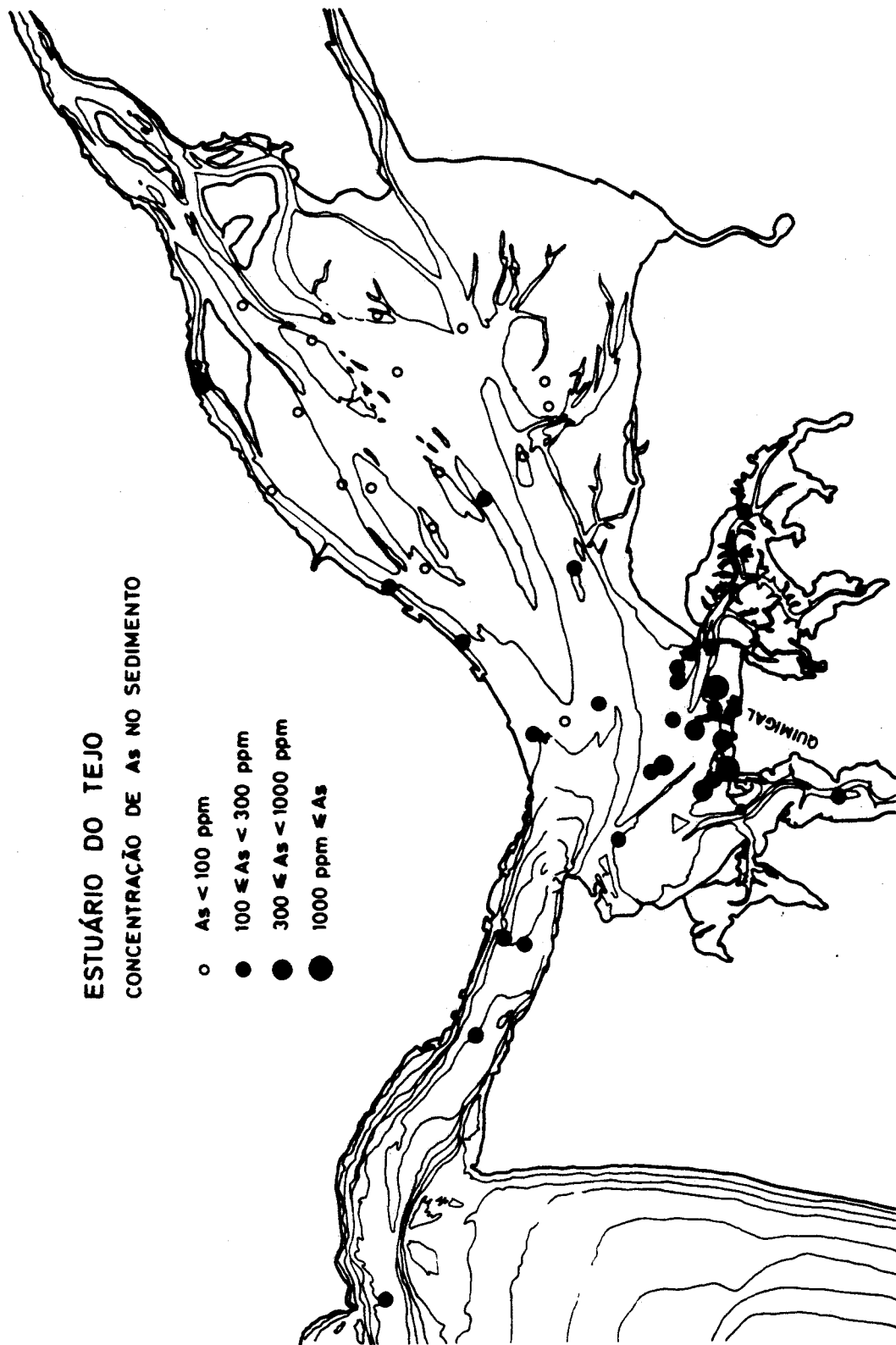


Fig.11 - Concentrações de arsénio no sedimento do estuário do Tejo

É também possível calcular um limite superior para a emissão total (incluindo a emissão atmosférica) a partir da tonelagem de pirite processada no Barreiro entre 1945 e 1981 e do respectivo teor de arsénio (Quimigal, 1982). Os valores médios anuais assim obtidos são 220.000.000 ton de pirite e 1.140 ton de As com um máximo entre 1972 e 1976 de 350.000 ton de pirite/ano e 1.800 ton de As/ano. Não se dispõe de informação suficiente para proceder ao fraccionamento deste volume em função das emissões directas e indirectas dos fornos da Quimigal. No entanto o valor encontrado parece coerente com as estimativas anteriores sobretudo se se tiver em conta que, de uma maneira ou de outra, uma fracção considerável do material processado deverá ser retido na vizinhança imediata da fonte (Crecelius, 1974, Penrose, 1974, Andreae, 1983b). Estes valores são significativos à escala global (ver atrás 3.4.1).

Desta análise resulta portanto a identificação do arsénio como contaminante de primeira importância no estuário do Tejo. Esta situação é ainda aparentemente confirmada pelos teores encontrados por Costa para peixes e mariscos adquiridos no mercado da Ribeira (Costa et al., 1969, 1974). Esta constatação é a causa próxima da abertura de uma linha de investigação sobre o arsénio no âmbito do Estudo Ambiental do Estuário do Tejo de que este trabalho constitui o desenvolvimento e a síntese no momento presente (O'Kane, 1982).

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Colheita das amostras

As amostras de água de superfície (60) foram colhidas em frascos Kartell de 1 l de capacidade, previamente descontaminados e geralmente fixos a um amostrador em acrílico, que se reproduziu de um modelo correntemente utilizado na Scripps Institution of Oceanography.

As amostras de água de fundo foram colhidas em garrafas WILCO de 4 l de capacidade também previamente descontaminadas de acordo com o procedimento geral.

Com objectivos específicos para que pareceu conveniente eliminar a eventual influência da microcamada superficial, foram ainda recolhidas amostras de água sub-superficial. Nesta colheita, efectuada com luvas de polietileno "Brand", utilizaram-se também frascos Kartell de 1 l de capacidade previamente descontaminados.

A localização aproximada do conjunto de estações utilizado neste trabalho indica-se na Fig.12.

O calendário das colheitas foi o seguinte:

Campanha I	18-19/07/83
Campanha II	25-26/11/83
Campanha III	6-7, 5 e 12/12/83
Campanha IV	9, 13/08/84
Amostra para digestão preliminar	19/09/86
Amostra para ultrafiltração	30/01/87
Amostra F ₀₀	14/03/87, 3/04/87
Amostra G ₀₀	06/08/87

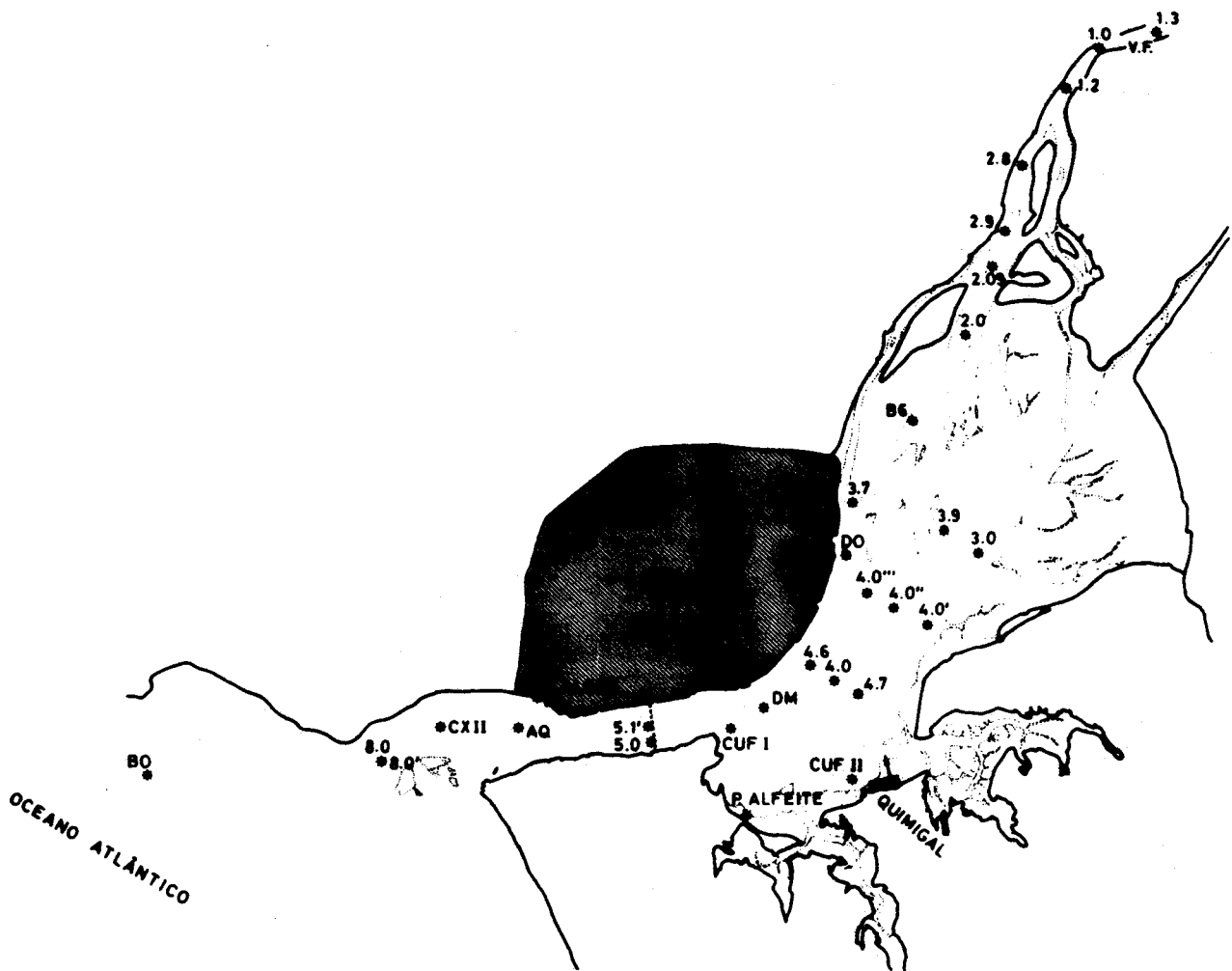


Fig. 12 - Localização das estações de amostragem

Utilizaram-se como meios flutuantes o rebocador "Rana" da Administração-Geral do Porto de Lisboa, o N/O "Mestre Costeiro", do Instituto Nacional de Investigação das Pescas, e uma lancha LDM, do Instituto Hidrográfico.

5.2 - Preservação das amostras

A água recolhida foi imediatamente filtrada a bordo ou à chegada ao laboratório por filtros 0,45 μm AH Millipore previamente descontaminados, secos e pesados. Utilizaram-se seringas de filtração Millipore de 50 cc de capacidade, previamente descontaminadas com ácido clorídrico concentrado e lavadas com água Milli-Q, de acordo com o procedimento geral. O filtrado acidificou-se a 0,05 N com ClH "suprapur" e manteve-se a 4 °C até análise (Andreae, 1983d).

Dada a incerta compatibilidade química das membranas de ultrafiltração com baixos valores de pH, a amostra para ultrafiltração (30/01/87) não foi, excepcionalmente, acidificada. Em vez disso passou-se por membranas 0,1 μm Schleicher & Schuell para esterilização temporária (Scudlark & Johnson, 1982) e manteve-se, tanto quanto possível, a baixa temperatura (4 °C) durante a sua manipulação.

5.3 - Método analítico principal para o arsénio

5.3.1 - Princípio do método e condições operacionais

O As^{3+} , o As^{5+} , o monometilarsénio (MMA), o dimetil (DMA) e o trimetilarsénio (TMA) foram, ao longo de todo este trabalho, quantificados pelo método desenvolvido por Braman e colaboradores para a colecta e evolução sequencial das arsínas (Braman & Foreback, 1972, Braman et al., 1977). Adoptou-se, com ligeiras modificações, a versão mais recente e sensível

otimizada por Andreae (Andreae, 1977, 1983d).

A detecção efectuou-se por absorção atómica num espectrofotómetro 5000 AAS Perkin-Elmer equipado com lâmpada e fonte EDL.

Na Fig.13 apresenta-se, esquematicamente, o arranjo do sistema principal.

Basicamente, as espécies de arsénio em solução susceptíveis de produzir hidretos são reduzidas, no reactor, às correspondentes arsinas por injeção de borohidreto de sódio a 4% (m/v). As arsinas produzidas são retiradas do reactor e transportadas por uma corrente de hélio até um "trap" constituído por um tubo de pyrex em U, parcialmente cheio com enchimento cromatográfico e imerso em azoto líquido (-196 °C). Esse "trap" é subsequentemente aquecido de modo controlado por uma resistência em série com um reóstato "Variac". As arsinas captadas libertam-se então numa sequência determinada pelos respectivos pontos de ebulição. A detecção, numa chama fria ar/hidrogénio, efectua-se num queimador em quartzo adaptado de Chau (Chau et al., 1975).

As formas metiladas e o As^{3+} foram doseadas a 193,7 nm enquanto que a detecção do arsénio inorgânico total se efectuou frequentemente com vantagem a 197.3 nm.

O arsénico inorgânico total ($As^{5+} + As^{3+}$) e o As^{3+} foram doseados em separado com base na sua diferente dependência em

relação ao pH durante a redução (Andreae, 1983d). O teor em As^{5+} obteve-se por diferença.

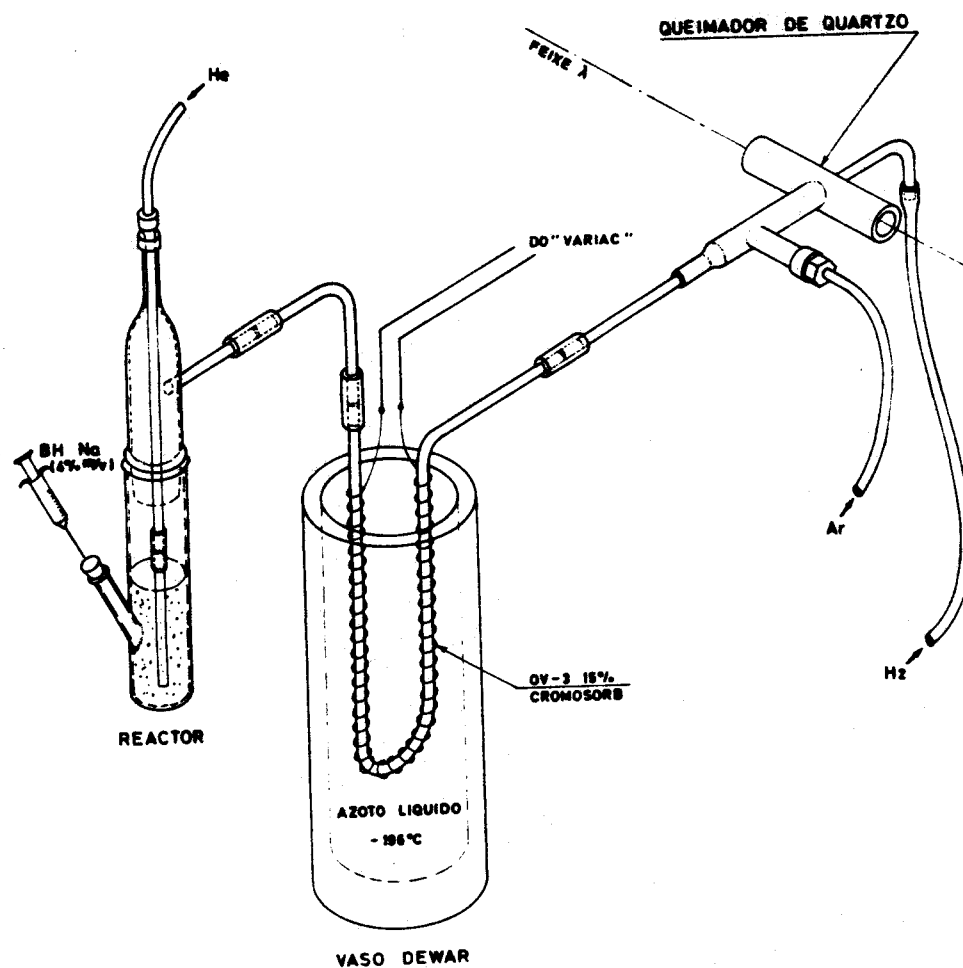


Fig. 13 - Arranjo instrumental do sistema HGC-QFAAS

O método é particularmente livre de interferências e pode ser aplicado directamente a águas naturais devido às duas etapas separativas incluídas - formação de hidretos e evolução das arsinas.

O sistema de gases compreende garrafas com monoredutores duplos, válvulas de agulha (NUPRO Applied Sc.8606 e 8614, Hoke 1315 F4Y) e rotâmetros (Matheson 601 e 602). As respectivas curvas de calibração para ar, hidrogénio e hélio, foram estabelecidas no laboratório com um fluxímetro de bolha de sabão.

As ligações da tubagem em teflon 1/4 e 1/8" foram asseguradas por uniões "swagelock" também em teflon.

No enchimento do "trap" utilizou-se OV-3 a 15% em Chromosorb W-AW-DCMS 60/80 mesh da Supelco.

No Quadro 4-1 indicam-se as condições gerais em que se utilizou o sistema.

5.3.2 - Passivação das superfícies

Todas as superfícies de vidro interessadas na produção e transporte das arsinas bem como a fase estacionária da coluna cromatográfica, foram passivadas com agentes silanizantes.

As superfícies de vidro foram condicionadas com DMDCS (5% em tolueno) à temperatura ambiente, lavadas com tolueno e metanol

e secas a 110 °C. A coluna/"trap" por outro lado, após prévia silanização da sua própria superfície de vidro, foi cheia sob vácuo, com o enchimento cromatográfico referido e condicionada a 170-180 °C, durante a noite, sob fluxo de azoto de 60 ml/min. No termo deste período procedeu-se à injeção de 2 x 25 µl de sylil-8 (Pierce Chemical Co.) e recondicionou-se à mesma temperatura. (Andreae, 1983e; Andreae, 1983d).

QUADRO 5-1

CONDIÇÕES OPERACIONAIS PARA O SISTEMA HGC-QPRAAS

Fonte	E.D.L. PERKIN ELMER
Comprimentos de onda	193.7, 197.3
Potência da fonte	8 Watt
Largura das fendas	0.7nm
Altura das fendas	0.1nm
Gás transportador	Hélio
Fluxo de hélio	150ml/min
Fluxo de hidrogénio	300ml/min
Fluxo de ar	300ml/min
Coluna GC	15% OV-3 em W-AW-DCMS

5.3.3 - Calibração, limites de detecção, coeficientes de variação

A gama de trabalho linear do método analítico principal foi estabelecida no laboratório, com soluções padrão, após optimização do quociente sinal/ruído, no sistema de detecção A.A.S. Em todas as determinações efectuadas pelo método dos hidretos utilizou-se a altura do pico como expressão quantitativa do sinal.

No caso de calibração simples e regressão linear o erro padrão foi calculado a partir de:

$$S_{y/x} = \left\{ \sum_1 \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

em que os y_i representam as absorvâncias correspondentes a cada pico medido no instrumento e \hat{y}_i os valores que decorrem, para as absorvâncias, da aplicação da recta de regressão calculada, aos valores de x individuais.

$n-2$ é o número de graus de liberdade, sendo n o número de pontos usado na calibração.

O desvio padrão correspondente calculou-se a partir de (Miller & Miller, 1984):

$$s_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \left\{ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{y_0 - \bar{y}_1}{b^2 \sum (x_0 - \bar{x}_1)^2} \right\}$$

em que m é o número de leituras efectuadas na amostra em cada determinação e y_0 o valor experimental de y a partir do qual a concentração x_0 é determinada; b é a inclinação da recta de regressão.

Por outro lado, o desvio padrão correspondente ao método das Adições Padrão calculou-se, a partir de (Miller & Miller, 1984):

$$s_{xe} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \left\{ \frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_1 - \bar{x})^2} \right\}$$

em que os símbolos têm o significado anteriormente atribuído.

Dum modo geral a calibração simples adoptou-se para a determinação das espécies inorgânicas em água e as adições padrão para as espécies metiladas e para o arsénio inorgânico em fracções cuja matriz fora sensivelmente alterada.

Os limites de detecção tomam-se como o dobro do desvio padrão dos brancos e observam o teste do quociente das médias (Perkin-Elmer, 1976).

Indicam-se juntamente com os coeficientes de variação obtidos para as diferentes espécies de arsénio analisadas no Quadro 5-2.

Os erros relativos (coeficientes de variação) que constituem uma medida prática da precisão do método, foram calculados a partir de um largo conjunto de resultados analíticos obtidos neste trabalho, suas médias e desvios padrões.

Limites de quantificação LOQ podem ainda estimar-se a partir dos limites de detecção apresentados no Quadro 5-2, tomando o seu quintuplo (Ramirez-Munoz, 1968).

Na análise das concentrações de TMA muito baixas utilizaram-se correntemente reatores de 50 ml.

QUADRO 5-2

LIMITES DE DETECÇÃO

Espécies de As	A.D.L.* (ng)	R.D.L.** (ng/l)	C.V. (%)
As ³⁺	0,05	2,1	5,3
AsiTotal	0,13	5,2	3,6
MMA	0,08	3,0	7,6
DMA	0,06	2,5	5,1
TMA	0,09	3,5	12,1

*ADL - Limite de detecção absoluto

**RDL - Limite de detecção relativo para um reactor de 25 cm³

C.V. - Coeficiente de variação $\sigma/\mu \times 100$

5.4 - Testes de significância

A discussão dos resultados implica, como se verá, a comparação de termos que são somatórios dos teores obtidos para as diferentes espécies de arsénio numa mesma água (e.g. $\Sigma^4 \text{As} = \text{As}_i \text{ tot} + \text{MMA} + \text{DMA} + \text{TMA}$). Estes teores são o resultado de determinações analíticas independentes umas das outras. No entanto o método analítico principal apresenta, para as diferentes espécies de arsénio sensibilidades e precisões distintas (Quadro 5-2).

Assim sendo discutível a viabilidade de um teste exacto e parecendo essencial estabelecer, de algum modo, se os referidos somatórios são ou não significativamente diferentes, adoptou-se uma aproximação sugerida por K.R. Clarke (1989):

Sendo

$$\hat{e}_1 = As_{11} + MMA_1 + DMA_1 + TMA_1$$

e

$$\hat{e}_2 = As_{12} + MMA_2 + DMA_2 + TMA_2$$

estimativas dos teores totais das espécies doseáveis pelo método dos hidretos e

$$\sigma_1^2 = s^2_{As11} + s^2_{MMA1} + s^2_{DMA1} + s^2_{TMA1}$$

$$\sigma_2^2 = s^2_{As12} + s^2_{MMA2} + s^2_{DMA2} + s^2_{TMA2}$$

estimativas das respectivas variâncias σ_1 e σ_2 , a hipótese nula a testar é

$$H_0 = \mu_{As11} + \mu_{MMA1} + \mu_{DMA1} + \mu_{TMA1} = \mu_{As12} + \mu_{MMA2} + \mu_{DMA2} + \mu_{TMA2}$$

ou uma sua simplificação pela redução do número de parcelas dos somatórios.

A partir de

$$\frac{\hat{e}_1 - \hat{e}_2}{\text{var}(\hat{e}_1 - \hat{e}_2)} \quad N(0,1)$$

constroi-se então o intervalo de confiança aproximado, a 95%

$$\hat{e}_1 - \hat{e}_2 \pm 2 \times \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$$

uma vez que $\text{var}(\hat{e}_1 - \hat{e}_2) = \sigma_1^2 + \sigma_2^2$ e as determinações (1) e (2) são independentes.

A hipótese nula é rejeitada se o intervalo de confiança construído não incluir o zero.

O teste é suficientemente "exacto" para um número de graus de liberdade não muito baixo, o que na maioria dos somatórios constitui uma hipótese razoável (Clarke, 1989).

5.5 - Métodos analíticos complementares

5.5.1 - Câmara de grafite (GF-AAS)

O doseamento do arsénio total em extractos e fracções efectuou-se eventualmente por GF-AAS. Utilizou-se uma câmara de grafite HGA-500 acoplada ao Perkin - Elmer 5000 AAS + "auto sampler" AS-40. Usaram-se tubos de grafite pirolíticos e plataformas de LV'OV.

As condições operacionais foram as seguintes:

Fonte	EDL, Perkin-Elmer
λ	193.7 nm
Gás	Argon N46
Volume da amostra	50 μ l

Programa:	Temp ^a	Rampa	"hold"	F.g.i.*
secagem	120°C	15 s	35 s	300ml/min
queima I ("charring")	500°C	5 s	5 s	300 "
queima II	500°C	2 s	3 s	10 "
atomização	2000°C	3 s	8 s	0 "
incineração (limpeza)	2700°C	2 s	2 s	300

*F.g.i. - Fluxo de gás interno

5.5.2 - Nutrientes e pigmentos

Em complemento das determinações de arsénio determinaram-se em algumas campanhas, concentrações de Nitrato, Nitrito, Fosfato e Silicato reactivo e também de clorofila a e feofitina.

Todos estes iões foram doseados por complexometria.

Os métodos utilizados foram os seguintes (Strickland & Parsons, 1972):

Nitrato, Nitrito	sulfamilamida/N-1-naftiletilenodiamina
Fosfato	molibdato de amónio/ácido ascórbico
Silicato	heptamolibdato de amónio/oxalato

As determinações de clorofila a e feofitina foram efectuadas de acordo também com a técnica fluorométrica proposta por Strickland & Parsons (1968).

5.6 - Cálculo do "input" do arsénio

Adoptou-se para o cálculo do afluxo do arsénio o modelo de Kaul & Froelich (1984).

Este modelo permite calcular os ganhos e as perdas que se verificam, para um elemento, num estuário, conhecidos o caudal significativo do rio e a distribuição da suas concentrações em função da salinidade. A fórmula geral (Andreae et al., 1983b, Froelich, 1985) para o "input" é:

$$I_E = - 36 \times K_{ES} \times R$$

em que:

K_{ES} é a inclinação da tangente à curva de concentrações **As em excesso**/salinidade junto ao termo marinho do perfil, em $g \times L^{-1}\%$ -1

R é o caudal significativo do rio em m^3/dia , e

I_E é o "input" do elemento em causa

No nosso caso tomou-se o caudal do rio em Santarém integrado sobre um período correspondente ao tempo de residência da água doce no estuário, na situação hidrológica da campanha e corrigido para o afluxo total de água doce a jusante (Bettencourt et al., 1980a).

5.7 - Digestão básica e foto-oxidação

A digestão básica de amostras líquidas obteve-se adicionando OHNa, a um volume adequado da amostra, até 0,5N, e aquecendo-se

a 80 °C durante 24 horas em copos de teflon cobertos com vidros de relógio também em teflon, previamente descontaminados de acordo com o procedimento geral.

O precipitado que se forma em amostras de água salgada foi redissolvido com 6N ClH "suprapur" antes da análise. Uma outra fracção da mesma amostra foi sistematicamente conservada a 4 °C indigerida até análise, para comparação.

Para evitar, quanto possível, erros devidos a efeitos matriciais adicionou-se à fracção indigerida uma quantidade equivalente de ambos os reagentes. Brancos de água Milli-Q foram processados pelos mesmos métodos.

Material purificado (como os extratos de 2ª ordem da purificação por troca iónica) foi sujeito a digestões ligeiramente mais fortes (0,8N OHNa) sendo, por outro lado, os solutos concentrados ácidos e básicos (ver adiante 4.9) previamente diluídos a 1:2 e 1:4.

Amostras de água filtrada (0,45 µm e 0,1 µm) e fracções purificadas (cromatografia de camada fina) foram ainda irradiadas com UV em tubos de quartzo previamente descontaminados (250 x 25 nm) por períodos de 6 e 12 horas. Utilizou-se nesta irradiação uma lâmpada de mercúrio Q-1200 de alta pressão, 1 Kw (Hanovia-Engelhardt). A algumas fracções adicionou-se uma gota de Perhydrol p.a. Merck.

5.8 - Digestão total

Para a digestão total, de amostras e fracções, adaptou-se a receita clássica da digestão "seca" (Uthe et al., 1975). Assim a um volume suficiente da fracção a digerir adicionou-se um volume adequado da "ashing-aid" ($(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{OMg}$). A solução seguidamente evaporada a 80°C foi sujeita a um programa de aquecimento progressivo (1h a 200°C + 1h a 300°C + 12 h a 460°C) numa mufla MK.70. O resíduo seco foi recuperado com 2N HCl "suprapur" e perfeito a 50ml com OH_2 milli-Q, para análise.

Para controlo das condições da digestão e avaliação do seu rendimento processaram-se em simultâneo brancos de água milli-Q e padrões internos de arsenocolina sintética (1.000 ng/ μl).

5.9 - Fraccionamento molecular por ultrafiltração

Com vista a obter indicações acerca do peso molecular da componente refractária ao método dos hidretos entretanto detectada, processou-se um volume adequado de água do estuário (1,86 dm^3) através de um esquema de ultrafiltração sequencial em cascata determinando-se, em cada fracção assim obtida, o conjunto das espécies de arsénico quantificáveis ($\text{As}_{\text{inorg tot}}$, MMA, DMA, TMA) em sub-amostras digeridas e não digeridas (digestão básica). Utilizou-se um conjunto de filtração em Plexiglass, previamente descontaminado e com cerca de 1dm^3 de capacidade. A secção eficaz é de cerca de 16 cm^2 e o gás utilizado azoto puro a 99,9995%.

Utilizaram-se ultrafiltros Schleicher & Schuell EI42 (40.000D), Millipore PCAC 09005 (1000D) e Amicon DIAFLO YC₀₅ (210D) por ordem decrescente de diâmetro de poro.

As condições operacionais adoptadas indicam-se no Quadro 5.3.

QUADRO 5-3
CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA ULTRAFILTRAÇÃO

FILTROS	NMWL (Em Dalton)	Pressão operacional para as amostras (em KPa)	Pressão operacional para os brancos (em KPa)	Fluxo (cm ³ /min)
EI ₄₂ (SCHLEICHER & SCHUELL)	60.000	300	320	0.8 - 1.0
PCAC - 09 - 005 (MILLIPORE)	1.000	100 - 200	200 - 300	N.A.
DIAFLO YC ₀₅ (AMICON)	210	200	370	>0.5

Processaram-se brancos de água Milli-Q para cada filtro incluindo os correspondentes à filtração preliminar (0,45 µm e 0,1 µm) e recolheram-se sub-amostras em cada fracção para estimativa do volume de 6N ClH necessário à neutralização, em diferentes matrizes, da solução alcalinizada (ver atrás 5.6).

Na ultrafiltração sequencial rejeitaram-se em cada fracção os últimos 10% do volume aplicado (Buffle *et al.*, 1978).

O esquema geral apresenta-se na Fig. 14.

5.10 - Concentração, extração com solventes e purificação por troca-iónica

Com vista ao isolamento de fracções enriquecidas nos compostos que constituem a componente refractária detectada adoptou-se um conjunto de procedimentos inspirado em grande parte do trabalho de Norin e também no de Lüten e colaboradores* (Norin et al., 1982, 1983, Lüten et al., 1982, 1983).

Obtiveram-se em cada etapa indicações sobre o conteúdo mínimo da componente refractária por digestão básica (ver acima 5.6).

Adoptaram-se neste capítulo duas modalidades distintas que se indicam esquematicamente nos fluxogramas das Figs.15 e 16.

5.10.1 - Fluxograma I

Para o processamento indicado no Fluxograma I (fracções FF) 10,5 dm³ de uma amostra composta de água do estuário (3,5dm³ da estação 3.0 (03/04/87) + 7 dm³ da Praia de Algés (14/03/87), Fig.12) foi passada por filtros 0.45 µm AH Millipore, acidificada de acordo com o método de conservação habitual (F₀₀) e concentrada, por evaporação a baixa temperatura (≤ 40 °C), até um volume de 3,6 dm³ (F₀₁).

* Indicam-se no Anexo II as propriedades das resinas utilizadas. Os volumes eluidos e os fluxos correspondentes às etapas de exaustão e regeneração das resinas foram calculados de acordo com as recomendações dos fabricantes (BDH; Bayer). As correcções de pH efectuaram-se com 4N OHNH₄ e 6N ClH.

A solução concentrada, após correcção do pH para 2, foi aplicada numa coluna de vidro (570 x 64 mm) contendo uma resina catiónica fraca (Lewatite CNP 80 (H+), Standard grade) previamente lavada e equilibrada por eluição sucessiva com ácido clorídrico a 3%, água Milli-Q bi-destilada, Hidróxido de sódio a 3% e água Milli-Q bidestilada.

Após correcção do pH para 8,5 o soluto drenado (F₀₂) foi aplicado uma segunda vez na mesma coluna e esta eluída então sucessivamente com água Milli-Q e 4N ClH.

A primeira fracção, eluída com água (F₀₂), foi acidificada, concentrada por evaporação a baixa temperatura (≤ 40 °C) até um volume de 670 ml e aplicada, após correcção do pH para 8, numa segunda coluna de troca iónica (400 x 40 mm) contendo a mesma resina e condicionada de um modo equivalente à primeira. A fracção eluída com água desta 2ª coluna (F₀₁₄) foi purificada por sucessivas evaporações à secura (a maior parte do tempo à temperatura ambiente), extracções com metanol e filtrações por filtros Wathman 541 até se obterem 500 µl que foram decantados e conservados a 4 °C (Amostra A).

Uma sub-amostra deste extracto foi doseada para arsenocolina e acetilarsenocolina por fragmentometria de massa (ver adiante 5.13).

ULTRAFILTRAÇÃO EM CASCATA

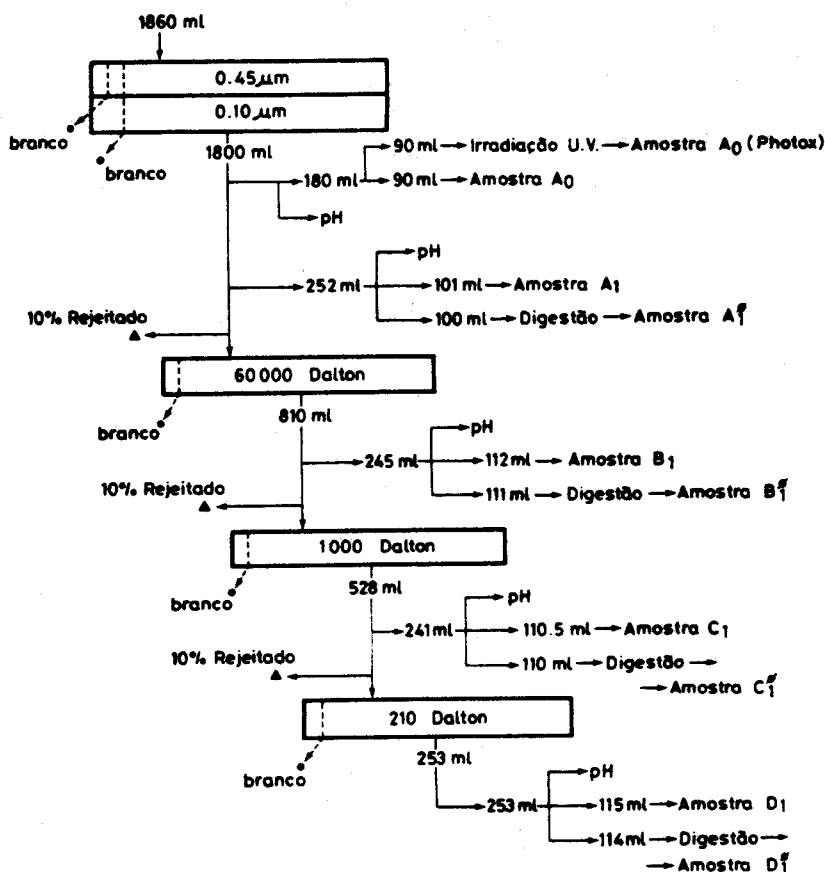


Fig. 14 - Ultrafiltração em Cascata; indicam-se os volumes utilizados ou obtidos para cada fracção principal; indicam-se também as sub-amostras para correcção do pH. As condições operacionais apresentam-se no Quadro 4-3.

Ao contrário da 1ª coluna a 2ª fracção desta 2ª coluna foi obtida com Ácido clorídrico diluído a 3% (F₀₁₅) e concentrada de um modo semelhante à primeira fracção (evaporações a baixa temperatura) até se obter um extracto de 200 μl em metanol destilado que foi conservado a 4°C (Amostra E). O soluto resultante da drenagem da 2ª aplicação na 1ª coluna (F₀₅) foi por outro lado diluído até um volume de 11,5 dm³ (1 : 3.62) e

TROCA-IÓNICA (FLUXOGRAMA I)

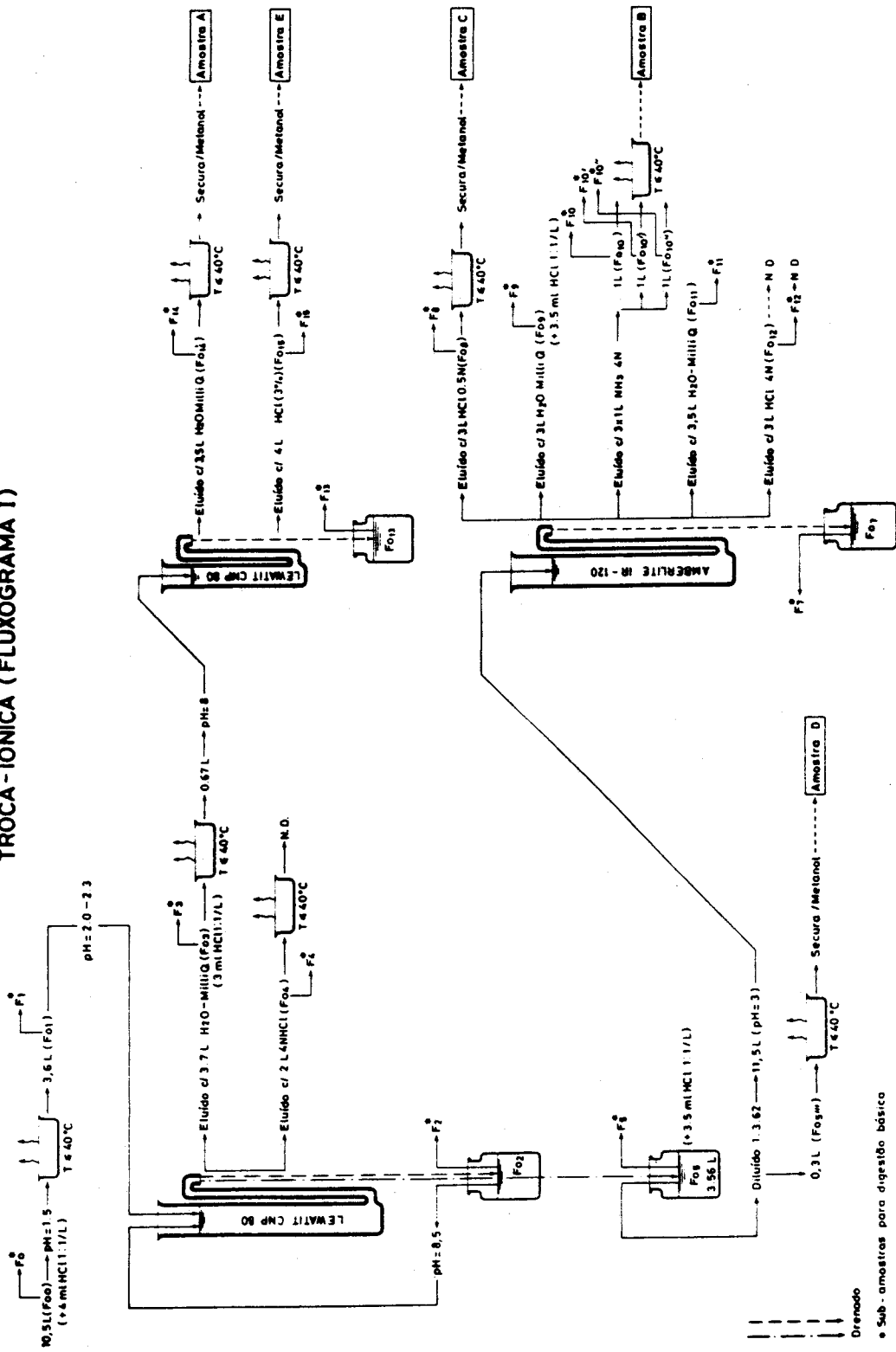


Fig. 15 - Extração e Purificação das Amostras FF

após correcção do pH para 3, aplicado numa 3ª coluna (570 x 64mm) contendo uma resina catiónica forte (Amberlite IR-120 (Na) analitical grade) e também previamente lavada e equilibrada com água Milli-Q, ácido clorídrico a 5% e de novo com água Milli-Q. Esta coluna foi então sucessivamente eluída com 0,5N ClH, OH₂ Milli-Q, 4N NH₃, OH₂ Milli-Q e 4N ClH numa adaptação das sequências de Tam e Norin e colaboradores (Tam et al., 1978; Norin et al., 1983).

As fracções que, em função dos resultados obtidos por digestão básica, apresentaram maiores teores na componente refractária (F₀₈, F₀₁₀, F₀₁₁) foram seguidamente concentradas e purificadas por procedimentos semelhantes aos das fracções F₀₁₄ e F₀₁₅ obtendo-se as amostras B, C e F. Da sub-fracção F₀₅... obteve-se por processos idênticos a amostra D. Além de evaporações e extracções sucessivas com metanol a amostra B foi ainda passada por um ultrafiltro Amicon DIAFLO YC05.

5.10.2 - Fluxograma II

A 06/08/87 uma segunda amostra foi colhida na Praia do Alfeite (Fig.12) e processada de acordo com a sequência esquematicamente indicada na Fig.16 (Fluxograma II, Fracções GG).

Após a filtração inicial por 0,45 µm AH Millipore o volume total desta amostra era de 10,070 dm³ (G₀₀).

TROCA- IÓNICA (FLUXOGRAMA II)

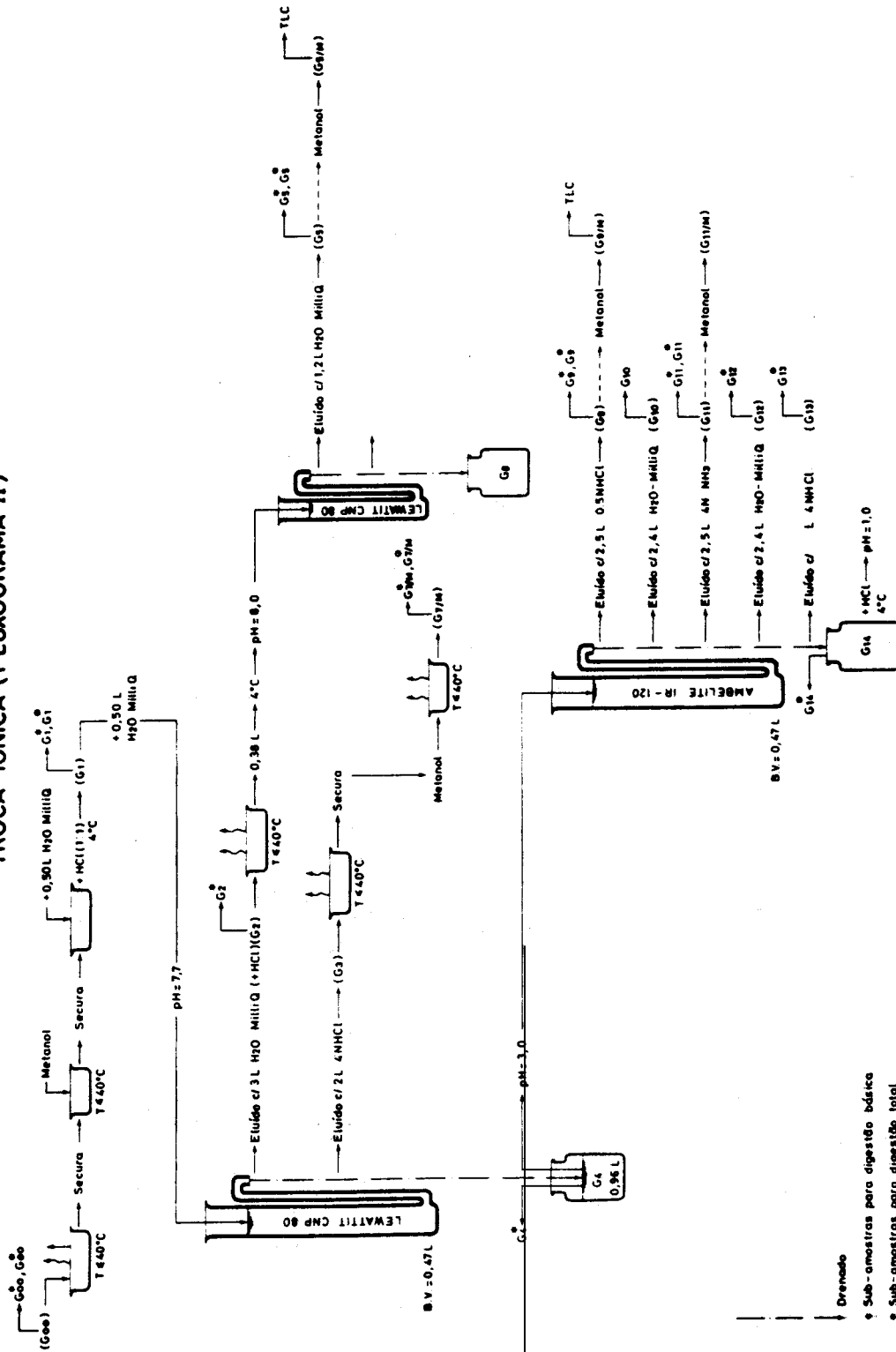


Fig. 16 - Extração e Purificação das Amostras GG

Adoptou-se neste caso uma sequência diferente procurando tirar partido da experiência adquirida. Assim foi imediatamente efectuada na amostra inicial acidificada, $\text{pH} = 1$, uma evaporação à secura sendo o resíduo seco extraído com metanol e, por sua vez, evaporado a baixa temperatura ($\leq 40^\circ\text{C}$) e recuperado com água Milli-Q (G_1). Tal procedimento reduz de imediato a força iónica da solução e consequentemente as necessidades em "bed-volume" e correlativo tempo de eluição das colunas.

O pH foi mantido à volta de 8 para resina catiónica fraca e à volta de 3 para a resina catiónica forte numa tentativa de tirar vantagem das diferenças de pK_a entre a arsenobetaina ($\text{pK}_a = 2,1$), de que se presumia a presença, e o TMAOH^+ forma matricial do TMAO ($\text{pK}_a = 3,75$) em soluções aquosas (Saaman et al., 1978; Norin et al., 1983).

O acondicionamento e as sequências de eluição foram os mesmos para o mesmo tipo de resinas sendo da dimensão da 1ª, 2ª e 3ª colunas de respectivamente 400 x 40, 300 x 30 e 400 x 40 mm.

Como para as fracções FF, as amostras mais ricas na componente refractária (G_5, G_7, G_9, G_{11}) foram sujeitas a purificação ulterior e eventualmente a cromatografia de camada fina TLC ($G_{5/M}$ e $G_{9/M}$).

Ao contrário das fracções FF, as fracções obtidas nesta sequência (GG) foram, no entanto, ainda sujeitas a digestão total (dry-ashing) para determinação do teor efectivo em arsénio total (ver atrás 5.8).

5.10.3 - Investigação de um artefacto

Investigou-se a eventualidade de um artefacto no conjunto de procedimentos que conduziram ao isolamento da amostra A (ver adiante 6.5.2 e 7.3).

Procurou assim reproduzir-se as condições do Fluxograma I utilizando a uma escala reduzida (B.V. = 17 cm³), a mesma resina (Lewatite CNP 80) condicionada de um modo semelhante e substituindo a fracção F₀₁ por uma amostra de água do mar sintética "concentrada" (3 x a força iónica previsível da amostra inicial F₀₀). A esta amostra adicionou-se arsenocolina sintética (22 µl; 1000 ng/µl). As quantidades utilizadas de fracção a eluir, eluentes e condicionantes foram as proporcionais. O esquema geral representa-se na Fig. 17.

Uma sub-fracção de cada uma das fracções obtidas (H₀₂, H₀₃, H₀₄) foi concentrada por processos semelhantes aos utilizados para as amostras FF e aplicada numa placa TLC (Merck 0,1 mm) juntamente com 22 µl do padrão de arsenocolina, de acordo com o procedimento geral adoptado (5.11).

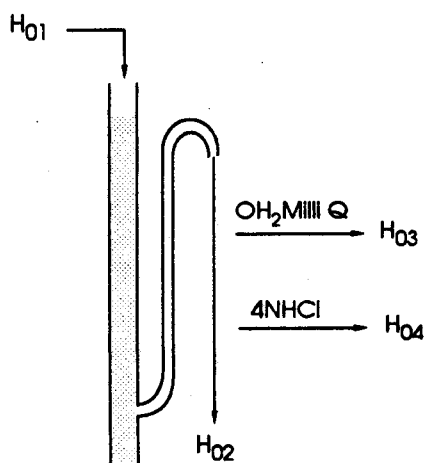


Fig. 17 - Esquema de eluição de uma coluna reduzida para investigação de um eventual artefacto no Fluxograma I

5.11 - Cromatografia de camada fina TLC

Fracções purificadas resultantes do processo de extracção com solventes/troca iónica foram aplicadas em placas de celulose (Merck DC-Plastikfolien, F₂₅₄ precoated, 0,1 mm, 20 x 20 cm) e eluidas numa tina "Camag" com clorofórmio/metanol/água/amónia (65 : 35 : 4 : 1, v/v).

As placas foram mantidas a ≤ 10 °C e précondicionadas com água destilada antes de usadas.

Uma vez que se presumia trabalhar muito abaixo do limite de detecção dos agentes reveladores disponíveis (iodo, ninidrina, reagente de Draggendorf) e, por outro lado, se pretendia conservar as fracções resultantes para posterior identificação positiva dos compostos de arsénio (ver adiante 5.12 e 5.13),

adoptou-se, nesta aplicação, um tratamento distinto para padrões e fracções eluidas.

Assim, aplicaram-se, para comparação, soluções relativamente concentradas em metanol, dos padrões sintéticos disponíveis sendo as manchas correspondentes desenvolvidas com iodo (0,5 g de iodo/100 ml de clorofórmio). As faixas correspondentes às fracções purificadas eluidas em simultâneo foram no entanto protegidas deste desenvolvimento e estabeleceram-se cromatogramas raspando fracções definidas da superfície de cada placa (Figs. 37 a 44), extraíndo os volumes de celulose obtido com metanol e filtrando os extractos por filtros Wathman 541 previamente descontaminados e embebidos em metanol. Parte do filtrado foi subsequentemente fotooxidado (UV/6hr) e analisado pelo método dos hidretos. O remanescente de fracções seleccionadas em função dos seus R_f foi depois concentrado e purificado pelo procedimento habitual sendo os extratos finais sujeitos a espectrometria de massa de impacto electrónico ou fragmentometria de massa.

5.12 - Cromatografia líquida de alta eficiência (H.P.L.C.)

Material purificado correspondente a fracções obtidas por cromatografia da camada fina TLC, foi ainda processado por H.P.L.C.. Utilizou-se um cromatógrafo Pye-Unicam com válvula de injeção. A coluna utilizada foi Merck Lichosorb RP - 18 de 250 x 10 mm. A amostra conservada em metanol "Fluka" a -25 °C foi injectada com uma seringa SGE de 100 μ l no "loop", de



aproximadamente 150 μ l.

O sistema eluente, otimizado para separar os padrões disponíveis (As^{3+} , As^{5+} , MMA, DMA, TMAO, DMOAE, arsenobetaina e arsenocolina), consiste em:

fracções	1 - 10	12 - 24	30 - 70
metanol	3%	10%	30%
água	97%	90%	70%

O pH foi estabilizado a 3,5 com ácido acético e o sistema operado a 23 °C. O fluxo foi de 2,0 ml/min e a frequência de recolha do colector de fracções 30/30 s. A detecção efectuou-se por GF-AAS (ver atrás 5.5.1).

5.13 - Espectrometria de massa de impacto electrónico

Como referido fracções resultantes do processamento por troca iónica/cromatografia de camada fina/H.P.L.C. foram tentativamente objecto de análise directa por espectrometria de massa de impacto electrónico (EI-MSS).

Utilizou-se um espectrómetro de massa Kratos (MS 9) acoplado de uma consola actualizada da VG Analytical Micromass.

O "direct inlet" foi usado em todas as aplicações bem sucedidas.

As condições operacionais foram:

temperatura da fonte.....	200° C
temperatura da "probe".....	arsenobetaina..... 270° C
	arsenocolina..... 350° C
	acetilarsenocolina..... 350° C
	dimetiloxarsiletanol..... 100° C
energia ionizante.....	120 μ A
energia do feixe.....	70 eV
voltagem de aceleração.....	8 KeV
pressão.....	10 ⁻⁷ Torr
fendas.....	abertas
gama de massas (m/z).....	50-250
	10-350

Fundos e brancos do solvente foram sistematicamente registados para comparação.

5.14 - Fragmentometria de massa

Na amostra A resultante do processamento por troca iónica (Fluxograma I) foram doseadas para arsenocolina e a acetilarsenocolina por fragmentometria de massa. Nas determinações, foi utilizada a versão mais recente do método analítico desenvolvido no Karolinska Institutet com este fim e que basicamente recorre a uma derivatização das arsenocolinas com propionilcloreto seguida de pirólise a 600 °C GC/MSS (Christakopoulos et al., 1987).

As condições operacionais foram as seguintes:

Pirolizador	Pyroprobe 170 (Chemical Data System)
Câmara de pirólise	VARIAN
secagem	150 °C, 2 min
pirólise	600 °C, 20 S
fluxo de gás	N ₂ 50 ml/min
"trap"	pipeta de Pasteur/200 µl clorofórmio
Cromatógrafo de fase gasosa	HP 5890
coluna	("cross-linked" metilsilicone SE30 Capilar (12 m x 0.20 mm i.d.)
gás	He 30 cm/s
temperatura injetor	150 °C
forno	40 °C 1 min 40-115 °C 10°C/min 115 °C 1 min.
Espectrômetro de massa	JEOL JMS D-300
energia de feixe	70 eV
temperatura da fonte	250 °C
pressão	10 ⁻⁶ Torr
temperatura da linha de transferência	250 °C
voltagem do multiplicador	2600 V

5.15 - Reagentes e padrões

Utilizou-se em todas as operações correntes no laboratório água desionizada e bidestilada Milli-Q. O borohidreto de sódio e o hidróxido de sódio utilizados foram "reagente de laboratório" (BDH) e p.a. (Merck) respectivamente.

Para determinações analíticas e conservação das amostras usou-se sempre ácido clorídrico "suprapur" da Merck.

Padrões concentrados foram preparados a partir de sais comerciais para ácido monometilarsônico (99,4% Quimilabo), ácido dimetilarsínico (99,0% Röhne-Poulenc), arseniato (98,5% Merck) e arsenito (99,5%) de acordo com Andreae (Andreae, 1983d). Os padrões comerciais foram verificados por AAS tomando como referência o padrão certificado da Fluka. Padrões diluídos para trabalho analítico, foram preparados diariamente no laboratório, a partir dos concentrados.

Padrões de trimetilarsênio óxido, arsenobetaina, arsenocolina, acetilarsenocolina e dimetiloxarsiletanol sintetizados no National Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Estocolmo, foram amavelmente fornecidos pelos Srs. Drs. Harald Norin e Alexandros Christakopoulos. A sua pureza é aproximadamente de 95%.

Os padrões concentrados e diluídos de TMAO foram preparados adaptando as receitas utilizadas para os outros compostos metilados (MMA e DMA). Os padrões utilizados em cromatografia de camada fina e espectrometria de massa foram invariavelmente soluções concentradas em metanol p.a. FLUKA.

5.16 - Filtros, material de vidro e plástico

O material de vidro e plástico utilizado no campo e no laboratório, foi descontaminado com 3N ClH p.a., imerso em 0.1N

ClH "suprapur" durante a noite e lavado com água Milli-Q bi-destilada antes da secagem.

O material de vidro envolvido de um modo geral nas manipulações conducentes ao isolamento e identificação de compostos orgânicos de arsénico (DT, IC, TLC, GC/MS, EI-MSS) foi, além disso descontaminado sistematicamente com éter sulfurico. As microseringas de 10 μ l, 25 μ l e 100 μ l utilizadas em cromatografia TLC e MSS foram ainda descontaminadas entre cada aplicação, por lavagem sucessiva com 0,5N ClH suprapur, OH_2 Milli-Q, éter sulfurico e metanol p.a. da FLUKA.

Os filtros 0.45 μ m e 0.1 μ m foram embebidos em 1N ClH "suprapur" durante a noite, lavados com água Milli-Q bidestilada e secos na estufa a 75°C durante 1 hora, até peso constante. Conservaram-se subsequentemente num excicador até à sua utilização.

5.17 - Outros parâmetros

A temperatura das amostras recolhidas foi medida no campo com um termómetro de mercúrio. No laboratório, as determinações da correspondente condutividade foram efectuadas com uma sonda CTU-38 Montedoro-Witney, calibrada com água do mar sintética.

Os valores de salinidade apresentados foram calculados a partir das condutividades e temperaturas medidas no laboratório, e verificados de acordo com Cox e colaboradores (Cox et al., 1967).

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Distribuição das espécies conhecidas de arsénio no Estuário do Tejo

Nos Quadros 6-1 e 6-2 apresentam-se as concentrações obtidas no estuário do Tejo para as espécies de arsénio conhecidas em água salgada (As^{3+} , As^{5+} , MMA e DMA) nas campanhas I e III respectivamente. Nas Figs. 17 a 20 apresentam-se, por outro lado, os correspondentes perfis longitudinais, obtidos em função da salinidade. Nos Quadros 6-2 e 6-4 apresentam-se também dados complementares recolhidos no decurso ou para as mesmas campanhas.

Podem ainda incluir-se neste conjunto os resultados obtidos para o As_{itot} nas campanhas II e IV e apresentados adiante juntamente com as determinações de TMA, em 6.2. (Quadros 6-6 e 6-8, Figs. 24 a 26).

As curvas obtidas nas campanhas I e IV correspondem a situações bem caracterizadas que se podem considerar como típicas para o estuário do Tejo, em estiagem. Já as campanhas II e III correspondendo a uma cheia ($3000 \text{ m}^3/\text{s}$, 21 de Novembro de 1983) e ao período de estabilização subsequente são relativas a situações de carácter excepcional, que embora relativamente frequentes, não são bem conhecidas no estuário do Tejo.

A análise das concentrações das espécies de arsénio consideradas permite verificar que, como se poderia esperar num

estuário bem oxigenado, o arseniato (As^{5+}) é a forma dominante representando entre 71 e 98% do arsénio analisado (mediana 95,7%). O arsenito (As^{3+}), o MMA e o DMA ocorrem por sua vez em proporções que variam entre 1,2 e 29% (mediana 2,7%), 0,03 e 1,44% e 0,11 e 4,45%, respectivamente.

Deste conjunto resulta desde logo que, de um modo geral o arsénio observa neste estuário um comportamento que se afasta claramente do comportamento característico em estuários não poluídos (ver atrás 3.4.3).

O rio Tejo, propriamente dito, apresenta, com efeito, concentrações de arsénio dentro da gama típica para rios não significativamente poluídos por este elemento em regiões climática e geologicamente comparáveis (Andreae, 1983b).

No entanto a distribuição de arsénio dissolvido no estuário apresenta, para a generalidade das espécies consideradas, um desvio da linearidade fortemente positivo excedendo as concentrações totais determinadas no seu corpo central, claramente as que se observam nos dois termos finais, o rio e o mar.

As curvas concentração/salinidade obtidas para o arsénio inorgânico (Figs. 18a,b) e 20a,b)) apresentam também, se exceptuarmos pontos singulares, uma certa semelhança com os perfis obtidos no Tamar para as mesmas formas (Langston *et al.*, 1983; Knox *et al.*, 1984). Por outro lado as curvas obtidas para o MMA e o DMA, (ressalvado o nível geral de concentrações que é

mais alto), são semelhantes às observadas por Andreae e colaboradores no estuário de Charllotte Harbour, na Flórida (Froelich et al., 1985).

Dum modo geral, o quociente As^{3+}/As^{5+} é, no estuário do Tejo, mais baixo que a média de 0.2 estabelecida para estuários e águas costeiras (ver atrás 3.4.3).

Constata-se também que os desvios positivos máximos das formas inorgânicas determinadas (As^{3+} , $As^{5+} + As^{3+}$) são muito mais marcados que os das correspondentes formas metiladas (MMA e DMA) e ocorrem na zona de influência do complexo da Quimigal, no Barreiro (estações 4.0, 4.0', 4.7, CUF I e CUF II). Além disso os picos de As^{3+} são proporcionalmente mais importantes que os correspondentes picos de As^{5+} .

Estes factos, associados ao incremento do quociente As^{3+}/As_i tot, na vizinhança dos máximos referidos (Fig. 22) sugerem, para a espécie As^{3+} , um papel dominante na química do efluente descarregado que, por sua vez, influenciaria directamente a distribuição do arsénio dissolvido no estuário. Uma segunda fonte de As^{3+} parece também localizar-se na vizinhança da Soda Póvoa (estação 2.9).

QUADRO 6.1

RESULTADOS DA CAMPANHA I (18-19/07/83)

AMOSTRAS	SAL. s ‰	ESPÉCIES DE ARSÊNICO ($\mu\text{g}/\text{dm}^3$) ($\bar{x} \pm \text{s.d.}$)					"ratio" $\text{As}^{3+}/\text{As}_I \text{TOT}$
		As^{3+}	$\text{As}_I \text{TOTAL}$	As^{5+}	MMAA	DMAA	
1.0	0.33	0.069 ± 0.007	5.86 ± 0.136	5.77 ± 0.136	0.031 ± 0.0034	0.036 ± 0.010	0.0152
2.8	2.32	0.102 ± 0.006	6.57 ± 0.136	6.47 ± 0.136	0.037 ± 0.0034	0.066 ± 0.011	0.0155
2.9	8.7	0.117 ± 0.014	8.49 ± 0.240	8.37 ± 0.240	0.056 ± 0.0021	0.082 ± 0.0095	0.0138
2.0	22.1	0.137 ± 0.019	10.61 ± 0.146	10.51 ± 0.360	0.073 ± 0.0011	0.128 ± 0.0028	0.0129
B.6	26.2	0.159 ± 0.014	13.56 ± 0.584	13.40 ± 0.584	0.073 ± 0.0011	0.126 ± 0.0021	0.0117
3.9	31.8	0.271 ± 0.021	15.06 ± 0.293	14.79 ± 0.294	0.064 ± 0.002	0.155 ± 0.0118	0.0180
3.0	31.2	0.242 ± 0.025	15.57 ± 0.293	15.33 ± 0.294	0.065 ± 0.0085	0.148 ± 0.0097	0.0155
4.0'	32.3	0.470 ± 0.035	33.96 ± 1.958	33.49 ± 1.958	0.088 ± 0.0114	0.232 ± 0.0169	0.0138
4.0"	31.8	0.202 ± 0.037	16.06 ± 0.466	15.91 ± 1.221	0.056 ± 0.0059	0.130 ± 0.0069	0.0126
4.7(s)	34.7	0.435 ± 0.030	14.75 ± 0.576	14.32 ± 0.577	0.050 ± 0.0007	0.174 ± 0.0042	0.0295
4.7(M)	33.7	0.395 ± 0.038	14.57 ± 0.264	14.18 ± 0.648	0.051 ± 0.0014	0.181 ± 0.0130	0.0271
4.7(f)	34.2	0.434 ± 0.026	12.88 ± 0.308	12.45 ± 0.309	0.037 ± 0.0019	0.172 ± 0.0124	0.0337
4.0(s)	33.3	0.549 ± 0.040	19.38 ± 0.414	18.07 ± 1.029	0.053 ± 0.0076	0.190 ± 0.015	0.0283
4.0(f)	33.9	0.720 ± 0.040	12.17 ± 0.711	11.35 ± 0.712	0.043 ± 0.0010	0.185 ± 0.0037	0.0590
DM(s)	32.9	0.373 ± 0.012	18.19 ± 1.524	17.82 ± 1.524	0.066 ± 0.0023	0.179 ± 0.0036	0.0194
DM(f)	34.5	0.498 ± 0.010	9.41 ± 0.484	8.91 ± 0.484	0.034 ± 0.0014	0.179 ± 0.0027	0.0529
5.1'(s)	34.1	0.449 ± 0.028	11.82 ± 0.505	11.37 ± 0.506	0.044 ± 0.0048	0.193 ± 0.0124	0.0379
5.1'(f)	34.6	0.280 ± 0.028	7.32 ± 0.557	7.04 ± 0.558	0.036 ± 0.0058	0.178 ± 0.0071	0.0383
AQ(s)	34.5	0.256 ± 0.004	8.75 ± 0.235	8.50 ± 0.704	0.043 ± 0.0037	0.188 ± 0.0076	0.0293
AQ(f)	35.0	0.199 ± 0.016	5.07 ± 0.420	4.87 ± 0.420	0.029 ± 0.0060	0.156 ± 0.015	0.0385
CxII(s)	34.6	0.132 ± 0.004	5.67 ± 0.420	5.54 ± 0.420	0.023 ± 0.0027	0.164 ± 0.0133	0.0233
CxII(f)	35.1	0.152 ± 0.024	3.98 ± 0.332	3.83 ± 0.333	0.019 ± 0.0027	0.166 ± 0.0027	0.0382
8.0(s)	35.4	0.134 ± 0.012	6.15 ± 0.227	6.02 ± 0.227	0.052 ± 0.0057	0.184 ± 0.0084	0.0218
8.0(f)	35.9	0.123 ± 0.002	4.43 ± 0.154	4.31 ± 0.154	0.018 ± 0.0019	0.162 ± 0.0025	0.0278

(s) - superfície

M - sub-superficial (vide 4.1.2)

(f) - fundo

$$\text{As}^{5+} = \text{As}_I \text{TOTAL} - \text{As}^{3+}$$

QUADRO 6.2

DADOS COMPLEMENTARES DA CAMPANHA I (R = 74 m³/sg)

AMOSTRAS	HORA DATA	TEMPERATURA °C	O ₂ DISSOLVIDO		pH	D. Secchi (m)	N-NO ₃ + NO ₂ (ppm)	Chl a (ppb)	Feot* (ppb)
			ppm	%					
1.0	17:10 /18	26,2	6,31		8,10	0,20	38	58,91	66,97
2.8	16:35 /18	25,0	6,01		8,02	0,25			
2.9	16:10 /18	24,8	6,46		8,15	0,45		121,77	205,41
2.0	15:35 /18	24,2	7,03		8,17	0,65	32	76,53 77,67	111,22 115,92
B.6	15:05 /18	24,2	8,0		8,21	0,50		73,26	88,38
3.9	11:02 /18	22,0	7,12		8,28	0,75		31,23	72,49
3.0	10:05 /18	21,9	7,44		8,28	0,75 0,85	13	43,41 48,11	55,33 91,36
4.0'	11:40 /18	21,7	7,47		8,28				
4.7(s)	12:10 /18	20,9	7,85		8,33			31,23	41,01
4.7(f)	12:15 /18	20,1	7,74		8,34			17,73	35,92
4.0(s)	13:40 /19	21,8	6,4	91,6			9,1-11	29,70 35,28	42,90 54,12
4.0(f)	13:30 /19	20,6	6,7	94,5			6,8	24,14	65,27
DM(s)	/19							34,94	42,30
5.0/5.1'(s)	12:05/19	20,6	6,8	94,5	8,2		5,1	22,96	28,54
AQ(s)	/19							22,78	30,72
CxII(s)	/19							21,26	27,96
8.0(s)	10:50 /19	19,2	7,9	109,3	7,9		2,2	21,42	25,88
8.0(f)	10:34 /19	18,0	9,0	122,4	8,3		1,4		

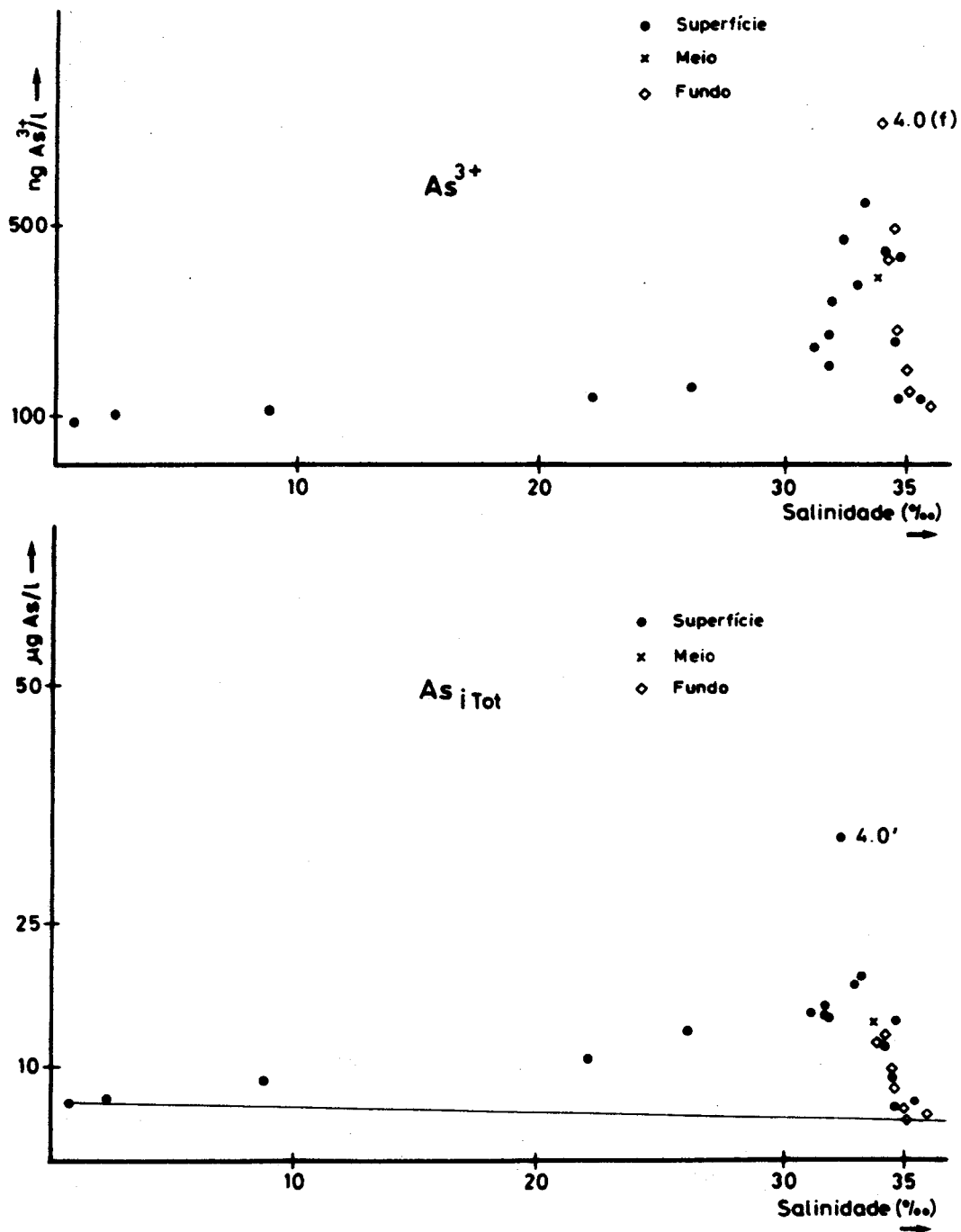


Fig. 18 - Distribuição de a) Arsenito (As³⁺) e b) Arsênio Inorgânico Total (As³⁺ + As⁵⁺) em função da salinidade, na campanha I. As rectas indicam a diluição teórica conservativa.

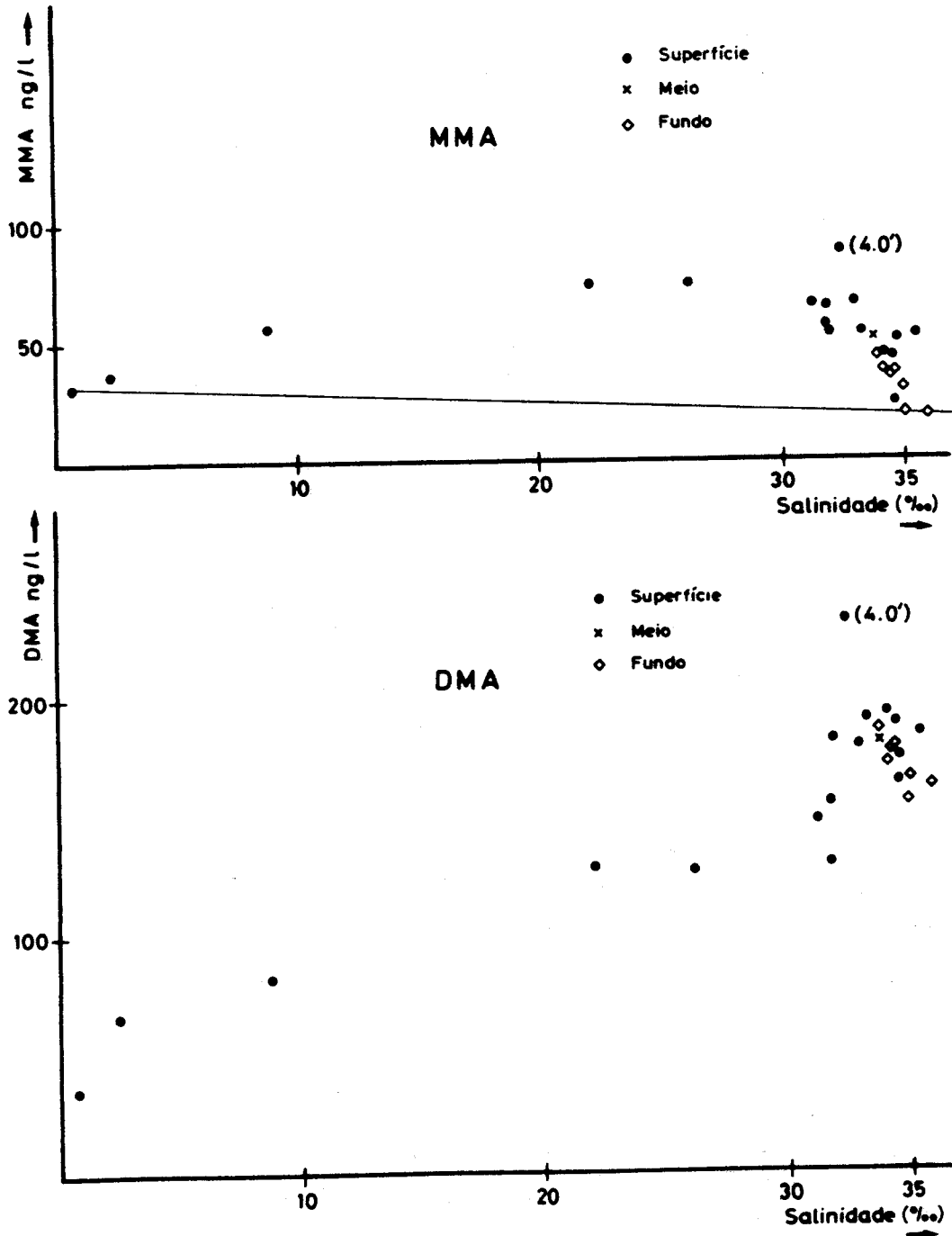


Fig. 19 - Distribuição de a) Monometilarsénio (MMA) e b) Dimetilarsénio (DMA) em função da salinidade, na campanha I. As rectas indicam a diluição teórica conservativa.

QUADRO 6.3

CAMPANHA III (6-7/12/83)

AMOSTRAS	S (%)	ESPÉCIES DE ARSÊNICO ($\mu\text{g} \times \text{dm}^3$) ($\bar{x} \pm \text{s. d.}$)					"ratio" $\frac{\text{As}^{3+}}{\text{As}_1 \text{TOT}}$
		As ³⁺	As ₁ TOTAL	As ⁵⁺ *	MMA	DMA	
2.8	0,26	0,078 ± 0,009	4,75 ± 0,138	4,67 ± 0,138	0,070 ± 0,0030	0,042 ± 0,0023	0,0164
2.9	0,69	0,100 ± 0,003	4,65 ± 0,245	4,55 ± 0,245	0,047 ± 0,0037	0,035 ± 0,0023	0,0220
2.09	4,61	0,093 ± 0,017	5,34 ± 0,342	5,25 ± 0,342	0,054 ± 0,0026	0,038 ± 0,0022	0,0174
2.0	8,3	0,081 ± 0,012	6,33 ± 0,601	6,25 ± 0,001	0,054 ± 0,0033	0,048 ± 0,0017	0,0128
B.6	11,8	0,139 ± 0,017	8,48 ± 0,183	8,34 ± 0,184	0,043 ± 0,0030	0,063 ± 0,0017	0,0164
3.7	23,7	0,627 ± 0,042	14,06 ± 0,469	13,43 ± 0,470	0,032 ± 0,0031	0,114 ± 0,0077	0,0446
3.9	15,9	0,151 ± 0,011	9,49 ± 0,996	9,34 ± 0,996	0,033 ± 0,0011	0,076 ± 0,0010	0,0159
3.0	14,3	0,169 ± 0,012	9,73 ± 0,128	9,56 ± 0,129	0,050 ± 0,0044	0,288 ± 0,0117	0,0174
4.0'	17,3	0,169 ± 0,015	10,16 ± 0,118	9,99 ± 0,129	0,052 ± 0,0024	0,106 ± 0,0046	0,0166
4.0"	24,1	1,205 ± 0,023	18,05 ± 0,171	16,85 ± 1,271	0,035 ± 0,0039	0,102 ± 0,0081	0,0668
4.0	21,0	0,416 ± 0,013	11,13 ± 0,423	10,81 ± 0,423	N.A.	N.A.	
4.7	19,2	0,221 ± 0,019	11,39 ± 0,170	11,17 ± 0,171	0,042 ± 0,0047	0,097 ± 0,0036	0,0194
4.6	21,3	0,410 ± 0,018	12,85 ± 0,170	12,44 ± 0,171	0,037 ± 0,0053	0,090 ± 0,0080	0,0319
CUF II	26,3	8,193 ± 0,538	71,50 ± 1,997	63,31 ± 2,068	0,043 ± 0,0031	0,122 ± 0,0069	0,1146
CUF I	24,0	29,99 ± 0,649	104,80 ± 2,454	74,81 ± 2,538	0,029 ± 0,0034	0,114 ± 0,0056	0,286
5.0	25,3	2,093 ± 0,069	17,88 ± 0,438	15,79 ± 0,443	0,030 ± 0,0031	0,106 ± 0,0019	0,117
AQ (s)	28,6	0,900 ± 0,017	13,83 ± 0,559	12,93 ± 0,559	0,028 ± 0,0024	0,113 ± 0,0061	0,065
Cx II	32,5	0,403 ± 0,016	8,07 ± 0,124	7,67 ± 0,125	0,018 ± 0,0004	0,113 ± 0,0007	0,0499
BO I 05/02/83	34,7	0,162 ± 0,024	4,40 ± 0,297	4,24 ± 0,298	0,019 ± 0,0021	0,142 ± 0,0127	0,0368
BO II 13/12/83	35,1	0,170 ± 0,013	3,21 ± 0,041	3,04 ± 0,043	0,012 ± 0,0011	0,150 ± 0,0067	0,0530

* As⁵⁺ = As₁ TOTAL - As³⁺

N.A. = Não Análisado

QUADRO 6-4

DADOS COMPLEMENTARES DA CAMPANHA III (R = 830 m³/s)

AMOSTRAS	TEMPERATURA °C	pH	OD (mg/l)	D. Secchi (m)	Chl a (ppb)	Feot ^a (ppb)
2.8	13.1	7.22	8.22		5.88	1.19
2.9	12.6					
2.0.9	13.0	7.56	8.41			
2.0	13.5	7.71	8.41		1.77	1.01
B.6	13.8					
3.9	14.9	7.76	8.39			
3.0	13.5	7.94	7.99		0.82	0.37
4.0	14.9	7.88	8.14		0.63	0.26
4.6	14.3	7.99	8.23			
4.7	14.7	7.98	8.07			
CUF I	13.7	7.95	8.48	0.65		
CUF II	14.9	>8.0	7.45	0.70		
5.0	14.6	6.57	8.52	0.50	0.60	0.21

Considerando as diferentes espécies em separado o transporte de arsénio é, à primeira vista, correctamente representado, neste estuário, pela distribuição da salinidade, não se constatando, ao longo das curvas obtidas, desvios significativos entre amostras de superfície e de fundo (Figs. 18 e 19). Também não se observam diferenças significativas entre as amostras colhidas à superfície e a correspondente amostra de água sub-superficial (4.7 (s) e 4.7 (M), Quadro 6-1).

No entanto um exame mais atento da evolução do "ratio" As^{3+}/As^{5+} revela diferenças sensíveis no valor deste quociente entre as amostras de fundo e de superfície colhidas na região jusante do estuário, no decurso da campanha I. (Fig. 22a)

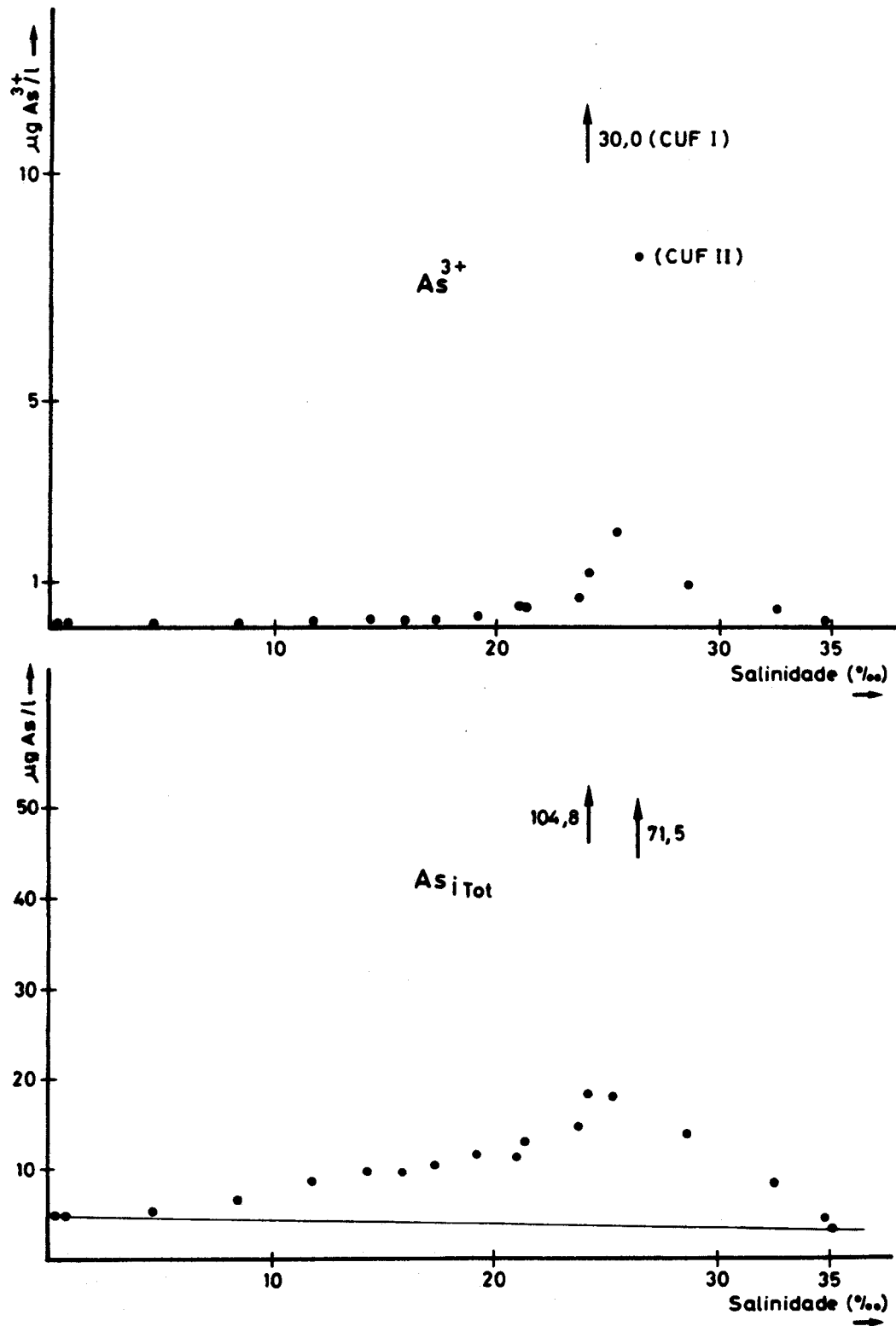


Fig. 20 - Distribuição de a) Arsenito (As^{3+}) e b) Arsênio Inorgânico Total ($\text{As}^{5+} + \text{As}^{3+}$) em função da salinidade na campanha III; a recta representa a diluição teórica conservativa para o As_itot . Assinalam-se os picos máximos CUF I e CUF II para ambas as formas.

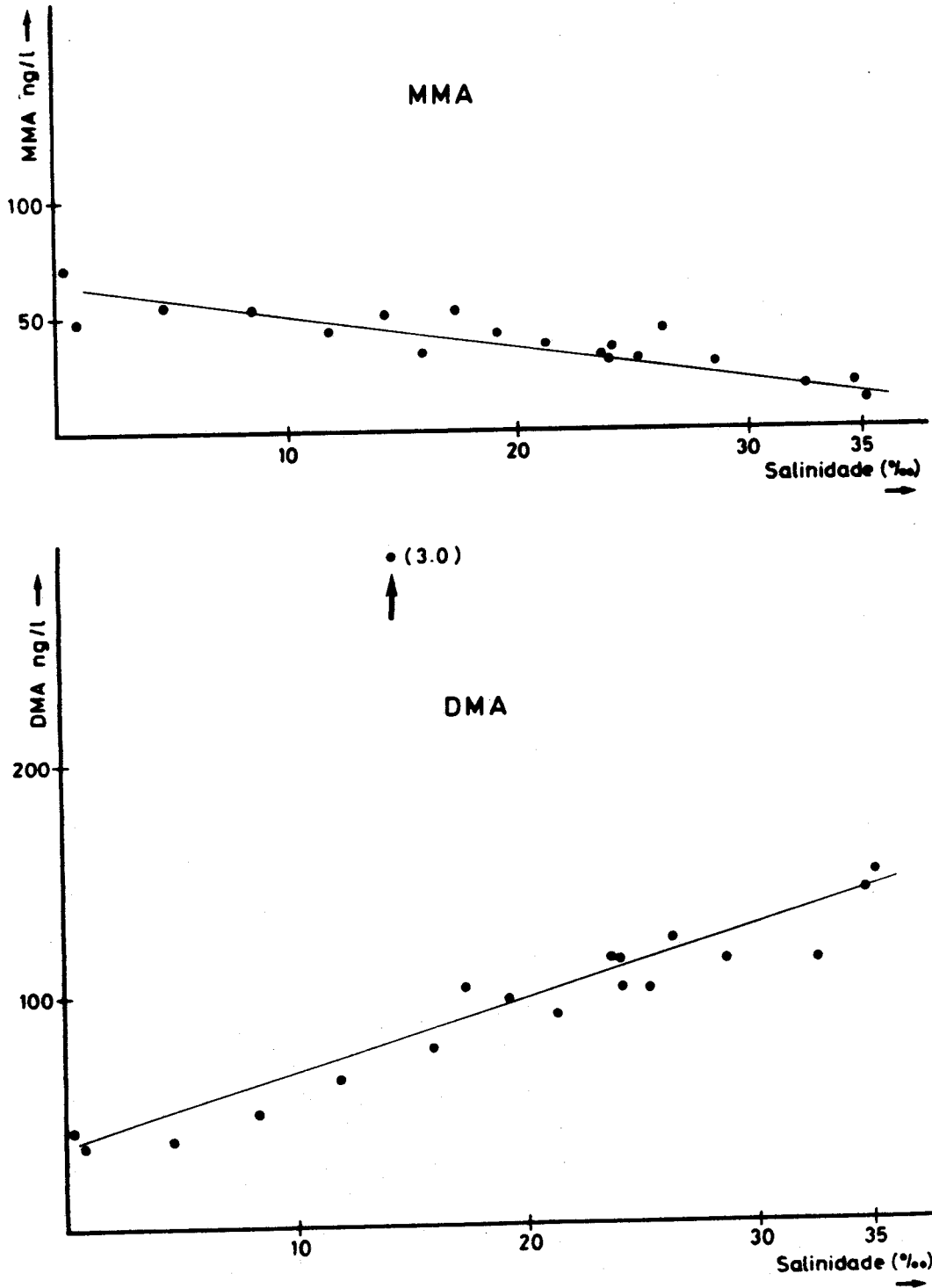


Fig. 21 - Distribuição de a) Monometilarsênio (MMA) e b) Dimetilarsênio (DMA) em função da salinidade, na campanha III; as rectas representam a diluição teórica conservativa.

Verifica-se também que os valores máximos deste quociente ocorrem em pontos da área de influência mas fora da vizinhança imediata da descarga da Quimigal (CUF I > CUF II, Fig. 22b)) e que, por outro lado, os picos de As^{3+} e de arsénio inorgânico total são muito mais marcados em cheia (campanha III R = 830 m^3/s) que em situação de estiagem (campanha I, R = 74 m^3/s) (Fig.22a)).

Estes factos parecem indicar que o compartimento sedimentar (sedimento sedimentado, intersticial) constitui, no estuário do Tejo, uma fonte secundária de arsénio inorgânico para a coluna de água. Essa fonte será eventualmente dominante em situações de acentuado hidrodinamismo, como é o caso da cheia (Carpenter *et al.*, 1978, Langston *et al.*, 1983, Knox *et al.*, 1984, Riedl *et al.*, 1987).

A suavidade das curvas obtidas para as formas metiladas, sobretudo no conjunto de situações de estiagem (campanhas I e IV) e sua linearidade em invernias (campanha III), em contraste com os picos de $As_i\ tot$ e As^{3+} , sugerem ainda que a acumulação de formas metiladas requer um intervalo de tempo que pode exceder o tempo de residência da água doce nas zonas produtivas do estuário.

Para todos os efeitos os desvios da linearidade observados indicam um afluxo considerável de arsénio dentro dos limites do estuário. Esse afluxo, na sequência de trabalhos anteriores (Andreae *et al.*, 1983b), pode ser estimado pelo modelo de Kaul e Froelich (ver atrás 5.6).

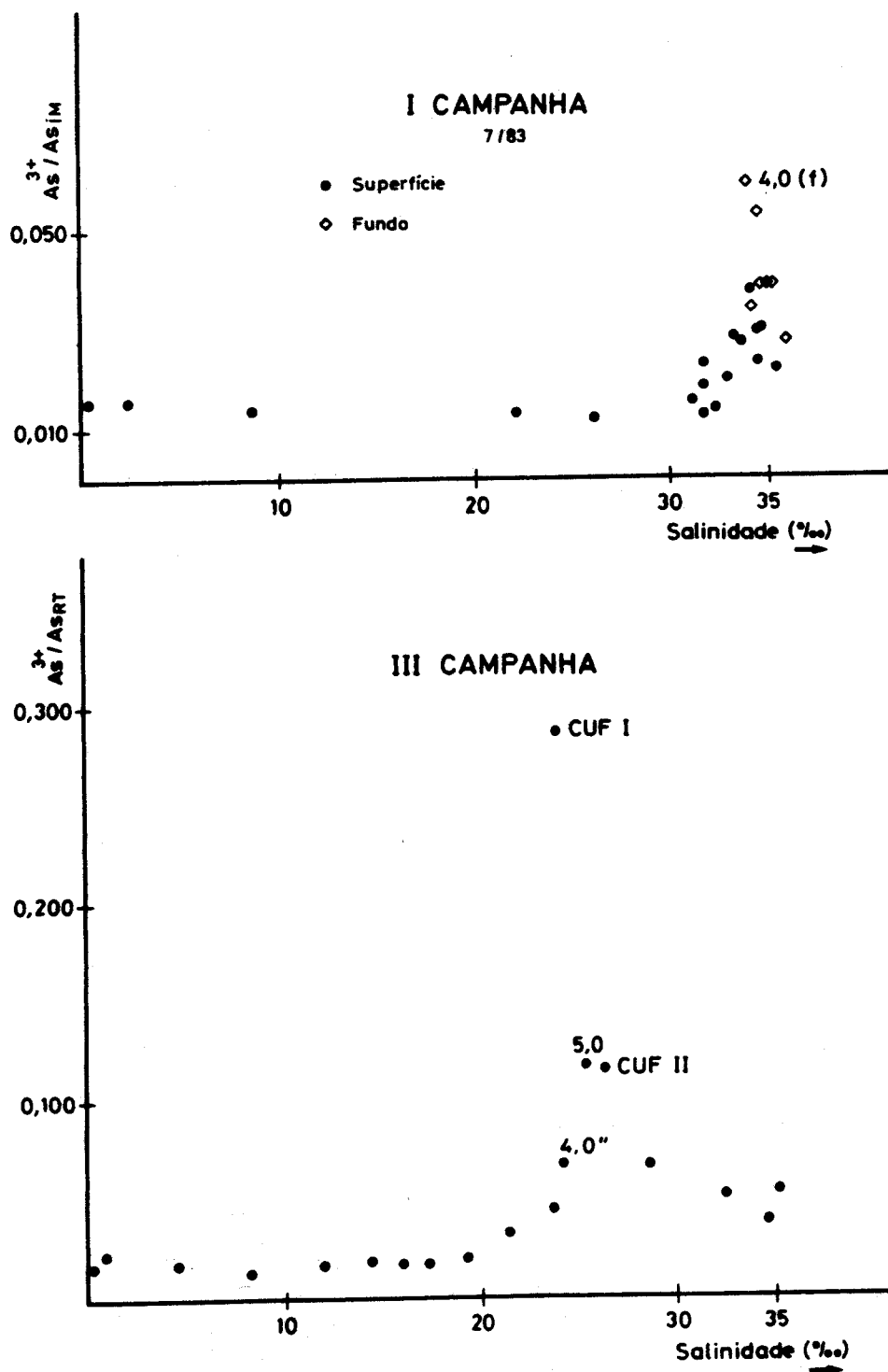


Fig. 22 - Distribuição longitudinal (salinidade) do ratio $As^{3+}/As_{i\text{tot}}$ em a) Campanha I (18-19/7/83), b) Campanha III (5-12/12/83)

Apresentam-se assim nas Figs. 23a), b) e c) as curvas **As em excesso**/salinidade que se obtiveram para as campanhas I e III e também para a campanha de Agosto de 1984 (IV).

A indefinição do termo marinho nos perfis correspondentes à campanha II não permite, neste caso, a aplicação do método.

No Quadro 6-5 apresentam-se por outro lado os caudais integrados, a inclinação das tangentes, K_{ES} , os correspondentes "inputs" calculados, I_E e bem assim os limites de confiança a 95% respectivos.

Admite-se que, para a campanha III, nem todas as condições requeridas para a correcta aplicação do modelo estejam reunidas, nomeadamente a estabilidade do termo fluvial que, correspondendo ao período subsequente às cheias de 1983, apresenta variações significativas durante o período de integração adoptado (DGRAH, 1984).

O modelo adoptado, no entanto, resultante da revisão de outros métodos (Boyle *et al.*, 1974; Liss, 1976; Officer, 1979; Boyle *et al.*, 1982) não será particularmente sensível a esta instabilidade (Kaul & Froelich, 1984). Parece admissível, portanto, que os altos valores obtidos para o "input" de arsénio durante a campanha de inverno correspondam efectivamente a um acréscimo momentâneo das afluências daquele elemento, nos limites do estuário, seja pela remobilização de

fontes secundárias (sedimento), seja devido à lixiviação, pela cheia, de terrenos fortemente contaminados por via atmosférica (Aston, 1975; Seyler, 1985).

QUADRO 6-5
"INPUT" DE ARSÉNIO NO ESTUÁRIO DO TEJO

CAMPANHA	Caudal do rio (m ³ /s)	K _{DS} (g As x L ⁻¹ x % ⁻¹)	"Input" (Kg dia ⁻¹)
I 18-19/07/83	74	$(-5,472 \pm 1,868) \times 10^{-6}$	1402 ± 478
III 6-7/12/83	830	$(-1,436 \pm 0,190) \times 10^{-6}$	4147 ± 548
IV 8/08/84	158	$(-2,321 \pm 0,969) \times 10^{-6}$	1140 ± 476
26/04/82 (Andreae, 1983)	181	$(-0,96 \pm 0,22) \times 10^{-6}$	541 ± 124

Há que reconhecer em todo o caso, que mesmo em situação de estiagem (campanhas I e IV) os "inputs" de arsénio calculados no âmbito deste trabalho são claramente superiores às estimativas anteriores de Martin e de Andreae para o estuário do Tejo (ver 4.3).

As estimativas efectuadas baseiam-se também no princípio de que a especiação considerada para o arsénio, na fase líquida, é completa. Não sendo este o caso, como se verá (capítulos 6.2, 6.3 e 6.5.5), os "inputs" calculados pecam ainda por defeito.

Não se observa por outro lado, uma deflecção negativa das curvas concentração/salinidade claramente indicativa de remoção activa do arsénio na zona de menores salinidades, como anteriormente proposto (Andreae et al., 1983b). Admite-se que,

na generalidade das situações, a eventual remoção de As da fase líquida seja mascarada pelo transporte, por difusão, para montante, do considerável "input" que se verifica um pouco mais a jusante.

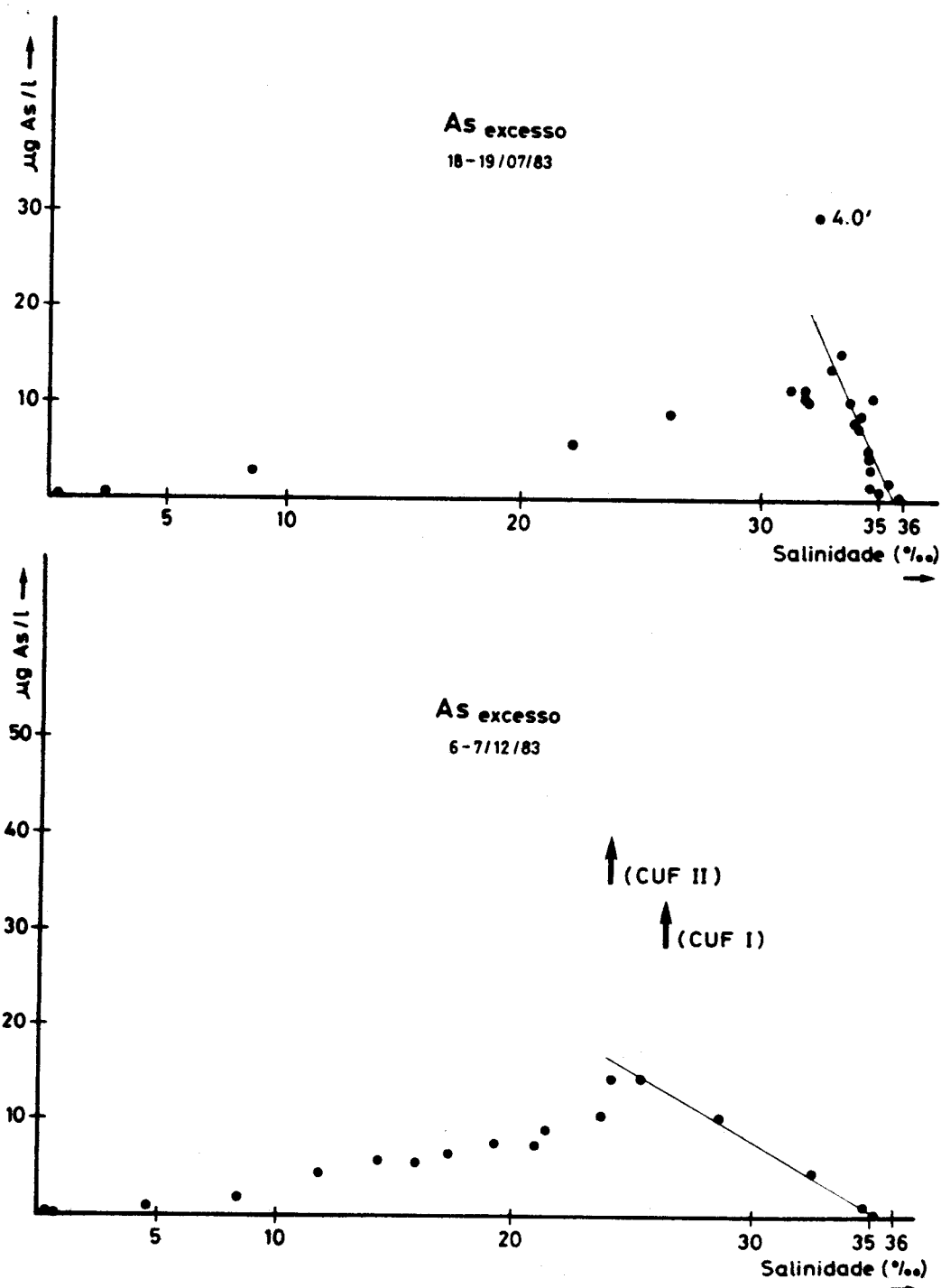


Fig. 23 - Distribuição das concentrações As em excesso em função da salinidade para a) campanha I (18-19/07/83) e b) campanha III (5-12/11/83).

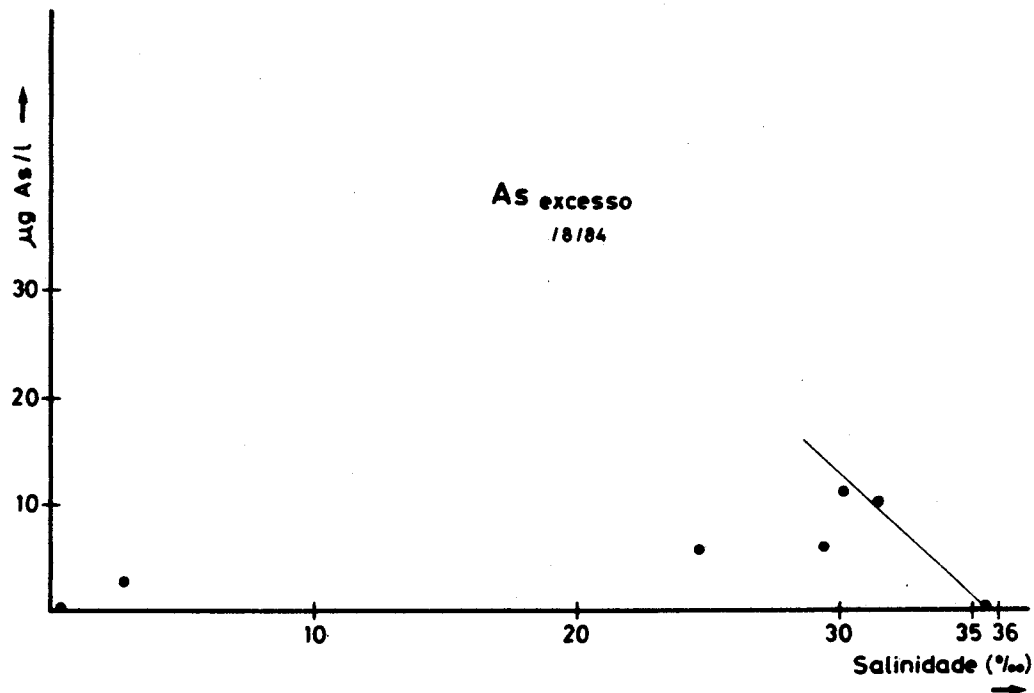


Fig.24 - Distribuição das concentrações **As em excesso**, em função da salinidade, para a campanha IV (9-13/08/84)

6.2 - A presença de formas trimetiladas

Independentemente da forma actual dos seus percursores (parent species) (ver adiante 7.1.3) estabeleceu-se claramente no âmbito deste trabalho a presença de formas dissolvidas que, por redução, produzem trimetilarsina (Bettencourt, 1988).

Outra não parece, com efeito, poder ser a interpretação do resultado das determinações efectuadas nas amostras recolhidas no decurso da II e IV campanhas. Apresentam-se, juntamente com as concentrações determinadas para outras espécies, nos Quadros 6-6 e 6-8. No Quadro 6-7 coligem-se os dados complementares da IV campanha.

Estas determinações, (efectuadas pelo método das adições padrão e utilizando, regra geral, um reactor de 50 ml), constituem, em nosso entender, prova suficiente da presença recorrente de formas trimetiladas de arsénio nas águas do estuário do Tejo.

Reproduz-se, na Fig. 27, um registo típico dessas determinações, podendo observar-se que o pico de TMA ocorre mascarado por um outro pico que absorve no mesmo comprimento de onda ($\lambda = 193.7$). Esta situação é frequente no estuário do Tejo. O ajustamento criterioso das condições operacionais e, sobretudo, a utilização de adições padrão permite, no entanto, distinguir os dois picos.

Estes resultados são confirmados, pelas análises correspondentes aos primeiros ensaios de digestão básica (Quadro 6-10), pela análise da amostra utilizada para ultrafiltração (Quadro 6-16) e ainda por determinações efectuadas nas amostras concentradas, extraídas e purificadas por troca iónica (FF e GG) (Quadros 6-18, 6-19 e 6-20).

O conjunto, correspondente a um total de 60 determinações confirma, para além de toda a dúvida razoável, a presença de formas trimetiladas nas águas deste estuário.

Este resultado contraria, no entanto, toda a evidência anteriormente recolhida para águas naturais marinhas, revista e resumida de um modo muito claro por Andreae (Andreae, 1986a) (ver adiante 6.2).

QUADRO 6-6

RESULTADOS DA CAMPANHA IV (9-13/08/84)

ESTAÇÃO	SALIN. (‰)	A _{4TOT} ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	MMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	DMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	TMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)
1.0	0.14	2,87 \pm 0,328	0,041 \pm 0,0045	0,070 \pm 0,0022	0,027 \pm 0,0023
2,9	2.7	5,54 \pm 0,358	0,035 \pm 0,0013	0,117 \pm 0,0053	0,025 \pm 0,0022
B ₆	24.7	9,07 \pm 0,816	0,062 \pm 0,0043	0,231 \pm 0,0049	0,036 \pm 0,0042
4.0"	29.4	9,50 \pm 0,335	0,049 \pm 0,0042	0,266 \pm 0,0110	0,030 \pm 0,0006
CUF (I)	30.5	14,80 \pm 0,035	0,051 \pm 0,0077	0,238 \pm 0,0077	0,035 \pm 0,0010
AQ (s)	31.4	13,72 \pm 0,635	0,047 \pm 0,0013	0,228 \pm 0,0028	0,042 \pm 0,0018
B ₀	35.5	3,86 \pm 0,377	0,014 \pm 0,0023	0,133 \pm 0,0055	0,010 \pm 0,0011

QUADRO 6-7

-DADOS COMPLEMENTARES DA CAMPANHA IV

ESTAÇÃO	DATA	HORA	TEMP. (°C)	N-NO ₂ (ppm)	P-PO ₄ (ppm)	Si-SiO ₂ (ppm)
1.0	09/08/84	12.45	22.5	0.007	0.226	0.385
2.9	"	12.15	21.5	0.008	0.158	0.334
8.6	"	11.30	20.5	0.015	0.080	0.361
4.0"	"	10.55	19.5	0.014	0.148	0.247
Cuf (I)	"	10.15	19.0	0.013	0.178	0.269
AQ (s)	"	09.30	18.5	0.010	0.163	0.203
B ₀	13/08/84	14.45	17.8	0.005	0.035	0.115

Passando à análise dos resultados obtidos apresenta-se nas Figs.25d) e 27b) a variação das concentrações de TMA em função da salinidade, para as campanhas IV e II.

É bem visível nestes perfis a influência das condições de escoamento nas concentrações actuais de trimetilarsénio e também as semelhanças que a distribuição deste composto e do MMA; ao contrário o DMA, parece correlacionar sobretudo com o As_{itot} .

O afastamento das concentrações observadas da recta teórica de diluição no corpo central do estuário indica, por outro lado, na campanha de verão (IV) um ganho positivo de TMA dentro dos limites do estuário, como para as outras espécies estudadas (ver atrás 6.1).

Faz-se notar além disso que, dum modo geral, e um tanto surpreendentemente, não parece haver lugar para uma sazonalidade marcada da concentração de trimetilarsénio (Quadros 6-6 e 6-8) variando, regra geral, as concentrações desta espécie, entre 10 e 40 ng/dm³.

Das concentrações medidas na amostra G_{00} decorre no entanto, claramente, que, no estuário do Tejo, pelo menos em situações localizadas e por períodos de tempo limitados, nem sempre é assim (Quadro 6-10).

A amostra ΔG_{00} colhida na praia do Alfeite em plena estiagem (26.08.87) apresentava, em todo o caso, uma biomassa considerável de macrófitos e parece corresponder a um período de máxima produção primária (ver adiante 6.5.1).

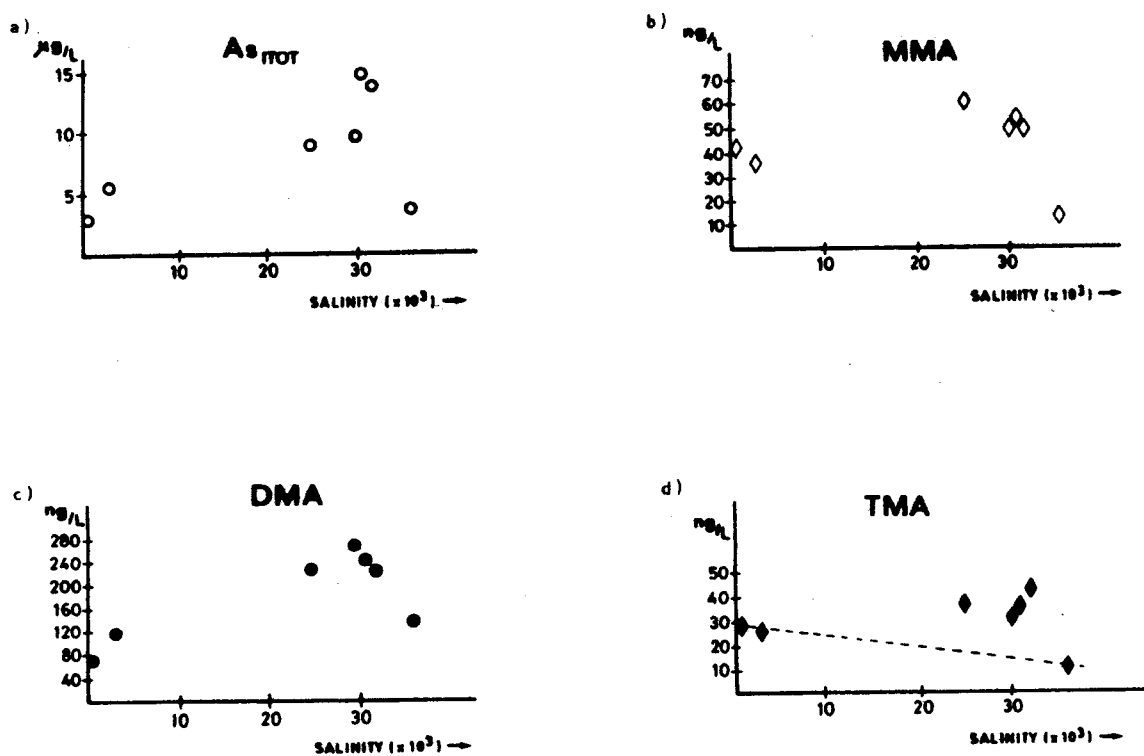


Fig. 25 - Distribuição de a) Arsénio Inorgânico Total ($\text{As}_i \text{ tot}$), b) Monometilarsénio (MMA), c) Dimetilarsénio (DMA) e d) Trimetilarsénio (TMA) na campanha IV, em função da salinidade. A recta a tracejado indica a diluição teórica conservativa.

A estes factos, como se verá adiante no capítulo 7, podem não ser estranhos altas concentrações de TMA.

Diversos autores demonstraram, por outro lado, a presença de formas trimetiladas de arsénio na urina humana aparentemente em função do consumo, na dieta, de organismos marinhos (Andreae & Klumpp, 1979; Odanaka et al., 1983; Foá et al., 1984; Yamato, 1988). Trabalhos recentes provaram igualmente a capacidade do organismo humano de metilar o DMA a TMA (3.3.c)).

Pareceu assim interessante analisar a eventualidade de o TMA presente, no estuário do Tejo, ter uma origem deste tipo, conhecido, como é, o peso da carga poluente do efluente urbano naquele corpo de água (4.3, Quadro 4-2 e 4-3).

QUADRO 6-8
CAMPANHA II (25-26/11/83)

AMOSTRAS	SALINIDADE ‰	As _i TOTAL ($\mu\text{g}/\text{dm}^3 \pm \text{s. d.}$)	MMA ($\mu\text{g}/\text{dm}^3 \pm \text{s. d.}$)	DMA ($\mu\text{g}/\text{dm}^3 \pm \text{s. d.}$)	TMA ($\mu\text{g}/\text{dm}^3 \pm \text{s. d.}$)
1.0	0.56	2.28 \pm 0.133	0.024 \pm 0.0005	0.036 \pm 0.0017	0.018 \pm 0.0020
2.8	0.56	2.23 \pm 0.069	0.028 \pm 0.0015	0.031 \pm 0.0030	0.021 \pm 0.0020
2.9	0.57	2.25 \pm 0.069	0.023 \pm 0.0015	0.029 \pm 0.0019	0.015 \pm 0.0027
2.0	0.56	2.27 \pm 0.078	0.026 \pm 0.0032	0.028 \pm 0.0020	0.013 \pm 0.0073
B.6	0.69	2.68 \pm 0.058	0.025 \pm 0.0011	0.030 \pm 0.0017	0.019 \pm 0.0006
BAL 1	3.8	3.53 \pm 0.117	0.028 \pm 0.0029	0.038 \pm 0.0022	0.018 \pm 0.0054
4.0"	9.5	5.32 \pm 0.047	0.033 \pm 0.0019	0.055 \pm 0.0047	0.022 \pm 0.0011
3.9	2.71	2.91 \pm 0.082	0.032 \pm 0.0016	0.040 \pm 0.0018	0.023 \pm 0.0055
3.0(s)	3.6	3.69 \pm 0.057	0.034 \pm 0.0024	0.043 \pm 0.0033	0.027 \pm 0.0039
3.0(f)	14.9	8.50 \pm 0.156	0.033 \pm 0.0027	0.073 \pm 0.0046	0.026 \pm 0.0006
D.Olv.	9.11	5.31 \pm 0.147	0.035 \pm 0.0025	0.059 \pm 0.0052	0.024 \pm 0.0030
D.M.	6.0	4.35 \pm 0.098	0.033 \pm 0.0036	0.044 \pm 0.0013	0.024 \pm 0.0018
5.1'	15.6	7.26 \pm 0.104	0.030 \pm 0.0020	0.069 \pm 0.0027	0.014 \pm 0.0040

A análise de sensibilidade efectuada, tomando as populações actuais da área ribeirinha e atribuindo-lhes concentrações de TMA- na urina equivalentes às registadas para o Japão (Yamato,

1988) indica, no entanto, que esta hipótese carece de verossimilhança (Quadro 6-9).

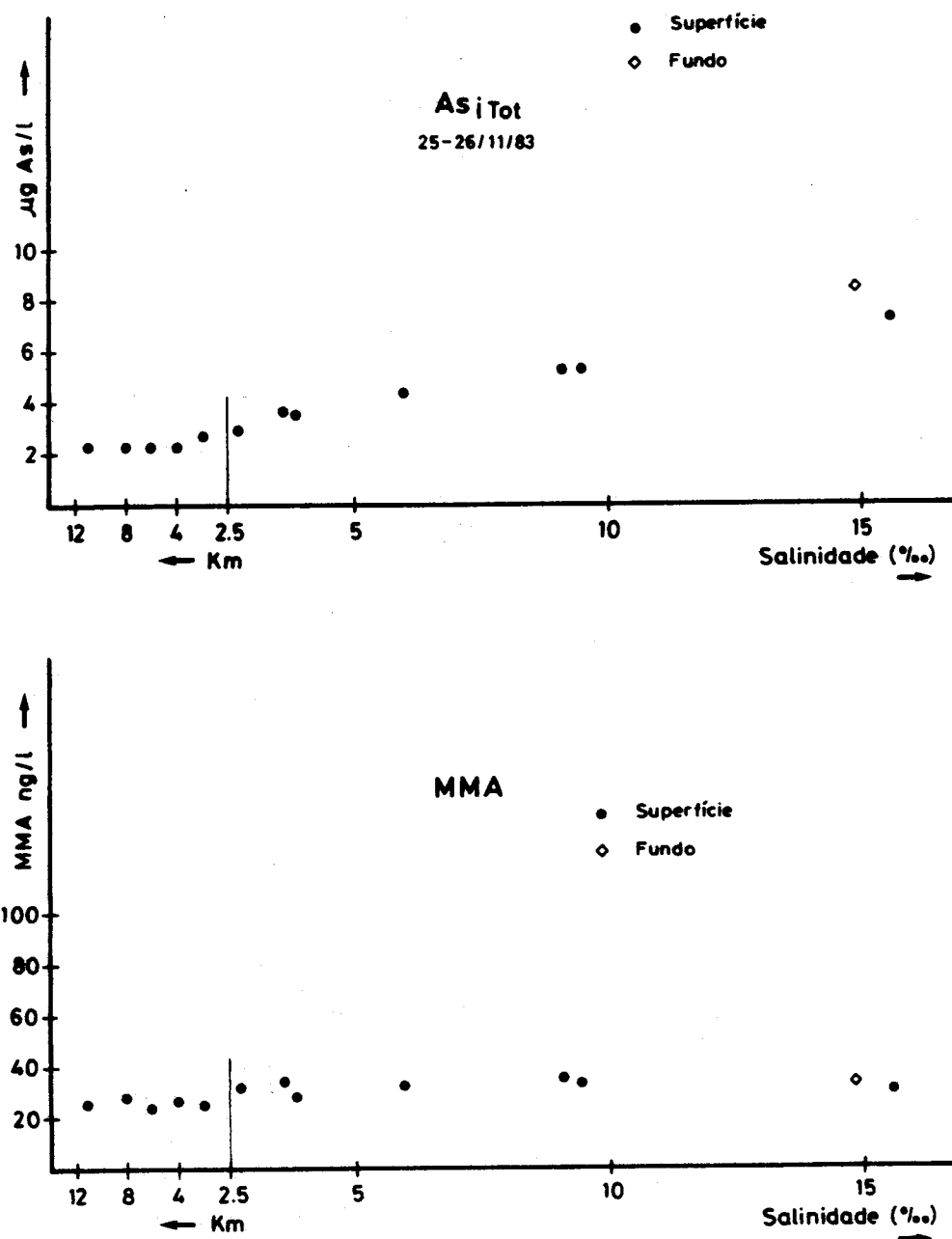


Fig. 26 - Distribuição de a) Arsênio Inorgânico Total ($As_i \text{ tot}$) e b) Monometil Arsênio (MMA) em função da salinidade e da distância a montante (Km) durante a Campanha II (25-26/11/83)

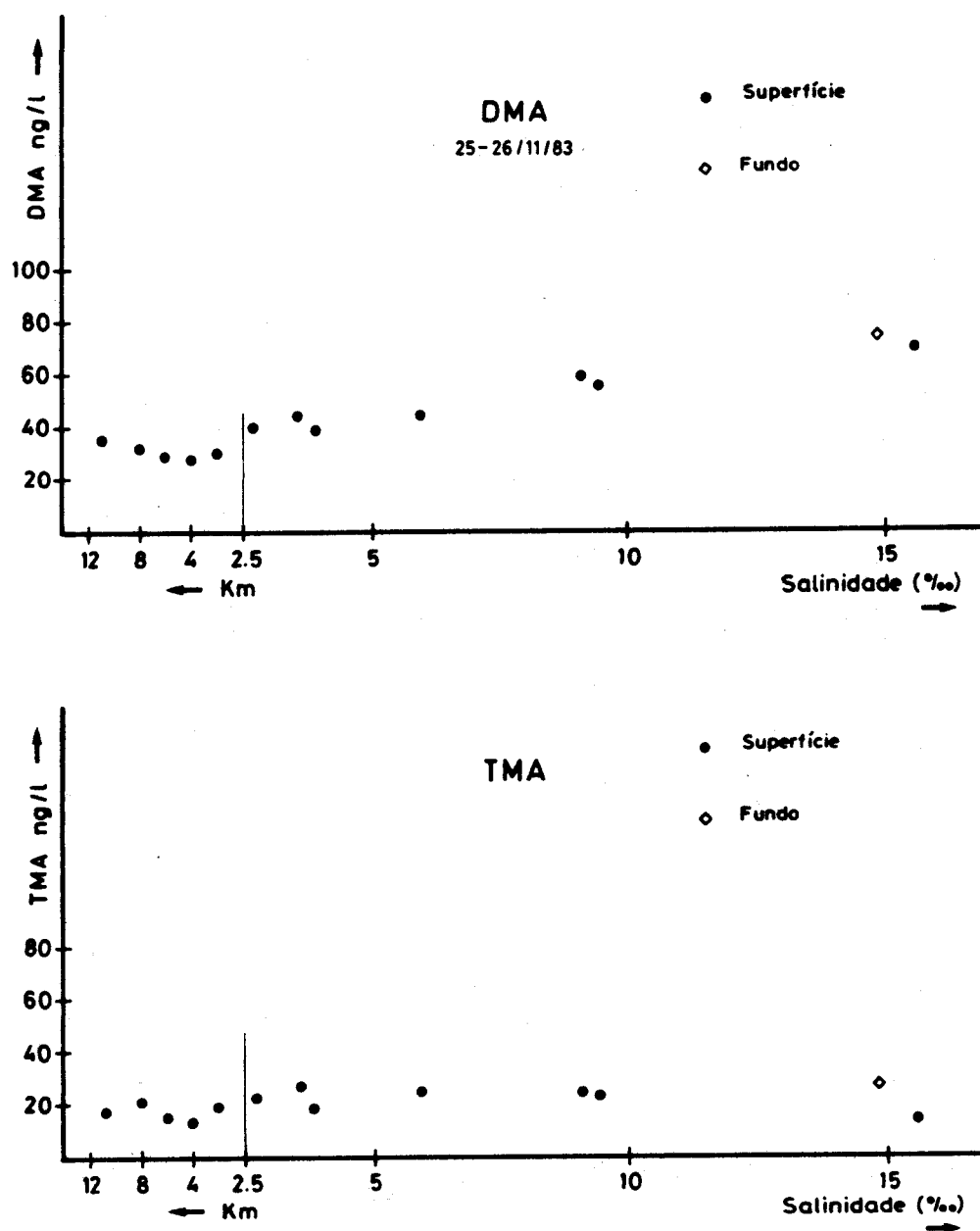


Fig. 27 - Distribuição de a) Dimetilarsênio (DMA) e b) Trimetilarsênio em função da salinidade e da distância a montante (Km) durante a campanha II (25-26/11/87).

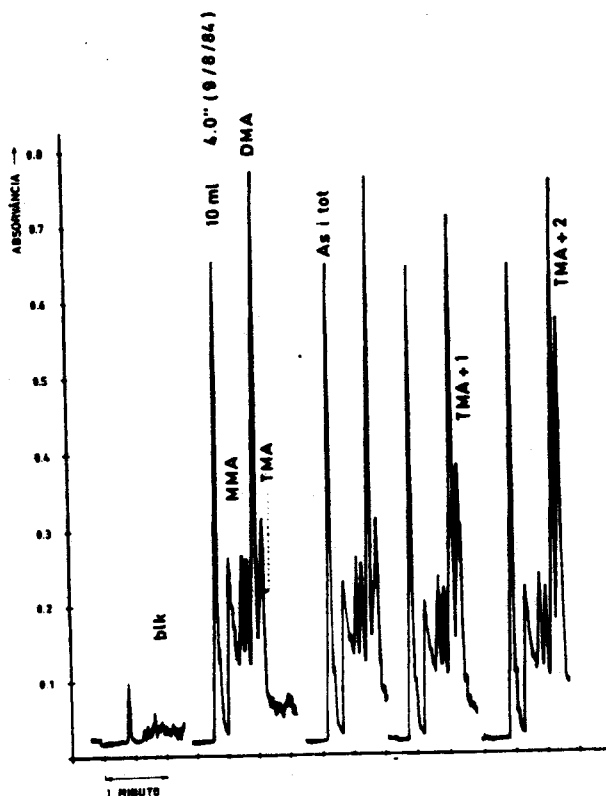


Fig. 28 - Registos Típicos de Trimetilarsénio (TMA); a localização dos picos é dada pelos tempos de retenção e verificada por adições padrão de 1 e 2 ng (TMA+1, TMA+2). Os picos de As_i tot e os picos de MMA, DMA e TMA estão expandidos de 0.3 e 7 x respectivamente

Assim, a ter uma origem imediatamente antropogénia, grande parte do TMA detectado e quantificado não terá certamente aquela.

Além disso, as formas trimetiladas encontradas na urina humana são, na maioria dos casos, provavelmente mero resultado do processamento por digestão, de materiais de origem aquática (Cannon et al., 1981; Luten et al., 1982). Há que considerar, portanto, para todos os efeitos, a reciclagem por mineralização e decaimento desses mesmos materiais no meio de origem.

É difícil, aliás, admitir que estas formas trimetiladas possam ter neste estuário uma origem que não resulte da intervenção de mecanismos naturais, significativos à escala geoquímica.

QUADRO 6-9
TMA NO ESTUÁRIO DO TEJO

Input (máx²) de TMA de origem antropogénia

População marginal	1,5 x 10 ⁶ Hab.
Produção média de urina	1,3 litro/hab/dia
Concentração na urina *	75 µg As/L

$$\text{Total Máximo} \quad 1,5 \times 10^6 \times 1,3 \times 75 \times 10^{-9} = 0,146 \text{ Kg dia}^{-1}$$

Ganho efectivo de TMA no estuário 9,13/8/84 (Kaul & Froelich)

$$K_{Es} = -3,650 \times 10^{-9} \text{ Kg.m}^3.\%^{-1}$$

$$R = 189 \text{ m}^3/\text{s}$$

$$I_E = 2,14 \text{ Kg TMA dia}^{-1}$$

$$\text{"Ratio"} = \frac{\text{Input TMA (antropogénio)}}{\text{ganho TMA}} = \frac{1}{15}$$

* Yamato (1988)

Em resumo, sendo de excluir uma origem antropogénia imediata e apresentando o TMA um ganho positivo nos limites do estuário, forçoso é considerar-se a eventualidade de uma fonte interna para esta espécie.

Parece assim haver uma alta probabilidade de o trimetilarsénio detectado constituir fundamentalmente uma etapa intermédia do complexo ciclo biogeoquímico local do arsénio podendo resultar quer da biometilação de outras formas quer da degradação de compostos tetralquilados daquele elemento. E como tal passou a ser encarado na subsequente investigação.

6.3 - Arsénio refractário "digerível" (ARD)

Tendo-se detectado e quantificado formas trimetiladas de arsénio nas águas do estuário passou-se à tentativa de identificação de um possível precursor daquelas formas, entre os compostos orgânicos de arsénico mais pesados.

Assim, na sequência de um certo número de testes com padrões, adoptou-se a receita para digestão alcalina referida atrás em 5.7, aplicando-a directamente nas águas do estuário.

Os resultados deste primeiro ensaio (19.09.86) apresentam-se no Quadro 6-10 podendo observar-se ao comparar a sub-amostra indigerida com a sub-amostra digerida um incremento positivo do somatório das concentrações das três formas metiladas doseadas (MMA + DMA + TMA). Assim, não se considerando a variação das concentrações do arsénio inorgânico total, que se mantém dentro do erro estatístico provável (Miller & Miller, 1984), a digestão alcalina parece produzir diferenças significativas da concentração do arsénio metilado.

QUADRO 6-10

DIGESTÃO BÁSICA

P^a DE ALGÉS (19/09/86)

ESPÉCIE FRACÇÃO	As _{TOT} ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^3 \pm \text{s.d.}$)	MMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^3 \pm \text{s.d.}$)	DMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^3 \pm \text{s.d.}$)	TMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^3 \pm \text{s.d.}$)	MMA + DMA + TMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^3 \pm \text{s.d.}$)
INDIGERIDO	9.33 \pm 0.131	0.043 \pm 0.004	0.193 \pm 0.026	0.009 \pm 0.006	0.245 \pm 0.027
DIGERIDO	9.05 \pm s.d.	0.046 \pm 0.002	0.345 \pm 0.019	0.030 \pm 0.007	0.421 \pm 0.020
DIGERIDO - - INDIGERIDO					0.176 \pm 0.034

O procedimento utilizado não é, contudo, isento de reparos uma vez que não se adoptaram, neste primeiro ensaio, todas as precauções referidas em 5.7, nomeadamente a adição à sub-amostra indigerida de uma quantidade equivalente dos reagentes adicionados à sub-amostra a digerir. O incremento positivo observado pode portanto, "in limine" ser ainda atribuído a efeitos decorrentes da alteração da matriz pelo que não se considerou como concludente.

As precauções referidas foram, no entanto, adoptadas nas digestões alcalinas subsequentes e no Quadro 6-16 pode observar-se, tomando, uma vez mais, apenas o conjunto das formas de arsénio correspondentes aos hidretos orgânicos, que se obtêm incrementos invariavelmente positivos entre alíquotas indigeridas e digeridas, em cada fracção (capítulo 6.5.1).

A aplicação (simplificada) do teste de Student (Clarke, 1989) às concentrações apresentadas no Quadro 6-16 permite entretanto observar que as diferenças obtidas entre sub-fracções digeridas e indigeridas, são todas significativas a mais de 95%.

Este resultado sugere, claramente, a presença, nas águas do estuário do Tejo, de um componente organoarsenical refractário à produção de arsinas (e portanto indetectável pela exclusiva aplicação do método dos hidretos), mas cujas ligações arsénio-carbono são sensíveis ao ataque pelo hidróxido de sódio nas condições operacionais adoptadas. Designou-se por arsénio refractário digerível (ARD) (Bettencourt, 1988).

O teor mínimo deste componente vem dado, em cada fracção pelas diferenças indicadas na 6ª coluna linhas 5ª, 8ª, 11ª e 14ª do Quadro referido e é, na amostra processada em 30/01/87 sempre superior ao teor apresentado pelas mesmas fracções em MMA e TMA.

Estes nossos primeiros dados foram complementados, no decurso deste trabalho, por outros resultados que decorrem da combinação da técnica da digestão básica com alguns dos métodos utilizados na caracterização físico-química do componente refractário detectado (Quadros 6-18, 6-19 e 6-20).

O conjunto, num total de mais de trinta ensaios de digestão básica, mostra que se produzem, quase invariavelmente, incrementos positivos para o somatório MMA + DMA + TMA, o que parece confirmar, de um modo seguro, a hipótese acima

apresentada relativa à presença nas águas do estuário do Tejo, de um componente refractário "digerível" (ARD).

Irgolic e colaboradores obtiveram também, ulteriormente, resultados em parte convergentes com os acima apresentados e que confirmam a presença de compostos organoarsenicais digeríveis (por digestão básica), em águas marinhas (ver adiante pp. 153-154).

Foi, contudo, investigada a possibilidade de um artefacto resultante da própria digestão alcalina estar na origem dos incrementos observados. Neste sentido processaram-se, pelos mesmos métodos e nas mesmas condições, brancos de água Milli-Q a que se adicionou uma quantidade conhecida de arseniato. Nestes ensaios não foi produzido, em todo o caso, qualquer incremento mensurável das diferentes espécies de arsénio (determináveis pelo método dos hidretos) ou do seu conjunto. A registar-se algum artefacto na digestão alcalina ele deverá, portanto, ser de natureza muito diferente do investigado.

A eventualidade de ter lugar uma situação mais complexa nomeadamente decorrente de reacções de transmetilação foi também examinada. Conhecem-se, com efeito, reacções de transmetilação a partir de compostos como o trimetilsulfóniohexafluorofosfato ($\text{Me}_3\text{S}^+\text{PF}_6^-$), susceptíveis de metilar o arsenito a monometilarsénio em condições não muito diferentes das que se verificam na digestão alcalina (pH = 12, 80 °C) (António et al., 1979). De facto todas as etapas de metilação previstas no esquema de Challenger (Fig.3) parecem

susceptíveis de ser produzidas por este mecanismo, nessas condições (Cullen & Reimer, 1989).

No entanto, as taxas de oxidação, puramente química, do arsenito a arseniato são relativamente elevadas (Scudlark & Johnson, 1982) e o método de conservação adoptado (acidificação a pH = 1) acelera esta oxidação (Andreae, 1977, 1983d). Além disso a generalidade das amostras e fracções em que se observam incrementos positivos das formas metiladas na sequência da digestão alcalina (ARD), foram sujeitas a prolongada manipulação incluindo arejamento e aquecimento o que só pode acelerar o processo de oxidação (ver adiante 6.5).

Assim, a presença nessas fracções de arsenito em concentrações susceptíveis de fornecer um substrato à transmetilação durante a digestão parece altamente improvável, mas sobretudo sendo este conjunto de procedimentos oxidante, não se dispõe, das etapas redutoras indispensáveis à metilação sequencial das diferentes espécies (3.4.2.3, Fig. 3).

A digestão alcalina não constitui portanto um modelo equivalente ao investigado por Cullen para a transmetilação do arsénio.

A hipótese de um artefacto durante a digestão foi conseqüentemente rejeitada.

Um exame mais pormenorizado destes dados sugere ainda a formação preferencial de DMA no conjunto das digestões

efectuadas, se exceptuarmos a amostra G_{00} e as fracções purificadas dela obtidas, ΔG_1 e ΔG_5 , em cujo digerido o TMA é claramente dominante (Fig. 28).

A interpretação destes factos não parece fácil. Kaise e colaboradores investigaram, com efeito, recentemente, da digeribilidade de uma série de compostos organoarsenicais cuja presença no ecossistema aquático é provável e concluem pela exclusão, à partida, do espectro dos compostos digeríveis da arsenocolina, da acetilarsenocolina, do dimetil(carboximetil)arsina óxido, do dimetil(2-carboxi-etil)arsina óxido, e do dimetil(2-hidróxi-etil)arsina óxido (Kaise et al., 1988).

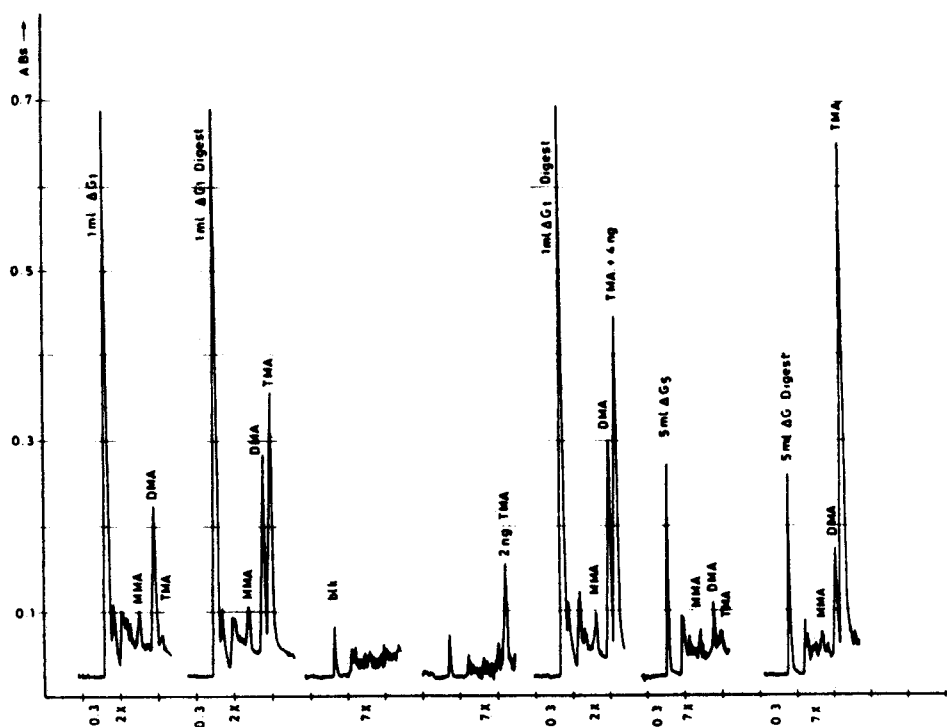


Fig. 29 - Registro das espécies de arsénio doseadas nas fracções ΔG , e ΔG_5 digeridas (digest) e indigeridas

Os ácidos monometilarsónico e dimetilarsínico bem como o

trimetilarsênio óxido são também considerados estáveis, pelos mesmos investigadores, nas condições operacionais por eles adoptadas (2N OHNa, 3Hr). Estes últimos resultados e o relativo à arsenocolina confirmam, aliás, resultados de investigação anterior (Crecelius, 1977, Klumpp, 1979) (Quadro 6-11).

A formação preferencial de DMA acima referida, é, no entanto, compatível com a presença de dimetilarsenoribosidos solúveis (Edmonds & Francesconi, 1981, Norin et al., 1983, Christakopoulos, 1988) o que, na sequência de trabalhos de Benson, é considerado possível na fase líquida, em meio aquático (Herrera-Lasso & Benson, 1982, Benson et al., 1988c). Kaise e colaboradores propõem ainda o esquema da Fig.30 como mecanismo básico da acção da solução alcalina sobre aqueles compostos.

QUADRO 6-11

ARSINAS GERADAS A PARTIR DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE COMPOSTOS
EMITIDOS DO ARSÊNIO COM BH_4Na A pH1 ANTES E DEPOIS DA DIGESTÃO
ALCALINA (2N OHNa)

COMPOSTO	Arsênio antes da digestão/depois da digestão com OHNa(%)			
	AsH ₃	CH ₃ AsH ₂	(CH ₃) ₂ AsH	(CH ₃) ₃ As
Arsenito	100/99.8	0/0	0/0	0/0
Ácido metilarsónico	0/0	100/98	0/0	0/0
Ácido dimetilarsínico	0/0	0/0	100/99.1	0/0
Trimetilarsênio óxido	0/0	0/0	0/0	100/99.1
Dimetil(carboximetil)arsina óxido	0/0	0/0	0/<0.1	0/0
Dimetil(2-carboxietil)arsina óxido	0/0	0/0	0/<0.1	0/0
Dimetil(2-hidroxietil)arsina óxido	0/0	0/0	0/<0.1	0/0
Trimetil(carboximetil)arsónio (arsenobetaina)	0/0	0/0	0/<0.1	0/99.8
Trimetil(carboxietil)arsónio	0/0	0/0	0/0	0/22.8
Trimetil(2-hidroxietil)arsónio (arsenocolina)	0/0	0/0	0/0	0/0.8

(Reproduzido de Kaise et al., 1988)

A formação preferencial de TMA na digestão básica de G_{00} e das suas fracções ΔG_1 e ΔG_5 , pode, por outro lado, ser atribuída à presença na fase líquida da arsenobetaina (Norin et al., 1982, Edmonds & Francesconi, 1977). O mecanismo correspondente é indicado na Fig. 31.

Estas questões estão no entanto, em nosso entender, longe de ser claras.

Convém referir aliás o carácter aligeirado da receita por nós adoptada para a digestão (0.5N OHNa/24hr) das amostra de água e fracções líquidas processadas, quando comparada com as receitas utilizadas por outros autores (Norin et al., 1983, 1985; Crecelius, 1977; Kaise et al., 1988).

A adopção desta receita decorre, em parte do peso inteiramente dominante, no nosso caso, da componente inorgânica ($As^{3+} + As^{5+}$) em relação ao conjunto das espécies metiladas conhecidas, à data, nas águas do estuário (MMA + DMA + TMA) e do receio de, pela adopção de uma versão mais forte, se obter, por demetilação sucessiva das formas metiladas (Fig. 32), sobretudo arsénio inorgânico. A variação das concentrações de arsénio em função da digestão seria então indistinguível do erro estatístico associado à determinação da fracção inorgânica.

Estes receios não parecem ser confirmados pelos trabalhos posteriores de Kaise (Quadro 6-11).

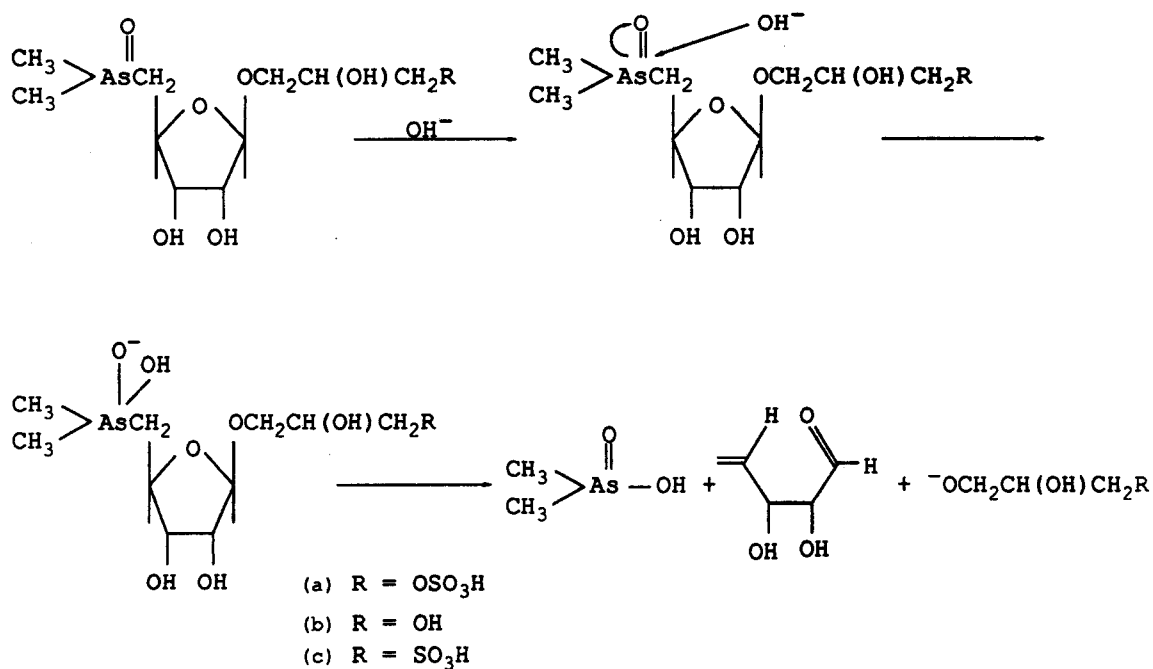


Fig. 30 - Mecanismo proposto para a digestão alcalina (OHNa) dos arsenoribosidos dimetilados (Esquema I)

(reproduzido de Kaise et al., 1988)

No entanto os nossos dados apontam nesse sentido já que a diminuição das concentrações de TMA, frequentemente observada durante a digestão (ver por ex. Quadros 6-18, 6-19; F₀₂, D/M, F₀₇, F₀₁₀, F₀₁₃, A/M) só parece poder ser atribuída a demetilação.

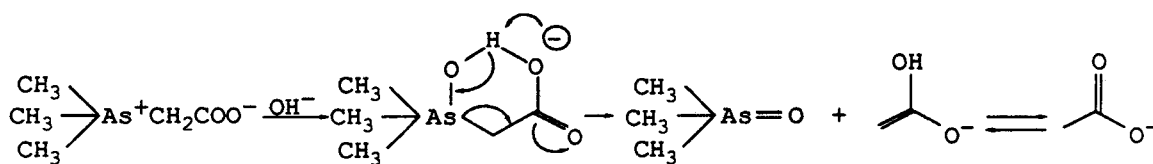


Fig. 31 - Mecanismo proposto para a digestão alcalina da arsenobetaina (esquema II)

(reproduzido de Kaise et al., 1988)

Acresce que a exclusiva produção de TMAO na digestão da arsenobetaina está longe de se encontrar bem estabelecida. Com efeito (contrariando as opiniões de Norin, Kaise e colaboradores (Norin *et al.*, 1982, Norin, 1987, Christakopoulos, 1988, Kaise *et al.*, 1988) e os nossos próprios dados (Quadro 6-12)) Edmonds & Francesconi obtiveram rendimentos de 30%TMA + 70%DMA ou só DMA para a digestão alcalina daquele composto (Edmonds & Francesconi, 1977). Crecelius obteve também um rendimento de 90% de DMA na digestão básica de um composto orgânico do arsénio que é provavelmente arsenobetaina (Crecelius, 1977). Os resultados obtidos por Bottino e colaboradores com arsenobetaina sintética (Bottino *et al.*, 1978) são ainda convergentes com os daqueles autores.

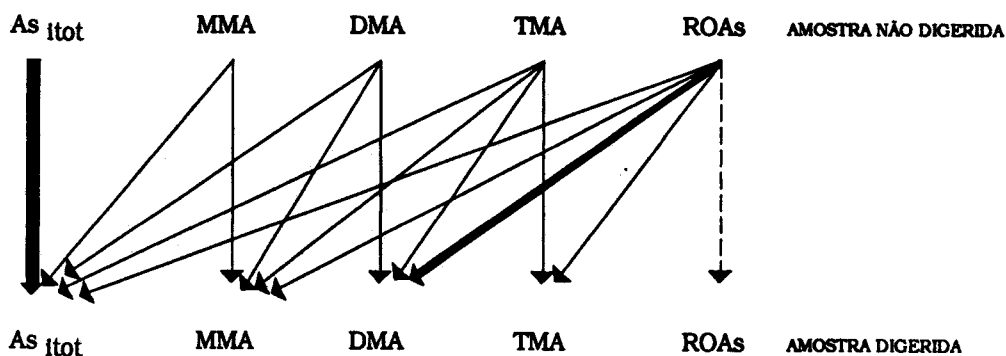


Fig. 32 - Interconversão eventual das espécies de arsénio durante a digestão alcalina

Estas percentagens de DMA são excessivamente altas para poderem ser atribuídas a impurezas.

Parece assim dever constatar-se que a composição final do digerido da arsenobetaina (digestão básica) (e de, eventualmente, outros compostos orgânicos de arsénio), é

relativamente imprevisível e variará em função da receita e de condições operacionais não especificadas (Quadro 6-12). É, em todo o caso, admissível que a digestão deste composto numa matriz altamente complexa, como é o caso de amostras de água salgada, na matriz que resulta da acidificação dessas amostras (5.2) e ainda em soluções mais ou menos puras de água destilada (Kaise et al., 1988, nossos dados Quadro 6-12), conduza a resultados diferentes.

Não está firmemente estabelecido, por outro lado, o exclusivo da arsenobetaina como precursor do TMAO na digestão alcalina. Com efeito, para além do trimetil(2-carboxietil)arsónio (Quadro 6-11) Bottino e colaboradores constataam a produção eventual de TMA na digestão alcalina das fracções de arsenolípidos isoladas a partir de *Tetraselmis chuii* (Bottino et al., 1978). Também não se pode afastar a hipótese da digestão alcalina dos arsenoribosidos trimetilados recentemente identificados (Shibata & Morita, 1988, Benson, 1988a) conduzir à produção de TMAO (ver adiante 7.4.1.).

A fracção arsenical refractária ao método dos hidretos muito recentemente detectada por Irgolic e colaboradores (nas águas do Maine) converte-se também em TMAO por digestão alcalina (Irgolic, 1989). As suas concentrações variam, no entanto, entre 7 e 9 μg (ARD)/ dm^3 , contra menos de 0.2 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ de arsénico inorgânico ($\text{As}^{5+} + \text{As}^{3+}$). Verifica-se assim que, neste caso, a fracção refractária é inteiramente dominante no computo total de arsénio. Observa-se também, no entanto, se se tiver em conta as concentrações médias expectáveis para águas marinhas,

uma clara depleção do arsénico inorgânico (ver Quadro 3-7). Este facto retira credibilidade à hipótese dessa fracção arsenical digerível ser fundamentalmente constituída por arsenobetaina. A fracção foi, com efeito, detectada no âmbito da investigação de um fenómeno de mortalidade maciça de lavagantes. Ora a simples decomposição do tecido animal e a eventual passagem da arsenobetaina nele contida, para a coluna de água, não explica a depleção em arsénico inorgânico observada. Por outro lado os produtos da degradação da arsenobetaina formam hidretos e não são, conseqüentemente, refractários (ver atrás 3.4.3).

Parece portanto claro que a situação, é mais complexa e que embora se obtenha TMAO por digestão da fracção refractária, é provável que também neste caso outro tipo de compostos que não a arsenobetaina esteja presente nas águas analisadas.

Assim à presença de uma fracção dominante de TMA no digerido não pode atribuir-se mais do que um carácter indicativo da presença de arsenobetaina na amostra original. Em contrapartida a presença de uma fracção dominante de DMA não deve, quanto a nós, ser tomada como prova suficiente da sua ausência.

É em todo o caso evidente que o teor acima indicado para a componente refractária digerível detectada (ARD) é um teor mínimo, uma vez que não se conhece o rendimento da digestão alcalina efectuada. Conseqüentemente mesmo dispondo-se de uma identificação positiva da componente referida haveria sempre que ter em conta o que acima se refere para a influência

determinante das condições operacionais adoptadas.

Parece assim indispensável obter um balanço completo do arsénio presente nas águas do estuário.

QUADRO 6-12
DIGESTÃO ALCALINA DE PADRÕES (OHNa)

PADRÃO	INCREMENTO DE ARSÉNIO EM (%)			REFERÊNCIAS
	MMA	DMA	TMA	
Arsenobetaina	N.D.	N.D.	79	φ
	N.D.	N.D.	85	φ
	N.D.	N.D.	73	φ
		70	30	Edmonds et al., 1981
	N.D.	*	N.D.	Edmonds et al., 1981
		90		Crececius et al., 1977
	N.D.	*	*	Bottino et al., 1978
		98	Norin et al., 1983	
	N.D.	N.D.	98	Kaise et al., 1988
Arsenocolina	N.D.	N.D.	N.D.	φ
	N.D.	N.D.	6	Lüten et al., 1982, 1983
			≤ 8	Norin et al., 1983
Acetilarsenocolina	N.D.	N.D.	N.D.	φ

φ Resultados obtidos no âmbito deste trabalho

* Quantidades não especificadas

6.4 - Arsénio refractário "indigerível" (ARI)

Sendo evidente a necessidade de tentar um balanço completo do arsénio nas águas do estuário ou seja, no mínimo, determinar o teor total de arsénio efectivamente presente (para além do que

resulta do método dos hidretos) tentou-se essa determinação, recorrendo, numa primeira fase, à fotooxidação com UV, nos termos da metodologia explicitada acima em 5.6.

O resultado apresenta-se no Quadro 6-16 (A_0 photox).

No entanto a aplicação do procedimento habitual de fotooxidação (UV/6Hr.) a padrões organoarsenicais relativamente concentrados revela limitações significativas deste procedimento. Os rendimentos obtidos para a arsenocolina e a acetilarsenocolina não excedem, em efeito, 21% (Quadro 6-13) .

Entendeu assim obter-se a efectiva digestão total de amostras de água do estuário adaptando a amostras líquidas, a receita conhecida da digestão "seca" (Uthe et al., 1975) como referido atrás em 5.7. Depois de ensaiada em padrões improvisados (água Milli-Q + arsenocolina sintética) essa receita foi, com efeito, aplicada uma primeira vez à amostra G_{00} colhida a 26/08/87 na Praia do Alfeite.

QUADRO 6-13

RENDIMENTO DA FOTO-OXIDAÇÃO (UV/6HR) (%)

PADRÃO	As _{tot} ($\bar{x} \pm s.d.$)	MMA ($\bar{x} \pm s.d.$)	DMA ($\bar{x} \pm s.d.$)	TMA ($\bar{x} \pm s.d.$)	Σ As ($\bar{x} \pm s.d.$)
Arsenocolina	4,2 ± 3,15	1,4 ± 0,083	2,2 ± 0,23	12,9 ± 0,162	20,7 ± 3,2
Arsenobetaina	19,6 ± 1,65	5,6 ± 0,04	6,1 ± 0,11	39,3 ± 1,65	70,6 ± 1,7
Acetilarsenocolina	8,2 ± 3,88	1,3 ± 0,093	3,0 ± 0,17	8,7 ± 0,15	21,0 ± 3,9

Os resultados* apresentam-se no Quadro 6-14.

Combinando estes resultados com os apresentados adiante, no Quadro 6-20, para as diferentes espécies daquela amostra é possível proceder ao fraccionamento e balanço que se apresentam mais adiante no Quadro 6-15.

Este conjunto de resultados parece contrariar claramente a doutrina prevalecente até agora na matéria e que assenta, fundamentalmente, no trabalho pioneiro de Andreae (Andreae, 1983c, 1986a).

Este autor, sujeitou com efeito, amostras de água previamente analisadas (método dos hidretos) a uma hidrólise básica rigorosa ($\text{NO}_3\text{Mg.O Mg}$) e comparou os resultados obtidos com os anteriores não tendo, no entanto, detectado, em caso nenhum, um acréscimo significativo no teor total de arsénio. Esta constatação leva-o a excluir a eventual presença de organoarsenicais mais pesados "do tipo dos encontrados nos extratos de algas, a níveis que excedam 1-2% do total de arsénio", em águas fluviais ou superficiais do oceano (Andreae, 1983c, 1986a). Outros autores chegam a conclusões semelhantes embora não explicitem o método utilizado na detecção dos compostos de arsénio (Sanders, 1980; Edmonds & Francesconi, 1988a).

* Entre parêntesis indica-se o número de determinações N o número de picos n ou o número de leituras m utilizados no estabelecimento de cada valor medido o que dá uma ideia da sua fiabilidade.

QUADRO 6-14

RESULTADOS DA DIGESTÃO TOTAL (AMOSTRA G₀₀)

FRACÇÕES	As Inorgânico Total ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$) (N, n ou m)	As Hidretos Orgânicos ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$) (N, n ou m)	As Total ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$) (N, n ou m)	Rendimento da Digestão	As Total Corrigido ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$) (N, n ou m)
G ₀₀	19,15 \pm 0,079 (2,14)	0,508 \pm 0,070 (1,4)	19,66 \pm 0,106		
G ₀₀ + DT			24,02 \pm 1,060 (3,16)	94,2%	24,29 \pm 1,136
(G ₀₀ + DT) - G ₀₀			4,366 \pm 1,065		
Branco DT			< 0,0052 (R.D.L.)		
Δ G ₀₀ + DB	18,73 \pm 0,130 (2,14)	1,453 \pm 0,230 (1,4)	20,18 \pm 0,264		
Δ G ₀₀ + DT			23,33 \pm 0,588 (3,16)	79,0%	24,16 \pm 0,857
(Δ G ₀₀ + DT) - (Δ G ₀₀ + DB)			3,145 \pm 0,645		
Branco DT			< 0,0052 (R.D.L.)		

D.B.: Digestão Básica; D.T.: Digestão Total;

G₀₀: Sub-amostra "tal e qual" da amostra colhida a 26/8/87; Δ G₀₀: sub-amostra de G₀₀ utilizada na digestão básica (10/11/87)

N: número de determinações; n e m: ver atrás 5.33

QUADRO 6-15

FRACÇIONAMENTO DA AMOSTRA G₀₀ (10,070 dm^3)

FRACÇÕES		Concentrações ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	Quantidades Totais (ng de As)	(%)
I, As Inorgânico Total ($\text{As}^{3+} + \text{As}^{5+}$)	(A.I.T.)	18,94 \pm 0,020	190726	78,17
II, As Hidretos Orgânicos (MMA+DMA+TMA)	(A.H.Og.)	0,508 \pm 0,070	5116	2,10
III, As Total Hidretos (I+II)	(A.H.T.)	19,45 \pm 0,073	195841	80,27
IV, As Refractário "Digerível" *	(A.R.D.)	0,945 \pm 0,240	9516	3,90
V, As Refractário "Indigerível" * (VI-IV)	(A.R.I.)	3,84 \pm 0,308	38618	15,83
VI, As Refractário Total (VIII-III)	(A.R.T.)	4,78 \pm 0,192	48135	19,73
VII, As "Orgânico" total (VI+II)	(A.Og.T.)	5,29 \pm 0,205	53250	21,83
VIII, As Total (I+VII=III+VI)	(A.T.)	24,23 \pm 0,178	243976	100,00

* Por digestão básica

No entanto, independentemente da capacidade explicativa destas hipóteses noutras situações, mantém-se o facto de as diferenças $As_{total} (DT) - \sum^4 As$ por nós obtidas (Quadro 6-14) resultarem significativas (a mais de 95%) da aplicação simplificada do teste "t" de Student (Clarke, 1989), em ambas as versões da digestão total efectuada. Parece também altamente improvável que estas diferenças decorram de imprecisão analítica devida a efeitos matriciais, uma vez que estes resultados foram obtidos com base no método das adições padrão.

Acresce que estes primeiros resultados (Quadros 6-14 e 6-15) são confirmados por evidência indirecta, mas significativa, que decorre da digestão total efectuada num conjunto de fracções obtidas a partir da mesma amostra G_{00} (ver 6.5.2), resultados que se apresentam por sua vez no Quadro 6-21.

Howard e colaboradores obtiveram também posteriormente indicações relativas à presença, nas águas de Southampton Water, de uma fracção indetectável pelo método dos hidretos mas detectável por irradiação U.V. e que, aparentemente, perfaz em média cerca de 25% do arsénico total presente (Howard e Comber, 1989).

A situação é assim tanto mais intrigante quanto é certo ser a receita utilizada por Andreae equivalente à adoptada por nós neste trabalho (Andreae, 1988).

Poderá sugerir-se, neste contexto, que a amostra G₀₀ não constitui uma amostra representativa do sistema estuarino. E efectivamente colhida a 26/08/87 a amostra em causa apresentava, como referido, características particulares, afectando corresponder ao termo de um período de importante produção primária e contendo considerável biomassa de macrófitos, de que foi possível identificar, no laboratório, (a partir dos detritos retidos nos filtros 0.45 µm), *Ulva lactuca* e *Enteromorpha* s.p. (Ferreira, 1987). Era também claramente visível nesse conjunto de detritos o rasto deixado pelo "grazing", aparentemente de moluscos herbívoros, e ainda a presença de outras espécies de macrófitos não identificados.

É, ainda, correntemente admitido que a biometilação de elementos como o selénio e o arsénio é dependente da temperatura e observa, portanto, variações sazonais (Chau et al., 1976; Tanaka et al., 1984; Mukai et al., 1986). A fracção refractária detectada em Southampton Water apresenta, aliás, uma variação deste tipo com valores mínimos no inverno e máximos na primavera e no verão (Howard & Comber, 1989).

No entanto a digestão total efectuada em diferentes fracções da ultrafiltração sequencial (ver adiante 6.5.1), e correspondentes portanto a uma amostra composta de água do estuário colhida em plena invernia, conduz a resultados semelhantes aos da amostra G₀₀. Este facto constitui certamente um obstáculo a esta linha de argumentação (Quadro 6-17).



Parece assim dispor-se de razoável evidência da presença, nas águas do estuário, tanto em estiagem como em invernias, de um componente refractário ao método dos hidretos e também indetectável por digestão básica, pelo menos nas condições operacionais adoptadas. Designámo-lo por Arsénio Refractário "Indigerível" (ARI) (Bettencourt, 1989).

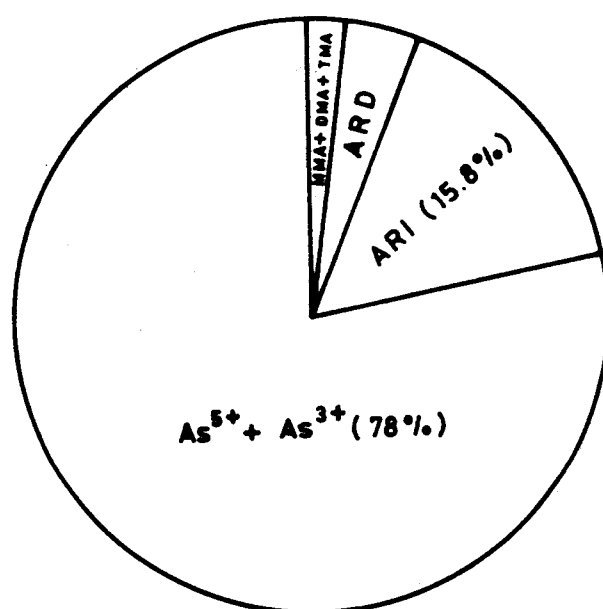


Fig. 33 - Fraccionamento da amostra G00 nos seus diferentes componentes

Uma análise mais detalhada do Quadro 6-15, revela ainda que este componente constitui aparentemente uma fracção dominante, cerca de 80% do arsénio refractário (ART), que, por sua vez, equivalerá a cerca de 90% do arsénio orgânico total (AOT) e a 20% do arsénio total (AT) presentes na amostra G00. As

proporções não serão muito diferentes para a amostra processada por ultrafiltração (Quadro 6-17) acentuando-se ainda o carácter dominante do ARI (97%) no arsénio "orgânico" total. Curiosamente, o seu teor parece muito próximo do teor em arsenito nas águas de estuário e nas águas marinhas em geral (ver 3.4.3 e 6.1).

Quanto à identidade química dos compostos que constituem este componente (ARI), pese embora o carácter necessariamente especulativo destas considerações, pode acrescentar-se de momento que, definindo-se pela sua indigeribilidade, não deverá ser constituído por arsenoribosidos nem por compostos mais ligeiros igualmente susceptíveis à digestão alcalina, como a arsenobetaina e o trimetil(2-carboxietil)arsónio.

Pode ainda pôr-se, legitimamente, a questão de saber se ligantes inorgânicos não serão susceptíveis de formar, com os iões de arsénio, complexos suficientemente estáveis (nas condições prevalecentes nas águas do estuário), para serem refractários ao método dos hidretos e à digestão alcalina, nas condições operacionais adoptadas.

Esta questão é retomada adiante em 7.4.

Parece em todo o caso evidente, que magnitude da fracção refractária detectada (Fig. 33), não permite considerar mais a química ambiental do arsénio em meio aquático como sendo essencialmente a química dos seus iões inorgânicos e das suas formas metiladas mais simples (Braman, 1983b).

6.5 - Caracterização físico-química do arsénio refractário

6.5.1 - Fraccionamento molecular por ultrafiltração

Com vista a obter indicações preliminares sobre a classe de pesos moleculares (NMWL) em que será legítimo incluir os componentes refractários por nós detectados, combinou-se o fraccionamento molecular de amostras de água com diferentes técnicas de digestão (conforme se trate de ARD ou de ARI).

No Quadro 6-16 apresentam-se os resultados obtidos na amostra composta colhida a 30/01/87 pela combinação da sua ultrafiltração sequencial com a digestão alcalina das fracções resultantes. A detecção das diferentes espécies nas sub-amostras digeridas e não digeridas efectuou-se pelo método dos hidretos.

Este ensaio corresponde portanto à tentativa de determinação do NMWL do arsénio refractário digerível presente na amostra em causa. No entanto, as diferenças entre os conteúdos mínimos obtidos para o ARD em cada fracção resultam como não significativas a 95%, da aplicação do teste simplificado de Student (Clarke, 1989).

Este facto pode ser tomado como uma indicação de que o peso molecular dos compostos que constituem o arsénio refractário deverá ser inferior ao "cut-off" nominal do último filtro da cascata, ou seja, no máximo 300-400 Dalton (Anon., 1983) ou,

inclusivamente, 210 (como trabalhos recentes propõem para a maioria dos compostos, no caso dos filtros utilizados (Amicon DIAFLO YC₀₅) (Buffle et al., 1978; Staub et al., 1984; Leppard, 1986)). A arsenobetaina e compostos similares mantêm-se assim como candidatos prováveis, enquanto que os arsenolípidos mais pesados, deverão ser eliminados. Os arsenoribosidos mais leves, com pesos moleculares da ordem de 328-329 (ver adiante), estão, relativamente perto daquele limiar.

Estes factos devem, no entanto, em nosso entender, ser encarados com prudência. Em primeiro lugar porque da análise do Quadro 6-16 é possível também retirar a conclusão da formação preferencial de DMA na digestão alcalina efectuada e não de TMAO o que, se não exclui, também não é indicativo da presença de compostos tetralquilados como a arsenobetaina (ver atrás 6.3). Em segundo lugar porque ao utilizar os somatórios $\Sigma^3\text{As}$ no estabelecimento das diferenças em causa se lida apenas com uma parte do arsénio presente, pelo que a aparente convergência dos níveis mínimos de ARD estabelecidos para as diferentes classes de "cut-off", pode ser, dado o peso relativo do arsénio inorgânico, apenas um acaso.

A Fig.32 ilustrou já esquematicamente este ponto indicando um conjunto de interconversões por demetilação que nos parecem possíveis entre as espécies de arsénio conhecidas e a componente refractária postulada (ver 6.3).

Acresce que os rendimentos da digestão alcalina de solutos de força iónica distinta são eventualmente diferentes (ver atrás

6.3) pelo que o conteúdo efectivo do ARD pode realmente variar ao longo da sequência de ultrafiltração. Acontece também que o comportamento dos diferentes organoarsenicais sujeitos a digestão alcalina é, como se sabe, bastante diverso (Norin & Christakopoulos, 1982; Kaise et al., 1988) e nada impede a componente em causa de ser uma mistura.

QUADRO 6.16
FRACCIÓNAMENTO MOLECULAR POR ULTRAFILTRAÇÃO

	As _{inorgânico} ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	MMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	DMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	TMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	MMA+DMA+TMA ($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \pm \text{s. d.}$)	Cut-off (Dalton)
A ₀	5,81 ± 0,392	0,043 ± 0,0018	0,037 ± 0,0014	0,026 ± 0,0023	0,106 ± 0,0032	
A ₀ (Photox)	6,51 ± 0,111	N.D.	N.D.	N.D.		
A ₀ (Photox) - A ₀	0,70 ± 0,407					< 800.000 N.M.W.L. > 60.000
A ₁	6,27 ± 0,851	0,039 ± 0,0014	0,047 ± 0,0009	0,026 ± 0,0030	0,112 ± 0,0034	
A ₁ *	5,57 ± 0,124	0,045 ± 0,0054	0,094 ± 0,0028	0,019 ± 0,0021	0,158 ± 0,0064	
A ₁ * - A ₁	- 0,68 ± 0,860				0,046 ± 0,0072	
B ₁	5,48 ± 0,267	0,042 ± 0,0014	0,0038 ± 0,0011	0,020 ± 0,0025	0,100 ± 0,0031	
B ₁ *	5,46 ± 0,126	0,049 ± 0,0032	0,102 ± 0,0061	0,017 ± 0,0073	0,168 ± 0,0100	< 60.000 N.M.W.L. > 1.000
B ₁ * - B ₁	+ 0,17 ± 0,296				0,068 ± 0,105	
C ₁	5,16 ± 0,193	0,041 ± 0,0024	0,038 ± 0,0035	0,013 ± 0,0011	0,092 ± 0,0044	
C ₁ *	6,07 ± 0,747	0,048 ± 0,0027	0,085 ± 0,0025	0,013 ± 0,0022	0,146 ± 0,0043	< 1.000 N.M.W.L. > 210
C ₁ * - C ₁	+ 0,91 ± 0,772				0,054 ± 0,0062	
D ₁	6,70 ± 0,493	0,033 ± 0,0019	0,040 ± 0,0016	0,013 ± 0,0020	0,086 ± 0,0032	
D ₁ *	6,22 ± 0,806	0,032 ± 0,0015	0,082 ± 0,0024	0,010 ± 0,0016	0,124 ± 0,0033	< 210 N.M.W.L.
D ₁ * - D ₁	- 0,48 ± 0,945				0,038 ± 0,0046	

N.D. - não determinado

Não parece portanto haver alternativa, neste caso, para um balanço de massas completo. Esse balanço foi conseqüentemente tentado recorrendo à digestão total (dry-ashing) de fracções da ultrafiltração escolhidas em função da respectiva classe de NMWL.

Os resultados apresentam-se por sua vez no Quadro 6-17 e são, de certo modo, surpreendentes. Revelam, com efeito o já referido carácter dominante do arsénio refractário "indigerível", ARI, no conjunto do arsénio refractário, ART, para uma amostra de água colhida em plena invernia. Mas mais importante indicam ainda que o peso molecular nominal de grande parte do arsénio refractário não deverá efectivamente, nesta amostra, ultrapassar o "cut-off" do último filtro da cascata ou seja, cerca de 210, (uma vez que a diferença $ART_{C1} - ART_{D1}$ também não é significativa a 95% (Clarke, 1989)).

Isto sugere também para o arsénio refractário "indigerível" a exclusão de compostos do tipo dos arsenolípidos e dos arsenoribosidos mais pesados (ver adiante 7.1.2). A convergência de pesos moleculares observada para as duas fracções em causa recorda aliás que elas são de natureza meramente operacional e suscita ainda a questão da postulada não identidade entre o arsénio refractário "digerível", ARD, e o arsénio refractário "indigerível", ARI.

Este ponto é retomado adiante em 6.5.2

QUADRO 6-17

DIGESTÃO TOTAL E FRACÇIONAMENTO DE FRACÇÕES DA ULTRAFILTRAÇÃO

FRACÇÕES	As Inorgânico Total ^{**} ($\mu\text{g dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	As Hidretos Orgânicos ($\mu\text{g dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	As Refractário "Digerível" [*] ($\mu\text{g dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	As Total D.T. ($\mu\text{g dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	As Refractário "Indigerível" [*] ($\mu\text{g dm}^{-3} \pm \text{s.d.}$)	Cut-off (Dalton)
C _{1DT}	5,96 ± 0,085	0,092 ± 0,0044	0,054 ± 0,0062	7,22 ± 0,292	1,253 ± 0,304	< 1000 N.M.W.L. > 210
D _{1DT}	5,96 ± 0,085	0,086 ± 0,0032	0,038 ± 0,0046	7,37 ± 0,346	1,408 ± 0,356	N.M.W.L. < 210

* Por Digestão Básica

** O $\text{As}_{\text{inorg tot}}$ toma-se como a média das concentrações das fracções indigeridas (Quadro 6-16)

6.5.2 - Extração com solventes e purificação por troca iónica

Tendo-se detectado nas águas do estuário novos componentes (ARD e ARI), procurou naturalmente isolar-se uma amostra em suficiente quantidade e suficientemente pura para permitir a sua identificação positiva.

Procedeu-se assim, à colheita e purificação de amostras de água do estuário adaptando técnicas correntemente utilizadas para material biótico (Luten *et al.*, 1982, 1983, Norin *et al.*, 1982, 1983). Como na ultrafiltração, tirou-se partido das características de digeribilidade, alcalina ou total, desses componentes, para detectar a sua presença.

O processamento da amostra F₀₀ foi já detalhadamente explicitado em 5.10 Na Fig. 34 indicam-se, no entanto,

esquemáticamente os principais passos. Nos Quadros 6-18 e 6-19 apresentam-se as fracções resultantes e os resultados obtidos nas correspondentes digestões básicas.

Na Fig. 35, por outro lado, indica-se a organização geral do Fluxograma II (Amostra G_{00}) e respectivas fracções e sub-fracções apresentando-se, no Quadro 6-20, os resultados da correspondente digestão alcalina. No Quadro 6-21 apresentam-se também os resultados da digestão total* (dry-ashing) efectuada nas fracções mais significativas que resultam daquele processamento e correspondente balanço em arsénio refractário "digerível" (ARD) e arsénio refractário "indigerível" (ARI).

Há a referir contudo neste contexto algumas limitações.

Com efeito condicionados pelo objectivo principal da identificação positiva dos compostos a isolar, reservou-se grande parte das fracções obtidas para este fim, utilizando-se no trabalho analítico quantidades tão reduzidas quanto possível. A qualidade analítica de alguns dos resultados não é portanto equivalente à praticada em geral no âmbito deste trabalho, como se pode verificar pelos desvios padrões calculados.

* Entre parêntesis indicam-se ainda o número de determinações N e o número de picos n ou m correspondentes a cada resultado apresentado.

FLUXOGRAMA I

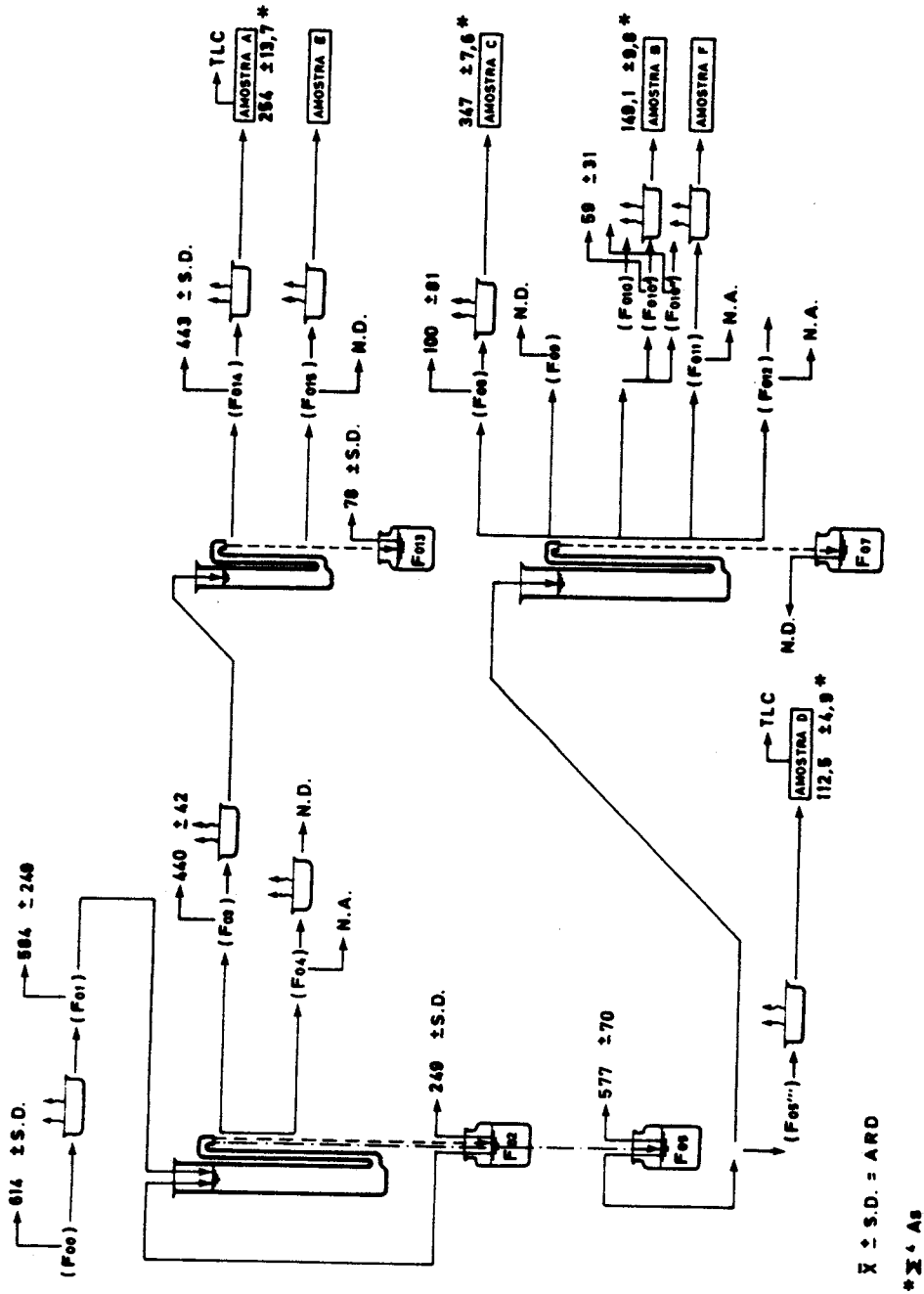


Fig. 34 - Extração e Purificação das Amostras Ff

FLUXOGRAMA II

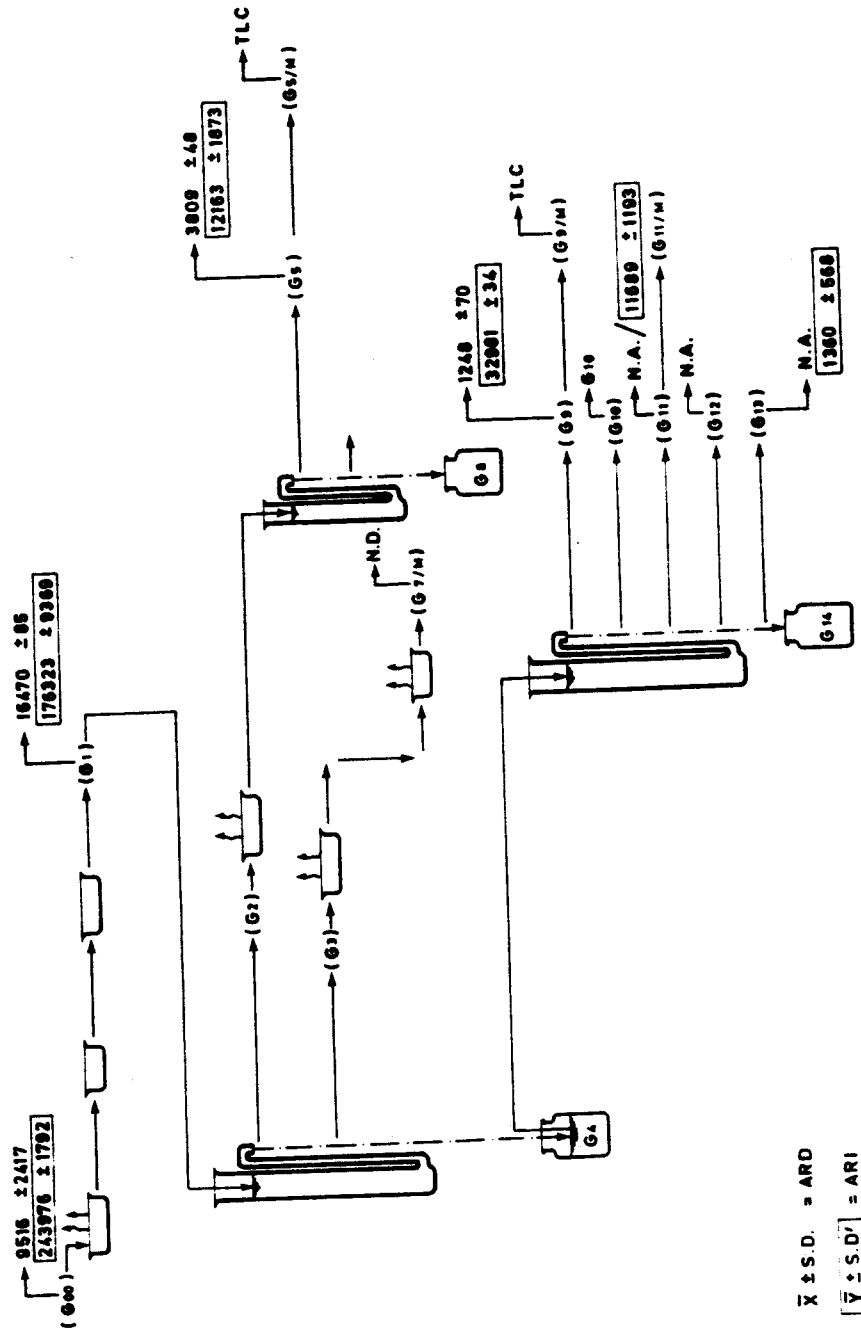


Fig. 35 - Extração e Purificação das Amostras GG

QUADRO 6-18

DIGESTÃO BÁSICA DAS FRACÇÕES FF

FRACÇÃO	As ₁ TOT (ng ± s.d.)	MMA (ng ± s.d.)	DMA (ng ± s.d.)	TMA (ng ± s.d.)	Σ ³ As (ng ± s.d.)	ARD (ng)
F ₀₀	37,160 ± 1,548	197,6 ± s.d.	598 ± s.d.	N.D.	796 ± s.d.	
F ₀₀ Digest F _{00D} - F ₀₀	35,995 ± 3,794	198 ± s.d.	1117 ± s.d.	153 ± s.d.	1409 ± s.d.	614 ± s.d.
F ₀₁		253 ± 13	875 ± 141	315 ± 140	1443 ± 200	
F ₀₁ Digest F _{01D} - F ₀₁		366 ± 26	1270 ± 113	390 ± 91	2026 ± 148	584 ± 249
F ₀₂		146 ± s.d.	476 ± 60	322 ± 10	944 ± s.d.	
F ₀₂ Digest F _{02D} - F ₀₂		135 ± s.d.	924 ± 64	133 ± 10	1193 ± s.d.	249 ± s.d.
F ₀₃	8,472 ± 2,509	75 ± 9	239 ± 4	N.D.	314 ± 9	
F ₀₃ Digest F _{03D} - F ₀₃	15,061 ± 3,202	88 ± 10	549 ± 29	117 ± 27	754 ± 40	440 ± 42
F ₀₄						N.A.
F ₀₅	26,223 ± 2,462	178 ± 9	558 ± 14	95 ± 64	831 ± 66	
F ₀₅ Digest F _{05D} - F ₀₅	28,487 ± 903	148 ± 18	1144 ± 42	116 ± 13	1407 ± 22	577 ± 70
F ₀₇		N.D.	237 ± 56	218 ± 73	454 ± 92	
F ₀₇ Digest F _{07D} - F ₀₇		159 ± 68	395 ± 169	N.D.	554 ± 182	N.D.
F ₀₈		N.D.	53 ± s.d.	N.D.		
F ₀₈ Digest F _{08D} - F ₀₈		N.D.	153 ± 56	N.D.		100 ± 81
F ₀₉		33 ± s.d.	N.D.	N.D.		
F ₀₉ Digest F _{09D} - F ₀₉		N.D.	35 ± s.d.	N.D.	N.D.	N.D.
F ₀₁₀		33 ± 22	N.D.	94 ± 5	127 ± 23	
F ₀₁₀ Digest F _{010D} - F ₀₁₀		33 ± 21	83 ± 1	68 ± 5	184 ± 22	59 ± 31
F ₀₁₁	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.		N.A.
F ₀₁₂	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.		N.A.
F ₀₁₃		29 ± 2	127 ± 9	30 ± 19	186 ± 21	
F ₀₁₃ Digest F _{013D} - F ₀₁₃		34 ± s.d.	230 ± s.d.	N.D.	263 ± s.d.	78 ± s.d.
F ₀₁₄		53 ± s.d.	85 ± 45	148 ± 19	286 ± 142	
F ₀₁₄ Digest * F ₀₁₄ Digest ** F _{014D} - F ₀₁₄		N.D. 127 ± 35	583 ± 69 384 ± 17	202 ± s.d. 161 ± s.d.	785 ± 225 672 ± 190	443 ± s.d.

QUADRO 6.19

DIGESTÃO DOS EXTRATOS (FF/M)

FRACÇÃO	As ₁ TOT (ng . ml ⁻¹ ± s.d.)	MMA (ng . ml ⁻¹ ± s.d.)	DMA (ng . ml ⁻¹ ± s.d.)	TMA (ng . ml ⁻¹ ± s.d.)	Σ ⁴ As (ng . ml ⁻¹ ± s.d.)	ARD (ng ± s.d.)
A/M	0,163 ± 0,0170	0,044 ± 0,0026	0,114 ± 0,0008	0,041 ± 0,0129	0,362 ± 0,0215	
A/M _{Digest}	0,748 ± 0,0278	0,074 ± 0,0042	0,206 ± 0,0014	N.D.	1,028 ± 0,0282	Σ ⁴ 257,0 ± 13,7
A/M - A/M _{Digest}					0,666 ± 0,0354	
B/M	0,175 ± 0,0147	0,010 ± 0,0022	0,037 ± 0,0007	N.D.	0,222 ± 0,0149	
B/M _{Digest}	0,633 ± 0,0265	0,025 ± 0,0041	0,030 ± 0,0013	N.D.	0,688 ± 0,0268	Σ ⁴ 149,1 ± 9,8
B/M - B/M _{Digest}		(N.D.)			0,466 ± 0,0307	
C/M	0,604 ± 0,0170	0,020 ± 0,0260	0,018 ± 0,0008	N.D.	0,642 ± 0,0311	
C/M _{Digest}	2,735 ± 0,0303	0,024 ± 0,0053	0,052 ± 0,0180	N.D.	2,811 ± 0,0356	Σ ⁴ 347 ± 7,6
C/M - C/M _{Digest}					2,169 ± 0,0473	
D/M	1,173 ± 0,0170	N.D.	N.D.	0,030 ± 0,0129	1,203 ± 0,0213	
D/M _{Digest}	1,869 ± 0,0194	0,021 ± 0,0030	0,037 ± 0,0096	N.D.	1,906 ± 0,0219	Σ ⁴ 112,5 ± 4,9
D/M - D/M _{Digest}					0,703 ± 0,0305	

Acontece também que as fracções contidas em eluentes muito concentrados (4N ClH e 4N OH NH₄) não são susceptíveis de análise, sem mais, pelo método dos hidretos, fundamentalmente por as diluições necessárias para anular os efeitos da alteração de pH serem incompatíveis com as quantidades disponíveis e os limites de detecção praticáveis. Não é possível portanto, neste caso, obter indicações sobre o ARD presente nessas fracções (NA) pelo que o balanço, neste componente, resulta necessariamente incompleto.

A detecção de um componente refractário indigerível (ARI) nas fracções GG e nas fracções obtidas por ultrafiltração sugere ainda que uma percentagem significativa do arsénio presente nas fracções FF não é detectado.

Do exame atento dos dados recolhidos parece, no entanto, poder, mesmo assim, proceder-se desde já a um certo número de observações. Com efeito:

a) O Fluxograma I, o Fluxograma II e respectivos resultados apresentam consideráveis diferenças entre si mesmo tomando em consideração apenas o ARD. Essas diferenças podem, nesta fase, ser atribuídas quer ao diferente processamento adoptado em cada caso, quer a diferenças de composição entre as amostras F_{00} e G_{00} recolhidas em pontos distintos do estuário em diferentes épocas do ano.

b) No Fluxograma I o ARD distribui-se praticamente por todas as fracções onde pode ser detectado em proporções não muito diferentes, o que parece indicar a relativa incapacidade do sistema para o reter numa fracção bem definida.

c) Por outro lado o balanço elaborado para as fracções GG (Quadro 6-21) permite ainda constatar que, praticamente todo o arsénico refractário retido na fracção ΔG_5 é arsénio refractário digerível, ao contrário do arsénio refractário retido na fracção ΔG_9 de que cerca de 86% é indigerível, nas condições operacionais adoptadas.

Este resultado parece reforçar a ideia da não identidade dos compostos que constituem o ARD e o ARI

QUADRO 6-20

DIGESTÃO BÁSICA DAS FRACÇÕES E EXTRACTOS GG

FRACÇÕES	As Π OT (ng \pm s.d.)	MMA (ng \pm s.d.)	DMA (ng \pm s.d.)	TMA (ng \pm s.d.)	As Refractário "digerível" (ng \pm s.d.)
ΔG_{00} ΔG_{00} Digest	190 726 \pm 204	524 \pm 101 1 561 \pm 329	3 384 \pm 222 8 489 \pm 720	1 208 \pm 706 4 602 \pm 2 181	Σ^3 9 516 \pm 2 417
ΔG_1 ΔG_1 Digest	144 183 \pm 2 401	777 \pm 42 977 \pm 54	4 340 \pm 32 6 890 \pm 37	226 \pm 11 13 946 \pm 9	Σ^3 16 470 \pm 85
ΔG_5 ΔG_5 Digest	8 540 \pm 224	53 \pm 26 37 \pm 28	153 \pm 19 423 \pm 21	70 \pm 5 3 626 \pm 6	Σ^3 3 809 \pm 48
$G_{5/M}$ $G_{5/M}$ Digest	746 \pm 69 858 \pm 34	14 \pm 3 15 \pm 3	58 \pm 3 100 \pm 3	N.D. N.D.	Σ^4 155 \pm 77
$G_{7/M}$ $G_{7/M}$ Digest	156 \pm 37 166 \pm 21	N.D. N.D.	N.D. N.D.	N.D. N.D.	N.D.
ΔG_9 ΔG_9 Digest	20 808 \pm 315	277 \pm 28 375 \pm 49	2 525 \pm 20 3 609 \pm 35	88 \pm 5 153 \pm 9	Σ^3 1 248 \pm 70
$G_{9/M}$ $G_{9/M}$ Digest	204 \pm 15 277 \pm 15	28 \pm 4 43 \pm 2	127 \pm 10 168 \pm 2	7 \pm 5 15 \pm s.d.	Σ^4 137 \pm 32
ΔG_{11}	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
$G_{11/M}$ $G_{11/M}$ Digest	51 \pm 45 47 \pm 46	N.D. 5 \pm s.d.	81 \pm 10 118 \pm 13	323 \pm 16 324 \pm 20	N.D.
ΔG_{12}	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
ΔG_{13}	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

N.D.: abaixo do limite de detecção

N.A.: não analisável

$$\Sigma^3 = \text{MMA} + \text{DMA} + \text{TMA}$$

$$\Sigma^4 = \text{As } \Pi\text{OT} + \text{MMA} + \text{DMA} + \text{TMA}$$

QUADRO 6-21

BALANÇO DAS FRACÇÕES GG

FRACÇÕES	As _{TOTAL} (ng ± s.d.)	As _{MMA + DMA + TMA} (ng ± s.d.)	As _{TOTAL} (ng ± s.d.)	ART* (ng)	ARD (ng)	ARI** (ng)
Δ G ₀₀ Δ G ₀₀ DT	190 726 ± 204 (4,28)	5 116 ± 705	243 976 ± 1 792 (6,32)	48 134	9 516	38 618
Δ G ₁ Δ G ₁ DT	144 183 ± 2 401 (3,14)	5 343 ± 54	176 323 ± 9 369 (3,14)	26 795	16 470	10 325
Δ G ₅ Δ G ₅ DT	8 540 ± 224 (3,15)	277 ± 33	12 163 ± 1 873 (1,4)	3 346	3 809	N.D.
Δ G _{7/M} DT	156 ± 37	N.D.	166 ± 21	N.D.	N.D.	N.D.
Δ G ₉ Δ G ₉ DT	20 808 ± 315 (2,10)	2 890 ± 35	32 981 ± 34 (1,4)	9 283	≥ 1 248	≤ 8 035
Δ G ₁₁ Δ G ₁₁ DT	N.A.	N.A.	11 689 ± 1 193 (1,4)	N.A.	N.A.	N.A.
Δ G ₁₃ Δ G ₁₃ DT	N.A.	N.A.	1 360 ± 568 (1,4)	N.A.	N.A.	N.A.
Δ G ₁₄ DT			792 ± 70 (1,5)			

* As Refractário Total (ART) = As Total (DT) - \sum^4 As (As_{TOT} + MMA + DMA + TMA)

** As Refractário "Indigerível" (ARI) = As Refractário Total - As Refractário "Digerível" (ARD) (Quadro 6-15)

DT - digestão total (n,m)

N.D.: abaixo do limite de detecção n = número de análises

N.A.: não analisável (ver 5.6) m = número de picos

O poder separativo do esquema sistematizado no Fluxograma II é também, aparentemente, superior ao do esquema sistematizado no Fluxograma I.

d) As condições da digestão alcalina parecem, no entanto, consideravelmente diferentes quer entre as fracções FF e GG no seu conjunto quer entre fracções que integram um mesmo

Fluxograma (I ou II). A fracção F_{05} (pH = 8,5) apresenta, com efeito, uma concentração do componente digerível, ARD_{F05} , superior à do seu precursor acidificado F_{02} (pH = 2,0 - 2,3).

Este facto pode explicar-se pela alteração das condições de retenção na primeira coluna catiónica fraca (Lewatite CNP80) e seria, neste entendimento, teoricamente indicativo da presença de um ião dipolar na fracção em causa.

Pode no entanto, atribuir-se também esta discrepância ao efeito do pH que, parece razoável, constitua um factor determinante no rendimento da digestão alcalina. Os resultados obtidos para o ARD e o ARI (ART - ARD) da fracção ΔG_9 , cuja matriz é 0.5N ClH, diluído apenas a 1:2, serão assim controversos e incomensuráveis com os das restantes fracções.

e) A fracção G_{11} contém uma quantidade considerável de arsénio revelada pela digestão total; pelas razões anteriormente apresentadas, é difícil dizer se se trata ou não de arsénio refractário.

f) Observa-se também no Fluxograma II que, embora a amostra G_{00} apresente desde logo, indigerida, uma concentração considerável de TMA, o incremento de ARD, entre G_{00} e G_1 , se deve exclusivamente ao acréscimo daquela espécie na sub-fracção digerida. Representa cerca de 84% do ARD em G_1 e 94% do ARD em

G₅.O TMA-ARD_{G5} é ainda da mesma ordem de grande do TMA-ARD_{G00} (Quadro 6-20).

Atribuem-se estes resultados à progressiva alteração da matriz decorrente do processo de concentração/purificação adoptado (ver atrás 6.3). Parece, com efeito, admissível que, para além do pH, a força iónica da solução e a quantidade de matéria orgânica presente interfiram no rendimento da digestão alcalina. É também concebível, no entanto, que as alterações observadas resultem, total ou parcialmente, da interconversão de compostos indigeríveis de arsénio em compostos digeríveis, durante a sua manipulação.

g) Os somatórios Σ^4As , que se tornam significativos pela eliminação do As_i tot no processo de purificação, apresentam também, utilizados no estabelecimento do ARD (diferença entre sub-fracções dirigidas e não dirigidas) e para o conjunto dos extractos em metanol obtidos, valores muito superiores aos que resultam dos somatórios Σ^3As (Quadros 6-19 e 6-20).

h) Independentemente do que se refere no ponto anterior, verifica-se um decréscimo considerável de ARD entre alguns dos extractos obtidos em metanol e as fracções aquosas que os precedem imediatamente (F₀₅; D/M; G₉; G₉/M; G₅; G₅/M). Este decréscimo que vai de 10 : 1 a 20 : 1 poderia ainda ser atribuído à diminuição do rendimento da digestão alcalina. No entanto, ocorre também, nas mesmas etapas e para as mesmas fracções, um decréscimo assinalável do teor total de arsénio

determinável pelo método dos hidretos ($As_i \text{ tot} + \text{MMA} + \text{DMA} + \text{TMAO} + \text{ARD}$) (Quadros 6-18, 6-19 e 6-20).

Parece assim evidente que o método de concentração/extracção com solventes adoptado tem (nas condições das etapas finais do Fluxograma II) um baixo rendimento em relação à generalidade das fracções arsenicais existentes e, nomeadamente, em relação ao ARD.

i) A importância da fracção em falta no balanço parcial efectuado para o Fluxograma II ($\Delta G_1 - (\Delta G_5 + G_{7/M} + \Delta G_9 + \Delta G_{11} + \Delta G_{13} + \Delta G_{14})$), cerca de 110.000 em 180.000 ng de As_{total} (DT), sugere ainda a sua irreversível fixação pelas resinas (Norin et al. 1983, Norin, 1987).

Este facto deverá, no entanto, ser interpretado com prudência uma vez que o balanço em causa não está completo. A questão é retomada em 7.3).

Tudo isto considerado, parece dever constatar-se que a ARD concentrado na fracção G_5 retido numa resina catiónica fraca (Lewatite CNP 80) e dela eluído com água Milli-Q é compatível com a arsenobetaina, eluindo na fracção em que será de esperar que este composto elua (Cannon et al., 1981, Norin et al., 1983), mas não com o trimetil(2-carboxietil)arsónio. Com efeito a digestão básica efectuada será completa e o rendimento expectável para a digestão básica deste segundo composto é

apenas de 23% (ver acima 6.3). Por outro lado, o componente concentrado em G₉, correspondente a cerca de 35% do arsénio refractário total da fracção G₁ passou (nas condições operacionais utilizadas), a resina catiónica fraca e, embora retido pela resina catiónica forte (Amberlite IR-120), foi facilmente eluído com 0.5N ClH, saindo na fracção em que normalmente eluem o arsenito e o arseniato (Norin *et al.*, 1983).

O tetrametilarsónio pode também ser deslocado, em resinas catiónicas fortes, por 1N ClH (Cullen & Reimer, 1989).

Mais difícil é o caso da fracção concentrada na amostra A (fracção F₀₁₄, Fluxograma I) em que se identificou posteriormente arsenocolina (ver adiante 6.5.5). A experiência adquirida e registada na literatura indica com efeito que aquele composto, ao contrário da arsenobetaina, deveria ser fortemente retido tanto em resinas catiónicas fracas como em resinas catiónicas fortes delas só eluindo com ácidos concentrados (Tam *et al.*, 1978, 1979a, Marafante *et al.*, 1984, Norin *et al.*, 1983, Norin, 1987, Shiomi *et al.*, 1987, Cullen & Dodd, 1989).

Assim a sua eluição na fracção aquosa aplicada às duas colunas catiónicas fracas (Fluxograma I) carece de explicação.

Efectuou-se assim no laboratório um ensaio em que se procurou reproduzir as condições da parte significativa do Fluxograma I.

Verifica-se, no entanto que nesta aplicação, uma fracção da arsenocolina adicionada, suficiente para ser desenvolvida pelo agente revelador adoptado, aparece no soluto drenado (fracção H₀₂, Fig. 58). Passou portanto, nas condições operacionais adoptadas, a coluna utilizada. Verifica-se, também (GF-AAS), que cerca de 20% da arsenocolina aplicada elui na fracção aquosa (H₀₃, Fig. 36).

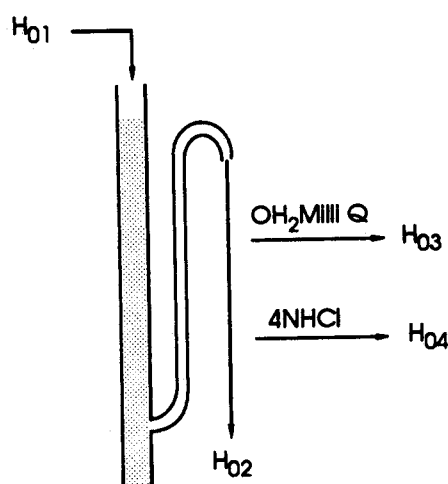


Fig. 36 - Esquema de eluição de uma coluna reduzida para investigação de um artefacto.

(Reproduzida da Fig. 17)

Parece isto significar que, independentemente dos volumes de material envolvidos, a força iónica da solução a purificar detém um papel determinante no comportamento, em troca iónica, de compostos como a arsenocolina.

Um comportamento anómalo em troca iónica (eluição com 5% NH_4 , AG50WX-8) de um composto identificado como arsenocolina foi também anteriormente observado por Lawrence e colaboradores (1986).

A hipótese de um artefacto, no conjunto de procedimentos que conduziram ao isolamento da amostra A, não parece portanto poder apoiar-se apenas no comportamento expectável da arsenocolina em resinas catiónicas.

6.5.3 - Cromatografia de camada fina (TLC)

Nas Figs. 38, 40, 42 e 44, e nos Quadros 6-22 a 6-25 apresentam-se os cromatogramas resultantes da aplicação de $G_{5/M}$ (TG e TG') e de $G_{9/M}$ (TH e Ti) em placas de celulose-TLC de acordo com a metodologia adoptada. Nas Figs. 37, 39, 41 e 43 representam-se o arranjo das placas, a posição dos padrões aplicados e as áreas correspondentes às fracções extraídas. Nas Figs. 45 a 48 a e no Quadro 6-26 apresentam-se também cromatogramas de ensaios brancos (metanol FLUKA) que se efectuaram, reproduzindo, tanto quanto possível as condições dos ensaios anteriores, (TBG e TBi). Finalmente, no Quadro 6-27 apresentam-se, para efeitos de comparação, os resultados obtidos no âmbito deste trabalho, para um conjunto de compostos (padrões sintéticos) e ainda os R_{ff} correspondentes a compostos isolados por outros autores em sistemas análogos de TLC.

QUADRO 6-22

RESULTADOS DO CROMATOGRAMA G5/M - TG

FRACÇÃO	As _{1TOT} (UV) (ng ± s. d.)	As _{1TOT} (UV) à escala
TG 1	9.6 ± 2.3	9.6
TG 2	7.7 ± 4.1	7.7
TG 3	6.8 ± 3.3	6.8
TG 4	4.6 ± 3.6	4.6
TG 5	12.4 ± 1.8	18.6
TG 6	8.0 ± 2.0	8.0
TG 7	5.8 ± 2.2	5.8
TG 8	5.4 ± 2.7	5.4
TG 9	3.7 ± 3.3	3.7
TG 10	6.0 ± 4.9	6.0
TG 11	5.0 ± 4.9	5.0
TG 12	2.9 ± 5.4	2.2

QUADRO 6-23

RESULTADOS DO CROMATOGRAMA G5/M - TG'

FRACÇÃO	As _{1TOT} (UV) (ng ± s. d.)	Σ As (UV) (ng ± s. d.)	As _{1TOT} (à escala)	Σ As (à escala)
TG' 1	173 ± 7	178 ± 8	76	89
TG' 2	52 ± 13	64 ± 30	52	64
TG' 3	23 ± 13	N.A.	23	N.A.
TG' 4	58 ± 11	73 ± 15	58	73
TG' 5	7 ± 7	N.A.	7	N.A.
TG' 6	34 ± 13	N.A.	34	N.A.
TG' 7	37 ± 26	40 ± 25	37	40
TG' 8	67 ± 19	81 ± 40	100	121
TG' 9	29 ± 16	69 ± 38	33	79
TG' 10	12 ± 9	N.A.	12	N.A.
TG' 11	13 ± 11	N.A.	10	N.A.

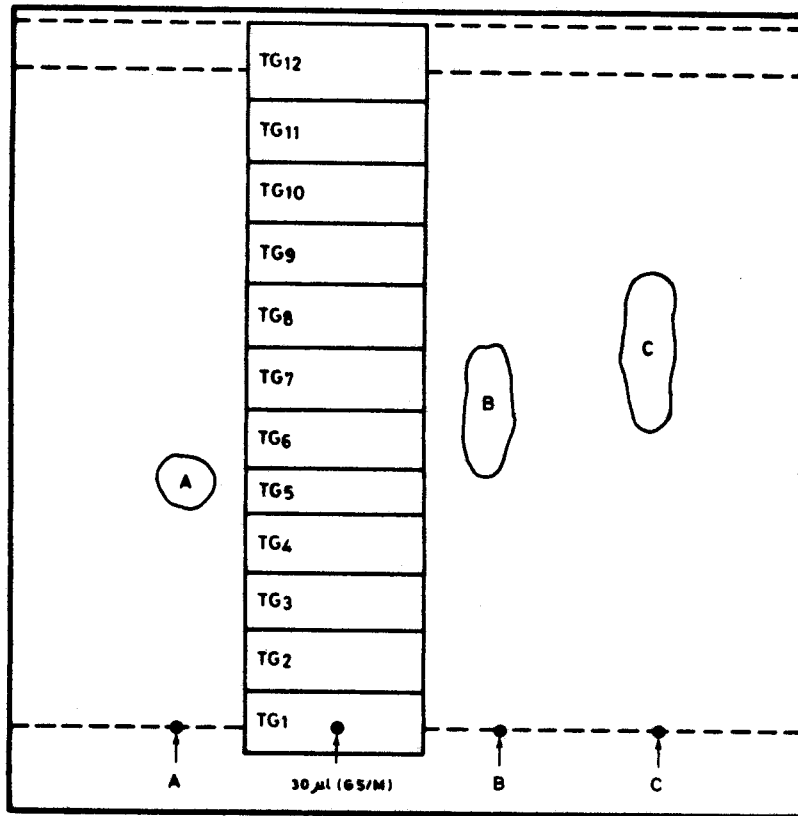


Fig. 37 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extrato G₅/M-TGG; A-arsenobetaina ; B-arsenocolina ; C-acetilarsenocolina

São conhecidas as limitações da cromatografia de camada fina como método de identificação de compostos, limitações de que o recente erro de interpretação da estrutura do "arsónio-fosfolípido" isolado por Benson e colaboradores constitui apenas um episódio, particularmente interessante, na história da investigação dos organoarsenicais em organismos aquáticos (Cooney et al., 1978; Knowles & Benson, 1983).

É também um facto que as condições de execução de um ensaio de cromatografia de camada fina não são, em rigor, reproduzíveis. As limitações referidas acima em 6.2 e relativas à precisão dos resultados analíticos mantêm-se também, neste capítulo.

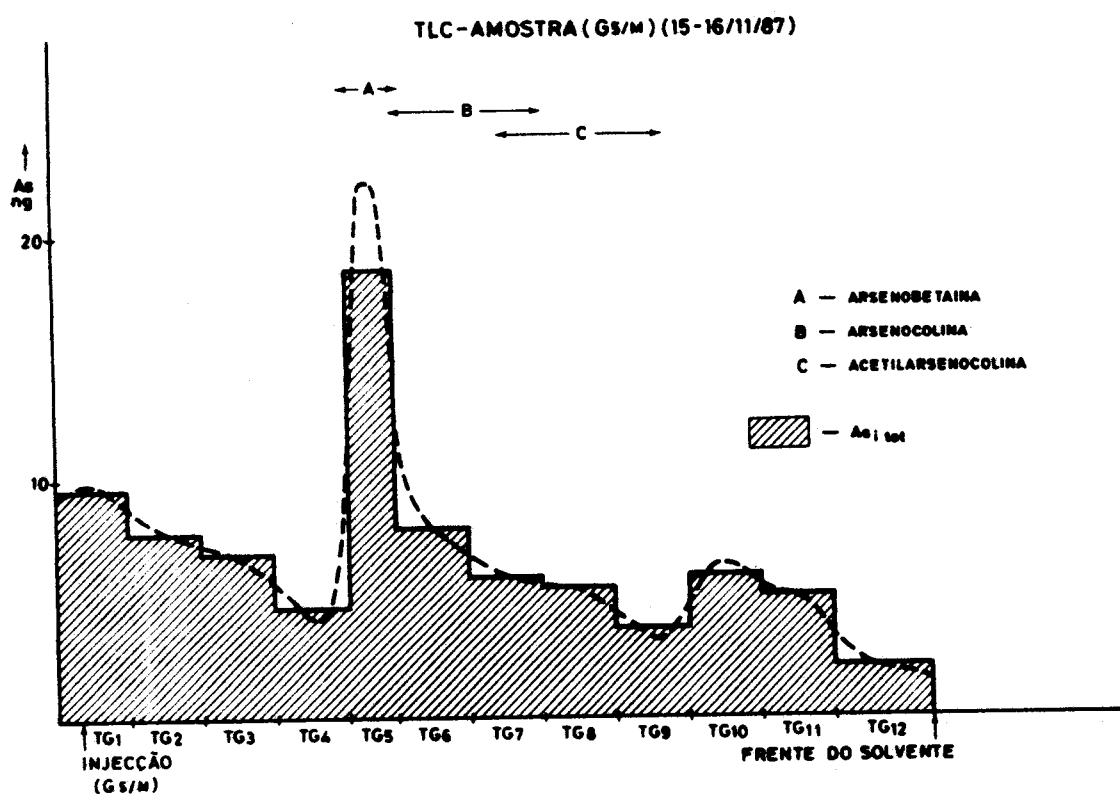


Fig. 38 - Cromatograma G₅/M-TG₆

No entanto, dos ensaios brancos acima referidos, parece poder retirar-se duas conclusões:

a) não se encontra evidência indicativa da ocorrência de contaminação cruzada entre os padrões aplicados e as fracções extraídas;

b) o método adoptado no estabelecimento destes cromatogramas enferma de limitações evidentes, não inteiramente esclarecidas, mas que podem, em parte, ser atribuídas à não standardização de certos procedimentos. Será nomeadamente o caso da extracção das fracções de celulose com metanol.

Há que admitir assim uma variação não negligenciável do "background" de arsénio, o que retira significado aos picos mais pequenos.

TLC-AMOSTRA (G5/M) (18/11/87)

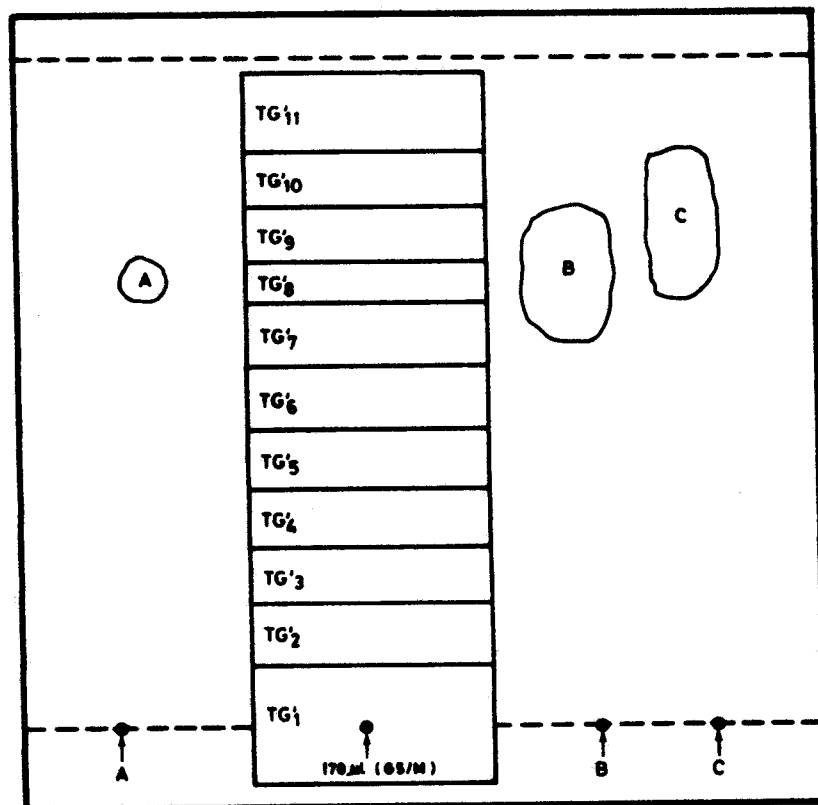


Fig. 39 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G₅/M-TGG'; A-arsenobetaina ; B-arsenocolina ; C-acetilarsenocolina

Por outro lado no Quadro 6-13 apresentam-se os rendimentos obtidos pelo procedimento habitual de fotooxidação (UV/6hr), em padrões relativamente concentrados de arsenobetaina, arsenocolina e acetilarsenocolina, em metanol.

Estes resultados revelam uma outra limitação importante do método adoptado. Parece com efeito evidente, pelo menos no caso da arsenocolina e da acetilarsenocolina, a sua relativa insensibilidade à presença de compostos organoarsenicais estáveis refractários à radiação UV, nas condições operacionais adoptadas.

Tudo isto considerado não deixa de ser um resultado assinalável que, nos cromatogramas resultantes da aplicação de $G_{5/M}$, se verifique a ocorrência de picos de arsénio (fotooxidável) que co-cromatografam com as manchas produzidas pelo padrão de arsenobetaina sintética (Figs. 38 e 40).

Convém referir no entanto que o pico TG'_8 também não parece incompatível com a posição da arsenocolina e é precedido pelo pico TG'_4 que não ocorre, aparentemente, na outra aplicação TLC do mesmo extracto (Fig. 38, Quadro 6.22).

Isto sugere a sua degradação entre os dois ensaios.

Especialmente interessante é o pico conspícuo que aparece na posição TH_3 do cromatograma $G_{9/M} - TH$ e que vem confirmado na posição Ti_3 da segunda aplicação de $G_{9/M}$. E é especialmente interessante porque:

1. Não co-cromatografa com nenhum dos padrões aplicados nestes ensaios e que incluem As^{5+} , MMA, DMA, TMAO,

dimetiloxarsiletanol, arsenobetaina, arsenocolina e acetilarsenocolina.

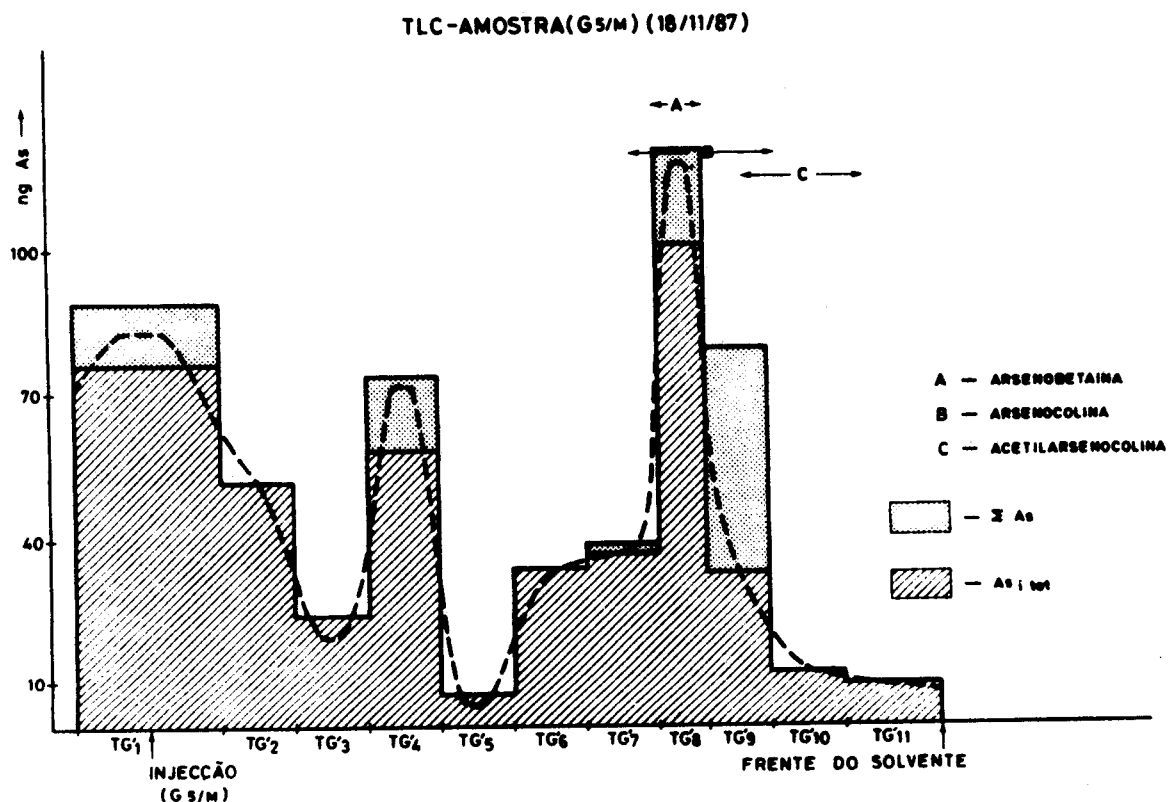


Fig. 40 - Cromatograma G₅/M-T_{GG}'

2. A fazer fé nos resultados compilados da literatura (Quadro 6-27) também não será compatível com a fosfatidilcolina.

3. O seu R_f não será no entanto incompatível, com o indicado por Benson para o controverso "arsônio-fosfolípido", isolado num sistema semelhante de TLC (Cooney et al., 1978).

QUADRO 6-24

RESULTADOS DO CROMATOGRAMA G₉/M - TH

FRACÇÕES	As _{ITOT} (UV) (ng ± s.d.)	Σ As (UV) (ng ± s.d.)	As _{ITOT} (UV) à escala	Σ As (UV) à escala
TH ₁	95 ± 38	119 ± 39	71	89
TH ₂	8 ± s.d.	43 ± 9	8	43
TH ₃	370 ± 11	1525 ± 24	370	1525
TH ₄	175 ± 22	581 ± 29	175	581
TH ₅	26 ± 4	102 ± 8	26	102
TH ₆	9 ± 7	125 ± s.d.	9	125
TH ₇	8 ± 7	63 ± 46	8	63
TH ₈	39 ± 13	82 ± 13	39	82
TH ₉	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.

N.D.: abaixo do limite de detecção

N.A.: não analisado

QUADRO 6-25

RESULTADOS DO CROMATOGRAMA G₉/M - Ti

FRACÇÃO	As _{ITOT} (UV) (\bar{x} ± s.d.)	As _{ITOT} (à escala)	Σ As (US) (\bar{x} ± s.d.)	Σ As (à escala)
Ti 1	23 ± 6	49 ± 6	18	36
Ti 2	39 ± 3	91,7 ± 4	45	106
Ti 3	51 ± 6	151 ± 7	77	226
Ti 4	31 ± 4	114 ± 4	23	86
Ti 5	34 ± 4	89 ± 7	20	53
Ti 6	26 ± 4	67 ± 4	20	50
Ti 7	14 ± 4	40 ± 4	21	60
Ti 8	25 ± 6	52 ± 7	37	77
Ti 9	16 ± 6	31 ± 6	16	31
Ti 10	20 ± 6	34 ± 6	20	34
Ti 11	17 ± 6	30 ± 9	17	30

4. É também aparentemente compatível com os R_{ff} recorrentemente observados por Klumpp (1979) num sistema semelhante de TLC, para um arsénolípido isolado a partir de extratos de fitoplâncton (Fig.49).

TLC-AMOSTRA (G9/M) (16/1/88)

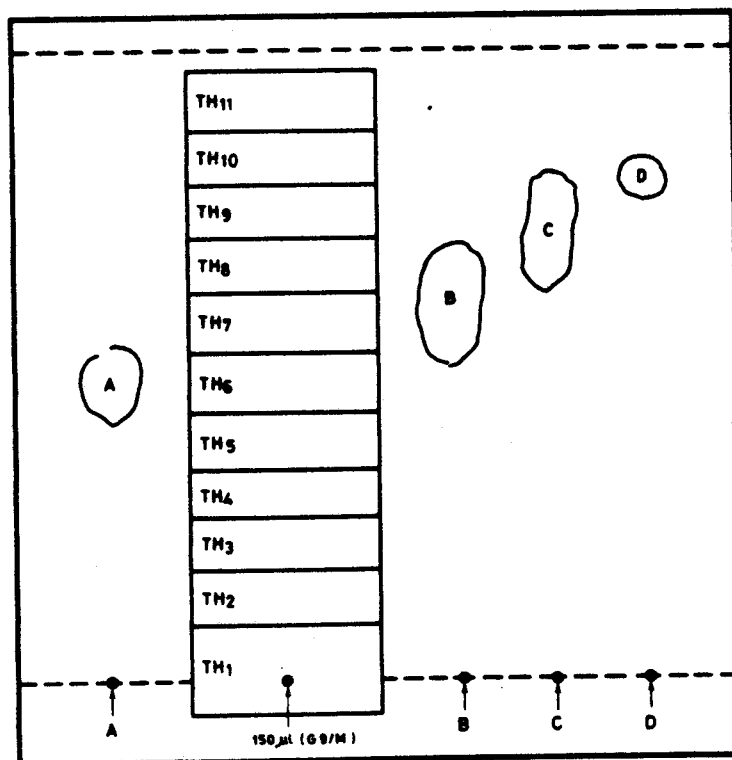


Fig. 41 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G_{9/M}-T_{HH}; A-arsenobetaina ; B-arsenocolina ; C-acetilarsenocolina ; D-TMAO

Poderá ser ainda particularmente reveladora, apesar das limitações referidas, uma reflexão sobre as quantidades de As envolvidas neste processo. Com efeito os picos em causa (TH₃ e Ti₃) correspondem a uma quantidade considerável de arsénio

indetectado por digestão básica dos extractos e ocorrem após a sua fotooxidação na fracção G_{9/M} mas não na fracção G_{5/M} (vide

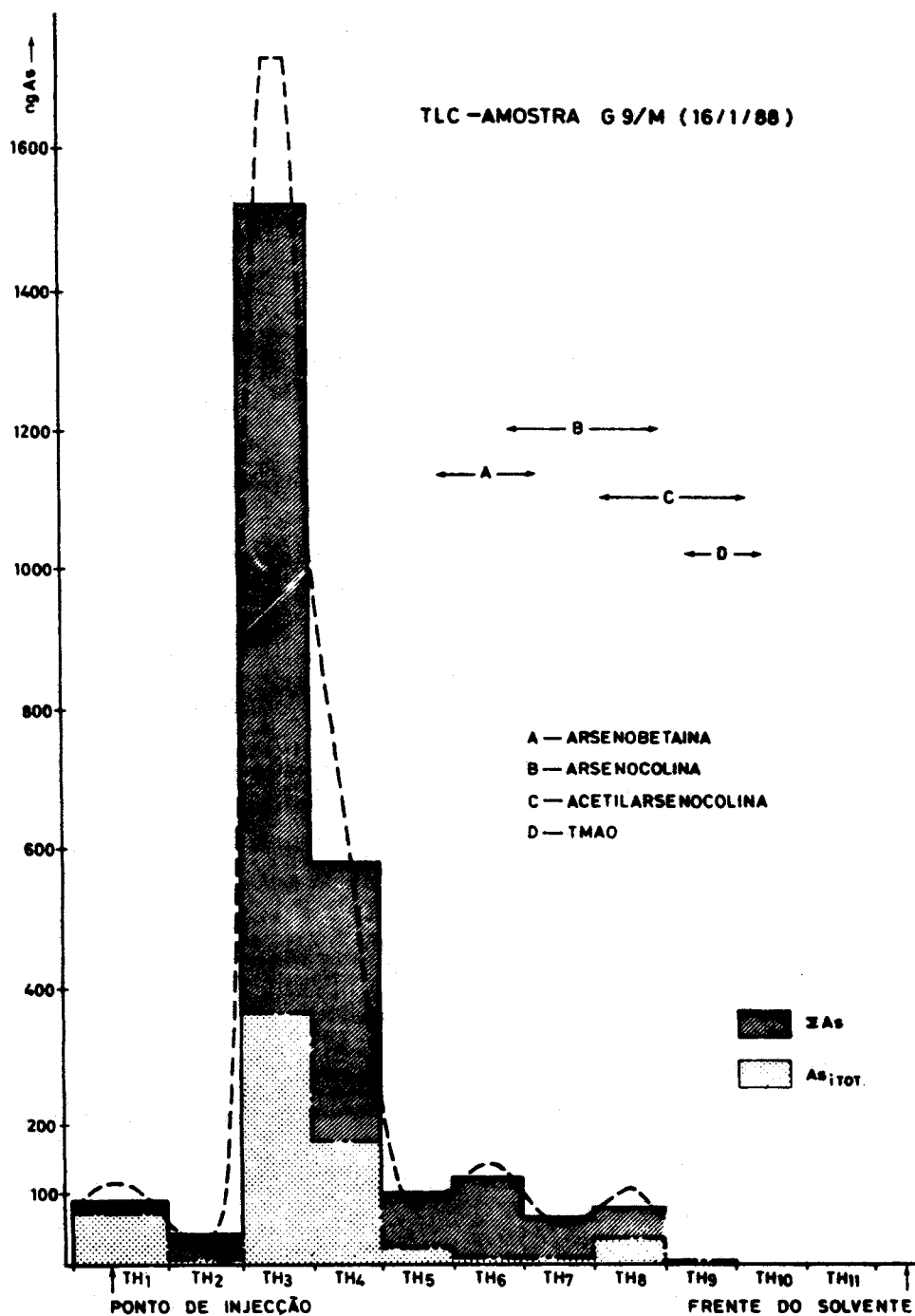


Fig. 42 - Cromatograma G_{9/M}-THH

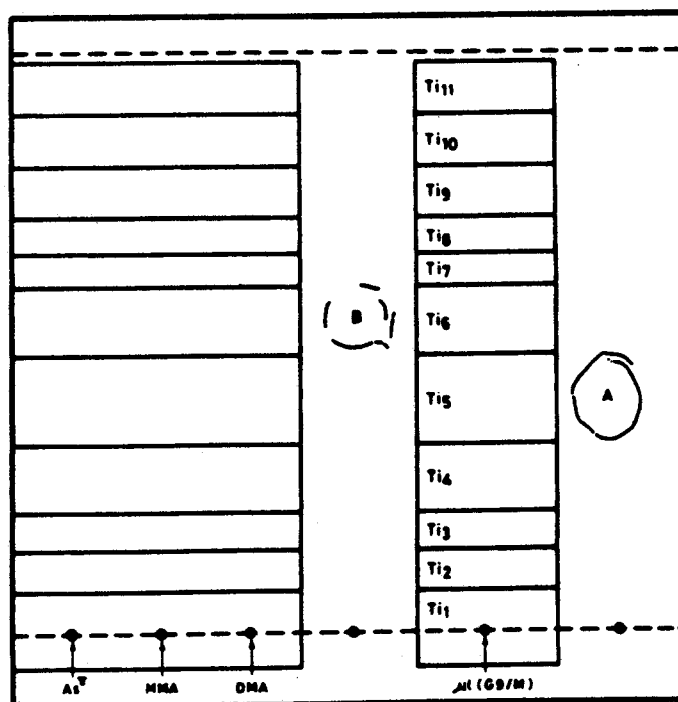
TLC-AMOSTRA (G₉/M) (3/2/88)

Fig. 43 - Arranjo da placa TLC na aplicação do extracto G₉/M-T₁₁; A-arsenocolina ; B-dimetiloxarsiletanol

Subtraindo o "background" de respectivamente 60 e 45 ng (Figs. 45 e 47) os picos centrados em TH₃ e Ti₃ correspondem, com efeito, a cerca de 2150 ng de arsénio, o que excede em cerca de 2000 ng, o ARD quantificado em G₉/M e também o total de arsénio (As_{i tot} + MMA + DMA + TMA + ARD) doseado na mesma fracção (Quadro 6-20).

Este valor que pode ainda ser excedido uma vez que se não conhece o rendimento da foto-oxidação, indica, para todos os

efeitos, a presença, nesta fracção, de um composto (ou mistura de compostos) de arsénio indigerível, nas condições adoptadas, e não identificado pelas técnicas analíticas utilizadas.

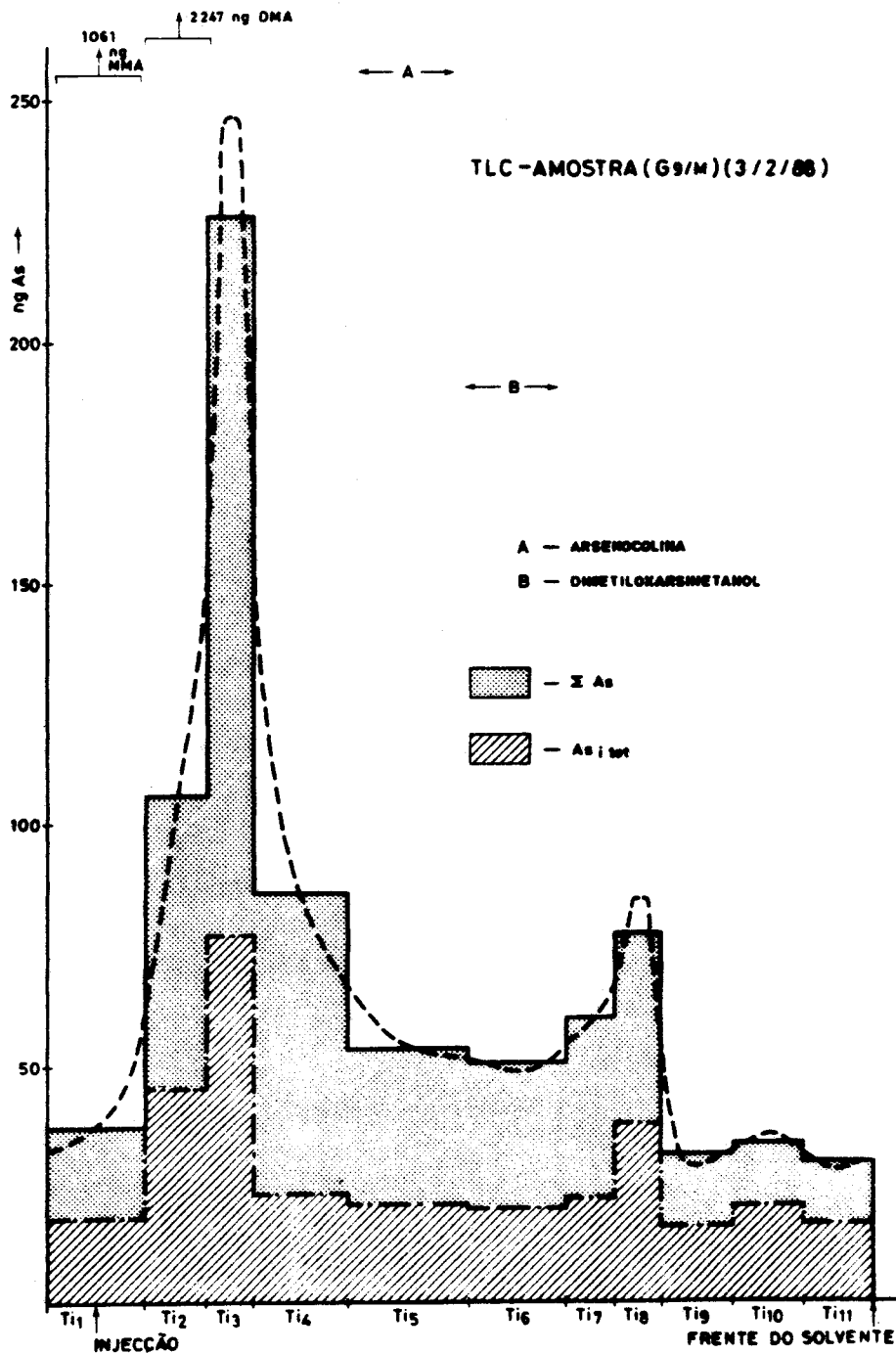


Fig. 44 - Cromatograma G₉/M-T₁₁

QUADRO 6-26

ENSAIOS BRANCOS TLC

FRACÇÃO	ng de Σ^4 As ($\bar{x} \pm$ s.d.)	FRACÇÃO	ng de Σ^4 As ($\bar{x} \pm$ s.d.)
TB _{G1}	N.D.	TB ₁₁	28.9 \pm 6.8
TB _{G2}	5.6 \pm s.d.	TB ₁₂	30.7 \pm 4.0
TB _{G3}	5.6 \pm s.d.	TB ₁₃	43.7 \pm 4.5
TB _{G4}	5.4 \pm 1.4	TB ₁₄	16.6 \pm 0.6
TB _{G5}	3.6 \pm 1.6	TB ₁₅	39.6 \pm 4.2
TB _{G6}	2.3 \pm 1.1	TB ₁₆	22.2 \pm 6.2
TB _{G7}	9.6 \pm 8.0	TB ₁₇	4.5 \pm s.d.

Este composto (ou mistura) apresenta, após irradiação UV, um teor das formas metiladas mais simples (MMA + DMA + TMA) que equivale aproximadamente a 71% da concentração total de arsênio determinada (Quadro 6-24, Fig. 41). A foto-oxidação UV é portanto também manifestamente ineficaz em relação ao composto, ou mistura de compostos, presente nas fracções TH₃, Ti₃.

Por outro lado, os picos TG₅ e TG'₈, correspondendo no conjunto a cerca de 150 ng de arsênio, parecem coerentes com o valor obtido para o ARD em G_{5/M} (155 \pm 77). Isto reforça aparentemente a ideia de que praticamente todo o arsênio refractário presente na amostra G_{5/M} será arsênio refractário digerível.

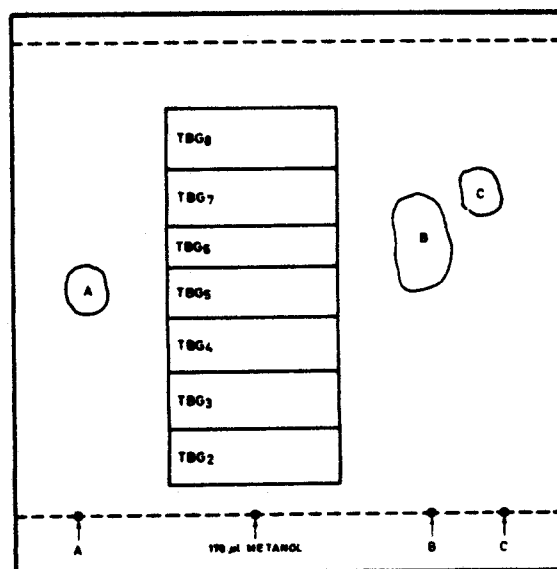


Fig. 45 - Arranjo da placa TLC no ensaio branco TB_{GG}; A-arsenobetaina ; B-arsenocolina ; C-acetilarsenocolina

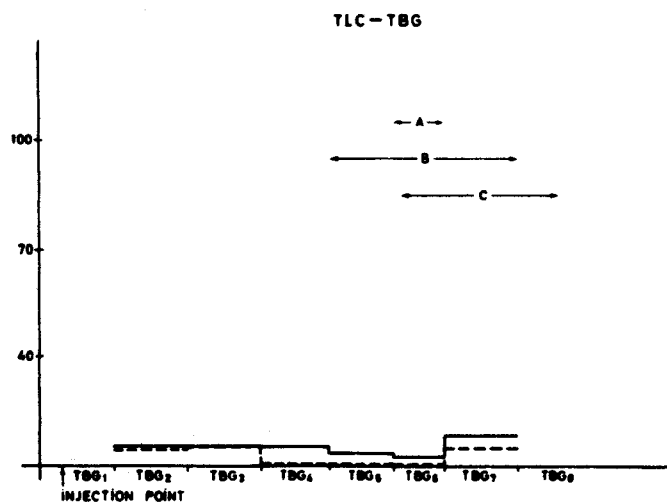


Fig. 46 - Crommatograma TB_{GG} ; — As total (Σ As) ;
--- As itot ($As^{5+}+As^{3+}$)

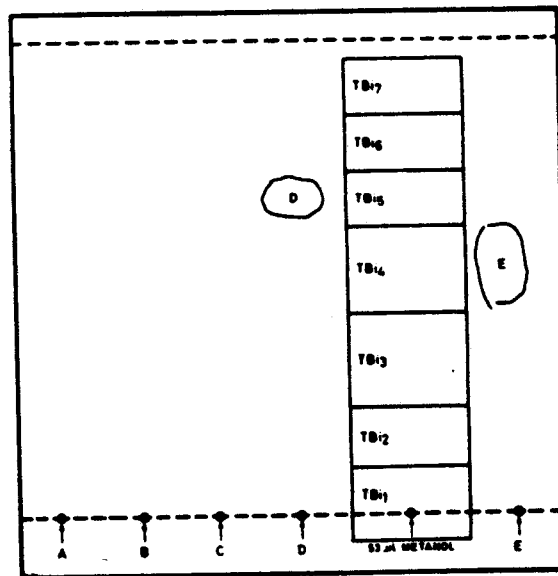


Fig. 47 - Arranjo da placa TLC no ensaio branco TB_{ii} ; A- As^{5+} ; B- MMA ; C- DMA ; D-dimetiloxarsiletanol ; E-arsenocolina

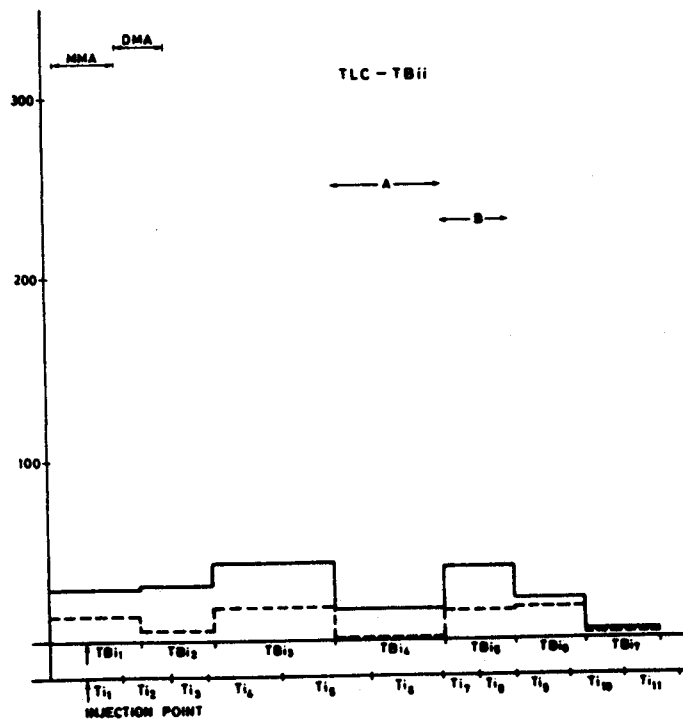


Fig. 48 - Crommatograma TB_{GG} ; — As total (ΣAs) ;
 --- AS itot ($As^{5+}+As^{3+}$)

QUADRO 6-27
RESULTADOS DA TLC

COMPOSTOS	Rf	REFERÊNCIAS
As ⁵⁺ • (Arseniato)	←	Klumpp, 1979
MMA•	←0.3←	
DMA•	←0.10←	
TMAO•		
Arsenobetaina•	←0.46→	Cooney et al., 1978 Cooney et al., 1978 Klumpp, 1979
Arsenocolina•	←0.52→	
Acetilarsenocolina•	←0.69→	
Dimetiloxarsiletanol•	←0.60→	
Arsenolípido	0.23	
Fosfatidilcolina	0.31	
Arsenolípido	0.18	
TH ₃ T ₁₃ C ₉ /M	←0.19→	

* Aplicações efectuadas neste trabalho

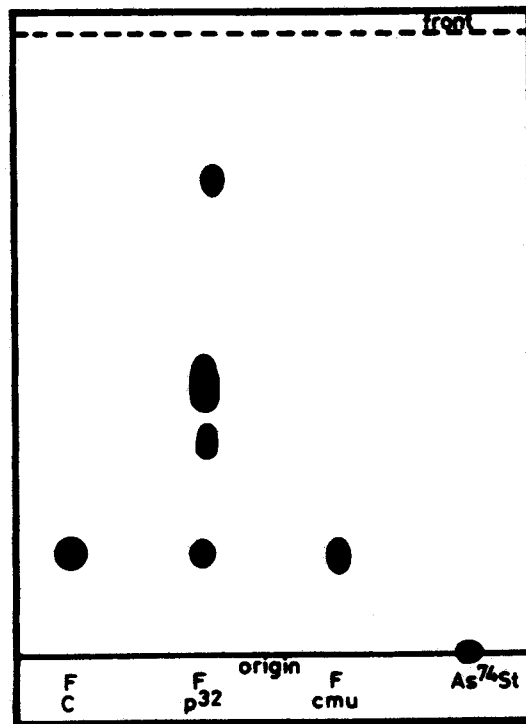


Fig. 49 - Cromatograma TLC de extractos lípidicos de *Fucus spirallis* (Klumpp)
 FC - controle marcado com As^{74} ; FP Fucus marcado com P^{32} ;
 FCMU - Fucus tratado com CMU e marcado com As^{74}
 As^{74} ST - branco

(Reproduzido de Klumpp. 1979)

6.5.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência (H.P.L.C.)

Na Fig. 49 junta apresenta-se o cromatograma resultante do processamento por H.P.L.C. de 120 μ l do extracto TH₃-G₉/M (TLC), nas condições indicadas anteriores em 5.12.

Pode observar-se neste cromatograma um pico conspícuo de

arsénio (pK_1) que, como nos sistemas anteriores (TLC), não cromatografa com nenhum dos padrões aplicados para comparação (As^{3+} , As^{5+} , MMA, DMA, TMAO, arsenobetaina, arsenocolina e dimetiloarsiletanol). Trata-se portanto, certamente, de um composto arsenical distinto.

Faz-se notar também que, tanto quanto a técnica analítica adoptada o permite detectar, não ocorre, na fracção TH₃, nenhum outro composto que contenha arsénio o que parece indicar que a fracção em causa não se degradou durante o longo período em que foi conservada.

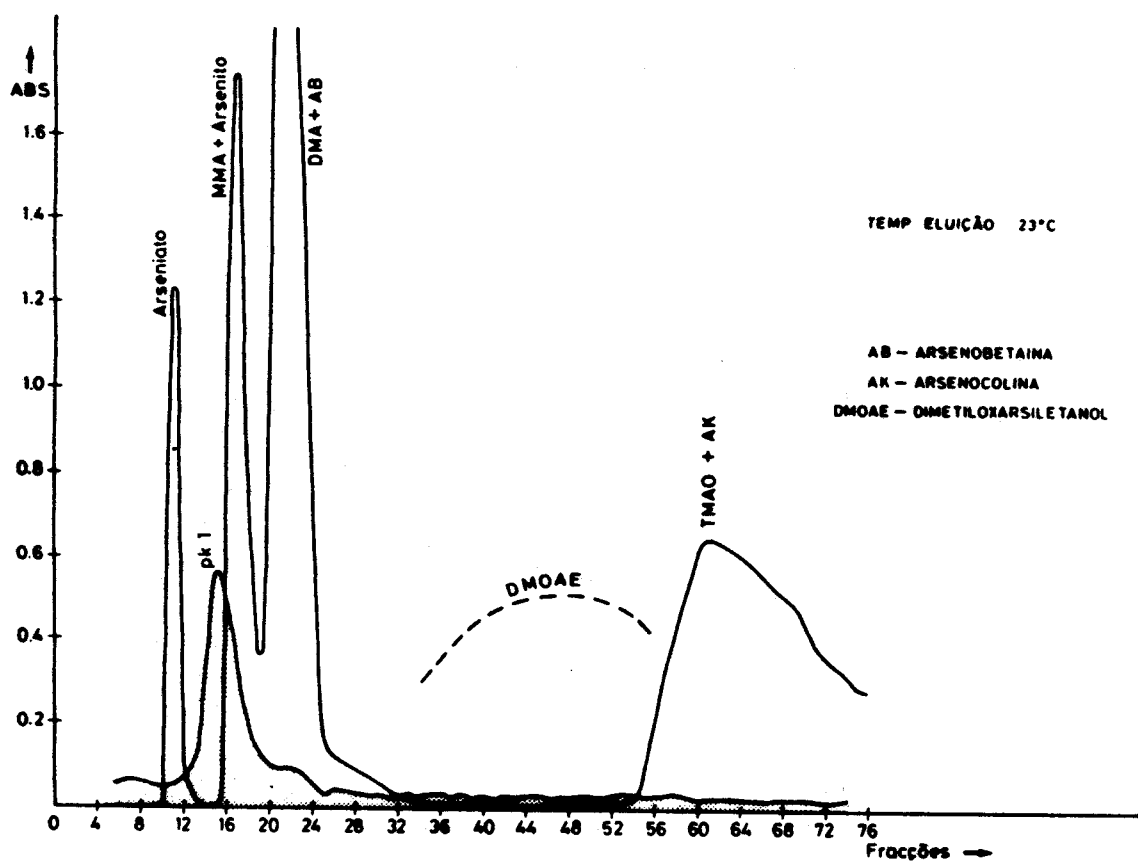


Fig. 50 - Cromatograma HPLC do extracto TH₃-G₉/M

QUADRO 6-28

ARSÊNIO PROCESSADO POR CROMATOGRAFIA (ng)

ESPÉCIES OU COMPONENTES FRACÇÕES	As ₁ TOTAL	MMA	DMA	TMA	ARD	ARI	ΣAs Determinado	As ₁ TOTAL (DT)
ΔG ₅	8540	53	153	70	3809 (2 ³)	N.D.	12.163	12.163
G ₅ /M	746	14	58	N.D.	155 (2 ⁴)		973	N.A.
TLC - G ₅ /M (T _{G8} , T _{G8}) + UV	130		20				150	N.A.
ΔG ₉	20.880	277	2525	88	≥ 1248	≤ 8035	32.981	32.981
G ₉ /M	204	28	127	7	137 (2 ⁴)		≥ 503	N.A.
TLC - G ₉ /M (TH ₃) (TH ₃ , TH ₄ , T ₁₃)	370	131	673	88			1260 (2140)	N.A.
HPLC - TH ₃ (pK)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.			≥ 500	≥ 500

Uma estimativa preliminar, tomando como referência o padrão de arseniato incluído na sequência do "auto-sampler" (AsO₄H₂Na, 75 ng/ml) dá um valor de 470 ng de arsênio para este pico.

No entanto, sendo a resposta da generalidade dos compostos de arsênio conhecidos normalmente mais fraca que a do arseniato ao programa GF-AAS (Fish et al., 1982) parece altamente provável que esta estimativa esteja errada por defeito.

Este resultado será assim grosseiramente convergente com as quantidades estimadas, com as limitações referidas, para o teor em arsênio do pico TH₃ + T₁₃ (TLC).

A situação sistematiza-se no Quadro 6-28 apresentando-se conjuntamente os teores de arsénio obtidos para as fracções ΔG_5 e ΔG_9 , os extractos $G_{5/M}$ e $G_{9/M}$ e ainda os picos obtidos por TLC e HPLC.

6.5.5 - Espectrometria e fragmentometria de massa

Obtiveram-se espectros de massa por impacto electrónico (EI-MSS) de arsenobetaina, arsenocolina, acetilarsenocolina, dimetiloxarsiletanol e trimetilarsénio óxido (TMAO) otimizando-se as respectivas condições operacionais (vide Anexo III).

No entanto a aplicação destes métodos às fracções purificadas por extracção com solventes e troca iónica exclusivamente (6.5.2) ou combinada com a passagem por placas TLC (6.5.3) revelou-se de um modo geral impraticável.

Estas dificuldades decorrem, em parte, dos relativamente altos limites de detecção do método para os compostos em causa, limites esses que, para a arsenobetaina, andam à volta de 40 e 100 ng de As*. Estes níveis estão próximos dos teores de arsénio que se verificam para muitas das fracções finais (Quadros 6-19, 6-20, 6-23, 6-25) o que, atendendo às perdas previsíveis, inviabiliza a sua purificação ulterior.

* Conforme se recorre a porta-amostras de 4 ou 10 μ l respectivamente.

Assim na indisponibilidade de procedimentos de separação mais eficazes e de técnicas de detecção menos destrutivas, não é fácil distinguir o espectro dos compostos em causa do espectro sobreposto de numerosas impurezas que apesar de tudo os acompanham.

Esta situação é aliás corrente na identificação de compostos em amostras complexas como são, quase sempre as colhidas em sistemas naturais e justifica a crescente utilização de técnicas analíticas sofisticadas em química do ambiente (Ryan, 1983).

Já a aplicação da fragmentometria de massa a uma sub-amostra da amostra A, nos termos da metodologia indicada em 5.13 (laboratórios de Karolinska Institutet), parece ter sido particularmente bem sucedida.

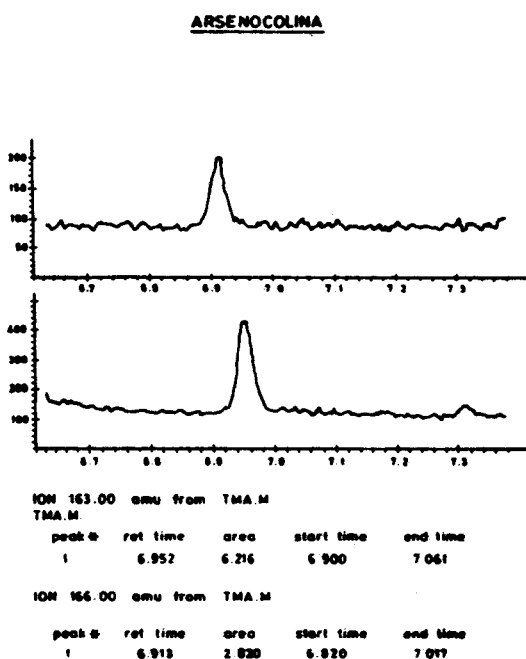
Foi possível, com efeito, medir cerca de 211 ng de As-arsenocolina (Christakopoulos, 1987) no que equivale a cerca de 370 ng de As-arsenocolina na totalidade da amostra A.

Verifica-se ainda que o teor de acetilarsenocolina nesta amostra está abaixo do limite de detecção respectivo. Este resultado que excede o ARD obtido para a mesma amostra (Quadro 6-19) não pode ser atribuído a contaminação durante o processo de concentração/purificação uma vez que, à data do seu processamento, não se dispunha no laboratório do padrão correspondente. É também da maior importância na medida em que, constitui a primeira identificação positiva de um composto

refractário ao método dos hidretos, em águas naturais.

A arsenobetaina não foi doseada. Nas Figs. 51 e 52 apresenta-se a reprodução dos respectivos cromatogramas.

Fig. 51 - Fragmentograma de massa da arsenocolina; Amostra A



ACETILARSENOCOLINA

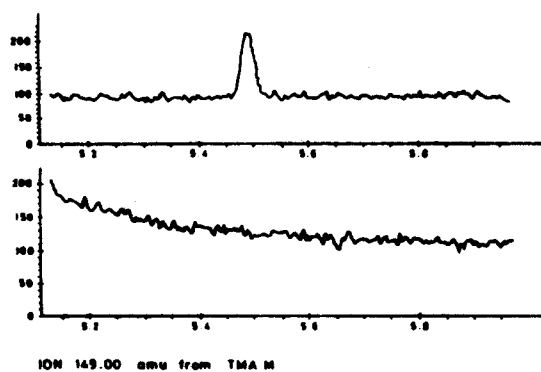


Fig. 52 - Fragmentograma de massa da acetilarsenocolina; Amostra A

7 - DISCUSSÃO GERAL

Parece útil e necessário antes de iniciar propriamente a discussão geral dos resultados obtidos, no seu conjunto, examinar algumas das questões fundamentais que constituem o pano de fundo da presente investigação e lhe dão integral significado.

É este o caso nomeadamente da questão da especiação do arsénio no meio aquático natural e da questão da origem da arsenobetaina nos tecidos dos animais marinhos.

7.1 - A questão da especiação

7.1.1 - Importância e significado

Entende-se correntemente por especiação dum elemento a totalidade das formas físico-químicas em que se apresenta numa amostra e também o processo de determinação, proporções relativas e reactividade dessas formas, no seu conjunto (Bernhard et al., 1986).

É um facto bem estabelecido, por outro lado, que as propriedades tóxicas dum elemento são estreitamente dependentes da forma físico-química individual (espécie) em que se apresenta. Diferenças de solubilidade na água ou nos lípidos, estado de agregação, estrutura química e volatilidade determinam, com efeito, a toxicocinética e a toxicodinâmica dos seus compostos. Essa dependência pode aliás manifestar-se mesmo

a nível da estrutura cristalina de compostos com a mesma composição química (Zielhuis & Wibowo, 1984).

As formas sob que se apresenta um elemento são também determinantes da sua dinâmica no ambiente externo e, em particular, parecem controlar os processos de troca de ciclos biogeoquímicos globais e locais (Braman, 1983a).

A determinação das proporções relativas das suas espécies no ambiente podem ainda contribuir para a elucidação de mecanismos de transporte e a identificação de fontes poluentes individuais e é complementar de modelos composicionais do tipo Eh-pH, no estudo das situações de equilíbrio (Braman, 1983a).

Por outro lado o conhecimento das formas químicas que resultam da interacção dum elemento com o material vivo e, em particular com os receptores internos dos organismos, além de constituir uma etapa essencial para a compreensão do seu papel fisiológico e estatuto ecotoxicológico, dá ainda indicações sobre o significado geoquímico do seu processamento pelo compartimento biótico (Sanders, 1986; Christakopoulos, 1988).

O estudo da especiação responde assim a requisitos mais avançados da compreensão dos fenómenos geoquímicos. No entanto, constitui também o nível mínimo de conhecimento indispensável a uma intervenção eficaz no caso da mobilização e bioacumulação de elementos tóxicos no ambiente como os acontecimentos trágicos de Minamata o vieram comprovar para o mercúrio (Förstner & Wittmann, 1979).

O arsénio é certamente um caso paradigmático da relevância destas questões para a plena compreensão do significado da contaminação do ambiente por um elemento químico (Bernhard et al., 1986). Com efeito para além da considerável diferença de toxicidade que se observa entre as diferentes espécies de arsénio susceptíveis de circular no ambiente (3.5), as consequências que, as alterações à sua especiação, têm, dum modo geral, sobre a sua reactividade geoquímica são da maior importância (Andreae, 1979a, Sanders, 1985, 1986, Peterson & Carpenter, 1986).

7.1.2 - Especiação conhecida em meio marinho

No estado actual do conhecimento verificam-se nesta matéria, contradições mal resolvidas entre os diferentes compartimentos do sistema estuarino/marinho.

Na fase líquida são com efeito conhecidas, (como referido atrás em 3.4.3), formas que correspondem a As^{3+} , As^{5+} , mono e dimetilarsénio (cacodilato). Outras formas alquiladas (etil-, propil- e butil-) e feniladas de arsénio susceptíveis de produzir arsinas com borohidreto (Talmi & Bostick, 1975; Ricci et al., 1981; Braman, 1983a; Irgolic et al., 1983) não foram até hoje detectadas em águas naturais. O ácido fenilarsénico foi, no entanto, doseado em águas resultantes do processamento de xistos betuminosos* (Fish et al. 1982).

* Muito recentemente Irgolic e colaboradores identificaram também trimetilarsina, dimetilarsina, metil dietilarsina e trietilarsina em amostras de gás natural (Irgolic & Puri, 1989).

As espécies trimetiladas registam-se apenas num número limitado de corpos de água doce contaminados (Braman, 1975, Braman et al., 1977).

Até à presente investigação não tinha, em todo o caso, sido referida na literatura a presença de espécies trimetiladas ou tetralquiladas de arsénio em águas de estuário ou marinhas (Andreae, 1983c, 1986a, Edmonds & Francesconi, 1988a, Maher & Butler, 1988, Cullen & Reimer, 1989).

Diferente é, no entanto, o caso do compartimento biótico correspondente. Neste compartimento com efeito para além das formas metiladas correntes (MMA e DMA), e do TMAO tem vindo a ser detectado um certo número de compostos orgânicos de arsénio mais pesados, dos quais alguns foram isolados e identificados. Assim o trabalho pioneiro de Edmonds e colaboradores estabeleceu para além de toda a dúvida razoável, a presença da arsenobetaina no músculo de *Panulirus longipes cygnus*, George (Edmonds et al., 1977).

A fórmula apresenta-se na Fig.53a), fazendo-se notar que sendo um análogo arsenical da betaina, a arsenobetaina ocorre normalmente na forma de ião dipolar (zwitterion).

A arsenocolina e a acetilarsenocolina (Figs. 53b) e c), respectivamente análogos arsenicais da colina e da acetilcolina, foram também identificadas em crustáceos decápodes (*Pandalus borealis*, *Sergestes lucens*, *Homarus vulgaris*, *Nephrops norvegicus*), crustáceos reptantia (*Cancer*

pagurus) moluscos cefalópodes (*Paroctopus dofleini*), "fish meal", peixes marinhos (*Pleuronectes platessa*, *Glyptocephalus cynoglossos*, *Myoxocephalus quadricornis*, *Clupea harengus*, *Lota lota*) e de água doce (*Perca fluviatilis*, *Esox lucius*, *Rutilus rutilus*) (Norin & Christakopoulos, 1983a, Norin et al., 1983, Luten et al., 1982, 1983, Shiomi et al., 1982, Norin et al., 1985, 1987, Christakopoulos et al., 1987).

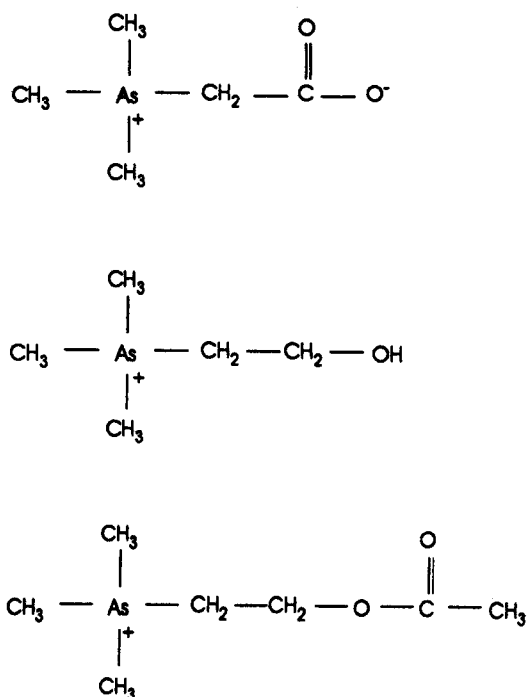


Fig. 53 a)- arsenobetaina; b)- arsenocolina; c)- acetilarsenocolina.

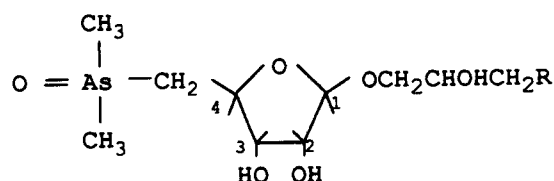
Há a referir também a detecção e identificação recente, em tecidos de invertebrados marinhos (*Meretrix lusoria*, *Aplysia kurodai*, *Parasicyonis actinosteloides*), de sais de $(\text{CH}_3)_4 \text{As}^+$ o que constitui a primeira identificação positiva deste tipo de

compostos em componentes de sistemas naturais* (Shiomi et al., 1987a, 1988).

Trabalhos muito recentes sugerem que a presença destes compostos pode ser generalizada pelo menos em determinados grupos animais (moluscos) (Cullen & Dodd, 1989).

Edmonds e colaboradores na sequência da arsenobetaina isolaram também e identificaram vários arsenoribosidos presentes nos tecidos da macroalga, *Eklonia radiata* e nas zoozantellae do bivalve *Tridacna maxima* (Edmonds & Francesconi, 1981, Edmonds et al., 1982, 1983).

A fórmula geral e o conjunto de compostos identificados a ela correspondentes apresenta-se na Fig. 54.



1a R = -OH

1b R = -SO₃H

1c R = -OSO₃H

1d R = $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-OPOCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$

Fig. 54 - Dimetilarsenoribosidos

* Alguns autores tinham, no entanto, isolado já compostos orgânicos do arsênio que apresentam, no espectro de massa, um pico base característico a m/z = 135 (Penrose et al., 1977; Tam et al., 1982; Lütten et al., 1983; Lawrence et al., 1986).

Algumas variantes a estas estruturas foram identificadas em arsenoaçúcares presentes noutros macrófitos (Jin et al., 1988).

Recentemente foram identificados pela primeira vez arsenoribosidos trimetilados, em extractos de fitoplâncton (*Chaetoceros gracilllis*) e de macroalgas (*Sargassum tumbergii*) (Benson, 1988a; Shibata & Morita, 1988). As suas fórmulas reproduzem-se nas Figs. 55a) e b).

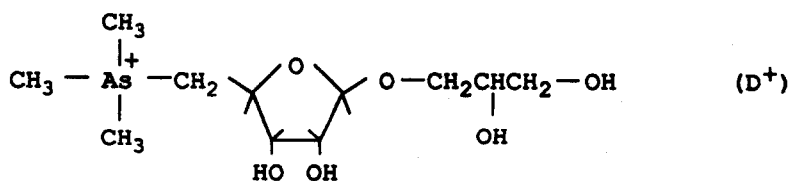
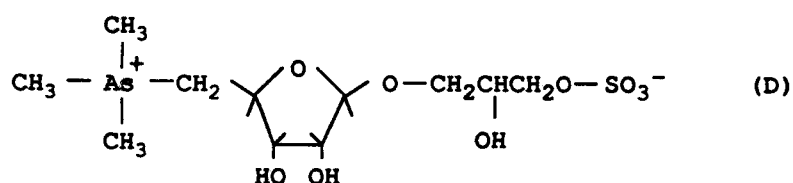


Fig. 55 - Arsenoribosidos trimetilados

Por outro lado a estrutura de um arsenolípido pesado retido em material fitoplanctónico (*Chaetoceros concavicornis*) (Fig. 56), terá sido identificada por Benson e colaboradores. Esta identificação produzida na sequência de uma primeira interpretação baseada em ensaios de electroforése e cromatografia de camada fina que se veio a revelar como um exemplo clássico de insuficiência destes métodos, foi particularmente difícil (Cooney et al., 1978, Knowles & Benson,

1983, Benson, 1987). Uma estrutura análoga foi entretanto proposta para estibinolípidos detectados em culturas semelhantes (Benson, 1988c).

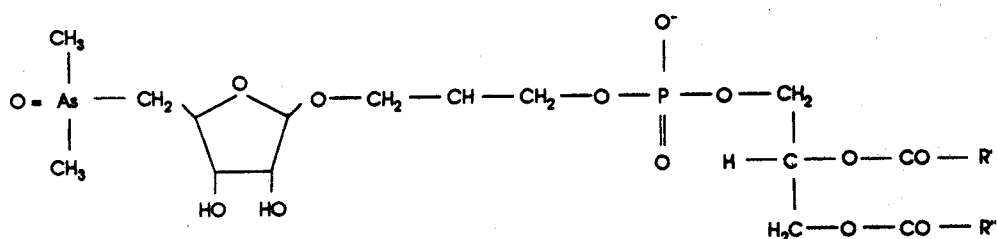


Fig. 56 - Dimetilarsenolípido de Knowles & Benson (1983)

No Quadro 7-1 apresenta-se uma sistematização dos compostos de arsênio conhecidos em meio marinho independentemente da nossa investigação. Indica-se também o respectivo compartimento e principais autores intervenientes na identificação.

Nota-se, neste quadro, um claro contraste entre o compartimento abiótico e o compartimento biótico no que respeita ao número e peso moléculas dos compostos identificados. Verifica-se além disso, dentro do compartimento biótico, que a arsenobetaina e a arsenocolina não ocorrem a nível de produtores primários e que, por outro lado, as estruturas conhecidas de arsenolípidos e arsenoribosidos não foram até agora identificadas em níveis tróficos superiores (Edmonds & Francesconi, 1987a).

QUADRO 7-1

COMPOSTOS DE ARSÊNIO CONHECIDOS EM MEIO MARINHO

COMPART.	COMPOSTOS	ESPÉCIES (BIOTA)/AUTORES
ÁGUA	As ⁵⁺ As ³⁺	Braman et al., 1972, Andreae, 1978, 1979, Howard et al., 1982
	MMA DMA	
	TMAO (Água doce)	Braman 1975, Braman et al., 1977
SEDIMENTO	As ³⁺ As ⁵⁺	Penrose, 1974, Andreae, 1979, Peterson & Carpenter, 1983, 1986
	MMA DMA	Crececius, 1975, Ebdon 1987, 1988
	TMAO	Reimer & Thompson (1988)
BIOTA	As ⁵⁺ e As ³⁺	Presentes na maioria dos organismos aquáticos em pequenas quantidades: Sargassum spp. (Johnson & Braman, 1975), Pormidium spp. Matsuto et al. (1984), Fucus sp., Laminaria digitata, Ascophyllum nodosum (Andreae, 1986a), Laminaria religiosa (Suzuki & Iwata, 1989), Asterias amurensis, Mytilus edulis, Tapes japonica, Batillus cornutus, Succulus supertexia (Hanaoka et al., 1988)
	MMA e DMA	
	MMA DMA	Conchas de moluscos (Cullen et al., 1989)
	TMA	Hymenopeneus sibogae, Plesionika sp., Aristomorpha foliacea, Metapeneus endeavouri, Metapeneus macleayi, Ibacus peronii, Thenus orientalis (Whitfield et al., 1983)
	TMAO	Saxidomus giganteus (Cullen & Dodd, 1989), Pleuronectes platessa (Lüten et al., 1982) Myoxocephalus quadricornis, Perca fluviatilis, Clupea harengus (Norin, et al., 1985), Cnidoglanis macrocephalus (Edmonds & Francesconi, 1987)
	DMA ribosidos	Eklonia radiata (Edmonds & Francesconi, 1981), Laminaria japonica (Shibata et al., 1987), Hizikia fusiforme (Edmonds et al., 1987), Macrocystis pirifera (Herman Lasso & Benson, 1982), Codium fragile (Jin et al., 1988), Tridacna máxima (Edmonds et al., 1982, 1983), Porphyra tenera (Shibata et al., 1989)
	TMA ribosidos	Chaetoceros gracilis (Benson, 1988a), Sargassum tumbergii (Shibata e Morita, 1988)
	n.id.	Arsenolipidos Tetraselmis chui (Bottino et al., 1978), Dunaliella tertiolecta* (Cooney et al., 1978), Chaetoceros gracilis (Benson, 1988), Chaetoceros concavicornis (Knowles & Benson, 1983), Fucus spiralis* (Klumpp, 1979, 1981), Pormidium* spp (Maeda et al., 1988), Prionace glaucum* (Kurosawa, 1980), Galeocerdo cuvier* (Miyajina et al., 1988), Todarodes pacificus* (Hirayama et al., 1989)
		Arsenobetaina Panulirus longipes cygnus George. (Edmonds & Francesconi, 1977) Palinurus sp., Jasus sp. (Cannon et al., 1979), Jasus novaezelandiae, Penaeus latissulcatus (Maher, 1985), Pandalus borealis (Norin & Christakopoulos, 1982), Nephrops norvegicus, Cancer cancer (Lüten et al., 1983), Homarus americanus (Edmonds & Francesconi, 1981), Cancer sp (Crececius, 1977), Cancer magister Dana. (Lüten et al., 1982), Paralithodes camtschatica, Chionoecetes bairdii Rathbun., Chionoecetes opilio (Lüten et al., 1982), Pecten alba, Septoteuthis australis (Maher, 1985), Paroctopus dofleini (Shiomi et al., 1983b), Buccinum striatissimum (Shiomi, 1984), Meretrix lusoria, Neptunea lyrata, Beringius crebriscotata, Neptunea phoeniceus, Charonia sauliae, Tegula pfeifferi, Reishia glavigera (Shiomi et al., 1987), Mytilus edulis, Tapes japonica, Batillus cornutus, Succulus supertexia, Octopus vulgaris, Liolophura japonica, Antholidaris crassirina, Styela claya, Polycarpa cryptocarpa, Pseudocentrotus depressus, Asterias pectinifera, Asteris amurensis (Hanaoka et al., 1988), Saxidomus giganteus, Mya arenaria, Protothaca staminea, Schizothoerus nuttalli, Panope generosa (Cullen & Dodd, 1989) Stichopus japonicus (Shiomi et al., 1983), Pectinopecten yessoensis, "salmão" (Lawrence et al., 1986), Sillago bassensis (Edmonds & Francesconi, 1981), Sillago schumbergini (Cannon et al., 198), Sillaginoides punctatus (Maher, 1985), Solea solea, Microstomus kitt, Pleuronectes platessa, Plactichthys flesus, Limanda limanda, (Lüten et al., 1982), Limanda hertzensteini (Shiomi et al., 1983), Eupsetta grigorjewi (Hanaoka & Tagawa, 1985), Prionace glaucus (Kurosawa, 1980), Carcharinus obscurus (Cannon et al., 1981), Carcharinus longimanus, Isurus oxyrinus, Carcharodon carcharias (Hanaoka et al., 1985, 1986), Mustelus manazo, Squalus brevirostris (Hanaoka et al., 1987a,b), Cnidoglanis macrocephalus (Edmonds & Francesconi, 1987b), Dasyatis akajei (Hanaoka et al., 1988)
		Arsenocolina Pandalus borealis (Norin & Christakopoulos, 1982), Sergestens lucens (Shiomi et al., 1983a), Homarus vulgaris (Christakopoulos, et al., 1987), Paroctopus dofleini (Shiomi et al., 1983b), Nephrops norvegicus (Norin et al., 1983), Pleuronectes platessa (Lüten et al., 1982), Glyptocephalus cynoglossus (Norin et al., 1982, 1983, Lüten et al., 1982), Myoxocephalus quadricornis, Clupea harengus, Lota lota, Perca fluviatilis, Esox lucius, Rutilus rutilus (Norin et al., 1985, 1987)
	Acetil Arsenocolina Pandalus borealis, Homarus vulgaris, Cancer pagurus (Christakopoulos et al., 1987), Myoxocephalus quadricornis, Clupea harengus, Lota lota, Perca fluviatilis, Esox lucius, Rutilus rutilus, (Norin et al., 1987), Pleuronectes platessa, Glyptocephalus cynoglossus (Christakopoulos et al., 1987)	
	(CH ₃) ₄ As ⁺ Aplysia kurodai, Parasiyonis actinosteloides, Meretrix lusoria (Shiomi et al., 1987), Saxidomus giganteus, Schizothoerus nuttalli, Mya arenaria, Protothaca staminea, Venerupis japonica, Mytilus edulis (Cullen & Dodd, 1989)	

7.1.3 - Questões de método

Os arsenolípidos constituem claramente uma área problemática não tendo a respectiva estrutura química sido positivamente identificada na maioria dos extratos de microalgas, macroalgas e animais (Irgolic et al., 1977, Bottino et al., 1978, Kurosawa et al., 1980, Klumpp, 1979, Klumpp & Peterson, 1981, Maeda et al., 1988, Miyajima et al., 1988, Benson, 1989b).

Tem sido aliás uma constante da investigação recente dos compostos orgânicos do arsénio, presentes em material vivo, a detecção e isolamento, juntamente com compostos identificados, de outros compostos de que se não chega a produzir uma identificação positiva.

Numerosos são os casos que se poderiam citar para além do já referido para os arsenolípidos*.

Esta situação decorre, naturalmente, de dificuldades analíticas e metodológicas que não se encontram resolvidas. (Ver adiante 7.6).

A questão da especiação não se esgota, no entanto, na identificação de novos compostos de arsénio já detectados e isolados.

* Lunde, Penrose e colaboradores não conseguiram identificar por TLC, Espectrometria de Massa de alta resolução e NMR, um composto organoarsenical isolado, a partir da solha (*Glyptocephalus cynoglossos*) (Penrose et al., 1977). Crecelius não apresenta qualquer conclusão sobre a identidade do composto de arsénio que isola a partir de *Cancer magister* e que se presume ser arsenobetaina (Crecelius, 1977). Andreae e Klumpp (1979) isolam cerca de 12 metabolitos produzidos em culturas de fitoplâncton marinho que, não chegam, na sua grande maioria, a identificar.

A necessidade de identificar a forma molecular efectiva em que o elemento ocorre no ambiente suscita, com efeito, questões delicadas que seriam secundárias se apenas se pretendesse conhecer a sua concentração total. Os métodos mais sensíveis utilizados incluem efectivamente derivatizações (e.g. hidretos, fragmentometria de massa) ou implicam um grau considerável de interferência. Põe-se assim legitimamente a questão da representatividade dos analitos em relação aos seus precursores na amostra original (parent species) (Howard et al., 1982, Braman, 1983a, Andreae, 1979a, 1986b).

Andreae por exemplo põe claramente a questão da eventual presença de tioarsenito, AsS^{2-} , na água intersticial do sedimento anóxico (Andreae, 1978, 1979a). Outros autores apresentam evidência indirecta da formação de arsinas a partir de As_2S_3 (Weiss et al., 1983). Em ambos os casos, no entanto, a arsina produzida é AsH_3 pelo que os seus presumíveis precursores são indistinguíveis, pelo método dos hidretos, do arsenito (Braman, 1983a).

Por outro lado, independentemente da questão da "espécie parental", põe-se também a questão da "espécie matricial" resultante da interacção da primeira com outros constituintes da matriz e da maior importância no que concerne à reactividade geoquímica e ecotoxicidade de elementos tóxicos (Burton, 1979; Bernhard et al., 1986). Os trabalhos de Waslenchuck permitiram, com efeito, pôr em evidência, nos estuários da Geórgia, uma estreita correlação entre o arseniato e uma fracção definida da

matéria orgânica dissolvida ($2.000 D < MW < 10.000 D$) o que sugere a sua complexação por aquele material, (Waslenchuck, 1977, Waslenchuck & Windom, 1979).

Weiss e colaboradores postularam também, em função de resultados obtidos no estudo da especiação do arsénio em matéria orgânica fossilizada, a associação do monometilarsénio com o Fe e uma fracção orgânica de origem húmica ($MW > 2.000 D$) um pouco como o ortofosfato e o Fe são supostos associar-se em polímeros (Weiss et al., 1983). A estrutura proposta representa-se na Fig. 57.

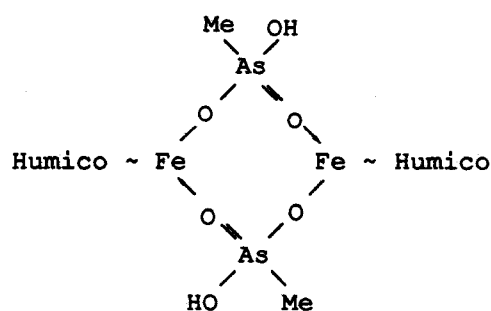


Fig. 57 - Estrutura sugerida para o complexo Humico/Fe/MMA

(Reproduzido de Weiss et al., 1983)

Estes factos sugerem que este tipo de ligações não é detectável e muito menos caracterizável pela aplicação exclusiva dos métodos analíticos correntes.

Suscita-se no entanto ainda a questão da capacidade dos métodos disponíveis para detectar não só os percursores (parent species) e as espécies "matriciais" mas simplesmente a totalidade das formas de arsénio presentes numa dada amostra

(Brinkmam et al., 1977; Irgolic, 1986).

A consulta do Quadro 7-1 revela, com efeito, a existência, no compartimento biótico, de compostos de arsénio refractários ao método dos hidretos, e que em princípio poderão ocorrer também noutras compartimentos.

Tem aliás sido admitida por diversos autores, com base no actual conhecimento do ciclo do arsénio e também no carácter polar e involátil destes compostos, a presença de concentrações baixas mas significativas de arsenobetaina e de arsenocolina na fase líquida (Andreae, 1979a, Irgolic et al., 1983, Edmonds & Francesoni, 1987a, Francesconi & Edmonds, 1987). A evidência recolhida por Andreae relativamente ao comportamento do As^{3+} dissolvido na vizinhança da interface água/sedimento pode ainda ser interpretada, de uma forma coerente, admitindo a sua transformação em formas orgânicas complexas indetectáveis pelos métodos correntes (Andreae, 1978, 1979a).

No entanto ensaios preliminares (Andreae, 1983c) para detectar por digestão básica rigorosa (dry-ashing), em águas fluviais ou marinhas, qualquer fracção indicativa da presença de outros compostos de arsénio para além das formas conhecidas (As^{5+} , As^{3+} , MMA e DMA), não deram, como referido, resultado positivo (ver atrás 6.3). A evidência recolhida sugere além disso que essa presença a verificar-se não excederá 1 a 2% do teor total de arsénio presente na coluna de água (Andreae, 1983c, 1986a).

Peterson e Carpenter procederam também à comparação dos teores

totais de arsénio obtidos pelo somatório das concentrações das diferentes espécies (hidretos), Σ As, com determinações de arsénio total (precipitação com hidróxido de ferro + activação neutrónica), TAs, tendo observado que, em águas oxigenadas, as primeiras são recorrentemente superiores às segundas, TAs > Σ As (Peterson & Carpenter, 1983). No entanto as diferenças observadas não são significativas.

Outros autores chegam a conclusões semelhantes embora não especificando claramente o método utilizado (Sanders, 1986; Edmonds & Francesconi, 1988a).

Assim na falta de métodos analíticos suficientemente sensíveis e na indisponibilidade de evidência complementar este conjunto de questões manteve-se até agora insuficientemente esclarecido.

7.2 - Da origem da arsenobetaina em animais marinhos

Os organismos marinhos parecem mais eficientes que os seus homólogos terrestres no processamento do arsénio (Irgolic, 1986).

A arsenobetaina, com efeito é praticamente ubíqua em animais marinhos e na sequência dos trabalhos de Edmonds tem vindo a ser identificada em crustáceos (reptantia e decápodes), holoturídeos, equinodermes, moluscos (bivalves, gasterópodes e cefalópodes), e peixes (elasmobrânquios e teleósteos) (Quadro 7-1).

Não foi, no entanto, detectada nunca em organismos terrestres e regista-se uma única referência na literatura da sua presença em organismos de água doce (Lawrence et al., 1986).

A arsenocolina, um provável precursor da arsenobetaina e o TMAO, um seu metabolito, foram também, como referido atrás, identificados, e quantificados em organismos marinhos e dulçaquícolas.

No entanto está longe de ser claro o mecanismo pelo qual a acumulação da arsenobetaina se processa em organismos marinhos de um modo tão eficiente e generalizado.

O que se conhecia até aqui da distribuição do arsénio nos sistemas aquáticos naturais não encorajava com efeito a ideia da sua concentração nos organismos por assimilação a partir da fase líquida (Christakopoulos, 1988). A detecção da arsenobetaina em águas naturais não foi, aliás, até hoje descrita na literatura (Edmonds & Francesconi, 1988a).

Ensaio preliminares relativos à biossíntese deste composto, em peixes e crustáceos, directamente a partir de água marcada com arseniato (As^{74}), deram também resultados desanimadores (Edmonds & Francesconi, 1988b).

Do mesmo modo a administração oral de arsénio inorgânico (arseniato) a peixes não conduz à acumulação de arsenobetaina nos seus tecidos. No caso de *Sillago bassensis* e de *Cnidoglanis macrocephalus* observa-se a acumulação de TMAO e, no caso de

Salmo trutta a formação de um composto orgânico de arsénio comprovadamente distinto da arsenobetaina* (Penrose et al., 1975). Este composto (ou a arsenocolina) não foi até hoje identificado em algas (Edmonds & Francesconi, 1988a).

A presença de compostos mais pesados, ocorrendo ubícuamente como metabolitos algais, e identificados como arsenoribosidos, sugere, em todo o caso, um mecanismo de acumulação através da cadeia trófica (Edmonds & Francesconi, 1987a).

Parece também provável que a biossíntese destes compostos siga o mecanismo proposto por Challenger e que envolve a redução e metilação sequencial dos diversos substratos por intervenção da S-adenosilmetionina (ver atrás 3.4.2.3) sendo contudo a redução final substituída pela transferência do grupo adenosilo do agente metilante, segundo o esquema da Fig. 58 (Edmonds & Francesconi, 1987a, 1988a).

Assim, na indisponibilidade de prova experimental quanto à biossíntese directa da arsenobetaina a partir do arsénio inorgânico e não dispondo de informação relativa à presença daquele composto na fase líquida, diversos autores, admitem que a arsenobetaina presente nos tecidos animais resulte, fundamentalmente, da conversão, ao longo da cadeia trófica, dos arsenoaçúcares produzidos de um modo generalizado pelas algas (Klumpp & Peterson, 1981, Edmonds & Francesconi, 1987a, 1988a, Irgolic, 1986).

* Subsistem dúvidas mesmo em relação ao incremento de TMAO observado na primeira experiência, já que pode resultar não da biometilação por etapas sucessivas do arseniato absorvido, (ver atrás 3.4.3) mas da mera degradação da arsenobetaina presente nos mesmos tecidos (Norin et al., 1985; Hanaoka et al., 1987; Kaise et al., 1987).

Cooney e Benson relatam, no entanto, que arsenoribosidos algais fornecidos como alimento a peixes, crustáceos (*Homarus americanus*), bivalves (*Mytilus californianus*) copépodes (*Calanus pacificus*) e bactérias não são metabolizados a arsenobetaina (Cooney & Benson, 1980, Cooney, 1981, Benson, 1988b, 1989a). Os trabalhos de Klumpp e Peterson parecem demonstrar também a não acumulação deste composto por *Nucella lapidus* alimentada com *Fucus spirallis* (numa cadeia alimentar curta e exclusiva de uma etapa detritívora) e evidenciam, em qualquer caso, uma assimilação do arsénio directamente a partir da água por aquela espécie (Klumpp, 1979, Klumpp & Peterson, 1981).

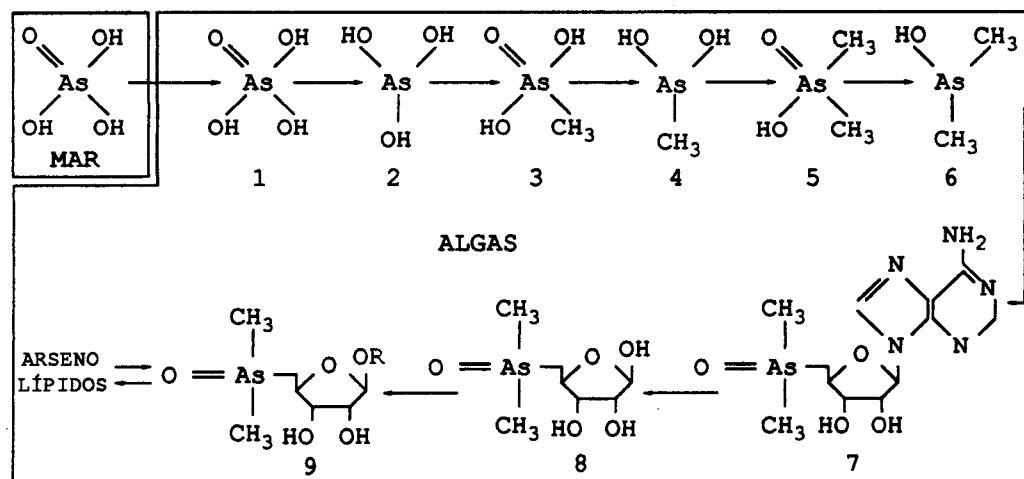


Fig. 58 - Biossíntese dos arsenoribosidos segundo Edmonds & Francesconi (1987a)

Neste contexto foi considerado um avanço significativo a confirmação experimental, de que a decomposição anaeróbia sedimentar de fragmentos de *Eklonia radiata* conduz à conversão quantitativa, dos arsenoribosidos presentes neste fragmentos em

dimetiloarsiletanol (Edmonds & Francesconi, 1982, 1987a). Este resultado sugere, que este composto, pode ter um papel central no complexo mecanismo biogeoquímico conducente à acumulação da arsenobetaina nos níveis tróficos secundários do ecossistema marinho, mecanismo que incluiria assim, obrigatoriamente, uma etapa microbiana sedimentar (Edmonds et al., 1982b, Christakopoulos, 1988).

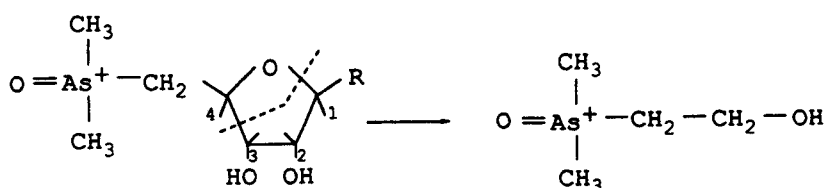


Fig. 59 - Degradação dos dimetilarsenoribosidos a dimetiloarsiletanol segundo Edmonds & Francesconi (1988a)

A produção do dimetiloarsiletanol implica a clivagem da ligação C₃-C₄ dos arsenoribosidos dimetilados (Fig. 59) e a sua conversão a arsenobetaina a oxidação do terminal CH₂OH a COOH, o que não parece levantar problemas de maior (Irgolic, 1986).

A formação de arsenobetaina a partir do dimetiloarsiletanol implica, no entanto, também, pelo esquema de Challenger, a redução deste composto à arsina (CH₃)₂AsCH₂CH₂OH (Fig. 60), o que não foi até agora comprovado experimentalmente (Edmonds & Francesconi, 1987a), implica ainda a metilação ulterior do átomo de arsénio e tetralquilarsénio.

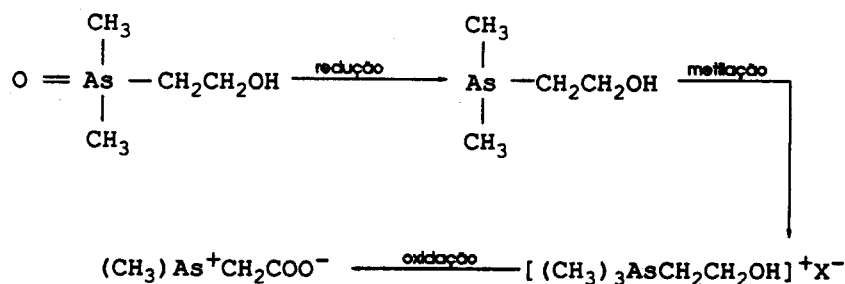


Fig. 60 - Conversão do dimetiloxarsiletanol a arsenobetaina segundo Edmonds & Francesconi (1987a, 1988a)

Este último passo levanta dificuldades uma vez que a produção de compostos tetralquilados de arsénio por biometilação nunca foi observada. O TMA, ou mesmo o ácido cacodílico, são os produtos finais dos mecanismos conhecidos (Edmonds & Francesconi, 1987a).

Além disso ao impor a mediação de uma etapa sedimentar obrigatória Edmonds e colaboradores complicam a versão da concentração por metabolização através da cadeia trófica não sendo claro, de modo nenhum, por que razão sistemas estrutural e funcionalmente diferentes*, apresentam distribuições semelhantes daquele composto.

Os autores que examinam esta questão numa base alargada de evidência concluem, aliás, não haver qualquer relação óbvia entre a concentração de arsenobetaina nos tecidos e os hábitos alimentares ou posição trófica dos organismos (Hanaoka et al., 1988).

* Os sistemas correspondentes às referências apresentadas no Quadro 7-1 cobrem um conjunto muito variado de situações geográficas e condições ecológicas.

Em qualquer caso partindo de arsenoribosidos como material fotossintético de base, forçoso é admitir, uma alta selectividade que favoreça a passagem e acumulação destes compostos ou dos seus metabolitos através da cadeia trófica. O que se conhece das propriedades físicas e químicas da arsenobetaina e do dimetiloxarsiletanol, não encoraja no entanto este tipo de especulações (Edmonds & Francesconi, 1987a).

A recente detecção de arsenoribosidos trimetilados quer no fitoplâncton quer em macroalgas é assim inegavelmente sugestiva já que fornece percursos tetralquilados à arsenobetaina que acumula no nível trófico superior (Benson, 1987, Shibata & Morita, 1988). Não evita, no entanto, a difícil etapa da produção de tetralquilar-sénio uma vez que a própria biossíntese destes percursos pressupõe um mecanismo semelhante (Benson, 1988a). Também não adianta qualquer explicação clara para a sua pressuposta metabolização a arsenobetaina, em contradição com o que Conney e Benson estabeleceram para compostos também identificados como arsenoribosidos (Benson, 1989a).

Por outro lado o facto de outras algas fitoplanctónicas aparentemente os não acumularem retira credibilidade à hipótese destes compostos constituírem uma fonte dominante, através da cadeia trófica, dum composto que apresenta uma distribuição ubíqua como a arsenobetaina (Benson, 1989a). O contributo daquela detecção para a questão de fundo não é, portanto, neste momento, inteiramente claro, hesitando os seus autores em

atribuir aos novos compostos o papel de intermediário no processo de acumulação da arsenobetaina (Shibata & Morita, 1988, Benson, 1988a).

Assim, nenhum dos mecanismos de concentração propostos sendo inteiramente convincente esta questão permaneceu também em aberto, apesar dos avanços significativos que terá recentemente experimentado.

7.3 - A nova evidência disponível

Neste contexto a informação recolhida no âmbito deste trabalho, pese embora o seu carácter fragmentário, pode revestir-se de alguma importância já que, por um lado, contribui para o esclarecimento da especiação do arsénio em meio estuarino e, por outro, abre novas perspectivas no que respeita ao seu comportamento biogeoquímico.

No domínio da especiação estabeleceu-se, com efeito, para além de toda dúvida razoável, a presença, em águas de estuário, de formas que produzem por redução com borohidreto, trimetilarsina (ver atrás 6.2). Não é claro, pelas limitações atrás referidas (7.1.3), que estas formas correspondam necessariamente à espécie TMAO que, no entanto, em águas oxigenadas é a forma mais provável (Braman, 1983b).

A presente investigação permitiu também detectar e quantificar duas novas fracções de arsénio refractário ao método dos hidretos, que se distinguem entre si pela diferente

susceptibilidade à digestão básica (6.3 e 6.4).

Este facto e a magnitude destas fracções refractárias constituem só por si uma alteração, considerável, do quadro até agora conhecido da especiação estuarina do arsénio.

Investigação subsequente permitiu ainda obter indicações preliminares sobre a natureza destas fracções refratárias. Os nossos resultados podem sistematizar-se como segue:

7.3.1 - Presença de arsenocolina

Foi comprovada a presença de arsenocolina na fracção concentrada por extracção com solventes e troca iónica e acima referida como amostra A (Figs. 15 e 48).

Tal não implica no entanto, necessariamente, a sua presença na amostra de água inicial, F_{00} .

A hipótese de um artefacto susceptível de produzir arsenocolina ao longo do moroso processamento* efectuado no Fluxograma I a partir de um precursor dotado de um comportamento sensivelmente diferente em troca iónica (um ião dipolar por exemplo) não pode, efectivamente, ser inteiramente excluída e foi, como referido, investigada.

Esta hipótese não foi no entanto confirmada pelos ensaios efectuados com vista a esclarecer esta questão (ver atrás

* Ver anexo I

6.5.2) pelo que é possível e parece provável a efectiva presença da arsenocolina na fracção F₀₁.

Não se provou, no entanto, que idêntico processamento de um seu precursor, não possa conduzir a um resultado idêntico ou seja à presença da arsenocolina na amostra A.

Também não se pode afastar inteiramente a hipótese da arsenocolina presente na fracção F₀₁ constituir fundamentalmente o resultado da manipulação a que se sujeitou a amostra F₀₀. Não é impossível com efeito que sucessivas alterações de pH e da temperatura, nas etapas iniciais do processo de concentração/purificação (ver atrás 5.10.1), sejam susceptíveis de, eventualmente, degradar a molécula de um precursor.

No entanto a degradação de precursores da arsenocolina, em meio estuarino, por processos naturais parece dispôr de uma base experimental mais segura que o processo equivalente sugerido para a sua eventual degradação no laboratório (ver adiante 7.4.1).

Assim a presença de arsenocolina na fracção original, F₀₀, é possível e parece mais razoável que a hipótese alternativa considerada.

7.3.2 - Evidência a favor da presença de arsenobetaina

Não se chegou, neste caso, a uma identificação positiva do componente em causa, como para a arsenocolina.

A evidência recolhida é assim de natureza indirecta e a sugestão da presença de arsenobetaina nas águas do estuário do Tejo é sempre, até certo ponto, de carácter conjectural.

Essa evidência decorre fundamentalmente do processamento da fracção G_{00} . Sistematizando, tem-se:

a) os digeridos (0.5N OHNa) das fracções G_{00} , G_1 e G_5 apresentam picos proporcionalmente dominantes de TMA; estes picos são característicos, embora não exclusivos, da digestão da arsenobetaina (ver atrás 6.3). Esse domínio acentua-se ainda ao longo da sequência $G_{00} \rightarrow G_1 \rightarrow G_5$ (48% em G_{00} , 85% em G_1 e 95% em G_5) sugerindo um aumento progressivo da concentração deste composto no extracto ou uma alteração das condições da digestão.

b) a fracção G_5 , (resultante da dupla passagem da fracção G_1 por colunas catiónicas fracas eluídas com OH_2 -Milli-Q), é aquela fracção em que será de esperar que a arsenobetaina elua, num soluto de força iónica moderada como é o caso (Fluxograma II) (Cannon et al., 1981, 1983, Norin et al., 1983).

c) as aplicações do extracto G_{5/M} em placas de camada fina TLC apresentam picos que co-cromatografam com padrões de arsenobetaina sintética (Figs. 38 e 40).

d) combinando a digestão básica e a digestão total da fracção G₅ verifica-se que praticamente todo o arsénio refractário presente nesta fracção é digerível (ARD) (Quadro 6-6). Numa primeira aproximação isto exclui como é evidente, todos os compostos de arsénio indigeríveis (ver atrás 6.2). Numa segunda aproximação estes dados excluem no entanto, também, aparentemente, compostos como o trimetil(2-carboxietil)arsónio que, por digestão básica apresentam rendimentos inferiores em TMA (23%) (Kaise et al., 1988).

Estes resultados, (a), b), c), e d)), insuficientes isoladamente, constituem, em todo o caso, um conjunto de evidência indirecta coerente e compatível com a presença da arsenobetaina nas amostras G₀₀.

Conhecem-se, no entanto, outros compostos trimetilados de arsénio que poderiam estar presentes naquela fracção. Assim pareceu útil levar esta análise mais longe comparando ainda o comportamento do ARD, presente nas amostras GG (G₀₀, G₀₁, G₅), e o que se sabe desse conjunto de compostos. Esta comparação baseia-se na experiência adquirida no âmbito deste trabalho, na informação compilada da literatura e também no que parece legítimo admitir em relação às propriedades físico-químicas de alguns deles.

Examinaram-se assim os possíveis mecanismos de digestão alcalina de compostos trimetilados de arsénio, tomando como base o conjunto de mecanismos proposto por Kaise e colaboradores (Kaise et al., 1988, Figs. 30 e 31).

Deste exame resulta evidente (pela impossibilidade de demetilar o arsénio) a indigeribilidade, por simples digestão alcalina ($2N\text{ OHNa}$) do tetrametilarsónio (Christakopoulos, 1989, Rosa, 1989). Este facto é aliás confirmado experimentalmente (Lüten et al., 1982, 1983). O tetrametilarsónio não pode, em consequência, integrar a fracção digerível, ARD.

Já para os arsenoribosidos trimetilados (e apesar do mecanismo proposto por Kaise (esquema I, Fig. 30) ser impraticável pela inexistência da ligação dupla polarizável $O=\text{As}(\text{CH}_3)_2^R$), são concebíveis outros mecanismos que conduzam, eventualmente, ao corte da ligação $\text{As}-\text{CH}_2$ (Rosa, 1989). Assim na presença de hidróxido de sódio em excesso estes compostos serão digeríveis, segundo o esquema da Fig. 61.

Parece razoável admitir, por outro lado, que compostos que ocorrem preferencialmente sob a forma de iões dipolares sejam susceptíveis de coeluir com a arsenobetaina, nas condições de pH e força iónica da 1ª parte do Fluxograma II, ao contrário dos que apresentam uma única carga positiva no átomo de arsénio (e.g. arsenocolina).

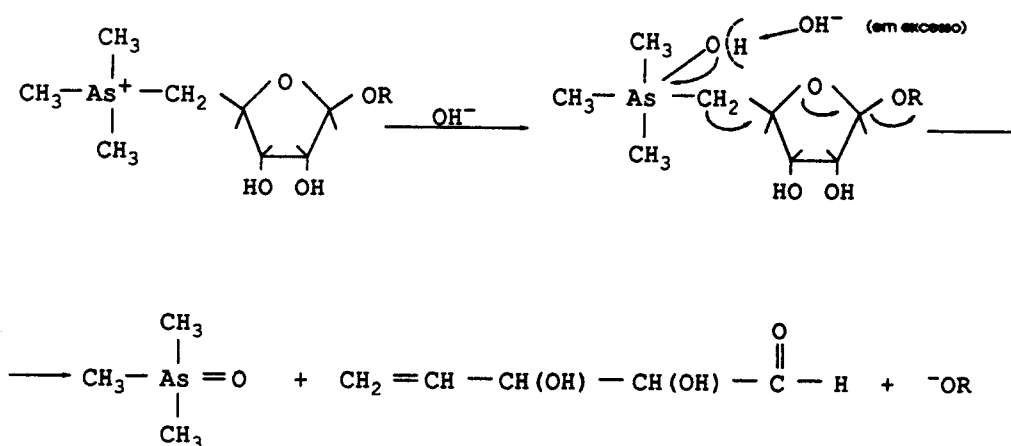


Fig. 61 - Mecanismo sugerido para a digestão alcalina dos arsenoribosidos trimetilados (Rosa, 1989)

O trimetilarsônio lactato, um ião dipolar como a arsenobetaina, é, no entanto, em princípio indigerível por digestão alcalina (Christakopoulos, 1989). O mesmo sucede com a arsenocolina e a acetilarsenocolina que, além disso, apresentam em troca iônica um comportamento catiónico, como referido (Norin et al., 1983, Norin, 1987).

Assim excluído o trimetil(2-carboxietil)arsônio (ver acima d)) do conjunto considerado e sistematizado no Quadro 7-2, apenas a fosfatidilarsenocolina, (estrutura proposta por Irgolic e colaboradores para o arsenolípido trimetilado de Bottino (Irgolic et al., 1977; Bottino et al., 1978)) e um dos trimetilarsenoribosidos identificados, (D), (Fig. 55a) parecem susceptíveis, de concorrer com a arsenobetaina para a fração em causa.

Parece pouco provável, em todo o caso, que as propriedades da fosfatidilarsenocolina, análogas às da fosfatidilcolina, (Cooney et al. 1978, Bottino et al., 1978, Miyajima et al., 1988) lhe confirmam R_{fs} coincidentes com os da arsenobetaina, no sistema TLC utilizado (Quadro 6-12).

Consequentemente parece também pouco provável a presença daquele composto na fracção G_5/M .

Não tendo sido aliás completamente elucidada a estrutura dos arsenolípidos presentes nas algas (Edmonds & Francesconi, 1988) não está excluída, uma relação de parentesco entre os arsenolípidos de Bottino e os arsenoribosidos acima referidos (ver adiante 7.4.2) e nesta última hipótese, ambos constituirão, mediatemente, potenciais percursores da arsenobetaina.

Pode ainda sugerir-se, que também neste caso, a arsenobetaina eventualmente presente no extracto G_5 resulte da degradação de um precursor presente no "pool" inicial de arsénio refractário da amostra G_0 .

No entanto o único precursor imediato da arsenobetaina até agora identificado é a arsenocolina (Edmonds et al., 1982, Edmonds & Francesconi, 1989, Norin et al., 1982, 1987) e a sua conversão em arsenobetaina, parece depender da actividade de enzimas hepáticos (Mann et al., 1938; Marafante et al., 1984) e nomeadamente da presença do enzima colina dehidrogenase

(Christakopoulos et al., 1988). Este tipo de transformações só parece portanto viável pela intervenção do metabolismo interno de um certo número de organismos.

A conversão no nosso caso, da arsenocolina a arsenobetaina no laboratório, resulta conseqüentemente improvável.

QUADRO 7-2
COMPATIBILIDADES ARD (G5/M)

MÉTODO COMPOSTO	HIDRETOS	DIGESTÃO BÁSICA	TROCA-IÓNICA (I)	TLC	DIGESTÃO BÁSICA + DIGESTÃO TOTAL	REFERÊNCIAS
TMAO	-	-	-	-	-	Kaise et al., 1988 Norin et al., 1983
Arsenobetaina	+	+	+	+	+	Norin et al., 1982, 1983
Arsenocolina	+	-	-	±	-	Norin et al., 1983
Acetilarsenocolina	+	-	-	-	-	Norin et al., 1983
Fosfatidilarsenocolina	+	+	+	-		Bottino, 1978 Cooney et al., 1978 Miyajima, 1988
Trimetilarsónio lactato	+	-	+	±	-	Benson, et al., 1981 Klumpp, 1981 Christakopoulos
Arsenoribosidos trimetilados	+	+	+		+	Shibata & Morita, 1987 Benson, 1988a
$(CH_3)_4As^+ X^-$	+	-	-		-	Shiomi et al., 1988
Trimetil(2-Carboxi-etil) Arsónio	+	+	+		-	Kaise et al., 1988

No entanto na indisponibilidade de uma identificação positiva do componente refractário digerível não se pode, neste momento, excluir, em definitivo, a presença de outros compostos, nomeadamente de arsenoribosidos trimetilados, na fracção em

causa (G_{5/M}). Nada impede também que se considere a presença de compostos orgânicos de arsénio não incluídos* no Quadro 7-2 desde que respeitem os requisitos de estabilidade no meio aquático natural.

Há que reconhecer, em todo o caso, que o quadro de evidência analisado (picos TMA característicos, eluição na fracção aquosa, co-comatografia TLC com padrões de As-betaina e ~ 100% de rendimento na digestão básica) é, dum modo geral, favorável à presença da arsenobetaina na amostra G₀₀.

7.3.3 - Presença de outros compostos de arsénio não identificados

A presente investigação, até por incidir preferencialmente na especiação do arsénio na fase líquida, não escapa, naturalmente, à regra geral da detecção de compostos que se não conseguem identificar.

Com efeito, a detecção de cerca de 2.000 ng de As no conjunto das aplicações do extracto G_{9/M} em TLC (picos TH₃, TH₄ e Ti₃) evidencia a existência de uma quantidade considerável de arsénio refractário distinto da arsenocolina (ver atrás 6.3). Nas condições de digestão adoptadas (0,5N OHNa), este arsénio é em grande parte indigerível (Quadro 6-6).

* Não se consideram compostos como o aldeído da arsenobetaina uma vez que não foi até hoje isolado na natureza ou no laboratório, sendo postulado como mero intermediário na biotransformação da arsenocolina a arsenobetaina (ver adiante 7.4.2).

Esta fracção reaparece na aplicação do extracto TH₃ em HPLC, uma vez mais isolada dos padrões utilizados para comparação (pK1, Fig. 50).

Não se tendo conseguido identificar este componente e não se dispondo também de indicações equivalentes às das fracções G₅ o tratamento desta questão poderia ficar por aqui. Pareceu, haver vantagem no entanto, em explorar, sem quebra de rigor, a evidência indirecta obtida.

Com efeito não tendo sido possível obter, até agora indicações precisas sobre a natureza química destes compostos é possível e parece razoável sistematizar o conjunto de hipóteses implícita ou explicitamente admitidas e que no desenvolvimento deste trabalho se vieram a revelar como falsas. Assim não se sabendo exactamente em que consiste a fracção em causa poderá em todo o caso recolher-se indicações sobre aquilo que certamente ela não é (Popper, 1959).

Procede-se (como para a fracção G₅), à análise das relações de compatibilidade entre um conjunto de compostos candidatos a integrarem aquela fracção (TH₃, Ti₃-G_{9/M}) e o que resulta da aplicação da metodologia escolhida para a sua caracterização físico-química (ver capítulo 6.5). A lista apresentada resulta também de uma análise da literatura e não pretende, bem entendido, à exaustão.

Assim as aplicações em cromatografia de camada fina do extracto

G₉/M (Quadros 6-24 e 6-25, Figs. 41 a 44) põem em evidência a incompatibilidade do componente em causa (TH₃, Ti₃-G₉/M) com a acetilarsenocolina (e também com a arsenocolina) que, em qualquer caso, não ocorrem naquele extracto em concentrações detectáveis (6.5.3).

Aliás, aceitando como válida a experiência adquirida com resinas catiónicas fortes (Tam et al., 1978; Norin et al., 1983, 1987, Shiomi et al., 1987, Cullen & Reimer, 1989), estes dois compostos de arsénio, não deverão eluir na fracção G₉.

A quantidade de arsénio em falta no balanço das fracções GG sugere ainda, neste caso, a sua adsorção irreversível nas resinas (ver 6.2).

Um dos arsenoribosidos trimetilados isolados por Benson, D⁺, (Fig. 55b) (Benson, 1988a) apresenta também uma estrutura eléctrica catiónica. Por outro lado, o trimetilarsóniolactato e o outro arsenoribosido trimetilado identificado, D, (Fig. 55a), iões dipolares a pH fisiológico (Benson et al., 1981; Shibata & Morita, 1988), deverão ter um comportamento catiónico a pH baixo. No entanto o que acima ficou demonstrado para a arsenocolina na fracção F₀₁ (7.3.2) (a sua inesperada eluição parcial na fracção aquosa) aconselha prudência e, na indisponibilidade de evidência experimental mais concreta, parece difícil extrapolar, a este conjunto de compostos, o que parece adquirido para a arsenocolina e para a acetilarsenocolina.

Diferente é o caso do tetrametilarsónio que dispendo de uma estrutura eléctrica catiónica, se sabe poder ser deslocado, em resinas catiónicas fortes, por 1N ClH (ver atrás 6.5.2).

O pico TH₃, Ti₃/G₉/M também não co-cromatografa com arsenobetaina, TMAO, DMA, MMA e As⁵⁺ (Figs. 42 e 44).

Estas aplicações TLC comprovam ainda a não ocorrência de dimetiloxarsiletanol nos extractos e, aparentemente, são igualmente incompatíveis com a estrutura atribuída ao arsenolípido de Bottino ou seja a fosfatidilarsenocolina (Cooney et al., 1978, Bottino et al., 1978, Miyajima et al., 1988). Este último composto e os dimetilarsenoaçúcares são aliás, comprovadamente digeríveis (0,5N OHNa) (Bottino et al., 1978; Edmonds & Francesconi, 1981) o que (apesar das dúvidas relativas à digeribilidade da fracção ΔG₉ e das dificuldades referidas para a digestão básica dos extractos/M), parece constituir uma clara contra-indicação para um constituinte desta fracção. O mesmo se presume para os dimetilarsenolípidos em geral (Esquema I, Fig. 30).

Por outro lado o ácido acético dimetiloxarsilo, que se admite poder eluir na fracção G₉ do fluxograma II e ser refractário à digestão alcalina (Kaise et al., 1988), é, proposto na literatura como mero intermediário no mecanismo da conversão do dimetiloxarsiletanol a arsenobetaina (Edmonds et al., 1982; Andreae, 1986a). Esta sugestão não obteve aliás, até agora confirmação experimental e, pelo contrário, sofre das

dificuldades referidas em 7.2. O dimetiloxarsiletanol também não foi detectado. A presença daquele intermediário parece consequentemente improvável.

A complexação do arsénio em solução não parece por outro lado, constituir a resposta adequada a estas questões. O complexo fúlvico/arseniato, detectado por Waslenchuk não será, com efeito, susceptível de evitar a produção de hidretos a partir do arseniato (Waslenchuk, 1977, Waslenchuk & Windom, 1978).

Já para os humatos/Fe/MMA e sobretudo para os arsenito/lípidos (sugeridos e isolados, respectivamente, por Weiss e Wrench e colaboradores), a situação parece ser menos clara uma vez que, pelo menos os segundos, serão susceptíveis de formar ligações covalentes (Weiss et al., 1983, Wrench & Addison, 1981).

É difícil admitir, em todo o caso, que mantendo ambos, o arsenito e o MMA, a sua individualidade química no complexo, possa a irradiação U.V. produzir incrementos sensíveis das formas dimetiladas mais simples (acréscimo de DMA ~ 53%), como se verifica para os picos TH₃ e Ti₃ (Figs. 42 e 44, Quadros 6-24 e 6-25).

A eventual formação de pares iónicos inorgânicos (Mg²⁺, Ca²⁺) mecanismo possível na química do arsénio em solução (Ferguson & Gavis, 1972, Lowenthal et al., 1976, Atlas et al., 1976), sofre das mesmas dificuldades.

Assim do conjunto considerado e sistematizado no Quadro 7-3 apenas o arsenolípido isolado por Klumpp, o trimetilarsónio lactato e o tetrametilarsónio serão susceptíveis (a manterem-se como válidos os critérios adoptados) de preencher os requisitos da fracção em causa.

Faz-se notar ainda que estes dois últimos compostos (ao contrário do primeiro) são compatíveis com o critério NMWL \leq 210 que se estabeleceu para a fracção refractária indigerível da amostra processada por ultrafiltração (ver atrás 6.5.1). O tetrametilarsónio dispõe no entanto para todos os efeitos, de um conjunto de relações de compatibilidade positivas com a fracção G_{9/M}, superior ao dos seus principais concorrentes (Quadro 7-3). Parece portanto reunir mais probabilidades de vir a ser identificado como o principal constituinte do ARI.

No entanto a arsenocolina foi também identificada nos extractos FF e (aparentemente excluída das fracções GG) é também compatível com o critério NMWL acima referido.

Parece assim admissível quer a ocorrência simultânea de vários compostos de arsénio na fracção ARI, quer a existência de diferenças significativas na composição química desta fracção entre amostras colhidas em estiagem (GG₀₀) e amostras colhidas em invernia (ULT + FF₀₀).

Esta a situação para o arsénio refractário indigerível (ARI).

QUADRO 7-3

COMPATIBILIDADES DA FRACÇÃO G₉/M

COMPOSTO	MÉTODO							REFERÊNCIAS
	HIDRETOS	DIGESTÃO BÁSICA (DB)	DIGESTÃO TOTAL (DT)	FOTOXIDAÇÃO (UV)	TROCA-IÔNICA II	TLC	HPLC	
Arseniato	-	+	-	-	+	-	-	Klumpp, 1979
Arsenito	-	+	-		+		-	Norin et al., 1983
Ácido monometilarsênico (MMA)	-				-	-	-	Norin et al., 1983
Ácido dimetilarsênico (DMA)	-				-	-	-	Norin et al., 1983
Trimetilarsênio óxido (TMAO)	-				-	-	-	Norin et al., 1983
Arsenobetaina	+	-	+	+		-	-	Norin et al., 1983, 1987
Arsenocolina	+	+	+	±	-	-	-	Norin et al., 1983, 1987 Tam et al., 1978
Acetilarsenocolina	+	+	+	±	-	-		Norin et al., 1983, 1987
Dimetiloxarsiletanol	+	+	+			-	-	Norin (1987) Kaise et al., (1988)
Arsenolípido	+		+			+		Klumpp, 1979 Klumpp & Peterson, 1981
DMA - Arsenolípido	+	-	+			+		Knowles & Benson, 1983
Trimetilarsônio lactato, TMAL	+	+	+					Benson et al., 1981 Christakopoulos, 1989
Fosfatidilarsenocolina	+	-	+			-		Bottino et al., 1978 Klumpp, 1979
Dimetilarsenorribosidos A, B	+	-	+					Edmonds & Francesconi, 1982, 1983
Trimetilarsenorribosidos D, D+	+	-	+					Shibata & Morita, 1987 Benson, 1988
(CH ₃) ₄ As ⁺ X ⁻	+	+	+		+			Shiomi et al., 1987, 1988 Cullen & Reimer, 1989
Complexo pesado Humatos - Fe - MMA				-				Weiss et al., 1983
Complexo fúlvico/arseniato	-			-				Waslenchuk, 1977, 1978
Complexo arsenito/lípidos				-				Wrench & Addison, 1981

No que respeita ao arsénio refractário digerível (ARD) não se produziu até agora qualquer sugestão relativa à identidade dos seus constituintes nas fracções em que, (ao contrário da fracção G₅) apresenta um incremento dominante de DMA, em resultado da digestão alcalina. É este o caso aliás da maioria das amostras e fracções digeridas.

Os arsenoribosidos dimetilados mais leves, solúveis na água e produzindo DMA por digestão, seriam os candidatos naturais a constituintes dessa fracção ARD. Estão, no entanto, no limiar do "cut-off" das membranas AMICON Diaflo YC05 (ver 6.5.1) pelo que, pelo menos para a amostra processada por ultrafiltração esta sugestão não se confirma. Uma alternativa, que, aparentemente, reúne todas as condições, será a de um composto resultante da degradação destes mesmos arsenoribosidos, como por exemplo o ácido láctico dimetilarsenoilo (Benson, 1990).

Assim, concluindo, parece provável a presença de arsenocolina nas águas do estuário do Tejo. Regista-se também a presença de um componente refractário indigerível distinto da arsenocolina e que não se identificou (TH₃, Ti₃-G_{9/M}). Este componente pode ser constituído fundamentalmente por tetrametilarsónio. A arsenobetaina estará também provavelmente presente, embora não seja inteiramente de excluir a ocorrência em alternativa de arsenoribosidos trimetilados. O arsénio refractário digerível deverá, no entanto, a maioria das vezes, ser constituído por outros compostos, eventualmente produtos da decomposição dos arsenoribosidos dimetilados.

Naturalmente que todo este conjunto de hipóteses se reveste de um carácter relativamente especulativo pelo que é possível que experimentação ulterior (quanto mais não seja pela identificação de compostos não incluídos no conjunto considerado) o venha a infirmar em vez de confirmar.

A identificação definitiva dos compostos em causa requiere, em todo o caso, a colheita, concentração e purificação de material em quantidade suficiente para ser sujeito a um número considerável de manipulações do âmbito da análise química. Requiere também, eventualmente, o recurso a técnicas mais sofisticadas de acoplagem de sistemas cromatográficos e espectrometria de massa. Prosseguem no laboratório esforços nesse sentido.

7.4 - Novas perspectivas no domínio da biogeoquímica do arsénio

7.4.1 - Da biotransformação do arsénio em meio estuarino

No estado actual do conhecimento na matéria parece evidente que a análise da reciclagem biogeoquímica do arsénio em meio estuarino requiere o estabelecimento de um "rationale" que permita estruturar o discurso e a investigação, compensando os hiatus e indeterminações que actualmente se verificam. Não pode em todo o caso, aparentemente, esse desiderato ser assegurado pela compreensão do processo metabólico da biotransformação deste elemento, como sugerido por Irgolic (Bottino et al., 1978) uma vez que, nesta área, se registam também substanciais

alterações de perspectiva.

Parece portanto essencial, neste contexto, sistematizar a informação existente e nomeadamente reexaminar alguns pontos de que depende criticamente a arquitectura do sistema.

Pode assim constatar-se que:

A) O isolamento em extractos de algas, de estruturas trimetiladas que apresentam um núcleo ribósido bem identificado (Shibata & Morita, 1988a) parece alterar consideravelmente as perspectivas existentes em matéria de biossíntese dos organoarsenicais.

Parece evidente, com efeito, que a metilação sequencial dos compostos de arsénio não só prossegue efectivamente até ao estágio trimetilado como é susceptível de o fazer em simultâneo e cumulativamente com a transferência de um grupo adenosilo, eventualmente da S-adenosilmetionina.

O mecanismo activo nas últimas etapas deste processo está, no entanto, longe de ser bem compreendido. Com efeito, são conhecidas as objecções à redução e metilação subsequente de compostos do tipo $O:As(CH_3)_2R$ (ver atrás 7.2) e também não é claro que a trimetilarsina possa atacar directamente a S-adenosilametionina (Cullen et al., 1984, Edmonds & Francesconi, 1988). Thayer e Brinkmann (1982) sugerem, no entanto, a tetrametilação do arsénio por este mecanismo e de qualquer modo parece evidente que, de uma maneira ou de outra,

ela deve ter lugar uma vez que se identificam compostos naturais com a estrutura $(\text{CH}_3)_4\text{As}^+ \text{X}^-$ (Shiomi *et al.*, 1988, Cullen & Dodd, 1989). Não parece fácil por outro lado, pela posição do núcleo ribosido, explicar a produção dos trimetilarsenoribosidos isolados a partir do mecanismo teórico sugerido por Phillips e Depledge (para a biossíntese dos arsenoaçúcares como sub-produtos da síntese dos arsenolípidos) (Phillips & Depledge, 1985).

Sugere-se assim, por analogia com o previsto por Cantoni (1960) e proposto por Edmonds e colaboradores para os dimetilarsenoribosidos, a formação de um composto intermediário segundo o esquema representado na Fig. 62. Este intermediário pode, aparentemente, por hidrólise enzimática da adenina e posterior reacção com os metabolitos disponíveis das algas (Edmonds & Francesconi, 1988a) produzir, as estruturas conhecidas dos arsenoribosidos em causa. Como o seu análogo dimetilado este composto não foi, no entanto, até agora isolado pelo que esta sugestão carece também de confirmação experimental.

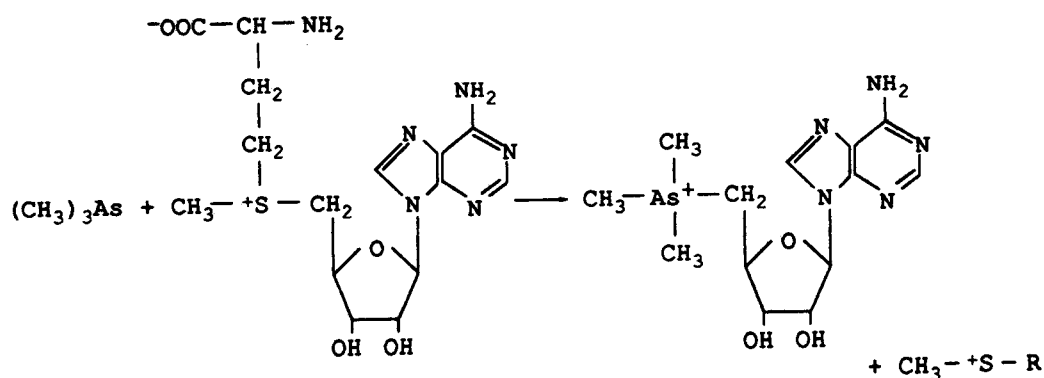


Fig. 62 - Eventual formação de um intermediário tetraalquilado a partir da trimetilarsina e da S-adenosilmetionina.

B) Parece admissível que a degradação destas estruturas trimetiladas se dê pela clivagem da ligação C₃-C₄ do núcleo ribosido, segundo um mecanismo análogo ao admitido para a degradação dos dimetilarsenoribosidos a dimetiloxarsiletanol (Edmonds *et al.*, 1982, Edmonds & Francesconi, 1988a), de acordo com o esquema representado na Fig. 63.

Esta transformação que, tudo indica poder dar-se na natureza por intervenção dos mesmos enzimas (e grupos de microorganismos) intervenientes nos ensaios de Edmonds e colaboradores (1982), estabelece uma relação directa entre os trimetilarsenoaçúcares identificados em extractos de algas e macrófitos (Shibata & Morita, 1988; Benson, 1988a) e a arsenocolina detectada em extractos de água de estuário, no âmbito deste trabalho (7.3.1).

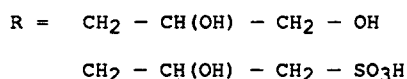
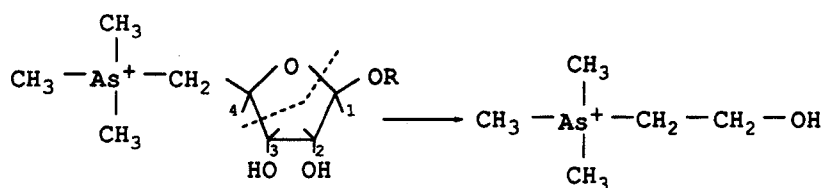


Fig. 63 - Degradação dos arsenoribosidos trimetilados a arsenocolina

A análise desta relação é aliás inevitável uma vez estabelecida a presença, em algas, de compostos tetralquilados de arsénio que, mais facilmente que o dimetiloxarsiletanol, podem

constituir precursores de arsenocolina/arsenobetaina.

Alguns autores sugerem ainda a clivagem da ligação C₂-C₃ do núcleo ribosido e a conseqüente formação de trimetilarsónio lactato, TMAL, (Benson, 1988a). Este é susceptível de, por sua vez, descarboxilar a arsenocolina (Christakopoulos, 1989), aparentemente segundo o mecanismo:

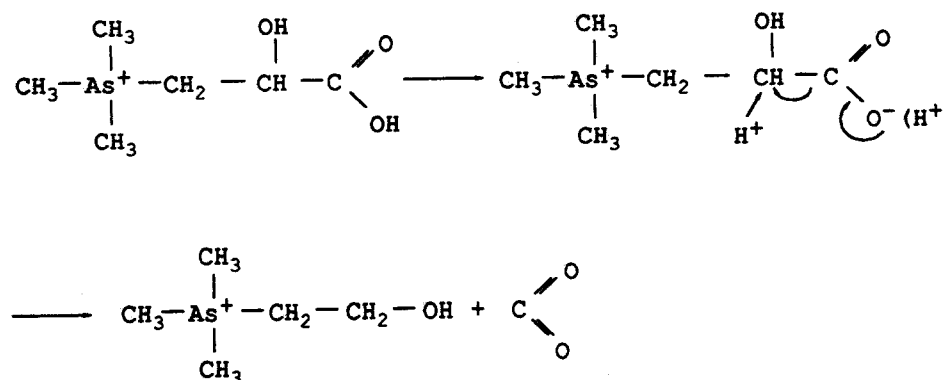


Fig. 64 -Descarboxilação do trimetilarsónio lactato a arsenocolina

Não se dispõe, em todo o caso, de base experimental para sugerir que este conjunto de transformações se possa dar, em meio estuarino, metabolicamente. O trimetilarsónio lactato, não foi, aliás, metabolizado a arsenobetaina nos ensaios efectuados com esse objectivo (Benson et al., 1981).

Assim, haveria que encarar a hipótese da pura degradação química do TMAL o que, dada a sua estabilidade e resistência (Benson et al., 1981), deverá constituir um processo lento.

Trata-se portanto, aparentemente, de um mecanismo menos provável, embora possível.

O produto imediato, estável e refractário, deste segundo esquema, será, no entanto, em qualquer caso, a arsenocolina* e, como o primeiro, este mecanismo evita as dificuldades atrás referidas para a pressuposta biometilação redutiva do dimetiloxarsiletanol a arsenocolina (7.3).

C) Investigação anterior (Mann et al., 1938; Welch & Landau, 1942; Marafante et al., 1984) estabeleceu também a biotransformação "in vitro" e "in vivo" (mamíferos) da arsenocolina em arsenobetaina via arsenobetaina aldeído. Em particular os detalhados ensaios de Norin, Christakopoulos e colaboradores permitiram estabelecer a exequibilidade dessa transformação pela colina dehidrogenase (pelo mesmo mecanismo da conversão da colina em betaina aldeído) (Christakopoulos et al., 1988). O aldeído da arsenobetaina será então convertido, nas mitocôndrias, a arsenobetaina pela betaina aldeído dehidrogenase. Um sub-produto desta oxidação é o TMAO que por redução ulterior dá ainda TMA.

* A arsenocolina detectada na água pode também resultar da degradação de outro tipo de compostos. Vários autores estabeleceram, com efeito, a possibilidade da incorporação da arsenocolina em lípidos animais (Welch, 1936, Man et al., 1938, Welch & Landau, 1942, Marafante et al., 1984) e trabalhos recentes sugerem de novo a fosfatidilarsenocolina como estrutura resultante dessa incorporação (Hirayawa et al., 1989).

Verifica-se no entanto, a aparente incompatibilidade deste último composto (e também dos lípidos em geral) com as principais fracções de arsénio refractário detectadas no âmbito deste trabalho, nas águas do estuário. Por outro lado ao sugerir a presença da arsenocolina, em resultado da degradação de uma estrutura onde este composto foi previamente incorporado não se adianta qualquer explicação para a sua própria biossíntese que permanece portanto como a questão principal.

Consequentemente, sem negar a verossimilhança deste mecanismo enquanto origem complementar do material identificado na água, parece evidente a sua insuficiência no contexto dos factos estabelecidos que é preciso explicar.

A conversão da colina em betaina nos peixes (Watts & Watts, 1974) sugere que nestes animais os mecanismos de biotransformação sejam semelhantes aos dos mamíferos*.

Para todos os efeitos a arsenobetaina parece ser o principal produto final do metabolismo do arsénio, nos animais marinhos. Estudos relativos à sua degradação comprovam por outro lado, a intervenção dos mecanismos de reciclagem referidos atrás em 3.4.3 com produção, por degradação microbiana sedimentar, de TMAO, e, a partir deste, de TMA, DMA, MMA, As^{3+} e As^{5+} (Hanaoka et al., 1987c, Kaise et al., 1987, Hanaoka et al., 1988, Christakopoulos, 1988, Hanaoka & Tagawa, 1989). O esquema correspondente representa-se na Fig. 65.

Um aspecto importante deste mecanismo é, em todo o caso, a sua estreita dependência da presença de um sistema enzimático específico (Christakopoulos et al., 1988).

Assim, e embora outros mecanismos se possam conceber para a oxidação da arsenocolina a arsenobetaina, não parece haver base para generalizar a sua presença aos vários compartimentos do sistema estuarino, o que, em parte, poderá explicar as diferenças referidas atrás a propósito do Quadro 7-1.

Alguns autores prevêm ainda teoricamente que a arsenobetaina possa descarboxilar a $(CH_3)_4As^+ X^-$ (Irgolic, 1986).

* A presença do necessário sistema enzimático sugere também que a acetilarsenocolina doseada em peixes, é produzida "in vivo" (Norin et al., 1983, Christakopoulos, 1988).

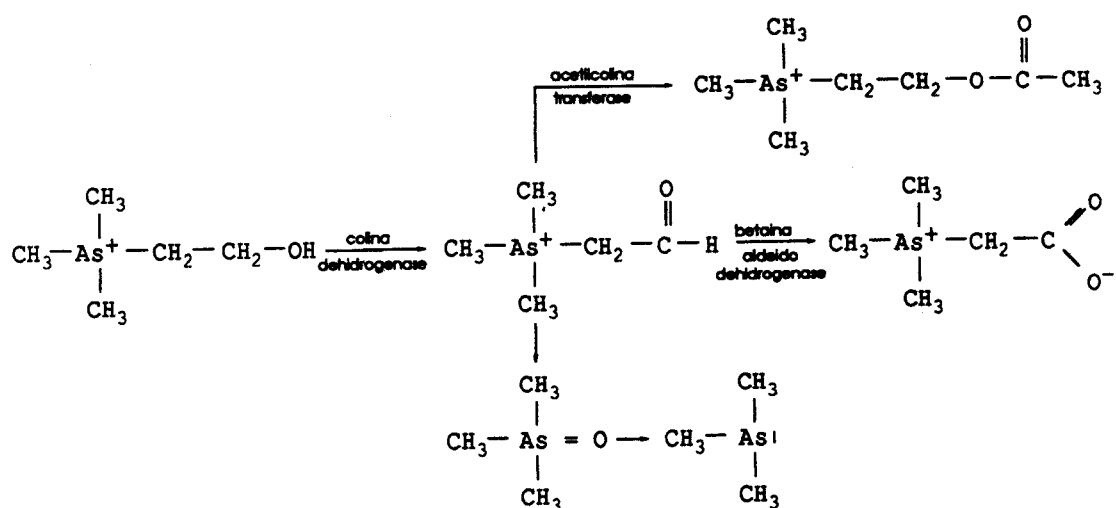


Fig. 65 - Conversão da arsenocolina a arsenobetaina, acetilarsenocolina, TMAO e TMA (segundo Norin e colaboradores)

(Reproduzido de Christakopoulos, 1988)

D) A comprovada ocorrência de arsenoaçúcares trimetilados sugere por outro lado a presença eventual, em algas, de estruturas análogas na fracção lípidica.

Os arsenoaçúcares presentes no tecido algal têm, com efeito, sido sempre entendidos como intermediários do metabolismo dos arsenolípidos, seja na sua síntese seja na sua degradação (Benson, 1987; Edmonds & Francesconi, 1988a). A hidrólise dos arsenolípidos conduz efectivamente à formação de arsenoribosidos solúveis na água (Klump & Peterson, 1981, Benson & Nissen, 1982, Edmonds & Francesconi, 1982, 1983, 1987a) e, por outro lado, este tipo de compostos foi sugerido por Lunde e observado por Klump como intermediário na biossíntese dos arsenolípidos (Lunde, 1973, 1977, Klump & Peterson, 1981).

Deve ainda recordar-se que Bottino e colaboradores terão obtido TMA, pela digestão alcalina de uma fracção lípidica, extraída de *Tetraselmis chuii* (Bottino et al., 1978).

A produção de arsenolípidos a partir do composto postulado (Fig.62) requer, aliás, apenas a substituição da adenosina ou da adenina pelo fosfatidilglicerol e sua esterificação (Benson et al., 1988). Do mesmo modo a adição de um grupo fosfatido e a esterificação dos dois hidroxilos do grupo terminal glicerol por ácidos gordos é suficiente para converter o composto (D⁺), de Benson, num arsenolípido trimetilado (Edmonds & Francesconi, 1983, 1987a, 1988b). Uma fórmula possível para estas estruturas lípidas trimetiladas será portanto a indicada na Fig. 66.

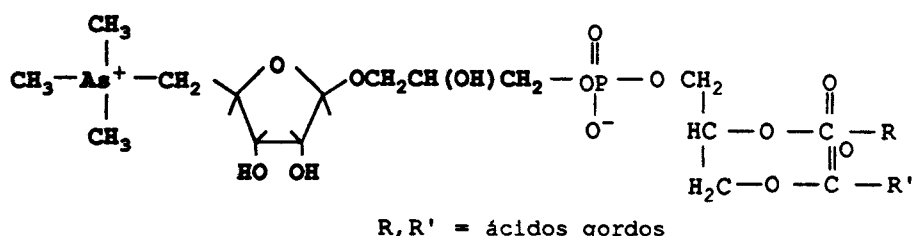


Fig. 66 - Estrutura possível de um arsenolípido trimetilado

Parece também razoável admitir que, a existirem na natureza, estes compostos detenham, pelo menos em relação aos compostos tetralquilados do arsénio (como sugerido para os arsenolípidos em geral (Klumpp, 1979, Benson, 1987)) uma posição determinante no seu metabolismo do arsénio em algas. A sua degradação deverá portanto produzir os arsenoribosidos trimetilados identificados.

Em resumo e sintetizando o conjunto de mecanismos e processos que se analisaram sequencialmente, sugere-se, como trajectória alternativa para biotransformação do arsénio em meio estuarino, o esquema global representado na Fig.67.

Nele os produtores primários sintetizam a partir do arseniato dissolvido, arsenolípidos (di e trimetilados) que posteriormente se degradam a arsenoribosidos. Os trimetilarsenoribosidos convertem-se, pelos mecanismos sugeridos atrás em B), em arsenocolina, ou, em alternativa, em trimetilarsenolactato, que posteriormente descarboxila a arsenocolina. Os dimetilarsenoribosidos, resultantes da hidrólise dos dimetilarsenolípidos, poderão também produzir arsenocolina via dimetiloxarsiletanol (como sugerido por Edmonds e colaboradores, (1982, 1987a)).

A arsenocolina constitui assim o composto central deste esquema. É subseqüentemente metabolizada a acetilarsenocolina, arsenobetaina, TMAO e TMA através de diferentes mecanismos de acção enzimática (C) (Christakopoulos, 1988).

O TMA pode ser tetrametilado a tetrametilarsónio (Mayer, 1984).

A arsenobetaina descarboxila também eventualmente a $(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$ que, por sua vez, se converte em TMAO. Este demetila a DMA e MMA que finalmente demetila a arseniato refazendo o ciclo.

7.5.2 - O arsénio refractário e a origem da arsenobetaina

O esquema que acima se propõe para a biotransformação do arsénio em meio estuarino (Fig.67) não localiza, com precisão, os mecanismos e processos sugeridos, nos diversos compartimentos e níveis do ecossistema estuarino. Tal alocação seria, com efeito prematura, e muito mais informação deverá ser recolhida antes de poder ser correctamente efectuada.

Parece possível, em todo o caso, proceder, neste contexto, a um reexame da questão da origem da arsenobetaina.

Com efeito, como se viu, o conjunto de mecanismos propostos para a sua concentração em tecidos animais marinhos enfrenta dificuldades (7.2). Parte dessas dificuldades advêm, em nosso entender, de se ter admitido, numa base insuficiente de evidência experimental, da não ocorrência, na água, de concentrações significativas de compostos orgânicos do arsénio percursores (ou intermediários) no processo da concentração/metabolização da arsenobetaina. Não se detectando este grupo de compostos na fase líquida forçoso é admitir a rapidez do processo de assimilação a partir da água e/ou a selectividade das transferências ao longo da cadeia trófica (Edmonds & Francesconi, 1987a, 1988a). Esta situação encoraja também certo número de hipóteses explicativas para a não detecção na coluna de água de compostos do "tipo dos encontrados nos extratos de algas" em resultado da excreção/mineralização do material celular fitoplanctónico (Benson et al., 1980, Andreae, 1983, 1986).

A recente identificação do éster sulfatado de um arsenoribosido no líquido sobrenadante de uma cultura de fitoplâncton, infirma esta posição, até agora dominante e clarifica resultados anteriores (Herrera-Lasso & Benson, 1982, Benson, 1988b). Não equivale, no entanto, a uma detecção em águas naturais.

Assim a detecção e quantificação, nas águas do estuário do Tejo, de arsénio refractário aos métodos mais sensíveis de determinação analítica corrente (6.3 e 6.4) constitui uma peça de evidência significativa.

A magnitude relativa da fracção refractária detectada, 18 a 20%, encoraja aliás, só por si, a ideia de uma reciclagem preferencial do "stock" de arsénio disponível através da fase líquida do sistema estuarino.

A eventual presença da própria arsenobetaina nas águas do estuário (ver atrás 7.3.2) confere também renovado interesse aos resultados de experimentação recente que estabelece a exequibilidade da sua absorção directamente a partir da água, por *Mytilus edulis* (Francesconi & Edmonds, 1987, 1989).

A nossa sugestão, com base na evidência recolhida é, no entanto, a de que esse transporte preferencial será essencialmente assegurado por compostos orgânicos de arsénio refractários ao método dos hidretos e também à digestão alcalina pelo que permaneceram, até agora, indetectados. É o caso da arsenocolina e/ou de alguns dos seus percursores.

A afinidade deste composto para a fracção lipídica explica aliás a sua diferente dinâmica interna nos organismos e, em particular a sua acrescida retenção nos receptores secundários, quando comparada com outros organoarsenicais (Marafante et al., 1984).

Este facto poderá explicar a maior eficiência e selectividade da assimilação por animais marinhos deste tipo de compostos (Francesconi & Edmonds, 1989).

O esquema sugerido (Fig. 67), sendo qualitativo, apresenta, no entanto, também dificuldades, nomeadamente a de explicar, em alternativa aos esquemas anteriores (Thayer, 1984, Andreae, 1986a, Irgolic, 1986, Christakopoulos, 1988) como podem as quantidades de arsenoribosidos trimetilados detectadas num número limitado de produtores primários, estar na origem das apreciáveis quantidades de arsenobetaina que se detectam na generalidade dos animais marinhos.

O facto de os trimetilarsenoribosidos terem sido até agora identificados apenas numa espécie fitoplanctónica (*Chaetoceros gracilis*) e num macrófita (*Sargassum tumbergii*) não parece, no entanto, particularmente limitativo do seu papel no metabolismo estuarino do arsénio.

Com efeito, e como já referido, numeroso grupo de compostos orgânicos do arsénio com particular relevância para a fracção lipídica, detectados e isolados em material biótico, nomeadamente em algas (ver atrás 7.1.2) aguarda identificação.

A magnitude relativa da fracção não identificada variará aliás de espécie para espécie e parece difícil admitir que seja constituída, em todos os casos, exclusivamente por arsénio residual proteico (Quadro 7-4).

Acontece também, por outro lado, que um baixo "standing crop", nos tecidos dos produtores primários não é necessariamente incompatível, com altas taxas de metabolização e reciclagem das fracções organoarsenicais, no conjunto de ecossistema.

QUADRO 7-4

**ARSINA, METILARSINA, DIMETILARSINA, E TRIMETILARSINA
IDENTIFICADAS EM EXTRACTOS DE METANOL DE ORGANISMOS MARINHOS
NA SEQUÊNCIA DA DIGESTÃO ALCALINA**

ORGANISMO	Arsénio ($\mu\text{g g}^{-1}$) como:					
	AsH ₃	CH ₃ AsH ₂	(CH ₃) ₂ AsH	(CH ₃) ₃ As	N.I. /%	Arsénio Total
Mariscos						
<i>Batillus cornutus</i>	0	0,03	0,13	1,29	0,19/12	1,64
<i>Crassostrea gigas</i>	0	0	0,17	6,15	3,63/36	9,95
<i>Mytilus edulis</i>	0	0	0,07	2,01	2,28/52	4,36
<i>Kellettia lischkei</i>	0	0,07	1,32	90,39	34,14/27	125,92
Peixes						
<i>Engraulis japonica</i>	0	0,05	0,01	2,01	0,26/11	2,33
<i>Sardinops melanosticta</i>	0	0,01	0,01	4,07	0,42/9	4,51
<i>Stephanolepis cirrhifer</i>	0	0	0,04	2,81	1,5/34	4,35
Crustáceos						
<i>Panaeus semisulcatus</i>	0	0	0	3,42	0,03/1	3,45
<i>Panulirus japonicus</i>	0	0	0,14	42,22	19,65/32	62,01
<i>Plagusia dentipes</i>	0	0	0,15	44,99	1,73/4	46,87
Macrófitos						
<i>Laminaria japonica</i>	0	0	36,48	1,07	12,21/25	49,76
<i>Hizikia fusiforme</i>	1,47	0	33,01	3,86	2,97/7	41,31

N.I. - não identificado

(Adaptado de Kaise et al., 1988)

Muito pelo contrário e como acontece para o próprio carbono um baixo "standing crop" pode ser consequência directa de uma alta taxa de reciclagem.

O mesmo se passará aliás nos tecidos animais com a arsenocolina, onde precedendo a arsenobetaina, ocorre no entanto em quantidades muito menores (0,1-5% do arsénio total) difíceis de detectar (Christakopoulos, 1988).

A questão das quantidades de arsenoribosidos armazenadas na biomassa dos produtores primários só faz sentido aliás na perspectiva da concentração preferencial da arsenobetaina através da cadeia trófica.

Assim a questão da sua origem não parece estar tanto na exequibilidade da biometilação ou na representatividade do conjunto das algas em que se detectam compostos tetralquilados de arsénio como na identificação da principal trajectória seguida pelo processo conducente à concentração da arsenobetaina em tecido animal. E constata-se, neste entendimento, que a hipótese, várias vezes admitida mas nunca confirmada, da assimilação directa (dos seus percursores) a partir da água parece ser o mecanismo de acumulação mais provável. Tratar-se-á assim, aparentemente, de um efeito contínuo de acumulação compatível com baixos níveis de "background" e que não requer fluxos de assimilação acelerados. Não requerendo por outro lado explicações funcionais complexas será também, compatível com uma grande variedade de sistemas o que poderá, em parte, explicar a ubiquidade da arsenobetaina.

A manter-se a hipótese da concentração preferencial a partir da água, parece essencial no entanto explicar por que razão, (sendo os métodos utilizados praticamente equivalentes), não se

detecta no Golfo do México mais de 1-2% de arsénio refractário (Andreae, 1983c, 1986a, 1988) enquanto que no estuário do Tejo essa fracção atinge praticamente os 20% (Quadro 6-15).

Pode observar-se, naturalmente, a diferença do nível de concentrações que se verifica, em geral, entre os dois corpos de água acima referidos e que aproxima qualquer determinação no Golfo do México dos limites de detecção praticáveis.

No entanto, sem negar inteiramente a pertinência destes factos, há que reconhecer que 20% das concentrações médias encontradas nas águas oceânicas, (Quadro 3-7), ou mesmo dos 0,1 ppb admitidos por Francesconi e Edmonds (1987) para a Baía de Perth, estão muito acima dos limites de detecção, quer absolutos quer relativos, praticáveis pelo método dos hidretos (Quadro 5-2).

Pareceu assim útil reexaminar os métodos de colheita utilizados tendo-se constatado que Andreae, como Peterson e Carpenter, evitam cuidadosamente a contaminação das amostras de água recolhidas para análise pela microcamada superficial do oceano (Andreae 1978, 1983b, Peterson & Carpenter, 1986). O mesmo não acontece com a técnica de amostragem adoptada em geral no âmbito deste trabalho para recolha de amostras de superfície (ver atrás 5.1). Assim, uma hipótese alternativa que parece pertinente (e que apesar de tudo merece um esclarecimento definitivo no futuro) é a de o carácter anfipático dos arsenolípidos produzidos pelo "pool" do fitoplâncton estuarino (Benson, 1987) induzir a sua concentração preferencial na

microcamada superficial.

Uma situação deste tipo explicaria facilmente um acréscimo na concentração total do arsénio dissolvido da ordem de 20%. Será aliás análoga ao que, aparentemente, se passa com os compostos orgânicos do estanho (Donard, 1989, Mathias et al., 1989).

Howard no entanto, detecta uma fracção refractária do arsénio em Southampton Water, aparentemente equivalente ao nosso arsénio refractário recolhendo amostras de água com uma garrafa "GO-FLOW" (Howard, 1989b).

Interessa assim analisar outras linhas de argumentação nomeadamente a da variabilidade do comportamento metabólico do fitoplâncton, em diferentes coordenadas geográficas.

Com efeito se o principal mediador da reciclagem do arsénio, em estuários, parece ser, de um modo geral, o "pool" de fitoplâncton estuarino já a sua capacidade de biotransformação apresenta considerável variação interespecífica mesmo entre espécies do mesmo género (Sanders, 1986). *S. costatum*, por exemplo, pode produzir só As^{3+} (Johnson & Burke, 1978) ou As^{3+} e DMA (Sanders & Windom, 1980) enquanto que outras diatomáceas podem produzir As^{3+} , DMA e pequenas quantidades de MMA. Os coccolitoforídeos, por outro lado, especializara-se na produção de As^{3+} , e um criptofito, *Chroomonas* sp., apresenta picos de biomassa associados a grandes concentrações de MMA (Sanders, 1986).

A razão desta diferenciação não é clara embora se admita que na sua base estejam diferenças de composição bioquímica*.

As suas consequências biogeoquímicas parecem, no entanto, claras e traduzem-se numa diferente especiação do arsénio dissolvido em estuários com diferentes populações fitoplanctónicas (Sanders, 1986).

A ubiquidade do fenómeno da presença da arsenobetaina não parece no entanto, compatível com essa variabilidade.

Assim parece importante referir que (independentemente da variação interespecífica acima enfatizada) subsistem, dum modo geral, consideráveis diferenças de ordem ecológica e ecofisiológica entre espécies de fitoplâncton estuarino e espécies de fitoplâncton marinho, nomeadamente no que respeita à sua capacidade de assimilação e reciclagem das diferentes espécies de arsénio (Sanders, 1986). É de esperar, efectivamente, que comunidades fitoplanctónicas dominadas por espécie oportunistas de rápido crescimento e adaptadas a um ambiente instável, rico em nutrientes, como são as estuarinas (Martins *et al.*, 1982) processem maiores quantidades de arsénio que espécies oceânicas adaptadas a um ambiente estável e oligotrófico (Sanders, 1986). A taxa de reciclagem e biotransformação do arsénio tenderá, portanto, de um modo geral, a ser sensivelmente superior em estuários.

* Admite-se, que nem todas as algas tenham os enzimas necessários à metabolização do MMA e enfatiza-se, a este propósito, que a conversão da fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina requer duas metiltransferases diferentes (Hirata *et al.*, 1978).

Poderá ainda eventualmente admitir-se que os principais produtores da fracção refractária sejam organismos dependentes do "habitat" costeiro (e ausentes do ecossistema "marinho" propriamente dito), como macrofitos fixos ou angiospérmicas.

Por outro lado os arsenicais metilados são extremamente estáveis quimicamente e mesmo por meios biológicos demetilam muito lentamente (Sanders, 1979b)). Estas características parecem extrapoláveis aos organoarsénicais mais pesados dada a sua estabilidade térmica, o seu carácter refractário à formação de hidretos e à digestão básica e a sua comprovada resistência à demetilação química (Welch & Landau, 1942; Du Vigneaud, 1952; Christakopoulos, 1988).

Assim, a assimetria biossíntese > demetilação associada ao mecanismo de "trapping" do estuário tenderá, de um modo geral, a promover a acumulação dos organoarsenicais refractários em meio estuarino, em contraste com o que se passa em pleno oceano e em áreas menos produtivas.

7.6 - Significado toxicológico e ecotoxicológico

Apesar do afluxo considerável de arsénio que se localiza na área da Quimigal (6.1) as concentrações determinadas não excedem, no estuário do Tejo em geral, para nenhuma das espécies determinadas, os "standards" actualmente aplicáveis a águas estuarinas. Apenas as amostras CUF I e CUF II apresentam, com efeito, na campanha III, concentrações superiores às recomendadas pela EPA para águas marinhas e estuarino-marinhas

(50 μg de As_{tot} x L^{-1} , EPA, 1973). Os "standards" para águas de captação e distribuição são da mesma ordem de grandeza (Train, 1979, Ferrante & Berlin, 1981).

Atribui-se em grande parte este facto às excelentes condições de escoamento do estuário.

As concentrações observadas para o As^{5+} excedem, no entanto, as concentrações-guia propostas pelas mesmas entidades (EPA, 1973) para os mesmos sistemas (10 μg As L^{-1}). Parece assim admissível que o nível de concentrações detectado, tenha efeitos tóxicos letais ou sub-letais sobre as componentes mais sensíveis do ecossistema estuarino, nomeadamente as suas populações fitoplanctónicas (Sanders, 1979a, Hollingbaugh et al., 1980).

Apresentam-se assim na Fig. 68 juntamente com as concentrações de As^{5+} determinadas na campanha I as correspondentes concentrações de clorofila *a*, que se tomam como indicador grosseiro da produção primária do fitoplâncton (Ryther & Yentsch, 1957).

Deste conjunto de resultados parece decorrer claramente que, (para além de factores físicos como turbidez, diluição e sedimentação (ver atrás 4.2)) efeitos tóxicos podem também contribuir para a diminuição da biomassa fitoplanctónica que se observa no corpo central do estuário.

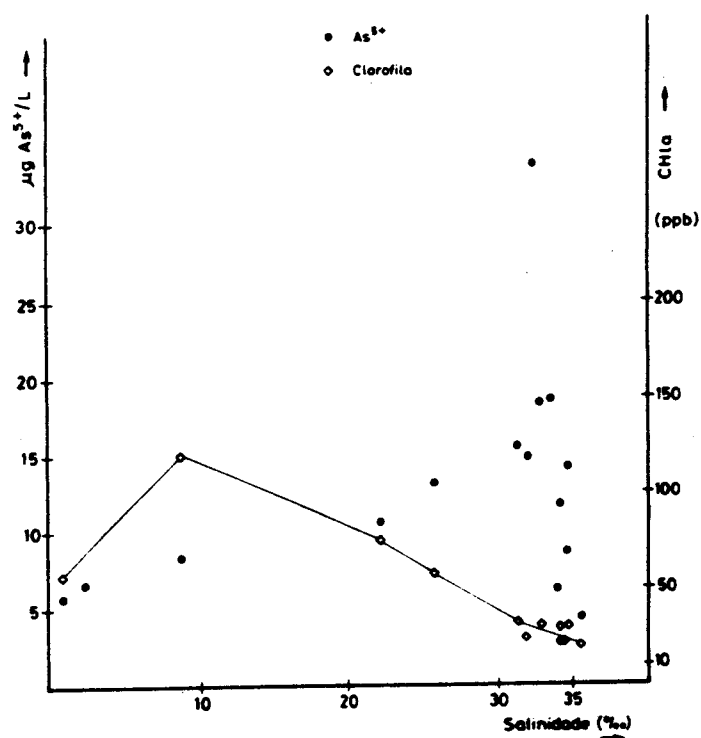


Fig. 68 - Distribuição das concentrações de As^{5+} e da clorofila *a* (campanhas I)

A evidência apresentada não é no entanto suficiente para que se possa atribuir claramente ao arsênio dissolvido (actuando sinergicamente com um conjunto muito variado de outros contaminantes, (Bettencourt et al., 1980b)) um papel dominante nesse processo.

A eventual ocorrência desses efeitos suscita, no entanto, a questão da capacidade dos "standards" em vigor para cobrir todo o espectro de situações de intoxicação, aguda e sub-aguda, dos vários componentes do sistema estuarino (Zielhuis & Wibowo, 1984).

Foi já referida, com efeito, a inexistência de uma clara margem de segurança entre os níveis tóxicos sub-letais e os níveis de exposição actual correntes para populações humanas (ver atrás 3.5). Não pode, portanto, considerar-se como inteiramente seguro do ponto de vista da saúde pública um estuário em que circulam anualmente de 200 a 1.000 ton de arsénio, em grande parte inorgânico, e no qual um conjunto muito variado de mecanismos de transporte e exposição para o Homem não foram até hoje investigados.

A questão da carcinogenicidade do arsénio não está aliás de modo nenhum encerrada e, a comprovar-se a nova evidência apresentada relativamente à sua capacidade de induzir neoplasias (Benson, 1989b), os níveis de exposição directa admissíveis serão certamente reduzidos (Zielhuis & Wibowo, 1984).

Esta questão depende, no entanto, decisivamente, da nossa capacidade para entender os mecanismos biogeoquímicos que controlam a especiação actual deste elemento no meio ambiente estuarino.

A estabilidade térmica, química e metabólica pressuposta para a fracção refractária detectada, sugere com efeito ainda (pela regra da toxicidade inversa da estabilidade (ver atrás 3-5)), um carácter relativamente inócuo em termos de saúde pública e ecotoxicologia para os seus componentes.

Por outro lado o peso desta fracção no computo geral do arsénio

orientações em matéria de reciclagem biogeoquímica deste elemento), que um mecanismo de desintoxicação, significativo à escala geoquímica poderá estar activo, para este elemento, no estuário do Tejo. A identificação do conjunto de processos que o constituem e o estudo criterioso dos mecanismos nele eventualmente envolvidos poderá assim vir a revelar-se, no futuro, do maior interesse prático.

7.7 - Limitações e dificuldades que se mantêm

Referiram-se atrás as principais dificuldades que se levantam ao estudo da especiação do arsénio em águas naturais, em consequência da insuficiente capacidade dos métodos analíticos de que actualmente se dispõe.

Em parte essas dificuldades têm a ver com as quantidades de material correntemente disponíveis para análise que, sendo mínimas, reduzem consideravelmente o espectro dos métodos analíticos praticáveis.

São também consequência da complexidade das matrizes em que se procede ao seu isolamento e consequente nível de interferência com o método analítico adoptado.

A ocorrência, numa mesma amostra, de um espectro variado de compostos de arsénio, com propriedades físicas e químicas muito diferentes ou muito semelhantes, pode ainda diminuir o rendimento dos procedimentos de concentração e isolamento e inviabiliza, por vezes, a sua detecção simultânea. É o caso dos

compostos orgânicos de arsénio mais pesados, térmica e quimicamente estáveis, refractários ao método dos hidretos e que competem com os reagentes que formam pares-iónicos utilizados em cromatografia (Irgolic, 1988). A sua detecção e quantificação implicam, em consequência, a utilização de métodos específicos incompatíveis com a detecção de outros compostos (Christakopoulos, 1987).

A identificação das espécies "matriciais", nomeadamente complexos, particularmente relevantes sob o ponto de vista toxicológico, parece também exceder, como referido, a capacidade analítica disponível, pelo que o seu estudo deverá aguardar o afinamento de técnicas mais delicadas, eventualmente aplicáveis "in situ" (Irgolic, 1988).

Este conjunto de questões é particularmente pertinente para a fase líquida na medida em que os baixos limites de detecção, que nela é forçoso praticar, restringem consideravelmente a escolha do método analítico.

No nosso caso mesmo a utilização de técnicas tão sensíveis como a espectrometria de massa depara com a insuficiência do material disponível (no termo do processo de concentração/purificação) relativamente aos limites de detecção praticáveis (ver atrás 6.5.5).

Por outro lado a complexidade das matrizes, nomeadamente das águas de estuário e fracções delas obtidas, complica o quadro das reacções possíveis, em procedimentos aparentemente tão

simples como a digestão básica, e confere um grau de incerteza considerável à interpretação dos seus resultados "característicos" (ver atrás 6.3).

Parece no entanto altamente provável que a disponibilização de técnicas mais sofisticadas venha a permitir, num futuro próximo, a identificação de um numeroso conjunto de compostos de arsénio já detectados mas até agora não completamente identificados. Entre eles contam-se os compostos "menores", correntemente negligenciados nos cromatogramas e electroforetogramas, mas cujo conhecimento é indispensável à compreensão plena dos mecanismos bioquímicos e biogeoquímicos que os produzem.

A questão da especiação do arsénio em meio aquático parece assim estar ainda numa fase preliminar.

Por outro lado, para além das dificuldades de carácter geral acima referidas, (que afectam necessariamente qualquer investigação que se produza neste momento na matéria), há que reconhecer ainda que o conjunto de sugestões apresentado neste trabalho para a biotransformação do arsénio e a sua reciclagem em meio estuarino, se apoia num conjunto limitado de evidência directa.

Não pode portanto, em nosso entender, no momento presente, a propósito deste processo, pretender-se mais que, com base na evidência segura disponível e no que pareça razoável admitir relativamente aos mecanismos nele directamente envolvidos,

formular hipóteses que venham a adquirir aceitação.

Muito mais informação deverá portanto ser recolhida, directamente dos sistemas naturais em estudo ou indirectamente em situações experimentais, antes de o esquema acima proposto (Fig. 67) poder ser considerado como uma aproximação razoável da realidade.

A sua utilidade consiste, em todo o caso, no facto de organizar sob forma de um conjunto coerente de proposições a evidência empírica e experimental existente permitindo a sua clara infirmação ou confirmação, em parte ou na totalidade, por investigação posterior (Popper, 1959).

Essa também, em nosso entender, a sua legitimidade.

8 - CONCLUSÕES

Na sequência de trabalhos anteriores efectuou-se, no estuário do Tejo, o estudo das espécies de arsénio até agora conhecidas para o meio marinho (As^{3+} , As^{5+} , MMA e DMA).

Em particular procurou caracterizar-se a sua distribuição e comportamento em situações de estiagem e de invernias.

Ao contrário da investigação anterior examinou-se, no entanto, com maior detalhe, a especiação do arsénio nas águas do estuário, tendo-se detectado, pela primeira vez em água salgada, a presença de formas dissolvidas que por redução dão trimetilarsina.

A investigação desenvolvida subsequentemente com vista a esclarecer a origem destas formas trimetiladas permitiu ainda detectar e quantificar duas novas fracções de arsénio refractárias ao método dos hidretos que se distinguem entre si pela sua diferente sensibilidade à digestão alcalina.

O arsénio refractário detectado foi seguidamente submetido a um conjunto de procedimentos de concentração/purificação e análise destinados a obter indicações sobre as suas propriedades físicas e químicas e, nomeadamente, sobre a sua composição.

O conjunto de resultados obtidos permite concluir que:

a) A distribuição do arsénio dissolvido apresenta, no Tejo, um

desvio da diluição teórica fortemente positivo o que indica a existência de um afluxo considerável, deste elemento, dentro dos limites do estuário. Esta conclusão confirma resultados da investigação que nos precedeu. As estimativas por nós obtidas, para este "input", da ordem dos 1000-1500 Kg . dia⁻¹, excedem, no entanto, as estimativas anteriores.

b) Como se poderia esperar num estuário bem oxigenado como o Tejo, a espécie dominante, nas suas águas, é sempre ou quase sempre o arseniato, As⁵⁺, que perfaz em média 96% contra cerca de 2,7, 1, 2 e 1% de As³⁺, MMA e DMA respectivamente. O "ratio" As³⁺/As⁵⁺ apresenta portanto, na generalidade das situações, valores abaixo da média geral de 0,2.

c) O exame atento da evolução deste quociente ao longo do estuário sugere ainda que o compartimento sedimentar pode constituir uma fonte secundária de arsénio inorgânico para a coluna de água, eventualmente dominante em situações de acentuado hidrodinamismo, como é o caso da cheia.

d) Com excepção do que se verifica nas estações CUF I e CUF II, os níveis atingidos pelas diferentes espécies de arsénio doseadas não excedem, os "standards" aplicáveis a águas estuarino-marinhas (EPA, 1973). Excedem, em todo o caso, as concentrações-guia recomendadas para os mesmos sistemas e curvas obtidas para a distribuição do fitoplâncton, sugerem ainda que (em sinergia com um conjunto variado de outros contaminantes e também com factores físicos, químicos e sedimentares), a toxicidade do arsénio possa desempenhar um

papel no decréscimo da biomassa fitoplânctónica que se verifica no corpo central do estuário.

e) Em estiagem como em invernias, observa-se no estuário do Tejo, a presença de formas trimetiladas de arsénio detectáveis e quantificáveis pelo método dos hidretos. As suas concentrações não parecem respeitar uma sazonalidade marcada. Apresentam no entanto um ganho positivo dentro dos limites do estuário, cerca de $2,14 \text{ kg} \cdot \text{dia}^{-1}$, ganho que não pode resultar da contribuição do esgoto doméstico das populações marginais e que, conseqüentemente, se atribui a uma fonte interna. O TMA detectado deverá assim constituir fundamentalmente uma etapa intermédia do complexo ciclo biogeoquímico local do arsénio.

f) Verifica-se também a presença de uma fracção organoarsenical, refractária à produção de arsinas mas sensível à digestão pelo hidróxido de sódio. Esta fracção até agora desconhecida designou-se por Arsénio Refractário Digerível (ARD). A sua concentração mínima obtém-se por diferença entre fracções digeridas e não-digeridas. Verifica-se ainda, na generalidade destas digestões, um incremento preferencial de DMA. O teor desta fracção excede sempre nas situações observadas, as concentrações de MMA e de TMA.

g) A digestão total de amostras de água do estuário revela ainda a presença de outra fracção desconhecida refractária ao método dos hidretos e simultâneamente indigerível por digestão alcalina. Designou-se por Arsénio Refractário Indigerível (ARI). O seu teor, atinge entre 16 e 19% do teor total de

arsénio dissolvido, constituindo cerca de 80% do arsénio refractário que por sua vez constitui cerca de 90% do arsénio orgânico total.

h) A caracterização físico-química destas fracções refractárias sugere a não identidade dos compostos que as constituem apesar da convergência dos seus pesos moleculares ($MW \leq 210$). O arsénio refractário digerível detectado numa amostra colhida em estiagem é provavelmente constituído, em grande parte, por arsenobetaina. A informação obtida, é no entanto, também compatível com a presença de arsenoribosidos trimetilados. O arsénio refractário indigerível parece ser constituído em parte por arsenocolina (que para todos os efeitos foi identificada pela primeira vez num extracto de água) e em parte por outros compostos não identificados, cujas propriedades são convergentes com as do trimetilarsóniolactato e com as do tetrametilarsónio.

i) A biotransformação do arsénio em meio estuarino é um processo complexo cujos mecanismos estão longe de cabal esclarecimento. Constatada a existêntica de trimetilarsenoribosidos parece viável, no entanto, a sua degradação a arsenocolina, seja directamente, seja via trimetilarsónio lactato. A arsenocolina pode, subsequentemente, ser incorporada e biotransformada em arsenobetaina via arsenobetaina aldeído. A reciclagem e mineralização de arsenobetaina, composto terminal do metabolismo animal aquático, produzirá TMAO e eventualmente TMA, para além de arsénio inorgânico e de outras formas metiladas mais simples.

j) A identificação de trimetilarsenoribosidos sugere a existência de trimetilarsenolípidos que poderão deter uma posição dominante em relação ao metabolismo dos compostos de arsénio tetralquilados.

k) A detecção de uma fracção considerável de compostos de arsénio, refractários e indigeríveis, na água do estuário do Tejo sugere, que a reciclagem do "stock" de arsénio disponível se dá preferencialmente por uma via até agora negligenciada - a concentração directa a partir da água. Particularidades ecológicas ou ecofisiológicas dos produtores primários estuarinos e o mecanismo de "trapping" do estuário (associados à presumida estabilidade desta fracção), podem explicar a discrepância destes resultados com resultados de investigação anterior.

l) A aparente estabilidade térmica, química e metabólica da fracção refractária sugere ainda, para os seus componentes, pela regra da estabilidade inversa da toxicidade, um carácter relativamente inócuo em termos de saúde pública e ecotoxicologia. Isto parece indicar a existência no estuário do Tejo, de um mecanismo de desintoxicação para o arsénio significativo à escala geoquímica, e cujo estudo promenorizado se pode vir a revelar do maior interesse prático.

m) O estudo do conjunto de processos e mecanismos que controlam em meio estuarino a especiação do arsénio e nomeadamente a produção da fracção refractária e a sua reciclagem, enfrenta no entanto dificuldades metodológicas que constituem sério

estrangulamento e não podem ser honestamente ignoradas. Avanços significativos no futuro dependem, conseqüentemente, da sua resolução em tempo útil.

CONCLUSIONS

In the sequence of previous investigation we have studied, in the Tagus estuary, the arsenic species that were known, up to now, for the estuarine-marine environment (As^{3+} , As^{5+} , MMA and DMA).

Particularly we have attempted the characterization of its distribution and behaviour in estuarine waters, for summer and winter conditions.

However we have examined with greater detail the speciation of this element having detected, for the first time in natural seawater, the presence of dissolved forms of arsenic that give trimethylarsine on reduction with borohydride.

The research that followed, aiming at the identification of the origin of these trimethylated forms, made possible the detection and quantification of two new fractions of arsenic refractory to the hydride method. Those fractions can be distinguished through their different sensitivity to alkaline digestion.

The refractory arsenic detected was further submitted to a number of concentration/purification and analytical procedures to get indications about its physical and chemical properties and eventually to establish its chemical composition.

The set of results that were obtained, allows one to conclude that:

a) The distribution of dissolved arsenic presents, in the Tagus, a strong positive deviation from linearity which indicates the existence of a substantial input of this element within the limits of the estuary. This confirms the results of prior investigation. However the estimates that we have obtained for this input, about 1000 to 1500 Kg.day⁻¹, exceed the estimates that were produced previously.

b) As one could expect, for a well oxygenated estuary as the Tagus, the dominant species in its waters is always or almost always the arsenate ion, As⁵⁺, that makes about 96%, on average, compared with about 2.7, 1, 2, and 1% for As³⁺, MMA and DMA, respectively. So the ratio As³⁺/As⁵⁺ presents, most of the time, a value lower than the general average of 0.2.

c) The close examination of the evolution of this ratio along the estuary further suggests the sedimentary compartment as a secondary source of inorganic arsenic for the water column, eventually dominant in strong hydrodynamic conditions as it is the case of flood.

d) With the exception of what happens in stations CUF I and CUF II, the levels attained by the different arsenic species determined do not exceed the standards mandatory for estuarine-marine waters (EPA, 1973). They exceed, nevertheless, the concentrations recommended for the same systems and the

plotting of phytoplankton distribution still suggests that (acting in synergy with a whole set of other contaminants and also with physical, chemical and sedimentary factors) the toxicity of arsenic can play a role in the depletion of phytoplankton biomass that occurs in the central body of the estuary.

e) The presence of trimethylated forms of arsenic that can be detected and quantitated by the hydride method can be observed, in the Tagus estuary, both in winter and summer time. Their concentrations do not seem to follow a marked seasonal pattern. They present, nevertheless, a positive gain within the limits of the estuary, about 2.14 Kg.day^{-1} , which cannot be the result of inputs of domestic sewage from marginal populations and that, consequently, is ascribed to an internal source. So the detected TMA shall constitute basically an intermediate step of the complex local biogeochemical cycle of arsenic.

f) The presence of an organoarsenical fraction refractory to the production of arsines but sensitive to sodium hydroxide digestion is also observed. This, up to now, unknown fraction was named Refractory Digestible Arsenic (RDA). Its minimum content is given by the difference between digested and undigested aliquots. One can still verify, in most of these digestions, a preferential increase of DMA. The concentration of that fraction always exceeded, in the situations observed, the contents of MMA and TMA.



g) The total digestion of estuarine water samples further reveals the presence of another unknown fraction of arsenic refractory to the hydride method and simultaneously undigestible through alkaline digestion. We have called it Refractory Undigestible Arsenic (RUA). Its content attains between 16 and 19% of the total dissolved arsenic content, and is about 80% of the total refractory arsenic that, on the other side, constitutes about 90% of total organic arsenic.

i) The arsenic biotransformation in the estuarine environment is a complex process whose mechanisms are far from being clear. However once established the existence of trimethylarsenoribosides it seems feasible its degradation to arsenocholine either directly, either via trimethylarsonium lactate. Arsenocholine can subsequently be incorporated and biotransformed into arsenobetaine via arsenobetaine aldehyde. The recycling and mineralization of arsenobetaine, the terminal compound of aquatic animal metabolism, will produce TMAO and eventually TMA, besides inorganic arsenic and the other simple forms of methylated arsenic.

j) The identification of trimethylarsenoribosides suggests the existence of trimethylarsenolipids that could have a dominant role in the metabolism of tetraalkylated arsenic compounds.

k) The detection of a substantial fraction of arsenic compounds in the estuarine waters of the Tagus, refractory and undigestible, suggests that the cycling of the stock of available arsenic takes place preferentially through an up to

g) The total digestion of estuarine water samples further reveals the presence of another unknown fraction of arsenic refractory to the hydride method and simultaneously undigestible through alkaline digestion. We have called it Refractory Undigestible Arsenic (RUA). Its content attains between 16 and 19% of the total dissolved arsenic content, and is about 80% of the total refractory arsenic that, on the other side, constitutes about 90% of total organic arsenic.

i) The arsenic biotransformation in the estuarine environment is a complex process whose mechanisms are far from being clear. However once established the existence of trimethylarsenoribosides it seems feasible its degradation to arsenocholine either directly, either via trimethylarsonium lactate. Arsenocholine can subsequently be incorporated and biotransformed into arsenobetaine via arsenobetaine aldehyde. The recycling and mineralization of arsenobetaine, the terminal compound of aquatic animal metabolism, will produce TMAO and eventually TMA, besides inorganic arsenic and the other simple forms of methylated arsenic.

j) The identification of trimethylarsenoribosides suggests the existence of trimethylarsenolipids that could have a dominant role in the metabolism of tetraalkylated arsenic compounds.

k) The detection of a substantial fraction of arsenic compounds in the estuarine waters of the Tagus, refractory and undigestible, suggests that the cycling of the stock of available arsenic takes place preferentially through an up to

now neglected pathway - the direct uptake from water. Ecological and ecophysiological peculiarities of the estuarine primary producers and the mechanism of trapping of the estuary (together with the presumed stability of that fraction) will allow for the discrepancy of these results and the results of previous investigation.

l) The apparent thermal, chemical and metabolic stability of the refractory fraction, further suggests, through the rule of stability inverse to toxicity, the relatively innocuous nature of its components, both in terms of public health and ecotoxicology. This seems to indicate the occurrence in the Tagus estuary of a detoxifying mechanism for arsenic, relevant at the geochemical scale, and which study in detail can be eventually of the greatest practical significance.

m) The study of the whole set of mechanisms and processes that control, in the estuarine environment, the speciation of arsenic and particularly the production of the refractory fraction and its recycling, faces nevertheless, methodological difficulties that certainly are a serious restriction and can not be honestly ignored. Significant advances in the future are pending, consequently, on its resolution in due time.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelghani, A.A., A.C. Anderson, A.J. Englande, J.W. Mason e P. de Kernion (1977)
«Demethylation of MSMA by soil microorganisms» in Hemphill, D.D. (ed) Trace substances in environmental health, Vol. 11, Univ. Mo. Press, Columbia, pp 419-426
- Abdelghani, A.A., R.S. Reimers, A.C. Anderson, A.J. Englande, Jr., C.P. Lo & M. Shariatpnanahi (1979)
«Transport and distribution of arsenic in sediments», in, «Management and Control of Heavy Metals in the Environment» CEP Consultants, Edinburg 1979
- Alden, J.C. (1983)
«The continuing need for inorganic arsenical pesticides», in: H.W. Lederer & R.J. Fensterheim, op. cit.
- Anderson, M.A., J.F. Ferguson & J. Gavis (1976)
«Arsenate adsorption on amorphous aluminium hydroxide», J. of Colloid and Interface Sci., Vol. 54, N.3, 1976
- Andrade, C. Freire de (1933)
«A tectónica do estuário do Tejo e dos vales submarinos ao largo da Costa da Caparica e a sua relação com as águas termo-medicinais de Lisboa», Com. Serv. Geol. de Portugal, Vol. XIX, p.p. 23-40, Lisboa 1933
- Andreae, M.O. (1977)
«Determination of arsenic species in natural waters», Anal. Chem. Vol. 49, N.6, May/1977, p.p. 820-823
- Andreae, M.O. (1978)
«Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae», Deep-Sea Research (1978), Vol. 25, p.p. 391-402
- Andreae, M.O. (1979 a)
«Arsenic speciation in seawaters and interstitial waters: the influence of biological-chemical interactions on the chemistry of a trace element», Limnol. Oceanog., 24 (3), 1979, 440-452
- Andreae, M.O. (1979 b)
«Biosynthesis and release of organoarsenical compounds by marine algae», Environm. Sci. Technol., Vol. 13 N. 6; June 1979, p.p. 738-741
- Andreae, M.O. (1980 a)
«Biotransformation of Arsenic in the environment», Spurenelement-Symposium, Arsen. Karl-max Univ. Leipzig N. Friedr. -Schiller, Univ. Jena, 1980, p.p. 131-137
- Andreae, M.O. (1980 b)
«Arsenic in rain and the atmospheric mass balance of arsenic», J. Geophys. Res. 85, 4512-4518 (1980)

- Andreae, M.O. (1983 a)
«The Determination of the chemical species of some of the hydride elements» (arsenic, antimony, tin and germanium) in seawater: methodology and results, in Wong, G.S., E, Boyle, K.W. Bruland, J.D. Burton, E.D. Goldberg (eds) «Trace Metals in seawater» Plenum Press., pp. 1-19, 1983
- Andreae, M.O. (1983 b)
«Arsenic, antimony, germanium, and tin in the Tejo estuary, Portugal: modeling a polluted estuary», Environm. Sci. Technol., Vol. 17 N. 12 1983, p.p. 731-737
- Andreae, M.O. (1983 c)
«Biotransformation of Arsenic in the marine environment», in W.H. Lederer and R.J. Fensterheim, op. cit.
- Andreae, M.O. (1983 d)
«Determination of trace metals». Chapt. 10.6.6. - Arsenic, in K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling «Methods of seawater analysis», Verlag Chemie, 1983, p.p. 218-224
- Andreae, M.O. (1986 a)
«Organoarsenic compounds in the environment, in P.J. Graig (ed); «Organometallic compounds in the environment, principles and reactions»; Longman, 1976, p.p. 198-228
- Andreae, M.O. (1986 b)
«Chemical species in seawater and marine particulates» in M. Bernhard, F.E. Brinckman, P.J. Sadler (eds.), «The importance of chemical speciation in environmental processes», Dahlem Konferenzen, Springer, 1986, p.p. 301-336
- Andreae, M.O. (1988) - com. pess. (Julho 1988)
- Andreae, M.O., D. Klump (1979)
«Biosynthesis and release of organoarsenical compounds by the marine algae» Environm. Sci. Technol., Vol. 13 N. 6, June 1979, p.p. 738-741
- Andreae, M.O., & P.M. Froelich, Jr. (1984)
«Arsenic, antimony and germanium biogeochemistry in the Baltic Sea», Tellus (1984), 36B, 101-107
- Andreae, M.O., & T.W. Andreae (1986)
«Arsenic in the Schelde Estuary and watershed, Belgium» (not published)
- Anon (1983)
«New YC05 ultrafilter... better performance for low molecular weight species». Amicon News, 1983
- António, T., A.K. Chopoa, W.R. Cullen e D. Dolphin (1979)
«A model for the biological methylation of arsenic», J. Inorg. Nucl. Chem. 41, 1220-1221, 1979
- Apte, S.C., A.G. Howard, R.J. Morris e M.J. McCartney (1986)
«Arsenic, antimony and selenium speciation during a spring phytoplankton bloom in a closed experimental ecosystem», Marine Chemistry, 20 (1986), 119-130

- Aston, S.R. (1975)
«Arsenic in stream sediments and waters of South-West England». The Science of Total Environment, 4 (1975) 347-358
- Atlas, E.C., Culberson, R.M., Pytkowicz (1976)
«Phosphate association with Na, Ca and Mg». Marine Chemistry, 4, p.p. 243-254.
- Aylett R.J. (1979)
«Organometanic compounds» 4th ed. Vol. I: The main group elements, Part II: Groups IV and V. Chapman and Hall, 1979
- Baker, M.D., P.T.S. Wong, Y.K. Chau, C.I. Mayfield & W.E. Inniss (1983)
«Methylation of arsenic by freshwater green algae» - Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40:1254-7
- Baldwin, W.J. (1983)
«The use of arsenic as a wood preservative» in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim, op. cit.
- Banks, C.H., J.R. Daniel and R.A. Zingaro (1979)
«Biomolecules bearing the S⁻ or SeAsMe₂ function; aminoacid and steroid derivatives», J. Medicinal Chem 22, p.p. 572-5
- Barrow, N.J. (1974)
«On the displacement of adsorbed anions from soil: displacement of phosphate by arsenate». Soil Sci. 117, 28-33
- Bauer, R.J. (1983)
«Arsenic; glass industry requirements» in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim, op. cit.
- Bautista, E.M. & M. Alexander (1972)
«Reduction of inorganic compounds by soil microorganisms» Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36, 918-920 (citado em E.A. Woolson 1983 b)
- Bernhard, M., F.E. Brinkman and K.J. Irgolic (1986)
«Why Speciation?». In Bernhard, M.F. Brinkman and P.J. Sadler «The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes». Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, 1986, p.p. 7-14
- Bennett, B.G. (1981)
«Exposure of man to environmental arsenic - an exposure commitment assesment» The Science of the Total Environment, 20 (1981) 99-107
- Benson, A.A., (1987)
«Radiochromatographic exploration» J.A.O.C.S., Vol. 64, 409 (September 1987), 1309-1314
- Benson, A.A., (1988 a)
«Biological methylation of the algae trialkylarsine oxides» in P.J. Craig & F. Glockling (Eds.) op. cit.
- Benson, A.A., (1988 b)
«Algal excretion of the arsenoribosylglycerol sulphate ester» in Craig & Glockling (Eds.) op. cit.

- Benson, A.A., (1988 c)
«Antimony metabolites in marine algae» in Craig & Glockling (Eds.) op. cit.
- Benson, A.A., (1989 a)
«Arsonium compounds in algae» Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 86, pp. 6131-6132, August 1989, Biochemistry
- Benson, A.A., (1989 b) com. pess.
- Benson, A.A. (1990) - Research proposal (1/01/90)
- Benson, A.A., R.E. Summons (1981)
«Arsenic accumulation in Great Barrier Reef invertebrates», Science 211:482-3
- Benson, A.A., R.V. Cooney & J.M. Herrera-Lasso (1981)
«Arsenic Metabolism in algae and higher plants», Journal of Plant Nutrition 3 (1-4), 285-292 (1981)
- Benson, A.A., E. Per Nissen (1982)
«The arsenolipids of aquatic plants», in J.F.G.M. Wintermans e P.J.C. Kuiper (eds) «Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids» Elsevier Biomedical Press, 1982
- Benson, A.A., M. Katayama & F.C. Knowles (1988)
«Arsenate metabolism in aquatic plants», Applied Organometallic Chemistry, Vol. 2/4 (1988), p. 349-352
- Bento de Sousa (1984)
«Cartas ao Conselheiro Henrique de Barros Gomes», in Prefácio de «O Príncipe Perfeito» de Oliveira Martins, p.p. 174 (1984)
- Bettencourt, A.M.M. de (1978)
«Avaliação da contaminação por metais pesados na região do Barreiro», Internal Report, DRENA, 1978
- Bettencourt, A.M.M. de (1984)
«Averiguações experimentais para a descarga de esgotos em meios aquáticos». I Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, APRH-ABES, Setembro de 1984
- Bettencourt, A.M.M. de (1988)
«On arsenic speciation in the Tagus estuary». The Netherland Journal of Sea Research, 22 (3): 205-212, 1988
- Bettencourt, A.M.M. de (1989)
«Da especiação do arsénio em águas do estuário». International Seminar on River Water Quality Assessment and Management, UNESCO/OMS/PGIRH/T, Maio de 1989
- Bettencourt, A.M.M. de, F.M. Franco, D. Coelho and G.G. Dias (1980 a)
«Estuário do Tejo - Tomo I» II-4 - Meios Receptores, Estudos de Base de Engenharia, RESBAL, DRENA-HIDROPROEJCTO, 1980

- Bettencourt, A.M.M. de, A.F. Rodrigues, M.T.J. Moita, C.S. Reis, O. Luis e A.A. Dias (1980 b)
 «Estuário do Tejo - Tomo II, II-4 - Meios Receptores, Estudos de Base de Engenharia, RESBAL, DRENA-HIDROPROEJCTO, 1980
- Bird, M.L., Challenger, F. Charlton, P.T. & J.O. Smith (1948)
 «Studies on biological methylation II. The action of molds on the inorganic and organic compounds of arsenic», *Biochem. J.* 43, 78-83
- Blackwell, W. & A. Robbins (1979)
 «Arsine (arsenic hydride) poisoning in the workplace», *Am Ind. Hyg. Assoc. J* (40), pp. A.56-A.61, 1979
- Blake & Johnson (1976)
 «Oxygen production-consumption of the pelagic sargassum community in a flow-through system with arsenic additon». *Deep-Sea Research*, 1976, Vol. 23, 773-778
- Blasco et al. (1971)
 «Absorption des ions arséniate par les chlorelles». *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 273 (30 Août 1971) 812 - Série D
- Bolt G.H. & M.G.M. Bruggenwert (1978)
 (eds.) «Soil Chemistry; A. Basic Elements», *Developments in Soil Science*, 5 A, Elsevier, 1978
- Borst Pauwels, G.W.F., J.K. Peter, S. Jager e C.C.B. Wijffels (1965)
 «A study of the arsenate uptake by yeast cells compared with phosphate uptake», *Biochem. Biophys. Acta* 94, 312-314
- Bottino, N.R., E.R. Cox, K.J. Irgolic, S. Maeda, W.J., McShane, R.A. Stockton & R.A. Zingaro (1978)
 «Arsenic uptake and metabolism by the alga Tetraselmis chui McShane, R.A., in: Brinckman & Bellama, op. cit., 116
- Bowen, H.J.R. (1979)
 «Environmental chemistry of the elements». Academic Press, 1979
- Boyle, E.A., R. Collier, A.T. Dengler, J.M. Edmond, A.C. NG e R.F. Stallard (1974)
 «On the chemical mass balance in estuaries». *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44, 35-54
- Boyle, E.A., J.M. Edmonds e E.R. Sholkowitz (1977)
 «The mechanism of iron removal in estuaries». *Geochim. Cosmochim. Acta*, 41, 1315-1324
- Boyle, E.A., S.S. Husted e B. Grant (1982)
 «The chemical mass-balance of the amazon plume - II. Copper, Nickel and cadmium», *Deep-Sea Res.* 29, 1355-1364
- Braman, R.S., L.L. Justen & C.C. Foreback (1972)
 «Direct volatilization spectral emission type detection systems for nanograms of arsenic and antimony», *Anal. Chem.* 44, (1972), p. 2195

- Braman, R.S., L.L. Foreback (1973)
«Methylated forms of arsenic in the environment», Science, 182, 1247-1249
- Braman, R.S., D.L. Johnson, C.C. Foreback, J.M. Ammons & J.L. Bricken (1977)
«Separation and determination of nanogram amounts of inorganic arsenic and methylated compounds», Anal. Chem. 49, pp. 621-625
- Braman, R.S. (1975)
«Arsenic in the Environment» in E.A. Woolson (Ed) «Arsenical Pesticides», Am. Chem. Soc. Symp. Series N.7, pp. 108-123
- Braman, R.S. (1983 a)
«Chemical speciation» in DFS Natush and Philip K. Hopke «Analytical aspects of environment chemistry» Wiley, 1983, pp. 1-60
- Braman, R.S. (1983 b)
«Environmental reaction and analysis methods» in Fowler (ed) «Biological and environmental effects in arsenic» Chp. 3, Elsevier Sci Pub, 1983
- Brinkman, F.E, G.E. Parris, W.R. Blair, K.L. Jewett, W.P. Inverson e J.M. Bellama (1977)
«Questions concerning environmental mobility of arsenic: needs for a chemical data base and means for speciation on trace organoarsenicals». Environ. Health Perspectives, vol. 19, pp. 11-24, 1977
- Brinkman, F.E e J.M. Bellama (1978)
(Eds.) «Organometals and Organometalloids: Occurrence and Fate in the Environment» ACS Symposium Series, 82, ACS 1978
- Buchet J.P., R. Lauwdery e H. Roels (1981)
«Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers» Int. Arch. Occup. Environm. Health (1981) 48: 111-118
- Buck W.B., G.D. Osweiler e G.A. Van Gerber (1973)
«Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology» Kendall-Hunt Publ. Co, Dubuque, Iowa (1973 (citado em Squibb & Fowler 1983)
- Buffle, J., P. Delanoey & W. Haerdi (1978)
«The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in freshwaters». Anal. Chem. Acta, 101 (1978) pp. 339-357
- Burton, J.D. (1979)
«Physico-chemical limitations in experimental investigations». Phil. Trans. R. Soc. Land., B. 286, 443-456 (1979)
- Cabeçadas, M.G., M.A. Sampaio, J. Pissarra, M.E. Cunha e M.T.J. Moita (1983)
«Red-tide in the Cascais Bay». Bull. Inst. Nac. Inv. Pescas, Lisboa, Vol. X, pp 5-49, 1983
- Cannon, J.R., J.S. Edmonds, K.A. Francesconi & J.B. Langford (1979)
«Arsenic in marine fauna» in: «Management and control of heavy metals in the environment» CEP consultants, Edinburg 1979, pp. 283-286

Cannon, J.R., J.S. Edmonds, K.A. Francesconi, C.L. Raston, J.B. Langford, B.W. Skelton e A.h. White (1981)

«Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, a constituent of the Western Rock Lobster, the Dusky shark and some samples of human urine» Aust. J. Chem, 1981, 34, pp. 787-798

Cannon, J.R., J.B. Saunders e R.F. Toia (1983)

«Isolation and preliminary toxicological evaluation of arsenobetaine - the water-soluble arsenical constituent from the Hepatopancreas of the Western Rock Lobster», The Science of the Total Environment, 31 (1983) 181-187

Cantoni G.I. (1960)

«Adenosylmethionine in: Salvatore, F., E. Borek, V. Zappia, H.G. Williams-Ashman e F. Schlenk (Eds.) «The Biochemistry of Adenosylmethionine», Columbia University Press, 1977, pp. 560 (citado em Benson 1988 a)

Carpenter R.. M.L. Peterson e R.A. Jahnke (1978)

«Sources, sinks and cycling of arsenic in the Puget sound region» in E. Cronin (ed) «Estuarine interactions», Academic Press, 1978, pp. 459-480

Carvalho, A. Galopim de (1968)

«Contribuição para o conhecimento geológico da bacia terciária do Tejo». Serviços Geológicos de Portugal, Memória nº 15 (Nova Série), Lisboa 1968

Castanheiro, J.M. (1982)

«Distribution, transport and sedimentation of suspended matter in the Tejo estuary. in Estuarine Processes: An Application to the Tagus Estuary. UNEP/UNESCO/CNA, Lisbon, Dec. 1982, pp. 73-90

Castanheiro J. (1985)

«Matéria em suspensão no estuário do Tejo. Distribuição e variabilidade». Estudo Ambiental do Estuário do Tejo. Nota Prévia, SQA. nº 2. DGQA, 1985

Challenger, F. (1945)

«Biological methylation». Chem. reviews, 36 (1945) 315-361

Challenger, F. (1978)

«Biosynthesis of organometallic and organometalloidal compounds» in Brinckman & Bellama «Organometals and Organometalloids». ACS Symposium Series 82, 1978

Challenger, F., C. Higginbottom e L. Ellis (1933)

«The formation of organo-metalloidal compounds by micro-organisms Part I. Trimethylarsine and Dimethylarsine». J. Chem. Soc. (1933), 1933:95-101 (citado em: N.A.S. 1977)

Chappell, W.R. & D.D. Runnells (1977)

«Toxic trace elements and oil shale production. in Hempill D.D. (Ed.) Trace substances in environmental health, Vol. XI, University of Missouri, pp. 383-388

Chau, Y.K., P.T.S. Wong e P.L. Goulden (1975)

Anal. Chem. 47, 2279 (1975) (citado em Andreae 1977)

- Chau, Y.K., P.T.S. Wong, B.A. Silverberg, P.L. Wxon e G.A. Bengert (1976)
Science, 192, 1130-1131 (1976) (citado em Mukai et al 1986)
- Cheng, C.H. & Focht (1979)
«Production of arsine and methylarsines in soil and in culture». Appl.
Environm. Microbiol. 38, 494-499
- Christakopoulos, A. (1987) - com. pess. (carta de 22/06/87)
- Christakopoulos, A. (1988)
«Quaternary organoarsenic compounds in aquatic organisms, a study of
their fate using gas chromatographic - mass spectrometric methods».
Stcokholm, 1988, PhD Thesis
- Christakopoulos, A. (1989) - com. pess.
- Christakopoulos, A., B. Mamasur, H. Norin e J. Nordgren (1987)
«Quantitative determination of arsenocholine and acetylarsenocholine in
aquatic organisms using pyrolysis and gas chromatography/mass
spectrometry». Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Vol. 14
(1987)
- Christakopoulos, A., H. Norin, M. Sandstrom, H. Thor, P. Moldeus e R. Ryhage
(1988)
«Cellular metabolism of arsenocholine». Journal of Applied Toxicology,
Vol. 8 (5) (1988)
- Clarke, K.R. (1989) - com. pess. (5/03/89)
- Comissão Nacional do Ambiente (1979)
«Estudo Ambiental do estuário do Tejo». CNA/TEJO nº 4 - Rel. 3
- Cooney, R.V. (1981)
«The metabolism of arsenic by marine organisms». PhD Dissertation.
University of California, San Diego, 1981
- Cooney, R.V., R.O. Mumma & A.A. Benson (1978)
«Arsonium phospholipid in Algae», Proc. Nat. Acd. Sci. USA, 75, pp. 4264
- Cooney & Benson (1980)
«Arsenic metabolism in Homarus americanus». Chemosphere, Vol. 9, pp.
335-341
- Costa. M.R.M. e M.I.C. Fonseca (1967)
«Teor de arsénio em mariscos». Revista Portuguesa de Química, Vol. XVII
(1967) Jan-Março, nº 1.
- Costa. M.R.M., M.I.C. Fonseca, N.M. do Paço, M.E. Raposo, M.J. Cruz (1974)
«Teores de elementos minerais em diversas espécies de peixes» in Degradação do ambiente português, I Congresso Nacional, Ordem dos Engenheiros, Porto, 1974
- Costa, M.J. (1980)
«Fishes of Tejo Estuary (Community structure, abundance and diversity)»,
Arq. Mus. Boc. (2ª ser) 7 (17): 291-356

- Costa, M.J. (1982)
«Ictiofaune de l'estuaire du Tage». These d'État, Université Paris VII:
1/237, 1982
- Costa, M.J. (1986)
«Les poissons du Tage», Cybium, 1986, 10 (11): 57-75
- Costa, M.J. (1988)
«Ecologie alimentaire des poissons de l'estuaire du Tage». Cybium, 12
(4), 1988
- Costa, P.C. Celestino da (1957)
«Poluição no estuário do Tejo». Técnica nº 274, Julho 1957
- Costa, P.C. Celestino da (1965)
«Distribuição da contaminação no estuário do Tejo». Técnica nº 349, 1965
- Costa, P.C. Celestino da (1988)
«Poluição do estuário do Tejo pelas águas residuais da Cidade de Lisboa». Livro do II Encontro Nacional de Saneamento Básico, 1988
- Costa, P.C. Celestino da & A.M.M. de Bettencourt (1980)
«Dispersão e escoamento no estuário do Tejo». Recursos Hídricos, Vol. 1
nº 1, pp. 15-17, Jan. 1980
- Cox, R.A., G. Culkin e J.P. Riley (1967)
«The electrical conductivity/chlorinity relationship in natural seawater»
Deep-sea Res. 14, 203-20
- Cox, D.P. & Alexander, M. (1973 a)
«Production of trimethylarsine gas from various arsenic compounds by
three sewage fungi», Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9, 84-88
- Craig, P.J. & F. Glockling (1988)
(Eds) «Biological alkylation of heavy elements», The Royal Society of
Chemistry Special Publ., 1988
- Crecelius, E.A. (1974)
«The Geochemistry of arsenic and antimony in puget sound and Lake Was-
hington», Washington, PhD Dissertation, Univ. of Washington
- Crecelius, E.A. (1975)
«The Geochemical cycle of arsenic in Lake Washington and its relation to
other elements». Limnol. Oceanogr. 20, 441-451
- Crecelius, E.A. (1977)
«Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by
man. Environ. Health Perspectives, Vol. 19, August 1977, pp- 147-150
- Cullen, W.R. (1966)
«Advances in organometal Chem» 4 (1966), 145 (citado em Cullen et al
1977)

Cullen, W.R., C.L. Froese, A. Iui, B.C. McBride, D.J. Patmore e M. Reimer (1977)

«The aerobic methylation of arsenic by microorganisms in the presence of L-Methionine-Methyl-D3». J. Organometallic Chemistry 139, 61-69

Cullen, W.R., B.C. McBride e M. Reimer (1979)

«Induction of the aerobic methylation of arsenic by Candida humicola». Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21, 157-161

Cullen, W.R., B.C. McBride e J. Renglinski (1984 a)

«The reduction of trimethylarsine oxide to trimethylarsine by thiols: a mechanistic model for the biological reduction of arsenicals». Journal of Inorganic Biochemistry, 21, 45-60, 1984

Cullen, W.R., B.C. McBride, A.W. Picket e J. Renglinski (1984 b)

«The wood preservative chromated copper arsenate is a substrate for trimethylarsine biosynthesis». Applied Environmental Microbiology, Feb 1984, pp 443-444

Cullen, W.R., & M. Dodd (1989)

«Arsenic speciation in clams of British Columbia». Applied Organometallic Chemistry (1989) 3, 79-88

Cullen, W.R., M. Dodd, B.U. Nwata, D.A. Reimer e K.R. Reimer (1989)

«Compounds of arsenic, antimony, and tin in mollusc shells». Communication, Applied Organometallic Chemistry (1989) 3, 351-353

Cullen, W.R., e K.J. Reimer (1989)

«Arsenic Speciation in the Environment». Chem. Rev. (1989), 89, 713-764

D.G.R.A.H. (1984)

«Cadais Portugal (Continente), D.G.R.A.H./D.S.H. (1984)

Daniel, J.R. & R.A. Zingaro (1976)

«Dimethylarsinous acid esters of 1-thio-and- seleno galactose. A new class of potential carcinoestactic agents». Phosphorous & Sulfur 4 (2), pp. 179-185

De Simone, R.E., M.W. Pewley, L. Charbonneau, S.G. Smith, J.M. Wood, H.A.O. Hill, M.J. Pratt, S. Ridsdale e R.J.P. Williams (1973)

Biochem. Biophys. Acta, 304, 851 (1973)

Donard, O.X. (1989) - Com. pess. (17/10/89)

Du Vigneaud, V. (1952)

«A trial of research». Cornell Univ. Press., Itacha, N.Y. 194 (citado em Marafante et al 1984)

Dyer, K.R. (1973)

«Estuaries: a physical introduction». John Willey & Sons, 1973

Ebdon, L., A.P. Walton, G.E. Millward e M. Whitfield (1987)

Appl. Organometallic Chemistry, 1987, 1, 427 (citado em Ebdon et al 1988)

- Ebdon, L., S.J. Hill, G.E. Millward e A.P. Walton (1988)
«Novel method for the determination of methylated metal species and their application to estuarine samples» in Craig, P.J. & Glocking, F., op. cit.
- Edmonds, J.S., K.A. Francesconi, J.T. Cannon, C.I. Raston, B.W. Skelton & A. H. White (1977)
«Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster Panulirus longipes cygnus George» Tetrahedron Letts., 188, pp. 1543-1546
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1981)
«Arsenosugars from Brown Kelp (Eklonia radiata) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem». Nature, 289, (5978), pp. 602-604 (1981)
- Edmonds, J.S., K.A. Francesconi e J.A. Hansen (1982)
«Dimethyloxarsylethanol from anaerobic decomposition of brown kelp (Eklonia radiata): a likely precursor of arsenobetaine in marine fauna». Experientia 38 (1982), 643-644
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1982)
«Isolation and crystal structure of an arsenic-containing sugar sulphate from de kidney of the giant clam, Tridacna maxima. X-ray crystal structure of (25)-3-[5-deox-5-(dimethylarsinoyl)- β -D-ribofuranosyloxy]-2-hydroxy-propyl hydrogen sulphate». J. Chem Soc. Perkin Tans. I., 1982, pp. 2989-2993
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1983)
«Arsenic-containing ribofuranosides: isolation from brown kelp (Eklonia radiata) and nuclear magnetic resonance spectra». J. Chem Soc. Perkin Tans. I., 1983, pp. 2375-2382
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1987 a)
«Transformation of arsenic in the marine environment». Experientia 43 (1987), 553-557
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1987 b)
in Sci. Total Environment, 1987, 64:317 (citado em Maher e Butler 1988)
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1988 a)
«The origin of arsenobetaine in marine animals». Applied Organometallic Chemistry 2/4 (1988) 297-302
- Edmonds, J.S. & K.A. Francesconi (1988 b)
«The methylation of arsenic by marine macro-algae». in Craig & Glocking, op. cit.
- EPA (1973)
Marine aquatic life and wildlife. Water Quality Criteria, EPA, 1973
- EPA (1985)
«Proposed rule-making for arsenic». Office of Drinking Water, U.S. Env. Prot. Agency (EPA 1985)

- Fassebender H.W. (1975)
«Solubility and fraccionation criteria for evaluating arsenic-phosphorous relationships in soils». *Ambio*, 4, 134-135 (citado em Woolson 1983 b)
- Ferguson, J.F. & J. Gavis (1972)
«A review of the arsenic cycle in natural waters». *Water Res.* Vol. 6, p. 1259-1274
- Ferrante, E.D. & A. Berlin (1981)
«Research and regulatory actions on heavy metals in the european community». «Heavy metals in the environment. Edinburg: CEP Consultants, CEE & WHO, 1981
- Ferreira, J.G. (1987) com. pess.
- Ferreira, J.G. (1988)
«Mercúrio em algas macrófitas do estuário do Tejo». Dissertação de doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, 1988
- Fiadeiro, P. (1979)
in 1º Simpósio Nacional de Estuários, LNEC/CNA, 24-26 de Janeiro de 1979
- Fish, R.H., F.E. Brinckman e K.L. Jewett (1982)
«Finger printing inorganic arsenic and organoarsenic compounds in «in situ» oil shale retort and process waters using a liquid chromatograph coupled with an atomic absorption spectrophotometer as a detector». *Environ. Sci. Technol.*, vol. 16, nº 3, 1982, pp. 174-179
- Fitzgerald, L.D. (1983)
«Arsenic sources, production and applications in the 1980's, in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim, op. cit.
- Foá, V., A. Columbi & M. Maroni (1984)
«The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic». *The Science & the Total Environ.*, 34 (1984), 241-259
- Fordham, A.W. & K. Norrish (1974)
«Direct measurement of the composition of soil components which retain added arsenate». *Aust J. Soil Res.* 12, 165-172 (citado em Woolson 1983 b)
- Forstner, U. & G.T.W. Wittman 1979
«Metal pollution in the aquatic environment». Springer-Verlag, 1979
- Forshufvud, S., H. Smith e A. Wassen (1961)
«Napoleon's illness 1816-1821 in the light of activation analysis of hairs from various dates». *Arch. Toxikol.* 20: 210-219, 1969
- Fowler, B.A. (1983 a)
«Biological and environmental effects of arsenic». *Topics in Environmental Health*, 6, Elsevier, 1983
- Fowler, B.A. (1983 b)
«Arsenical metabolism and toxicity to freshwater and marine species» in B.A. Fowler, 1983, op. cit.

- Fowler, B.A., N. Ishminishi, K. Tsuchiya e M. Vahter (1979)
«Arsenic», Ch. 17, L. Friberg (ed) «Handbook on the Toxicology of Metals». Elsevier, 1979
- Francesconi, K.A. & J.S. Edmonds (1987)
«Accumulation of arsenobetaine from seawater by the mussel Mytilus edulis» in Lindberg & Hutchinson (Eds) «Heavy Metals in the Environment» CEP Consultants, 1987
- Francesconi, K.A. & J.S. Edmonds (1989)
«Metabolism by marine fish of administered arsenic compounds» 4th, Int. Symposium on «Natural and Industrial Arsenic». Tokyo, Japan, Nov. 25, 1979
- Freeman, M.C., J. Aggett e G. O'Brien (1986)
«Microbial transformation of arsenic in lake Otakuri, New Zealand». Wat. Res., Vol. 20, Nº 3, pp. 283-289, 1986
- Froelich, P.N., L.W. Kaul, J.T. Byrd, M.O. Andreae e K.K. Roe (1985)
«Arsenic, barium, germanium, tin, dimethylsulfide and nutrient biogeochemistry in Charlotte Harbour, Florida, a phosphorous-enriched estuary». Estuarine, Coastal and Shelf Science (1985), 20, 239-264
- Furst, A. (1983)
«A new look at arsenic carcinogenesis». in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim op. cit.
- Gainer, J.H. & Pry, T.W. (1972)
«Effects of arsenicals on viral infection in mice». Am. J. Vet. Res., 33, 2299-2307, (citado em Squibb e Fowler, 1983)
- Garrels, R.M., F.T. Mackenzie & C. Hunt (1979)
«Chemical cycles and the global environment: assessing human influences». William Kaufman, Inc., Los Angeles, 206 p.
- Germani, M.S., M. Shall, W.H. Zoller, J.L. Moyers (1981)
«Fractionation of elements during copper smelting». Environmental Science & Technology, Vol. 15, Nº 3, March 1981, 299-305
- Gesser, M.J. (1981)
«ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorilating conditions». The Journal of Biological Chemistry, Vol. 256, nº 12, p. 5981-5983, 1981
- Goede, A.A. & M. de Bruin (1985)
«Arsenic in the dulin (Calidris alpina) from the dutch wadden zee. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (1985) 34: 617-622
- Goldschmidt, V.M. (1958)
«Geochemistry», Claredon Press, 1958
- Gosio, B. (1893)
«Action de quelques moissures sur les composées fixes d'arsenic». Arch. Ital. Biol., 18, 253-265 (citado em Woolson 1983 b)

- Gupta, S.K. & K.V. Cheng (1978)
«Arsenic removal by adsorption». J. Wat. Poll. Control. Fed., 50, 493-5, 1978
- Harding-Barlow, I. (1983)
«What is the status of arsenic as a human carcinogen» in: W.H. Lederer & R.J.Fensterheim, op. cit, pp. 203-209
- Halpern, J., A. Maher (1964)
J. Amer. Chem. Soc. 90, 2311-2312 (1964) (citado in Wood et al 1977)
- Hanaoka, K. & S. Tagawa (1985 a)
«Isolation and identification of arsenobetaine as a major watersoluble arsenic compound from muscle of blue pointer Isurus oxyrinus and whitetip shark Carcharinus longimanus». Bull. Japan. Soc. Scientific Fisheries, 51(4), 681-685 (1985)
- Hanaoka, K. & S. Tagawa (1985 b)
«Identification of arsenobetaine in muscle of roundnose flounder Eopsetta grigorjewi». Bull. of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51 (7), 1203 (1985)
- Hanaoka, K., M. Matsuda, T. Kaise e S. Tagawa (1986)
J. Shimonoseki Univ. Fisheries, 1986, 35:37 (citado em Maher e Butler, 1988)
- Hanaoka, K., T. Fujita, M. Matsuda, S. Tagawa e T. Kaise (1987 a)
Comp. Biochem. Physiol. 1987, 86B:681 (citado em Maher e Butler 1988)
- Hanaoka, K., M. Kobayashi, S. Tagawa e T. Kaise (1987 b)
Comp. Biochem. Physiol. 1987, 88C:189 (citado em Maher e Butler 1988)
- Hanaoka, K., T. Matsumoto, S. Tagawa e T. Kaise (1987 c)
«Microbial degradation of arsenobetaine, the major water soluble organoarsenic compound occurring in marine animals». Chemosphere, Vol. 16, Nº 10-12, pp. 2545-2550 (1987)
- Hanaoka, K., H. Yamamoto, K. Kawashima, S. Tagawa e T. Kaise (1988)
«Ubiquity of arsenobetaine in marine animals and degradation of arsenobetaine by sedimentary microorganisms». Applied Organometallic Chemistry Vol. 2/4 (1988), 371-376
- Hanaoka, K. e S. Tagawa (1989)
«Aerobic and anaerobic degradation of several arsenicals by sedimentary microorganisms», 4th Int. Symp. on «Natural and Industrial Arsenic», Tokyo, Japan, Nov. 25, 1989
- Hayes, M.O. (1975)
«Morphology of sand accumulation in estuaries: an introduction to the Symposium», in Cronin L.E., Estuarine Research, Vol. II, Academic Press, 1975, pp. 3-22
- Herrera-Lasso, J.H. e A.A. Benson (1982)
«Arsenic detoxification in Macrocystis pyrifera». in A. San Pietro «Biosaline research: a look to the future». Plenum Pb. Co., 1982

- Hess, R.E. & R.W. Blanchard (1976)
«Arsenic stability in contaminated soils». Soil Sci. Soc. Am. J. 40, 847-852
- Hirata, F., D.H. Viveros, E.J. Diliverto e J. Axelrod (1978)
«Identification and properties of two methyltransferases in conversion on phosphotidylethanolamine to phosphotidylcholine». Proc. Nat. Acad. Sci. 75: 1718-1721
- Hirayawa, T., J. Murau, T. Watanase (1989)
«Studies on the structure of lipophilic arsenic compounds in squid liver» in 4th Symp. on «Natural and Industrial Arsenic», Tokyo, Japan, Nov. 25 (1989).
- Hollingbaugh, J.T., D.I.R. Seibert e W.M. Thomas (1980)
«A comparison of the active toxicities of ten heavy metals to phytoplankton from Saanich Inlet, B.C., Canada». Estuarine and Coastal Marine Science (1980) 10, 93-105
- Holm, T.R., M.A. Anderson, D.G. Iverson & R.S. Stanforth (1979)
«Heterogeneous interactions of arsenic in aquatic systems». in Jenne «Chemical Modelling in aqueous systems». Am. Chem. Soc. Syst. Ser. Nº 93, 711-736, (1979)
- Holm, T.R., M.A. Anderson, R.S. Stanforth & D.G. Iverson (1979)
«The influence of adsorption on the rates of microbial degradation of arsenic species in sediments». Limnol. Oceanogr. 25(1), 1980, 23-30
- Howard, A.G. e M.N. Arbab-Zavar (1981)
«Determination of inorganic arsenic (III) and arsenic (IV), methylarsenic and dimethylarsenic by selective hydride evolution atomic absorption spectroscopy». Analyst 106:213-220
- Howard, A.G., M.N. Arbab-Zavar e S. Apte (1982)
«Seasonal variability of biological arsenic methylation in the estuary of the river Beaulieu», Marine Chemistry, 11 (1982). pp. 493-498
- Howard, A. & S.D.W. Comber (1989)
«The discovery of a hidden arsenic species in coastal waters» Applied Organometallic Chemistry (para publicação)
- Howard A. (1989) com. pess. (16/10/89)
- Huang, P.M. (1975)
«Retention of arsenic by hydroxy-aluminium on surfaces of micaceous mineral colloids». Soil Sci. Soc. Amer. Proc., Vol. 39, 1975
- Huang, P.M., D.W. Oscarson, W.K. Liaw e U.T. Mannner (1982)
«Dynamics and mechanisms of arsenite oxidation by freshwater lake sediment». Hydrobiologia, 91, 315-322 (1982)
- IARC, Monographs
«On the evolution of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metals and metallic compounds», 1980, vol.23

- Irgolic, K.J. (1983)
«Determination of arsenic and arsenic compounds in water supplies» in Lederer & Fensterheim, op. cit.
- Irgolic, K.J. (1986)
«Arsenic in the environment» in: A. Xavier «Frontiers in bioinorganic chemistry», Verlag, (1986), 399
- Irgolic, K.J. 1988
«Review: Arsenic compounds in marine and terrestrial organisms: Analytical, chemical and biochemical aspects» Applied organometallic chemistry, vol.2/4 (1988), 303-308
- Irgolic, K.J. (1988) (unpublished results)
- Irgolic, K.J. (1989) com. pess (10/89)
- Irgolic, K.L., E.A. Woolson, R.A. Stockton, R.D. Newman, N.R. Bottino, R.A. Zingaro, P.C. Kearney, R.A. Pyles, S. Maeda, W.J. McShane & E.R. Cox (1977)
«Characterization of arsenic compounds formed by Daphnia magna and Tetraselmis chuii from inorganic arsenate», Environ. Health Perspect. 1977 pp 61-66
- Irgolic, K.J., C.H. Bankes, N.R. Bottino, D. Chrakraborti, J.M. Gennity, D.C. Hillman, D.H. O'Brian, R.A. Pyles, R.A. Stockton, A.E. Wheeler e R.A. Zingaro
«Analytical and biochemical aspects of the transformation of arsenic and selenium compounds into biomolecules» in Brinkman, F.E. & R.M. Fish «Environment speciation and monitoring needs for trace Metal-Containing substances from Energy-Related processes» N.B.S. Spec. Publ. (1981) 244-263
- Irgolic, K.J. & B.K. Puri (1989)
«Arsenic compounds in natural gas and Petroleum» 4th, Int. Symp. on «Natural and industrial arsenic» Tokyo, Japan, Nov. 25, 1989
- Ishinishi, N., K. Tsuchiya, M. Vahter e B. Fowler (1986)
Arsenic, chap. 3 in L. Friberg, C.F. Nordberg e V. Vouk (Eds.) «Handbook on the toxicology of metals», Elsevier, 1986
- Jacobs L., D.R. Keeney e L.M. Walsh (1970)
«Arsenic residue toxicity to vegetable crops grown on plainfield sand» Agron J. 62, 588-591
- Janeiro, A. (1981)
«Avaliação da carga poluidora afluenta ao estuário do Tejo», Relatório I Estudo Ambiental do Estuário do Tejo/D.G.R.A.H., Lisboa, 1981
- Jin, K., Y. Shibata e M. Morita (1988)
«Isolation and identification of arsenic-containing ribofuranosides from edible brown seaweed, Sphaerotrichia divaricata (Ishimozuku) Agric. Biol. Chem. 52 (8), 1965-1971, (1988)
- Johnson, D.L. (1972)
«Bacterial reduction of arsenate in sea water» Nature, Lond, 240, 445

- Johnson, D.L. & R.S. Braman (1975)
«The speciation of arsenic and the content of germanium and mercury in members of the pelagic Sargassum community», Deep-sea Res. 22: 503-507
- Johnson, D.L. & M.E.Q. Pilson (1975)
«The oxidation of arsenite in seawater». Environmental Letters, 8 (2), 157-171 (1975)
- Johnson, D.L. & R.M. Burke (1978)
«Biological methylation of chemical speciation II. Arsenate reduction during marine phytoplankton blooms». Chemosphere, nº 8, pp. 645-648, 1978
- Kaise T., K. Hanaoka e S. Tagawa (1987)
«The formation of trimethylarsine oxide from arsenobetaine by biodegradation with marine microorganisms» Chemosphere, vol.16, Nºs 10-12, pp 2551-2558, 1987
- Kaise T., H. Yamauchi, T. Hirayama e S. Fukui (1988)
«Determination of inorganic arsenic and organic arsenic compounds in marine organisms by Hydride generation/cold trap/gas chromatography-mass spectrometry» Applied Organometallic Chemistry, vol.2/4 (1988) pp. 349-352
- Kaise, T., H. Yamauchi, Y. Horiguchi, T. Tani, S. Watanebe, T. Hirayama e S. Fukui (1989)
«A comparative study on acute toxicity of methylarsinic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide in mice». Applied Organometallic Chemistry (1989), 3, 273-277
- Kaiser, K. L.E. (1979)
«Correlation and prediction of metal toxicity to aquatic biota» Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol.37, (1980) 211-318
- Kanamori, S. (1965)
«Geochemical study of arsenic in natural waters. II. Arsenic in river waters». J. Earth. Sci., Nagoya Univ. 13, 36 (1965)
- Kanamori, S. e K. Sugawara (1965)
«Geochemical study of arsenic in natural waters. I. Arsenic in rain and snow». J. Earth. Sci., Nagoya Univ. 13, 23 (1965)
- Kaul, L.W. & P.N. Froelich (1984)
«Modelling estuarine nutrient geochemistry in a simple system». Geochim. et Cosmochimica Acta Vol. 48, pp. 1417-1433, 1984
- Keaton C.M. & L.T. Kardos (1940)
«Oxidation reduction potentials of arsenate - arsenite systems in sand and soil mediums», Soil Sci. 50, 189-207 (citado em Woolson 1983 b)
- Kensler, C.J. Abels e C.P. Rhoads
«Arsine poisoning, mode of action and treatment», J. Pharmacol. Exp. Ther. 88, 99-108
- Klump, D.W. (1979)
«Arsenic accumulation in an estuarine food chain» Ph.D Dissertation, University of London, 1979

- Klump D.W. & P.J. Peterson (1981)
«Chemical characteristics of arsenic in a marine food chain» Marine Biology 62, 297-305 (1981)
- Knowles, F.C. & A.A. Benson (1983)
«The biochemistry of arsenic» Trends Biochem. Sci., May 1983, 178-180
- Knox, S., W.J. Langston, M. Whitfield, D.R. Turner & M.I. Liddicoat (1984)
«Statistical analysis of estuarine profiles: II application to arsenic in the Tamar estuary» (S.W. England), Estuarine, Coastal and Shelf Science (1984), 18, 623-638
- Koch, R.
«The Book of Signs», Dover Publications, 1930
- Kurosawa, S., K. Yasuda, M. Tagulhi, S. Yamazaki, S. Toda, M. Morita, T. Vehiro e K. Fuwa (1980)
«Identification of arsenobetaine a water soluble organo-arsenic compound in muscle and liver of a shark, Primace glaucus». Agric. Biol. Chem. 44, 1993 (1980)
- Langston W.J. (1983)
«The behaviour of arsenic in selected United Kingdom estuaries» Can. J. Fish. Aquat. Sci.
- Lantzy, R.J. e F.T. Mackenzie (1978)
«Atmospheric trace metals: global cycles and assessment of man's impact». Geochim. Cosmochim. Acta, 43, 511-585
- Lasko, J.U. & S.A. Peoples (1975)
«Methylation of inorganic arsenic by mammals». J. Agric. Food Chem. 23:674-676, 1975
- Lawrence J.F., P. Michalik, G. Tam e H.B.S. Conacher (1986)
«Identification of arsenobetaine in Canadian fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with arsenic absorption detection and confirmation by fast atom bombardment mass spectrometry» J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 315-319
- Lederer, W.H. & R.J. Fensterheim (1983)
«Arsenic, Industrial, Biomedical, Environmental perspectives», Van Nostrand Reinhold, 1983
- Lee, A.M. & J.F. Fraumeni Jr (1969)
«Arsenic and respiratory cancer in man: an occupational study», J. Nat. Cancer Inst., 42: 1045-1052 (1969)
- Lemos, P.F. (1979) com. pess. (AGPL)
- Leppard, G.G., J. Buffle, R. Baudat (1986)
«A description of the aggregation properties of aquatic pedogenic fulvic acids». Wat. Res. Vol. 20, nº 2, (1986), 185-196
- Li, Y.H. (1981)
«Geochemical cycles of elements and human perturbation» Geoch. Cosmochim. Acta, vol.45, (1981) pp 2073-2084

- Liss, S. (1976)
«Conservative and non-conservative behaviour of dissolved constituents during estuarine mixing» in Burton e Liss (ed) «Estuarine Chemistry», Academic Press, 1976
- Lowenthal D.H., M.E.Q. Pilson e R.H. Byrne (1977)
«The determination of the apparent dissociation constants of arsenic acid in sea water», Journal of marine research, 35, 4, (1977) 653-669
- Luh, M.G., R.A. Baker & Don E. Henley (1973)
«Arsenic analysis and toxicity - A Review» The Science of the total Environment 2 (1973) 1-12
- Lunde, G., (1973)
«The synthesis of fat and water soluble arseno organic compounds in marine and limnetic algae» Acta Chem. Scand. 27, 1586-1594 (citado em Christakopoulos 1988)
- Lunde, G. (1977)
«Occurrence and transformation of arsenic in the marine environment», Environ. Health Perspect. 19, 97-52
- Luten, J.B., G. Riekwel-Booy & A. Rauchbaar (1982)
«Occurrence of arsenic in plaice (Pleuronectes platessa): Nature of organo-arsenic compound present and its excretion by Man», Environ. Health Perspect. 45, pp 165-170
- Luten, J.B., G. Riekwel-Booy, Greef & M.C. Ten Noever de Braawn (1983)
«Identification of arsenobetaine in sole, lemon sole, flounder, dab, crab and shrimps by field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry», Chemosphere, 12, pp 131-141
- Mackenzie F.T., R.L. Lantzy e V. Paterson (1979)
«Global trace metal cycles and predictions», Mathematical Geology, vol.11, Nº 2, 1979, pp 99-142
- Maeda S., S. Fusita, A. Ohki, I. Yoshifuku, S. Higashi e T. Takeshita (1988)
«Arsenic accumulation by arsenic-tolerant freshwater blue-green algae (Phormidium sp.) Applied Organometallic Chemistry, vol.2/4 (1988) 353-358
- Maher, W.A. (1985)
Comp. Biochem. Physiol., 1985, 80C: 199 (citado em Maher e Butler 1988)
- Maher, W.A. & E. Butler (1988)
«Arsenic in the marine environment», review, Applied Organometallic Chemistry (1988) 2, 191-214
- Mann P.J.G., H.E. Woodward & S.M. Quastel (1938)
«Hepatic oxidation of choline and arsenocholine» Biochem. J. 32: 1024-1032
- Malokty, D.T. & M.A. Anderson (1976)
The adsorption of the potential determining arsenate anion on oxide surfaces» in Colloid an interface science, Vol. IV, Academic Press

- Marafante E., F. Bertolero, J. Edel, R. Pietra e E. Sabbioni (1982)
«Intracellular interaction and biotransformation of arsenite in rats and rabbits» The science of the Total Environment, 24 (1982) 27-39
- Marafante, E., M. Vahter & L. Dencker (1984)
«Metabolism of arsenocholine in mice, rats and rabbits» The science of Total Environment, 34 (1984) 223-240
- Marafante, E., M. Vahter, H. Morin, J. Envall, M. Sandstrom, A. Christakopoulos e R. Ryhage (1987)
J. Appl. Toxicol., 1987, 7, (2), 111 (citado em Vahter e Marafante 1988)
- Martin, J.M. (1981)
«Le mercure et l'arsenic dans l'estuaire du Tage» Laboratoire de Geologie, E.N.S./ C.N.A., Jan 1981
- Martin, J.M. (1984)
«L'Arsenic dans l'Estuaire du Tage», Project UNDP/POR/77/016, CNA, Lisbonne, 1984
- Martins H.M., M.T. Moita e J.G. Ferreira (1982)
«Interrelation of phytoplankton and physico-chemical data in the Tejo estuary» in «Estuarine processes»: An application to the Tagus estuary UNEP/UNESCO/IOC, CNA 1986
- Mathias, C.L., S.J. Bushong, L.W. Hall, Jr, J.M. Bellama e F.E. Brinkman (1988)
«Simultaneous butyltin determinations in the microlayer, water column and sediment of a northern Chesapeake Bay marina and receiving system» Applied Organometallic Chemistry (1988) 2, 547-552
- Matsuto, S., H. Kasuga, H. Okumoto e A. Taka Haschi (1984)
«Accumulation of arsenic in blue-green alga, Phormidium sp». Comp. Biochem. Physiol. Vol. 78C, Nº 2, pp. 377-382, 1984
- Matsuzono, Y., M. Nakamura, S. Tanaka e Y. Hashimoto (1989)
«Chemical form of arsenic compounds and distribution of their concentrations in marine atmosphere» in 4th Int. Symp. on «Natural and Industrial Arsenic», Tokyo, Japan, 25 Nov., 1989
- McBride, B.C. & R.S. Wolfe (1971)
«Biosynthesis of dimethylarsine by bacteria», Biochemistry (Easton) 10, 4312-4317
- McBride, B.C., H. Merilees, W.R. Cullen e W. Pickett (1978)
«Anaerobic and aerobic alkylation of arsenic» in Brinckman & Bellama (Eds.), op. cit.
- Mello Breyner, T. (1918)
«Arsenicais e síflis, crítica do tratamento abortivo» Academia das ciências de Lisboa, Memória, Março de 1918
- Miller, J.C. & J.N. Miller (1984)
«Statistics for analytical chemistry». Ellis Horwood Limited/John Wiley & Sons, 1984

- Misra, S.G. & R.C. Tiwari (1963)
«Arsenate-Arsenite adsorption in soils». Indian J. Appl. Chem. 26, 117-121
(citado em Woolson 1983 b)
- Miyajima, M., N. Hamada, E. Yoshimura, A. Okubo, S. Yamazaki e S. Toda (1988)
«Lipophilic arsenic compounds(s) in the liver of the tiger shark
(Galeocerdo cuvier)». Applied Organometallic Chemistry, Vol. 2/4 (1988),
377-384
- Moita, M.T.J. (1982 a)
«Estudo dos pigmentos (clorofila e feopigmentos) colhidos no estuário do
Tejo (1980)», Estudo Ambiental do Estuário do Tejo, CNA/tejo nº 15, Rel.
14, p/188.
- Moita, M.T.J. (1982 b)
«Estudo do fitoplancton do estuário do Tejo (1980-1981)» Estudo Ambiental
do Estuário do Tejo, 1982
- Monteiro, J., D. Calejo (1971)
«Elementos de biologia» - Cruzeiro CEPOL I, J.N.I.C.T., 1971
- Moore, R.M., J.D. Burton, P.J. Le B. Williams e M.L. Young (1979)
«The behaviour of dissolved organic material, iron and manganese in
estuarine mixing». Geochim. Cosmochimica Acta, Vol. 43, pp 919-926
- Morris R.J., M.J. McCartney, A.G. Howard, M.H. Arbab-Zavar e J.S Davis (1984)
«The ability of a field population of diatoms to discriminate between
phosphate and arsenate» Marine Chemistry, 14 (1984) 259-265.
- Mukai, H., Y. Ambe, T Muku, K. Takeshita e T. Fukuma (1986)
«Seasonal variation of methylarsenic compounds in airborne particulate
matter». Nature, Vol. 324, November 1986, pp 239-241
- National Academy of Sciences (1977)
«Medical and Biological Effects of Environment pollutants: Arsenic»,
N.A.S. Washington, D.C.
- National Academy of Sciences (1983)
«Drinking Water and Health». Washington D.C., N.A. Press. 1983
- Nelson, K.W. (1983)
«Introduction. Industrial Sources». in Lederer e Fensterheim, (1983), op.
cit.
- Newland, L.W. (1982)
«Arsenic, Beryllium, Selenium and Vanadium» in Antropogenic Compounds,
The Handbook of Environmental Chemistry», O. Hutzinger (ed), Vol. 3. part
B, Springer 1982
- Nielsen, F.H. & T.B. Shuler (1978)
«Arsenic deprivation studies in chicks» Fed. Proc. Fed. Am. Jor. Exp.
Biol., 37, 833 abs (1978) (citado em Uthus, 1983)
- Nissen, P, & A.A. Benson (1982)
«Arsenic metabolism in freshwater and terrestrial plants», Physiol.
Plant. 54: 446-450, 1982

- Nixon, S.W., J.R. Kelly, B.N. Furnas, C.A. Oviatt e S.S. Hale (1980)
«Phosphorous regeneration and the metabolism of coastal marine bottom communities» in Marine Benthic Dynamics, ed. K.R. Tenore e B.C. Coull., The Belle W. Baruch. Library in Marine Science, nº 11
- Norin, H. (1987) com. pess.
- Norin, H., A. Christakopoulos (1982)
«Evidence for the presence of arsenobetaine and another organoarsenical in shrimps», Chemosphere, 11, 787-798.
- Norin, H., R. Ryhage, A. Christakopoulos e M. Sandstrom (1983)
«New evidence for the presence of arsenocholine in shrimps (Pandalus borealis) by use of pyrolysis gas chromatography - atomic absorption spectrometry/mass spectrometry» Chemosphere, 12, 299-315.
- Norin H., A. Christakopoulos, M. Sandstrom e R. Ryhage (1985)
«Mass fragmentographic estimation of trimethylarsine oxide in aquatic organisms» Chemosphere, vol.14, Nº 3/4, pp. 313-323, 1985.
- Norin, H., A. Christakopoulos, L. Rondhal, A. Hagman e S. Jacobsson (1987)
«Identification and quantification of arsenocholine and acetylarsenocholine in trace amounts in biological material by use of pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry». Biomedical and environmental mass spectrometry, Vol. 14, 117-125 (1987)
- O'Connor, T.P. & T.C. Campbell (1985)
«Essentiality of the trace element: arsenic». Final report. U.S. Environ. Protect. Agency, Washington, unpublished, 1985
- Oikawa, K. (1988)
«Short review: utilization of inorganic and organic arsenic compounds in new technologies» Applied Organometallic Chemistry vol.2/4 (1988), 391-394
- Odanaka, Y., N. Tsuchiya, O. Matano e S. Goto (1983)
«Determination of inorganic arsenic and methylarsenic compounds by gas chromatography and multiple ion detection mass spectrometry after hydride generation-heptane cold trap», Anal. Chem. (1983), 55, 929-932
- Officer, C.B. (1979)
«Discussion of the behaviour of non conservative dissolved constituents in estuaries» Est. Coastal Marine Science (1979), 9, 91-94
- O'Kane, D.P. (1982)
«Environmental studies and related activities in the Tejo estuary» IV steering committee meeting, POR/77/016 - env. st. Tagus estuary. Jan. 1982.
- Oliveira, E. Arantes e (1941)
«Esgotos de Lisboa - Estudos de anteprojecto» - C.M.L., 1941
- Onishi, H. (1969)
Arsenic, Chapter 33, in K.W. Wedepohl (ed.) «Handbook of Geochemistry», 1969.

- Osborne, F.H. & H.L. Erlich (1976)
«Oxidation of arsenite by a soil isolate of Alcaligenes» J. Appl. Bacteriol. 41, 295-305.
- Oscarson, D.W., P.M. Huang e W.K. Liaw (1980)
«The oxidation of arsenite by aquatic sediment». J. Environ. Qual., Vol. 9, nº 4, 1980
- Oscarson, D.W., P.M. Huang, C. Defosse & A. Herbillon (1981)
«Oxidative power of Mn(IV) and Fe(III) oxides with respect to As(III) in terrestrial and aquatic environment». Nature Vol. 291, May 1981, 50-51
- Ott, M.B., B.B. Molder & H.L. Gordon (1974)
«Respiratory cancer and occupational exposure to arsenicals», Arch. Hlth. 29. 250-255
- Parris G.E. & F.E. Brinkman (1976)
«Reactions wich relate to environmental mobility of arsenic and antimony. II. Oxidation of trimethylarsine and trimethylstibine, 10 (12), Nov. 1976.
- Parish G.C., R. Glass, R. Kimbrough (1979)
«Acute poisoning in two workers cleaning a clogged drain» Archives of Environmental Health, 34 (4), 1979, pp 224-227.
- Partington J.R. (1950)
«Quimica General e Inorganica» Dossat, Madrid, 1950.
- Penrose, W.R. (1975)
«Biosynthesis of organoarsenic compounds in brown trout (Salmo trutta) J. Fish. Res. Bd. Can, 32, 2385-90.
- Penrose W.R. & E.A. Woolson (1974)
«Arsenic in the marine and aquatic environments: analysis, occurence and significance» CRC Critical reviews in Environmental Control, 4, 465 (1974).
- Penrose W.R. H.B.S. Conacher, R. Black, J.C. Méranger, W. Miles, H.M. Cunningham e W.R.S. Squires (1977)
«Implications of inorganic/organic interconversions on fluxes of arsenic in marine food webs» Environmental Health Perspectives, vol.19, pp 53-59, 1977.
- Perkin-Elmer, (1976)
«Detection limits», «Handbook of the 5000 AAS», September 1976
- Pershagen G. (1983)
«The epidemiology of human arsenic exposure» in Fowler, B.A. (ed.), op. cit, 1983.
- Pershagen G. & M. Vahter (1979)
«Arsenic, a toxicological and epidemiological appraisal» Naturvardsverket, Rapport, snv pm 1128, 1979.

- Peters R.A. (1955)
«Biochemistry of some Toxic Agent. I. Present state of knowledge of biochemical lesions induced by trivalent arsenic poisoning». Bull. John Hopkins Hosp. 97, 1-4L.
- Peterson M.L. & R. Carpenter (1983)
«Biogeochemical processes affecting total arsenic and arsenic species distribution in an intermittently anoxic fjord». Marine Chemistry, 12 (1983) 295-321.
- Peterson M.L. & R. Carpenter (1986)
«Arsenic distributions in porewaters and sediments of Puget Sound, Lake Washington, the Washington coast and Saanich Inlet, B.C.» Geochimica et Cosmochimica Acta, vol.50, pp. 353-369.
- Philips D.J.H. & M.H. Depledge (1985)
«Metabolic pathways involving arsenic in marine organisms: unifying hypothesis» Marine Environmental Research 17 (1988) 1-12.
- Pierce M.L. & C.B. Moore (1982)
«Adsorption of arsenite on amorphous iron hydroxide from dilute aqueous solution». Environ. Sci. Technol. 14, 214-216
- Pilson M.E.Q. (1974)
«Arsenate uptake and reduction by Pocillopora verrucosa» Limnol. Oceanogr., 19, 339-341.
- Piver W.T. (1983)
«Mobilization of arsenic by natural and industrial processes» in Fowler (1983 a) op. cit.
- Planas D. & F.P. Healey (1978)
«Effects of arsenate on growth and phosphorous metabolism of phytoplankton» J. Phycol. 14: 337-341.
- Polonovski M. (1941)
«Éléments de biochimie Médicale» Masson et Cte, Editeurs, 1941.
- Pool, J.F.A. (1912)
«Biological reaction for arsenic with Monilia sitophila Saccardo», Pharma. Weedblad 49, 873-886 (citado em Woolson 1983 b)
- Popper, K.R. (1959)
«Falsiability». chap. IV, «The logical of Scientific Discovery», Harper & Row, 1959
- Quimigal (1982), com. pess. (carta de 12/03/82)
- Raiziss, G.W. & J.L. Gavron (1923)
«Trivalent aliphatic arsenicals», pp. 36-68, in Organic Arsenical Compounds, N.Y., The Chemical Catalogue Co, Inc., 1923 (citado em Klumpp 1979)
- Ramirez-Munoz, J. (1968)
«Atomic Absorption Spectroscopy». Elsevier, New York, 1968, p. 235

- Ramos, M.I. & F.M. Catarino (1979)
«Cartografia da vegetação halófito do estuário do Tejo». 1º Simpósio Nacional de Estuários, 1979
- Reimer, K.J. e J.A. Thompson (1988)
J. Biogeochemistry 1988, 6, 211 (citado em Cullen e Reimer 1989)
- Reis, C.S. (1980)
«Fauna bêntica», in: Bettencourt et al. (1980 b) op. cit.
- Ricci, G.R., L.S. Shepard, G. Colovos & N.E. Hester (1981)
«Ion chromatography with atomic absorption spectrometric detection for determination of organic and inorganic arsenic species» Anal. Chem. 53: 610-613.
- Ridley W.P., L.J. Dizikies, J.M. Wood (1977)
«Biomethylation of toxic elements in the environment» Science, 22 July 1977, vol.197, no 4301, 329-332.
- Riedl, G.F., J.G. Sanders e R.W. Osman (1987)
«The effect of biological and physical disturbances on the transport of arsenic from contaminated estuarine sediments» Estuarine, Coastal & Shelf Science (1987), 25, 693-786.
- Rodrigues, A.M.F. e M.T.J. Moita (1978)
«Relatório do estudo quantitativo do fitoplâncton colhido no estuário do Tejo e nas praias de Paço de Arcos e de Carcavelos em Junho de 1977», I.N.I.P., 1978
- Rodrigues, A.M.F. e M.T.J. Moita (1979)
«Sistema dos sapróbios aplicado ao estudo do fitoplâncton para uma possível classificação da água do estuário do Tejo», 1º Simp. Nac. de Estuários, LNEC/CNA, 24-26 Jan, 1979
- Rodrigues A.M.F., M.T.J. Moita (1980)
«Distribuição do fitoplâncton. 6.3.1. Fitoplâncton» in Bettencourt et al. (1980 b), op. cit.
- Rosa, M.R. Tavares da (1989) com. pess. (Agosto 1989)
- Rufino, R.A.D. (1989) com. pess. (Dezembro de 1989)
- Ryan, P.W. (1983)
«Recent advances in gas chromatography/mass spectrometry in environmental analysis» in Natusch, D.F.S. e P.K. Hopke «Analytical Aspects of Environmental Chemistry», Wiley 1983
- Ryther, J.R., C.S. Yentsch (1957)
«The estimation of phytoplankton production in ocean from chlorophyll and light data». Limnol. Oceanogr. 2: 281-286, 1957
- Saaman, S. (1970)
in Methoden der organische Chemie band XIII/8 Metallorganische Verbindungen As, Sb, Bi pp402 (Thieme, Stuttgart, 1970)



- Saldanha, L.V.C. (1980)
«Povamentos bñtonicos, peixes e ictioplancton do estuário do Tejo» Estudo ambiental do estuário do Tejo, CNA/Tejo, no 5 - Rel.4, Jan. 1980
- Sandberg G.R., & Allen I.R. (1975)
«A proposed arsenic cycle in an agronomical ecosystem», in Woolson E.A. (ed) «Arsenical Pesticides», Am. Chem. Soc. Symp. Series. nº 7, pp. 124-147
- Sanders J.G. (1979 a)
«Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of Skelectonema costatum (Bacillariophyceae) J. Phycol., 15:424-428.
- Sanders, J.G. (1979 b)
«Microbial role in the demethylation and oxidation of methylated arsenicals in seawater» Chemosphere, 8, 135-137.
- Sanders, J.G. (1979 c)
«The concentration and speciation of arsenic in marine macro-algae». Estuarine and Coastal Marine Sciences (1979) 9, 95-99
- Sanders, J.G. (1980)
«Arsenic cycling in marine systems» Mar. Environ. Res., 3: 257-266.
- Sanders, J.G. (1983)
«Role of marine phytoplankton in determining the chemical speciation and biogeochemical cycling of arsenic» Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40 (suppl.2): 192-196.
- Sanders, J.G. (1985)
«Arsenic geochemistry in Chesapeake Bay: dependence upon anthropogenic inputs and phytoplankton species composition». Marine Chemistry, 17 (1985), 329-340
- Sanders, J.G. (1986)
«Alteration of arsenic transport and reactivity in coastal marine system after biological transformation» Rapp. p-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer., 186; 185-192, 1986.
- Sanders, J.G. & H.L., Windom (1980)
«The uptake and reduction of arsenic species by marine algae» Estuarine, and Marine Coastal Science, 10, 555-567.
- Sanders, J.G. & P.S., Vermeersch (1982)
«Response of marine phytoplankton to low levels of arsenate» J. Plankton Res., 4: 881-893.
- Sanders, J.G. & Cibik (1985)
«Adaptive behaviour of euryhaline phytoplankton communities to arsenic stress». Marine Ecology - Progress Series, Vol. 22: 199-205, 1985
- Sanders J.G. & Osman (1985)
«Arsenic incorporation in a salt marsh ecosystem» Estuarine, Coastal and Shelf Science (1985). 20, 387-392.

- Shiller, C.M., B.A. Fowler e J.S. Wood (1977)
 «Arsenic effects on pyruvate dehydrogenase activation», *Environ. Health Perspectives*, 19:205 (1977)
- Schroeder & Ballassa (1966)
 «Abnormal trace metals in Man: Arsenic» *J. Chron. Dis.* 1966, vol.19, pp 85-106.
- Schweizer E.E. (1967)
 «Toxicity of DSMA soil residues to cotton and rotational crops» *Weeds* 15, 72-76 (citado em Woolson 1983)
- Scudlark, J.R. & D.L. Johnson (1982)
 «Biological oxidation of arsenite in seawater» *Est. Coast and Shelf Sci.* (1982), 14, 693-706.
- Seyler, P. (1985)
 «Formes chimiques et comportement de l'arsenic en milieu estuarien». These de Doctorat, Université de Paris 6, 1985
- Silva E.S., M.E. Assis, M.A. Sampaio (1969)
 «Primary productivity in the Tagus and Sado Estuaries from May 1967 to May 1968», *I.B.M., N.E. n° 37*, Maio 1969
- Shariatpanahi, M., A.C. Anderson, A.A. Abdelghani (1981)
 in Trace substances in Environment Health. XV (Ed. Hemphill, DD). University of Missouri, Columbia, pp. 383-7 (citado em Andreae 1986 a)
- Shen Y.S. & C.S. Chen (1964)
 «Relation between black-foot disease and the pollution of drinking water by arsenic in Taiwan» in *Advances in Water Pollution Research*, O. JAAG (ed.) 1964.
- Shibata, Y., M. Morita e J.S. Edmonds (1987)
 «Purification and identification of arsenic-containing ribofuranosides from edible brown seaweed Laminaria japonica (Makombu)». *Agric. Biol. Chem.* 51(2), 391-398, 1987
- Shibata, Y. & M. Morita (1988)
 «A novel, trimethylated arseno-sugar isolated from the brown alga Sargassum tumbergii», *Agric. Biol. Chem.* 52, (4), (1988), 1087.
- Shibata, Y., K. Jin e M. Morita (1989)
 «Chemical forms of arsenic in the edible red alga, Pophyra tenera and the product, Nori» in 4th Int. Symp. on «Natural and Industrial Arsenic», Tokyo, Japão, 25 Nov. 1989
- Shiomi, K., A. Shinagawa, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1983 a)
 «Purification and identification of arsenobetaine from the muscle of an octopus Paraoctopus dofleini», *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49(1), 79-83 (1983)
- Shiomi, K., A. Shinagawa, M. Azoma, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1983 b)
 «Purification and comparison of water-soluble arsenic compounds in a flatfish Limanda limanda Hentzensteini, Sea Squirt Halocynthia roretzi,

and sea cucumber Stichopus japonicus». Comp. Biochem. Physiol. vol. 74C: 393

Shiomi, K., A. Shinagawa, T. Garashi, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1984 a)
«Evidence for the presence of arsenobetaine as a major arsenic compound in the shrimp Sergestes lucens» *Experientia*, 40 (1984), 1247-1248

Shiomi K., A. Shinagawa, K. Mirotta, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1984 b)
«Identification of arsenobetaine as a major arsenic compound in the ivory shell Buccinum striatissimum» *Agric. Biol. Chem.* 48(11), 2863-2864, 1984

Shiomi, K., Y. Kakehashi, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1987 a)
Applied Organometallic Chemistry 1987 1:177 (citado em Shiomi et al 1988)

Shiomi, K., M. Orii, H. Yamanaka e T. Kikuchi (1987 b)
Nippon. Suisan Sukkaishi 1987, 53, 103, (citado em Cullen e Reimer 1989)

Shiomi K. Y. Horiguchi e T. Kaise (1988)
«Acute toxicity and rapid excretion in urine of tetramethylarsonium salts found in some marine animals» *Applied Organometallic Chemistry* vol. 2/4 (1988), 385-390.

Sholkovitz, E.R. (1976)
«Floculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and sea-water» *Geochim. Cosmochimica Acta*, 40, 831-845

Show, I.T. Jr. (1980)
«The movements of marine copepod in a tidal lagoon» in «Estuarine and wetland processes with emphasis on modelling», P. Hamilton, K.B. MacDonald (Eds.), Plenum, pp. 561-601

Sobral, P. (1982)
«Zooplankton no estuário do Tejo. Distribuição e abundância» in «Estuarine Processes. An Application to the Tagus Estuary», UNEP/UNESCO/IOC/CNA, Lisbon, 1982

Squibb K.S. & B.A. Fowler (1983)
«The toxicity of arsenic and its compounds» in Fowler (1983a) (ed). op.cit., pp. 233-263.

Staub C., J. Buffle, W. Haerbi (1984)
«Measurements of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration. Influence of various factors on the retention of metals and ligands by neutral and negatively charged membranes. *Analyt. Chem.* 56, 2843-2849

Stevens, J.T., L.L. Hall, J.D. Farmer, L.C. DiPasquale, N. Chernoff e W.F. Durham (1977)
«Disposition of ¹⁴C and/or ⁷⁴As - cacodylic acid in rats intravenous, intratracheal and peroral administration». *Environ. Health Perspectives*, 19: 151-7, 1977

Stocken, L.A., & R.H.S. Thompson (1949)
«Reactions of British anti-lewisite with arsenic and other metals in living systems.» *Biochem. J.*, vol.29, (1949) pp. 168-194.

- Strickland J.D.H. & T.R. Parsons (1968)
«A practical handbook of seawater analysis». Fish. Res. Bd. of Canada, 1st. ed, 1968
- Strickland J.D.H. & T.R. Parsons (1972)
«A practical handbook of seawater analysis» Fisheries Research Board of Canada Bull. 167, 2nd ed. Ottawa, 1972.
- Sugawara K. & S. Kanamori (1964)
«The spectrometric determination of trace amounts of arsenate and arsenite in natural waters with special reference to phosphate determination» Bull. Chem. Soc. Jpn. 37, 1358-1363.
- Suzuki, N., Y. Iwata (1989)
«Determination of arsenic in marine macro algae by radioactivation analysis and substochiometry». in 4th Int. Symp. on «Natural and Industrial Arsenic», Tokyo, Japão, 25 Nov. 1989
- Takamatsu, T., M. Kawashima e M. Koyama (1985)
«The role of Mn^{2+} -rich hydrous manganese oxide in the accumulation of arsenic in lake sediments». Water Res., Vol. 19, nº 8, pp. 1029-1033, 1985
- Talmi, Y. & D.T. Bosttick (1975)
«Determination of alkylarsenic acids in pesticide and environment samples by gas chromatography with a microwave emission spectrometry detection system», Anal. Chem., vol.47, nº13, Nov. 1975, pp. 2145-2150.
- Tam G.K.H., S.M. Charbonneau, F. Bryce e G. Lacroix (1978)
«Separation of arsenic metabolites in dog plasma and urine following intravenous injection of ^{74}As ». Anal. Biochem. 86: 505-511
- Tam G.K.H., S.M. Charbonneau, G. Lacroix e F. Bryce (1979 a)
«Confirmation of inorganic arsenic and dimethylarsinic acid in urine and plasma of dog by ion-exchange and TLC». Bull. Environ. Toxicol. 21 (1979 a), 371-374
- Tam G.K.H., S.M. Charbonneau, F. Bryce, G. Pomroy e E. Sandi (1979 b)
«Metabolism of inorganic arsenic (^{74}As) in human following oral ingestion». Toxicology and Applied Pharmacology, 50, 319-322 (1979)
- Tam G.K.H., S.M. Charbonneau, F. Bryce e E. Sandi (1982)
«Excretion of a single oral dose of fish-arsenic in man». Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28, 669-673 (1982)
- Tanaka, S. (1988)
«Distribution of arsenic in the natural environment with emphasis on rocks and soils» Applied Organometallic Chemistry 2/4 (1988), 283-296
- Tanaka, S, M. Kaneko e Y. Hashimoto (1984)
J. Chem. Soc. Japan, 637-642, (1984) (citado em Mukai et al 1986)
- Taylor, C.D. & R.S. Wolfe (1974)
J. Biol. Chem. 249, 4879-4893 (1974) (citado em Wood et. al 1977)

- Ter Welle, R.J. & E.C. Slater (1964)
«Uncoupling of respiratory chain phosphorylation by arsenate». *Biochem. Biophys. Acta*, 143, 1-17 (citado em Woolson, 1983)
- Thanabalasingam, P. & L.T. Pickering (1986)
«Arsenic adsorption by humic acids». *Environmental Pollution (Series B)*, 12 (1986) 233-246
- Thayer J.S. (1984)
«Organometallic compounds and living organisms» Academic Press, 1984
- Thayer, J.S. & F.E. Brinkman (1982)
in *Advances in Organometallic Chemistry*, Stone, F.G.A. e West, R. (Eds.). Academic Press, N.Y. 1982, Vol. 20, pp. 313-356
- Thom C. & K.B. Raper (1932)
«The arsenic fungi of Gosio.» *Science*, 76, 548-550 (citado em Woolson 1983)
- Train, R.E. (1979)
«Quality criteria for water», US.E.P.A. Castle House Publ. Lta., 1979.
- Turner, A.W. (1949)
«Bacterial oxidation of arsenite». *Nature*, July 9, 1949, nº 4158, pp. 76-77
- Turner, J.T. (1982)
«The annual cycle of zooplankton in a Long Island estuary». *Estuaries*, 5(4): 261-274
- Uthe, J.F., H.C. Freeman, J.R. Johnston & P. Michlik (1974)
«Comparison of wet ashing and dry ashing for the determination of arsenic in marine organisms, using methylated arsenicals for standards», *J. of the AOAC*, 57, 6 (1974) 1363
- Uthe, J.F. & J. Reincke (1975)
«Arsenate ion reduction in non-living biological materials». *Environ. Letters*, 10 (2), 83-88 (1975)
- Uthus, E.O., W.E. Cornatzer & F.H. Nielsen (1983)
«Consequences of arsenic deprivation in laboratory animals», in W. Lederer and R.J. Fensterheim op. cit
- Uthus O. e F.H. Nielsen (1987)
«Methyl depletion affects the response of rats to arsenic deprivation» *Nutrition Research*, vol.7, pp 1061-1072, 1987.
- Vather M. (1981)
«Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats». *Environ. Res.* 25, 286-293 (1981)
- Vather, M. & R. Gustafsson (1980)
in 3. Spuren Element Symposium. Arsen, M. Anke, H.J. Schneider e C. Br-
ücker (eds.). Karl Marx Universität Leipzig and
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 1980, p. 123-129

- Vather, M., E. Marafante e E.L. Dencker (1983)
«Metabolism of arsenobetaine in mice, rats and rabbits». The Science of the Total Environment 30 (1988) 197-211
- Vather, M. & E. Marafante (1988)
«In vivo methylation and detoxification of arsenic» in Craig & Glockling op. cit.
- Vidal, F.V. e V.M.V. Vidal (1980)
«Arsenic metabolism in marine bacteria and yeast» Marine Biology 60, 1-7 (1980)
- Vallee D., D. Ulmer, e W.E.C Wacker (1960)
«Arsenic Toxicology and Biochemistry» A.M.A. Arch. Ind. Hlth., 21, 132-151 (citado em Klumpp (1979))
- Voegtlin C., H.A. Dyer e C.S. Leonard (1924)
US Public Health Rep. 38, 1882-1912 (citado em Squibb e Fowler 1983)
- Von Endt D.W., P.C. Kearney e D.D. Kaufman (1968)
«Degradation of monosodium methanearsonate by soil microorganisms» J. Agric. Food. Chem. 16, 17-20
- Walsh, P.R., R.A. Duce e J.L. Fasching (1979)
«Considerations of the environment, sources and flux of arsenic in the troposphere», J. Geophys. Res. 84, (C4)), 1719-1726 (1979)
- Waslenchuk, D.G. (1977)
«The geochemistry of arsenic in the continental shelf environment», PhD Dissertation, Georgia Institute of Technology, 61 pp
- Waslenchuk, D.G. (1979)
«The geochemical controls of arsenic concentrations in southeastern United States» Chemical Geology, 24 (1979) 315-325
- Waslenchuk, D.G. e H.L. Windom (1978)
«Factors controlling the estuarine chemistry of arsenic» Estuarine and Coastal Marine Science (1978) 7, 455-464
- Watts R.L. & D.C. Watts (1974)
«Nitrogen metabolism in fish» in «Chemical Zoology», vol VIII, Deuterostomians, Cyclosoemes and fish (M. Flockin & T. Cheer, Eds) Academic Press
- Wauchope, R. Don (1983)
«Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants» in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim op. cit.
- Webb J.L. (1966)
«Enzymes and metabolic inhibitors», vol.3, Academic Press, W.Y. 595-793
- Welch, A De M. (1936)
«Utilization of the arsenic analogue of choline chloride in the biosynthesis of phospholipid». Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 35: 107-108

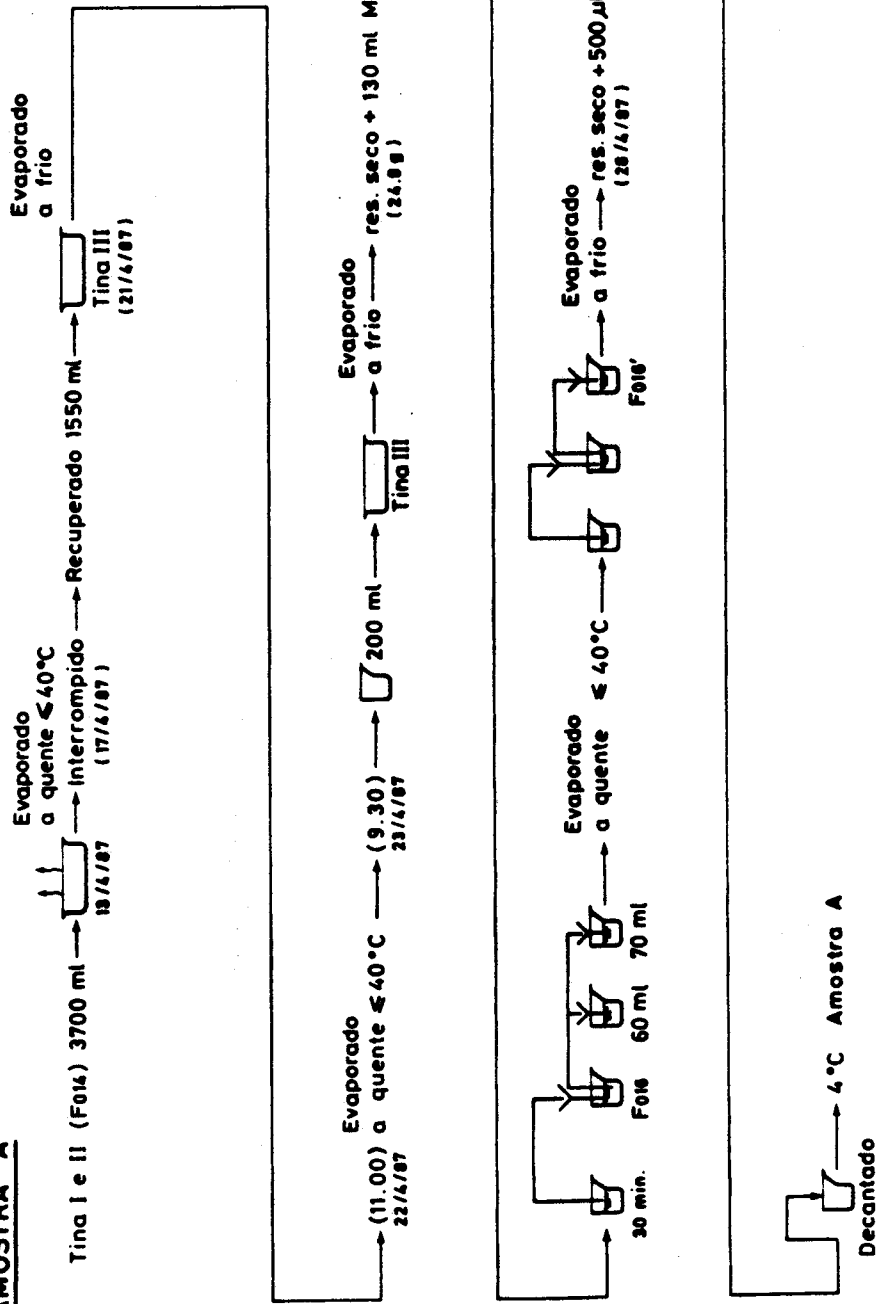
- Welch A.D. & R.L.Landau (1942)
«The arsenic analogue of choline as a component of lecithin in rats fed arsenocholine chloride» J. Biol. Chem. 144: 581-588
- Weiss, C.S., E.J. Parks & F.E. Brinckman (1983)
«Speciation of arsenic in fossil fuels and their conversion process fluids», in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim op. cit.
- Whittaker, R.H. e G.E. Likens (1973)
«Carbon in the biota» in Woodwell, G.M. e E.V. Pecan (Eds.) «Carbon in the biosphere». AEC Symposium Series 30, N.T.I.S., Springfield, Va, p. 281-302
- Wilkinson, S.P., P. Mchugh, S. Horsley, H. Tubbs, M. Lewis, A. Thould, M. Winterton, V. Parsons, e R. Williams (1975)
«Arsine toxicity aboard the Asia Freighter» British Medical Journal, 1975, 3, 559-563
- Wildenberg, J. (1978)
«An assessment of experimental carcinogen-detecting system with special reference to inorganic arsenicals», Environ.Res. 16, 1978, pp 139-152
- Willarson, R.K. (1983)
«Arsenic in electronics» in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim op. cit.
- Wong, P.T.S. Y.K. Chau, L. Luxon & G.A. Bengert (1977)
«Methylation of arsenic in the aquatic environment» in Trace Substances in Environmental Health II, 100-106, 1977
- Wood, J.M. (1974)
«Biological cycles for toxic elements in the environment», Science 183, 1049-1052
- Wood, J.M. (1975)
«Metabolism cycles for toxic elements in the environment, a study of kinetics and mechanisms» Int. Conf. IAWPR (1975)
- Wood, J.M., F.S. Kennedy & C.G. Rosen (1968)
Nature, 220, 173 (1968) (citado em Ridley et al 1977)
- Wood, J.M., J.D. Lipscomb, L. Que, J.R. Stephens, W.H. Orme-Johnson, E. Hunk, W.P. Ridley, V. Dizires., A. Cheh, M. Francia, T. Frisk, R. Zimmerman e J. Howard (1977)
«Some bio-inorganic chemical reaction of environmental significance» in Environmental Bio-Inorganic Chemistry, (D.H. Dolphin, ed.) Wiley 1977, pp. 261-288
- Woolson, E.A. (1973)
«Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops», Weed Sci., 21, 524-527
- Woolson, E.A. (1976)
«Organoarsenical pesticides» in: Kearney, P.C. & D.D. Kaufman «Degradation of herbicides», Marcel Dekker, pp 741-776, (citado em Woolson 1983 b)

- Woolson, E.A. (1977)
«Generation of alkylarsines from soil», *Weed Sci.* 25, pp 412-416
- Woolson, E.A. (1983 a)
«Man's perturbation of arsenic cycle» in: W.H. Lederer & R.J. Fensterheim
op. cit.
- Woolson E.A. (1983 b)
«Emissions, cycling and effects of arsenate in soil Ecosystems» in Fowler
(ed) op. cit.
- Woolson, E.A. & P.C. Kearney (1973)
«Persistence and reactions of C14-cacodylic acid in soils» *Environ. Sci.
Technol.*, 7, 47-50 (citado in Andreae 1986a)
- W.H.O. (1967)
Arsenic. Technical Report, Series N° 373, pp. 14-15, Geneva: WHO
- W.H.O. (1973)
Arsenic. Technical Report, Series N° 532, pp. 49-50, Geneva: WHO
- Wrench, J.J. & Addison (1981)
«Reduction, methylation and incorporation of arsenic into lipids by the
marine phytoplankton Dunaliella tertiolecta, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
38, pp 518-533
- Xu, H., B. Allard & A. Grimwall (1988)
«Influence of pH and organic substance on the adsorption of As^{IV} on
geological materials», *Water, Air & Soil Pollution*, 40 (1988), 293-305
- Yamauchi H. & Y. Yamamura (1979)
«Urinary inorganic arsenic and methylarsenic excretion following arsenate
- rich seaweed ingestion», *Jpn. J. Ind. Health*, 21: 47-54
- Yamato N. (1988)
«Concentrations and chemical species of arsenic in human urine and hair»
Bull Environ. Contam. Toxicol. (1988) 40: 633-640
- Zingaro R.A., N.R. Bottino (1983)
«The biochemistry of arsenic: recent developments» in Lederer e
Fensterheim op, cit.
- Zielhuis R.L. & A.A.E. Wibowo (1984)
«Standard setting and metal speciation: Arsenic» in Dahlem Konferenzen,
Springer, 1984
- Zussman R. E. Vicher e I.J. Lyon (1961)
«Arsine production by Trichophyton rubrum» *J. Bact* 81, 157

ANEXO I

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA F014

AMOSTRA A

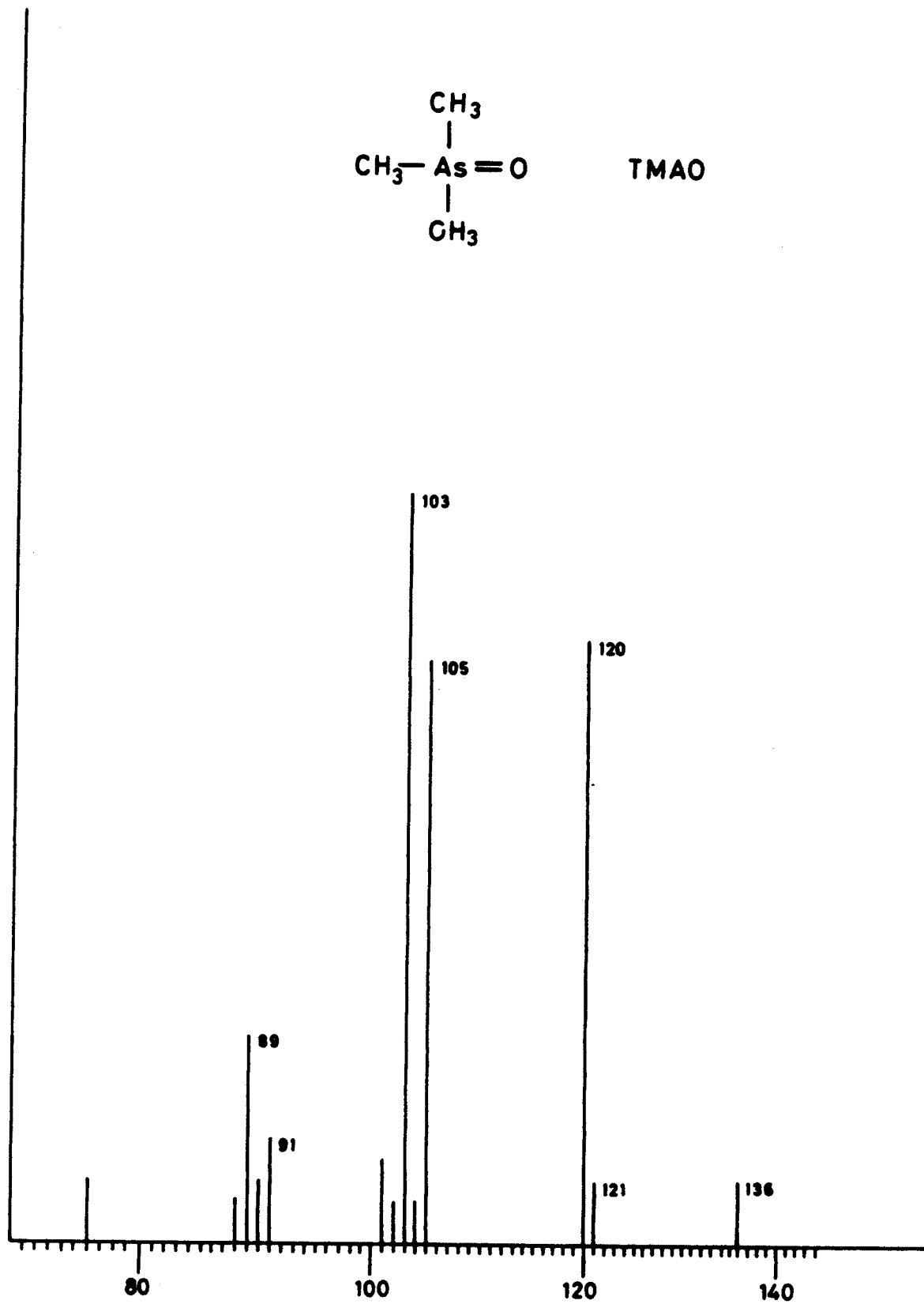
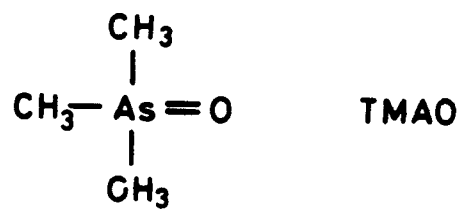


ANEXO II

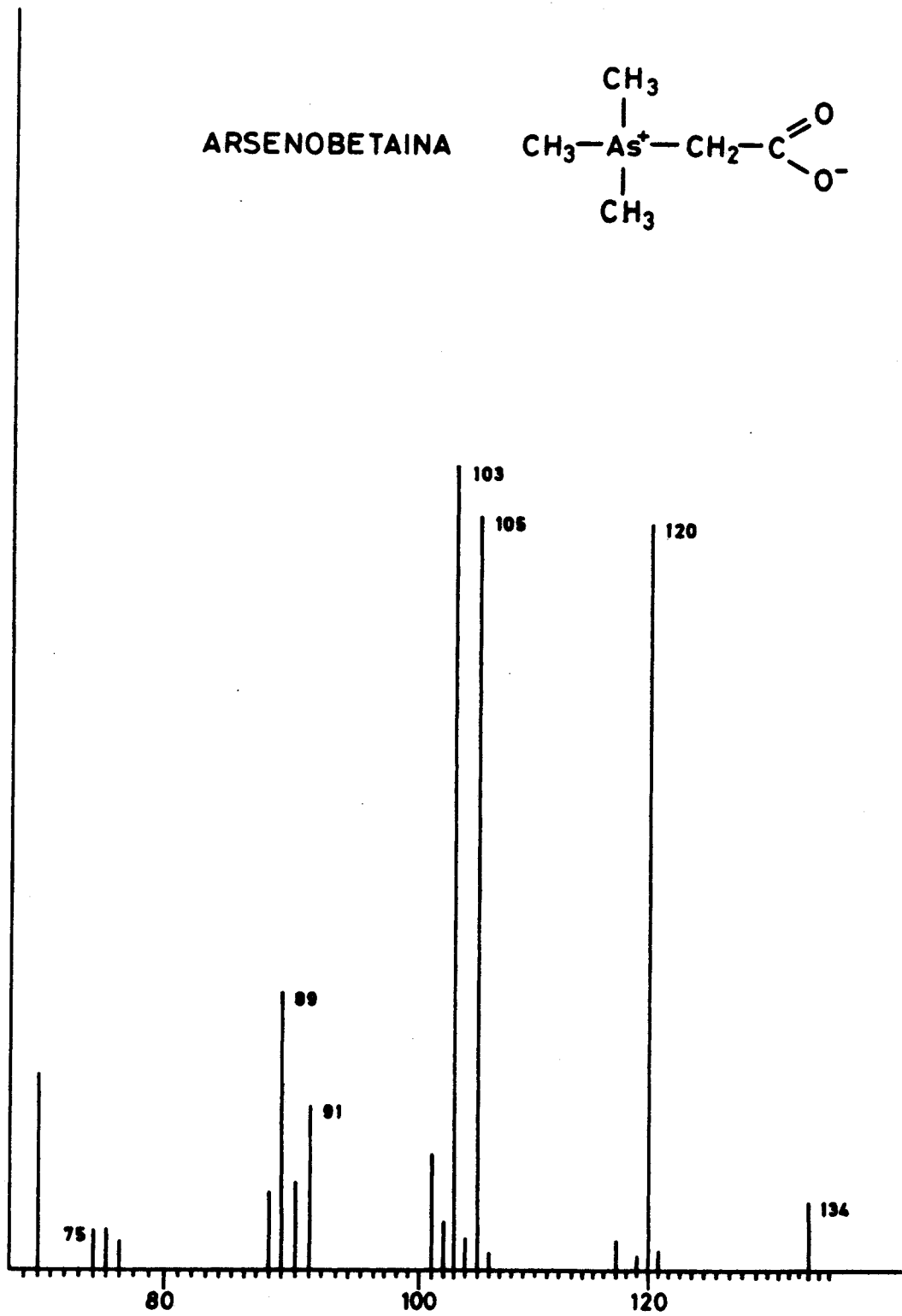
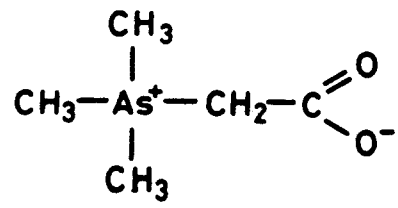
PROPRIEDADES DAS RESINAS

PROPRIEDADES	AMBERLITE IR-120	LEWATITE CNP 80
GRAU/FORMA	ANALÍTICO/(Na)	STANDARD /H ⁺
GRANULOMETRIA	14/52 mesh	0.3 - 1.25 mm Ø
MATERIAL BÁSICO	POLIESTIRENO	POLIACRILATO
GRUPOS ACTIVOS	SULFONAS	CARBOXÍLICOS
% DE LIGAÇÕES CRUZADAS	8	
TEOR DE HUMIDADE	44 - 48	45 - 50
DENSIDADE	850 g/l	1.180 g/l
CAPACIDADE DE TROCA		
HÚMIDA	19 meq/ml	4.8 mole/l
SECA	50 meq/g	
ESTABILIDADE À TEMPERATURA	≤ 120° C	-20° C a +120° C
ESTABILIDADE AO PH	1 - 14	1 - 14
EQUIVALÊNCIAS	DOWEX 50 - XB ZEOKARB - 225 ZEROLIT - 225 DUOLITE C 225	DOWEX CC R-1 AMBERLITE 50 DUOLITE CS - 100 BIO-REX 70

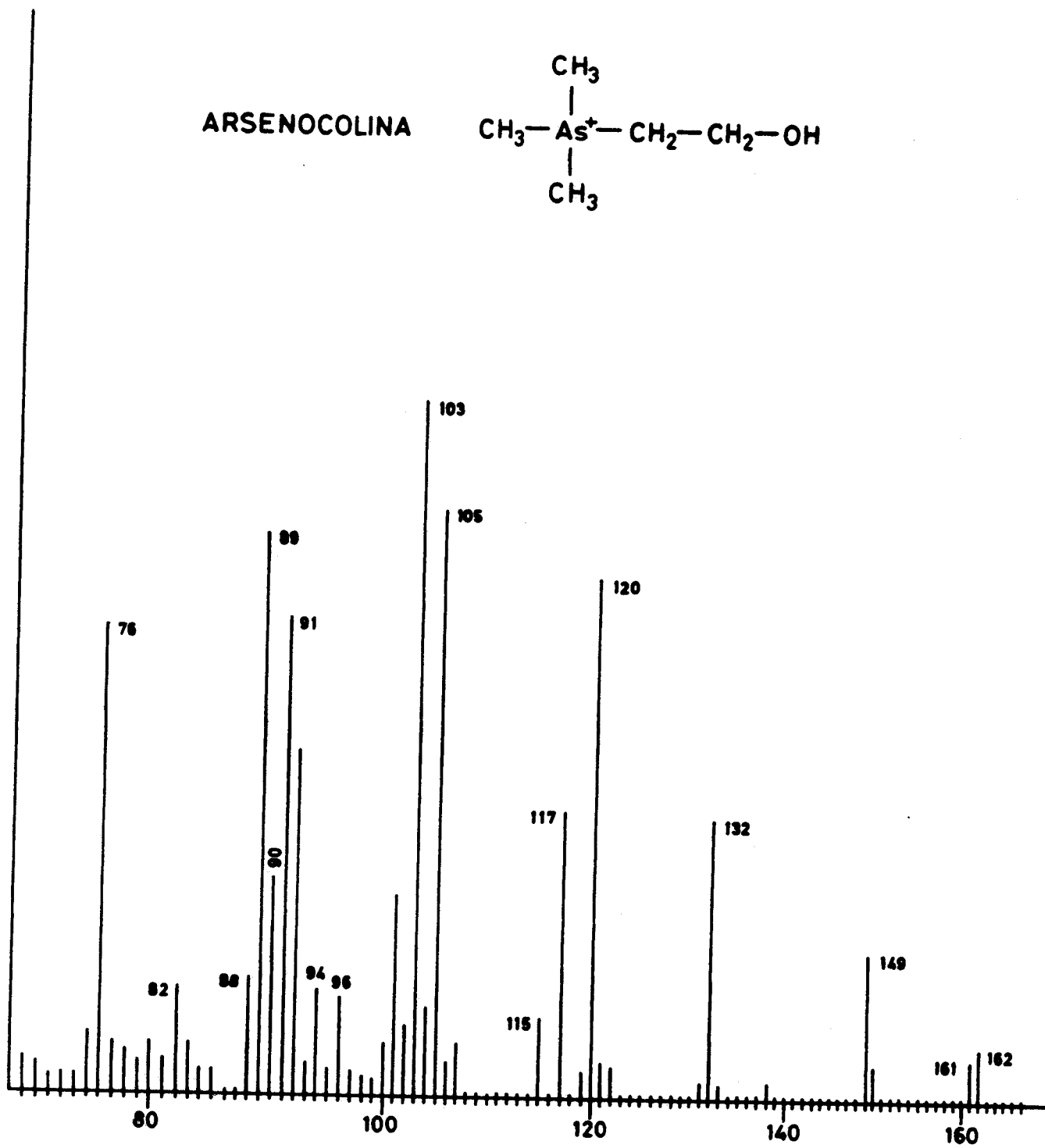
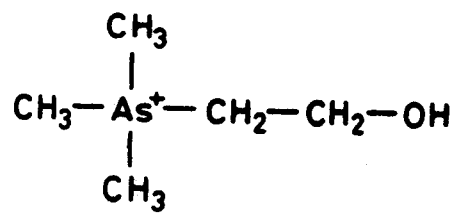
ANEXO III



ARSENOBETAINA



ARSENOCOLINA



ACETILARSENOCOLINA

