

3

Métodos Analíticos Utilizados na Determinação de Elementos-traço em Amostras Biológicas

O crescente interesse relativo à análise de traços em amostras ambientais e biológicas, principalmente com o intuito de se estimar o impacto destas concentrações no meio ambiente, principalmente no sistema aquático, ocasionou um substancial progresso no aprimoramento de técnicas de análise para se determinar as concentrações destes elementos em diferentes matrizes. Em virtude da alta toxicidade apresentada por alguns elementos, geralmente em concentrações na faixa de microgramas por quilograma para alguns organismos aquáticos, o desenvolvimento (ou redescobrimto) de vários métodos, técnicas e procedimentos analíticos foram realizados nos últimos 40 anos, com o objetivo, entre outros, de melhorar os limites de detecção disponíveis (Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008). Um exemplo desta evolução, por exemplo, foi a substituição, na absorção atômica, da chama por atomizadores eletrotérmicos, bem mais sensíveis. Assim, embora usando os mesmos princípios do método, a nova técnica desceu a menores limites de detecção, e abriu um largo campo para o estudo de sua otimização e aplicabilidade (Welz & Sperling, 1999). Outro exemplo foi a evolução do ICP ótico para o ICP massa. Ambos os métodos convivem, hoje em dia, com seus campos de aplicação, mas não resta dúvida quanto ao salto de sensibilidade e de limites de detecção trazido pelo último (Bocca et al., 2007; Nordberg et al., 2007).

Segundo a literatura, dentre as técnicas analíticas atualmente empregadas para a análise de sub-microgramas de elementos-traço em amostras biológicas, as mais utilizadas são: a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Bocca et al., 2007; Nordberg et al., 2007; Batista et al., 2008; Pozebon et al., 2008; Srogi, 2008; Nardi et al., 2009); a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008; Suleiman et al., 2008; Amorim et al., 2008); a análise de

ativação por nêutrons (NAA) (Kučera, 2007; Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008); a emissão de raios-X induzida por partículas (PIXE) (Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008) e a espectrometria de absorção atômica com chama, vapor frio e forno de grafite (Nordberg et al., 2007; Amorim et al., 2008; Batista et al., 2008; Srogi, 2008).

A determinação de concentrações traço e até subtraço de alguns elementos impuseram exigências especiais na hora de se selecionar o método a ser empregado, tais como: disponibilidade do equipamento, o tempo e a complexidade do processamento das amostras, a reprodutibilidade, a sensibilidade e o limite de detecção (Skoog et al., 2002; Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008). Porém, nem sempre é fácil selecionar um método ótimo entre as técnicas instrumentais disponíveis. Generalizações sobre as vantagens dos diversos métodos disponíveis, com base na precisão, conveniência ou no tempo dispendido são igualmente difíceis de avaliar (Skoog et al., 2002).

As Tabelas 1 e 2 ilustram alguns desses métodos e algumas de suas características.

Tabela 1. Alguns métodos instrumentais utilizados na análise de elementos-traço (adaptado de Skoog et al., 2002).

Absorciometria molecular
Fluorimetria
Absorção atômica
Fluorescência atômica
Emissão atômica
Espectrometria de massa com plasma
Voltametria de Redissolução anódica
Polarografia de pulso diferencial
Potenciometria
Fluorescência de Raio X
Espectroscopia eletrônica (ESCA)
Espectroscopia eletrônica (AUGER)
Espectrometria de massa
Cromatografia gasosa
Cromatografia líquida de alta resolução
Análise por ativação
Métodos combinados

Tabela 2. Comparação entre diversos métodos de análise para elementos-traços (adaptado de Welz & Sperling, 1999; Skoog et al., 2002; Nordberg et al., 2007).

Método	Precisão (%)	L.D. absoluto (g)	Massa da amostra	Destrutivo	Multi-elementar	Tempo
Análise por ativação	2-10	$>10^{-12}$	mg's	Não	Sim	min
Espectro/massa-centelha	20-30	$10^{-3}-10^{-4}$	mg's	Sim	Sim	horas
Emissão (arco)	5-20	$10^{-5}-10^{-6}$	10-100mg	Sim	Sim	1-2h
Absorção Molecular	4-8	$10^{-5}-10^{-7}$	10mg-1g	Sim	Não	horas
AA Chama	2-5	$10^{-6}-10^{-7}$	0,1-1g	Sim	Não	min
AA Forno	2-5	$10^{-11}-10^{-12}$	1mg-2 g	Sim	Não	horas
ICP-OES	1-3	$10^{-8}-10^{-9}$	0,1-1g	Sim	Sim	min
ICP-MS	1-3	$10^{-12}-10^{-13}$	0,1-1g	Sim	Sim	min
Fluorescência R-X	1-2	$10^{-3}-10^{-5}$	0,1-2g	Não	Sim	1h
Polarografia	4-8	$10^{-6}-10^{-7}$	0,010-1g	Sim	Não	1-2h

Neste estudo, empregou-se o método de absorção atômica utilizando-se como técnicas de atomização o forno de grafite e o vapor frio para a determinação das concentrações totais de alguns elementos-traço (Se, Cu, As, Cd, Ag e Pb) e mercúrio total e orgânico (Hg e Hg_{Org}), respectivamente, em amostras biológicas.

3.1. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

Considerada como uma técnica analítica bem-sucedida, a espectrometria de absorção atômica (AAS – *Atomic Absorption Spectrometry*) é uma das mais utilizadas na determinação de elementos em baixas concentrações, que estão presentes numa variedade de amostras, sejam estas líquidas, sólidas, em suspensão, e até mesmo gasosas, podendo estar associada a sistemas de análise em

fluxo e permitir também, os estudos de especiação (Welz & Sperling, 1999; Amorim et al., 2008).

Todas as aplicações analíticas modernas da AAS tiveram origem a partir de trabalhos publicados no final da década de 50 (Walsh, 1955 apud Amorim et al., 2008; Alkemade & Milatz, 1955 apud Amorim et al., 2008), que propuseram pela primeira vez o uso da AAS para análises químicas (Koirtyohann, 1980 apud Amorim et al., 2008). Marcando, em 2005, o aniversário de 50 anos de existência destas publicações, deve-se reconhecer que o uso da AAS muito contribuiu para o progresso científico. Neste meio século de aplicações, a confiabilidade e, principalmente, a economia apresentadas pela AAS foram os dois aspectos mais importantes para a utilização desta técnica analítica na determinação rotineira de concentrações traço ou sub-traço vários elementos em diversos tipos de matrizes, principalmente em amostras biológicas (Nordberg et al., 2007; Srogi, 2008; Amorim et al., 2008). Cerca de 70 diferentes elementos têm sido determinados por métodos de absorção atômica, incluindo os terras-raras mais comuns. A aplicação direta da técnica é limitada aos metais e semi-metais embora, por princípio, ela também possa ser aplicada a ametais, sendo este o caso do fósforo. Ao mesmo tempo, diversos ametais também têm sido determinados por métodos indiretos (Welz & Sperling, 1999).

Devido a sua simplicidade e baixo custo de operação, a AAS atraiu bastante interesse, mostrado principalmente, pelo crescente número de publicações a partir da década de 60. Este interesse foi mais evidenciado analisando-se o número de laboratórios que adquiriram este equipamento, principalmente os laboratórios industriais (Boar, 1999 apud Amorim et al., 2008). Porém, com o desenvolvimento de técnicas como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), as vantagens e desvantagens de cada técnica passaram a ser comparadas e começaram então, a aparecer previsões a respeito do abandono da AAS como técnica analítica (Hieftje, 1989 apud Amorim et al., 2008). Entretanto, a AAS apresenta algumas vantagens quando comparada às estas técnicas analíticas, tais como, menor custo do equipamento, menor custo operacional, facilidade de operação, além do reduzido número de linhas espectrais, que acarreta uma possibilidade bem menor de interferência por sobreposição de linhas. Além do mais, a absorção atômica vem sofrendo um

desenvolvimento contínuo, com novas células de absorção, fontes de radiação, detectores e técnicas de introdução de amostra, assim como melhores sistemas de leitura e softwares que não acarretam na possibilidade de abandono desta técnica analítica (Welz & Sperling, 1999; Amorim et al., 2008).

Atualmente, verifica-se que a AAS é ainda bastante empregada e que ganha bastante força com o emprego de técnicas de injeção em fluxo e possibilidade de separação e pré-concentração on-line (Amorim et al., 2008). Segundo Sneddon et al. (1993), o uso e o interesse pela AAS não são representados pelo número de publicações, que são indicativos do interesse acadêmico, mas sim, pelo número laboratórios que fazem uso desta técnica.

A AAS é uma técnica espectrométrica óptica atômica baseada na medida da absorção específica de energia por átomos livres, gasosos, no estado fundamental. A transformação do analito, presente na amostra, em átomos livres é proporcionada pela utilização de diferentes tipos de atomizadores. Os atomizadores mais utilizados na AAS são: uma chama formada pela combinação de diferentes combustíveis e oxidantes, na espectrometria de absorção atômica com chama (F-AAS); enquanto na espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET-AAS) diferentes tipos de atomizadores eletrotérmicos são empregados, tais como o forno de grafite na GF-AAS ou o tubo de quartzo aquecido na espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS). Os diferentes modos de se produzir o vapor atômico (atomização) a partir da amostra são que definem as técnicas de absorção atômica (chama, geração de hidretos, vapor frio e forno de grafite) (Welz & Sperling, 1999; Skoog et al., 2002).

Neste estudo foram empregadas duas técnicas de atomização da AAS para se determinar as concentrações dos elementos nas amostras de fígado e rins dos cetáceos da costa brasileira. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) foi utilizada para se determinar as concentrações totais de Se, Cu, As, Cd, Ag e Pb, enquanto a espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS) foi utilizada para se determinar a concentração de mercúrio total e orgânico (Hg e Hg_{Org}) nestas amostras.

3.1.1. A técnica do forno de grafite

O uso de um forno de grafite como atomizador foi proposto por Bóris V. L'vov, em 1959. Este forno baseou-se naquele projetado inicialmente por King, em 1905. A idéia de L'vov era que a amostra deveria ser completamente vaporizada e atomizada, e a absorvância total, associada devida ao elemento de interesse, usada para a quantificação do mesmo. L'vov, já em 1956, havia tido contato com o artigo de Walsh, que fora enviado ao seu chefe para uma revisão. Desde então, tornou-se “encantado por este elegante método para toda a vida” (Welz & Sperling, 1999).

A Figura 1a mostra o forno original de L'vov. Este consistia em um tubo de 10cm de comprimento, internamente revestido com uma folha de Ta, para evitar a difusão dos átomos através das paredes do tubo. A amostra era colocada em um eletrodo de grafite móvel e, entre este eletrodo e o tubo de grafite, era aplicada uma diferença de potencial. Assim, quando o eletrodo se aproximava do tubo, formava-se um arco elétrico, vaporizando a amostra, enquanto o tubo era, ao mesmo tempo, aquecido pelo efeito joule, pela passagem de uma corrente elétrica ao longo de seu comprimento. Todo o conjunto era montado numa câmara contendo argônio, e janelas de quartzo permitiam a passagem de radiação. Com este arranjo, L'vov atingiu limites de detecção entre 10^{-10} e 10^{-14} g, diversas ordens de grandeza melhores do que os obtidos até então pela chama (primeira técnica de atomização a ser desenvolvida na AAS). Posteriormente, L'vov utilizou o aquecimento Joule, tanto para o tubo como para a amostra, além de diminuir as dimensões do forno. Outra novidade foi a utilização do grafite pirolítico, menos poroso e mais denso do que o grafite eletrolítico, no lugar da folha de Ta (Welz & Sperling, 1999).

Na Figura 1b também está representado o forno de Massmann, que surgiu em 1967. O forno de Massmann representou um grande avanço para o desenvolvimento de um atomizador eletrotérmico que pudesse ser usado em aparelhos comerciais. O forno, mostrado na Figura 1b, consistia numa versão compacta do aparelho de King, aquecido pelo efeito Joule. Um tubo de grafite, de 50mm de comprimento, aquecido pela aplicação de uma corrente muito alta (500A), a baixa voltagem (10V), permitia uma gradação muito fina de

temperatura e, portanto, a seleção de condições de temperaturas ótimas para a atomização de cada elemento. O tubo de Massmann não era montado em uma câmara de argônio e, portanto, tinha de ser submetido a um fluxo constante de um gás inerte. Uma amostra (0,5 mg de sólido ou 50 μ L de solução) era introduzida no tubo através de um furo. A temperatura do forno era aquecida em etapas, de modo que o solvente e os concomitantes mais voláteis fossem eliminados de se proceder ao aquecimento final, capaz de levar o analito à atomização. Com este forno, Massmann obteve limites de detecção cerca de 10 vezes piores que os obtidos por L'vov. A razão disto pode ser atribuída ao fluxo de gás inerte, que nos aparelhos modernos, pode ser interrompido na etapa da atomização. Além disso, o aquecimento resistivo é mais lento do que o arco (Welz & Sperling, 1999).

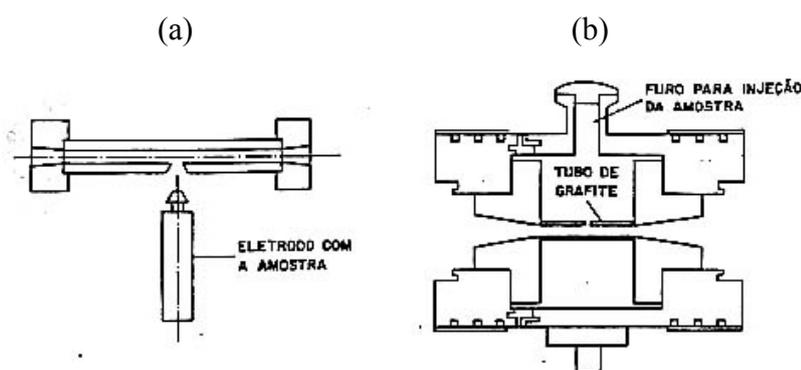


Figura 1. Representação do forno original de L'vov (a) e do Forno de Massmann (b) (Modificado de Welz & Sperling, 1999).

Uma série de outros autores propôs dispositivos alternativos de atomização, mas o modelo de Massmann é o que foi adotado pelos fabricantes e introduzido comercialmente em 1970, como um acessório dos instrumentos de absorção atômica em chama (Welz & Sperling, 1999). Porém, logo em seguida, os fabricantes dos instrumentos reconheceram o erro ao vender o forno como um acessório de instrumentos desenhados e planejados para trabalhos em chama. O sinal de absorção no forno de grafite, medido durante a etapa de atomização, era

muito rápido e aqueles instrumentos não proporcionavam respostas reais do pico de absorção. Além disso, as medidas de absorvância em altura de pico, dependiam da cinética de atomização e das condições do grafite, não sendo, portanto, reprodutivas. O forno possuía características não isotérmicas, que aumentavam as interferências. Estes equívocos foram, então, sendo corrigidos, com o tempo (Welz & Sperling, 1999).

Na técnica do forno de grafite, o aquecimento resistivo pode ser variado pelo controle da corrente elétrica, de modo que podem ser conseguidas temperaturas até o limite de resistência do grafite, em torno de 3000 °C. Geralmente, o aquecimento ocorre em três etapas: a secagem, em torno da temperatura de ebulição do solvente, a pirólise, que é usada para destruir a matriz, sem perder o elemento a ser determinado e que, portanto, depende da matriz e do elemento e a atomização. O forno é aquecido mais lentamente até a secagem e até a pirólise (rampas), mas tão rapidamente quanto possível no passo de atomização. A absorvância é medida durante a atomização. Cada estágio pode ser constituído de mais de uma etapa de temperatura. Uma etapa final de limpeza é também aconselhada (ver Figura 2).

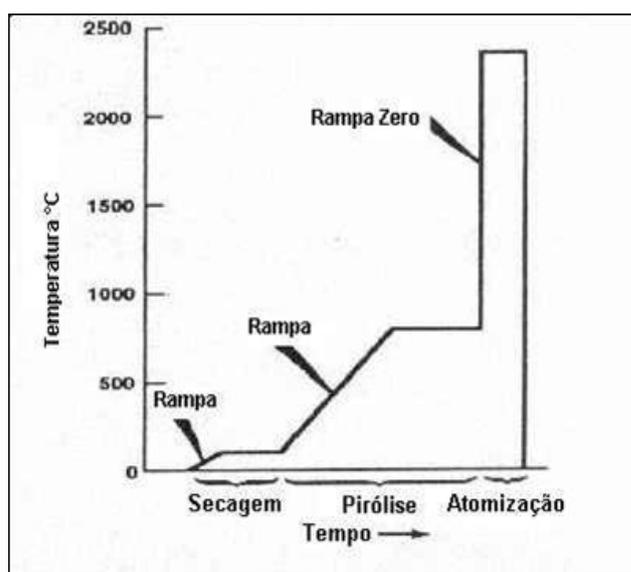


Figura 2. Programa de temperatura do forno de grafite (modificado de Seixas, 2004).

Entre as vantagens do forno de grafite podem ser citadas: a alta sensibilidade, a pequena quantidade de amostra requerida (5-100 μL), a possibilidade de se analisar amostras de outro modo difíceis de lidar com a nebulização pneumática, a possibilidade de se analisar amostras sólidas diretamente, sem solubilização prévia e, usando-se um amostrador automático, a possibilidade de automação, com o funcionamento sem a presença do operador. Em relação à técnica de chama, os limites de detecção melhoram de várias ordens de grandeza (Welz & Sperling, 1999). Entretanto, o tempo de análise e as chances de interferência são bem maiores. Estas interferências ocorrem porque não só o analito, mas também os componentes da matriz estão mais concentrados no interior do forno; daí, a importância da etapa de pirólise onde se tenta simplificar ao máximo a matriz para que, no momento da atomização, as chances de interferência sejam minimizadas.

As dificuldades de controle das interferências, quase provocaram o abandono da técnica, mas em 1981, foi introduzido por Slavin o conceito STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*) que, se seguido, leva ao sucesso da análise (Welz & Sperling, 1999). O conceito STPF consiste, fundamentalmente em:

- (i) Proceder a atomização em uma atmosfera isotérmica no tempo e no espaço, o que pode ser conseguido pelo aquecimento rápido do forno no momento da atomização (rampa “zero”), pelo uso da plataforma de L'vov e, mais recentemente, pelo aquecimento transversal do forno;
- (ii) Uso de modificadores químicos, que são agentes que buscam ajudar na simplificação da matriz previamente à atomização; os modificadores podem atuar aumentando a volatilidade da matriz ou, mais frequentemente, aumentando a estabilidade térmica do analito, permitindo maiores temperaturas de pirólise;
- (iii) Uso de correção de fundo mais eficiente, como o corretor Zeeman;
- (iv) Integração do sinal de absorção (leitura em área); como se trata de um sinal transiente (Figura 3), a leitura em área evita a influência da cinética de atomização, desde que realizada por um sistema de leitura suficientemente rápido (10 a 20 ms);

- (v) Uso do “stop-flow”, isto é, fluxo zero do gás de proteção (geralmente argônio) durante a etapa de atomização, o que aumenta o tempo de residência do vapor do analito no caminho ótico, com aumento conseqüente da sensibilidade e aproxima o forno das condições de isothermicidade;
- (vi) Uso de tubo de grafite recoberto com grafite pirolítico, mais inerte e menos poroso ao vapor atômico (Welz & Sperling, 1999).

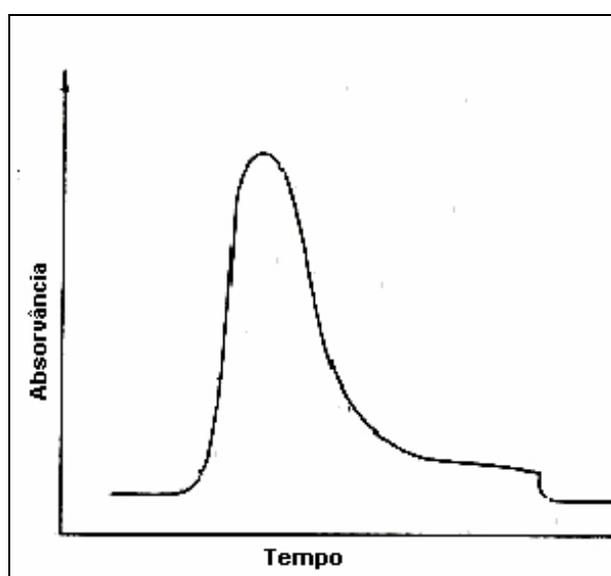


Figura 3. Pulso de absorção: Absorvância x Tempo (modificado de Seixas, 2004).

Hoje em dia, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) tornou-se uma das técnicas mais bem estabelecidas para a determinação rotineira de elementos-traço em amostras biológicas ou ambientais, devido, principalmente, à sua alta sensibilidade, precisão, exatidão e simplicidade (Srogi, 2008; Welz & Sperling, 1999). Entretanto, para bons resultados, o analista sempre deve estar atento a problemas de interferência, checando alguns resultados por adição de analito, por exemplo. O forno apresenta ainda a possibilidade da análise direta de sólidos ou de suspensões, o que contorna a etapa de abertura de

amostras, evitando os riscos de contaminação ou perdas e a diluição a ela associadas.

3.1.2. A técnica do vapor frio

Atualmente, o método analítico, baseado na espectrometria de absorção atômica (AAS), mais amplamente utilizado para a determinação de concentrações traço de mercúrio em uma grande variedade de matrizes, é aquele conhecido como vapor frio (CV-AAS) (Srogi, 2008).

Esta técnica é específica para a determinação de mercúrio, pois, este é o único elemento metálico cuja forma atômica (Hg^0) está presente na forma de vapor à temperatura ambiente. Assim, o método se baseia na redução, que normalmente utiliza o cloreto estanoso ou borohidreto de sódio da forma iônica mais oxidada, Hg^{2+} a Hg^0 (vapor) que é arrastado por um gás inerte para a célula de absorção, um tubo cilíndrico de vidro, com janelas de quartzo, postado longitudinalmente no caminho ótico do equipamento de absorção atômica. Como o elemento já chega à célula de absorção na forma atômica, esta não necessita ser aquecida. Daí, ser chamada técnica do “vapor frio” (Welz & Sperling, 1999).

Nos aparelhos atuais, o mercúrio é reduzido pela adição de cloreto estanoso ou borohidreto de sódio, e arrastado da fase líquida para fase vapor por borbulhamento da solução com ar ou nitrogênio, ou agitando-a fortemente. Uma montagem para a técnica do vapor frio é mostrada na Figura 4. No caso de aeração ter sido realizada por agitação, o gás carreador não precisa, necessariamente, borbulhar a solução. Não há diferença de sensibilidade entre os dois procedimentos. Mas, no caso do borbulhamento é importante o uso de um tubo dessecante (geralmente com perclorato de magnésio), a fim de evitar condensação de água nas paredes da célula. Alternativamente, a célula de absorção pode ser aquecida a uns 200 °C, evitando, assim, qualquer condensação de vapor d’água. A célula de absorção deve ter janelas de quartzo, em função do comprimento de onda utilizado (253.7 nm), embora um tubo T, sem janelas, também possa ser utilizado. O fluxo de gás carreador (de 0,1 a 0,5 L min⁻¹) e o tempo de agitação, se for o caso, devem ser otimizados. A agitação deve ser bem

intensa, de modo a garantir que o equilíbrio $\text{Hg}_{(l)} \leftrightarrow \text{Hg}_{(v)}$ seja alcançado, dentro de frasco de reação, para só depois haver a transferência do Hg para a célula de absorção, garantindo, assim, leituras reprodutivas (Welz & Sperling, 1999).

Na técnica do vapor frio, a leitura deve ser realizada em altura de pico, uma vez que o tempo de integração teria que ser excessivamente longo para conter todo o pico. Melhores limites de detecção podem ser encontrados utilizando-se a pré-concentração por amalgamação: uma armadilha consistindo de uma rede de ouro é postada entre o tubo de reação e a célula de absorção; o mercúrio gerado no frasco de reação é amalgamado pelo ouro; a operação pode ser repetida várias vezes, acumulando-se na rede do ouro mais mercúrio a cada ciclo. O mercúrio concentrado na rede de ouro é, então, liberado pelo aquecimento da armadilha. Limites de detecção da ordem de $0,001 \text{ ng mL}^{-1}$ são assim relatados (Welz & Sperling, 1999).

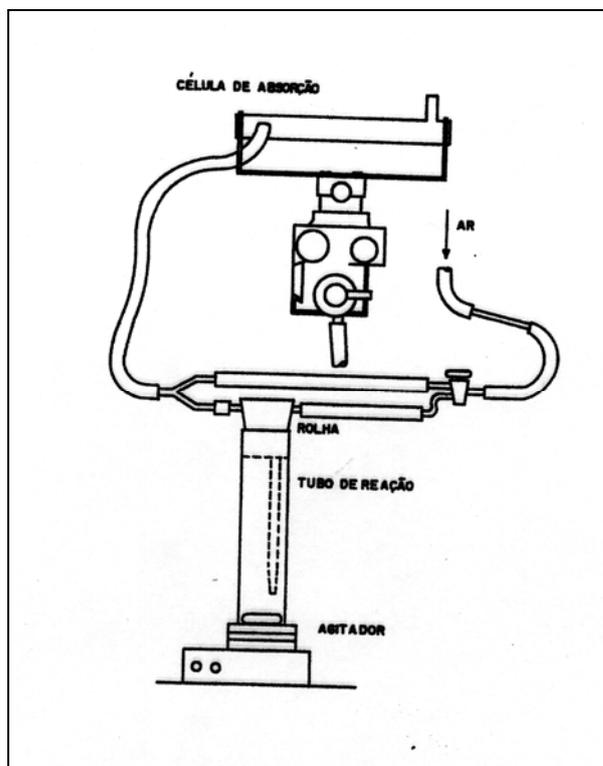


Figura 4. Esquema de um sistema para determinação de mercúrio pela técnica de vapor frio.

Muitas vezes, o mercúrio pode ser apresentar em solução na forma inorgânica (Hg^{2+}), ou na forma de diversos derivados organomercuriais, sendo o mais importante deles, do ponto de vista toxicológico e ambiental, o metil-mercúrio, HgCH_3^+ . É interessante observar que o cloreto estano, em meio ácido, é capaz de reduzir somente o íon Hg^{2+} e alguns organomercuriais. O metil-mercúrio não é reduzido pelo cloreto estano em meio ácido. A redução completa dos organomercuriais pode ser alcançada pela utilização do cloreto estano em meio básico, na presença de cloreto de cádmio, ou pela utilização de um redutor mais enérgico, como o borohidreto de sódio (Welz & Sperling, 1999).

O uso de sistemas em fluxo, automatizados, se tornou bastante popular na técnica do vapor frio, poupando o tempo do analista, diminuindo os riscos de contaminações e aumentando a repetibilidade das operações, o que leva a melhores limites de detecção. A especificidade do comportamento do mercúrio, permitindo o uso de uma célula de absorção fria, e principalmente, a importância ambiental deste elemento, têm levado os fabricantes a oferecer ao mercado equipamentos exclusivos para a determinação de mercúrio. Em geral, nestes casos, são equipamentos com uma célula de absorção de caminho óptico mais longo, de modo a aumentar a sensibilidade, que utilizam lâmpadas de descarga de mercúrio como fonte primária de radiação, mais potentes, diminuindo, assim, o nível de ruído, com detectores de estado sólido e sistema de fluxo acoplado. Estes equipamentos apresentam limites de detecção bem mais baixos (Welz & Sperling, 1999).

No presente estudo, a espectrometria de absorção atômica com vapor frio, acoplado a um sistema de injeção em fluxo (FI-CV-AAS) e equipado com um sistema automático de amostragem líquida, utilizando como agente redutor, uma solução 0,2% (m/v) de borohidreto de sódio em 0,05% (m/v) de hidróxido de sódio (Kehrig et al., 2008), foi o método analítico utilizado para a determinação de mercúrio total e mercúrio orgânico nos órgãos das espécies de cetáceos estudadas.