4
Arsênio: Breve resumo sobre a especiação deste elemento e de suas propriedades toxicológicas

4.1.
Fontes de arsênio

Arsênio é encontrado na atmosfera, na água, em solos e sedimentos tanto quanto em organismos, estando sua abundância na crosta terrestre em 52º lugar. O elemento é encontrado em uma variedade de formas químicas e pode sofrer transformação através da ação de microorganismos, por mudanças nas condições geoquímicas ou por outros processos que ocorrem no meio ambiente. Arsênio é liberado na atmosfera por fenômenos naturais e por fontes antropogênicas na proporção de 60:40 e retorna para a superfície da terra através de deposição seca ou úmida (Cornelis, 2005).

As duas principais fontes naturais de arsênio são a volatilização que libera, aproximadamente, 26.000 toneladas de arsênio por ano e a atividade vulcânica, que libera para a atmosfera em torno de 17.000 toneladas de As por ano. O elemento é encontrado em centenas de minerais, dos quais 60 % são arsenatos, 20 % são arsenosulfetos com metais como Fe, Pb, Cu, Ag e Tl e o restante se compõe de arsenitos, óxidos, arsenetos e arsênio elementar. O mineral mais comum é o arsenopirita (FeAsS). A crosta terrestre, rochas e sedimentos possuem níveis diferenciados de arsênio em sua composição, porém a maior parte do arsênio está associada com pirita. A produção mundial de As é estimada da ordem de 0,75 a 1,0 x 10^3 toneladas por ano, sendo utilizado em diversos setores. Os processos de refino de rochas, incluindo a fusão de cobre e chumbo são as maiores fontes de liberação de arsênio (www.clu-in.org). Arsênio elementar é usado na produção de vidro e como aditivo na fabricação de ligas não ferrosas. O gás arsina (AsH3), espécie de maior toxicidade entre todas, é usado na indústria de microeletrônicos e semicondutores.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

No passado, compostos de arsênio eram largamente usados na agricultura e silvicultura como inseticida ou herbicida, principalmente nas culturas de algodão. Atualmente, os compostos inorgânicos não podem ser utilizados na agricultura, porém alguns compostos orgânicos, tais como o ácido cacodílico, o metilarsenato dissódico e o metilarsenato monossódico ainda são usados como pesticidas. No ramo da agricultura, o arsênio também tem aplicação como preservativo de madeira, para aumentar a sua resistência ao apodrecimento.

No ramo da medicina veterinária, o arsênio é utilizado como agente antiparasitário e como aditivo em ração animal para acelerar o crescimento (Marcus, 2006) (ATSDR, 2005).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

4.2.
Toxicologia do arsênio nos seres humanos

É importante diferenciar as duas classes de compostos de arsênio, pois os inorgânicos são mais tóxicos que os orgânicos. A maioria dos compostos inorgânicos ou orgânicos de arsênio é um pó branco; também, não possuem odor ou sabor especial. Desta forma, não é possível saber se existe arsênio na comida, na água ou no ar (ATSDR, 2005).

Já que o arsênio é encontrado naturalmente no meio ambiente, o envenenamento ocorre através da ocupação industrial, na ingestão de comida ou bebida contaminada, pela respiração, pelo contato da pele com água ou solo contendo arsênio ou devido a atos intencionais (Marcus, 2006) (ATSDR, 2005).

Arsenito é tido como a espécie mais solúvel, móvel e mais tóxica que os compostos de arsenato. A toxicidade está diretamente relacionada com a mobilidade na água e em fluidos biológicos. O grau de toxicidade corresponde a seguinte ordem decrescente: arsina > arsenitos inorgânicos > compostos trivalentes orgânicos > arsenatos inorgânicos > compostos pentavalentes orgânicos > compostos arsônicos > As elementar. As espécies arsenobetaína e arsenocolina são consideradas atóxicas (Cornelis, 2005).

Os efeitos causados pela exposição ao arsênio dependem da espécie, da dose, da duração e da via de exposição. Outros fatores a serem considerados são idade, sexo, hábitos familiares e estado de saúde da pessoa que foi exposta (ATSDR, 2005). O arsênio nos alimentos ocorre como uma mistura de espécies inorgânicas e orgânicas, incluindo a arsenobetaína. Geralmente os compostos orgânicos representam 60 a 99 % do arsênio total na alimentação. Estudos indicam que em espécies aquáticas, os níveis de arsênio inorgânico são, geralmente, inferiores a 1 %, mas em outros alimentos, tais como carne, aves e cereais, o teor de arsênio inorgânico é maior. Nos alimentos, um limite considerado tolerável para o consumo de arsênio é da ordem de 1 $\mu g\ g^{-1}$ como trióxido de arsênio (Cornelis, 2005). Para seres humanos, o envenenamento por arsênio inorgânico pode ser letal, se estes forem submetidos a grandes doses orais (acima de 60 mg de As por kg de massa corporal), através da comida ou bebida. Ao serem expostos a doses orais entre 3 e 30 mg de As por kg de massa corporal, os sintomas mais aparentes são irritação estomacal ou do intestino, causando dor,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

náusea, vômito e diarréia. Além disto, a contaminação por arsênio inorgânico pode provocar a diminuição da produção das células brancas e vermelhas do sangue causando fadiga, alteração dos batimentos cardíacos ou das funções nervosas (ATSDR, 2005).

Ao se tratar de exposições orais por períodos prolongados, o envenenamento por arsênio inorgânico pode provocar alterações na pele, como o seu escurecimento e o aparecimento de pequenos calos ou verrugas na palma da mão, planta do pé ou dorso, que estão frequentemente, associados à alterações nos vasos sanguíneos da pele. Como alguns destes calos podem resultar em câncer de pele, o arsênio inorgânico é considerado cancerígeno para os seres humanos por diversas instituições de saúde pública (ATSDR, 2005).

A inalação de baixas concentrações de arsênio inorgânico, por longos períodos, pode provocar efeitos na pele e problemas circulatórios. Já a exposição a altas concentrações pode acarretar dor de garganta e irritação nos pulmões, aumentando, consideravelmente, o risco de câncer de pulmão. Além disto, existem dados que sugerem que a inalação de arsênio inorgânico pode interferir no desenvolvimento fetal (ATSDR, 2005). O contato direto da pele com compostos de arsênio inorgânico pode provocar irritação na pele, levando à vermelhidão e inchaço. No entanto, os efeitos apresentados por este contato, aparentemente, não acarretam nenhum sintoma interno grave.

Em relação aos compostos orgânicos de arsênio, praticamente não se conhece os efeitos provocados nos seres humanos por exposição a estes compostos. No entanto, através de estudos com animais, verificou-se que a exposição a altas concentrações pode levar ao aparecimento de alguns sintomas, como por exemplo, irritação estomacal e problemas nervosos (ATSDR, 2005).

O estudo da biotransformação de arsênio deriva de investigações em metabólitos urinários, pois esta é a principal via de excreção do arsênio em animais. Em microorganismos, o arsenato inorgânico sofre sucessivas reduções e metilações oxidativas, mas em homens e outros mamíferos apenas duas etapas acontecem, levando aos arsênicos mono e dimetilados, identificados como ácido monometilarsônico (MMAV) e ácido dimetilarsínico (DMAV). Estas espécies são os metabólitos presentes em maior proporção, mas têm sido vistos, em alguns casos extremos, associados com a presença de MMA(III) e DMA(III) (Cornelis, 2005).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

As espécies orgânicas de arsênio são facilmente absorvidas através do consumo de cogumelos ou frutos do mar. No entanto, elas são rapidamente excretadas pela urina, algumas, como a arsenobetaína ou arsenocolina sem transformação, mas outras podem sofrer biotransformação, levando à excreção de DMAV (Cornelis 2005).

4.3. Toxicologia do arsênio nos animais

Em diferentes estudos, tem sido reportado que, em ratos e cavalos, a adição de arsênio na ração provoca uma melhora na aparência da pele e do pêlo do animal. Além disso, pesquisas comparativas mostraram que uma dieta complementada com uma determinada quantidade de arsênio provocou uma diminuição da mortalidade neonatal, apresentou aumento no peso dos filhotes e um aumento no desempenho reprodutor. No entanto, o mecanismo de ação ainda é desconhecido (NAT, 1980).

O arsênio, como é usualmente encontrado na comida, é rapidamente absorvido e excretado, principalmente, pela urina. Nas fezes encontra-se menos de 10 % da forma solúvel. O arsênio inorgânico, na forma de As_2O_3, quando ingerido também é rapidamente absorvido, mas tem um longo período de retenção em tecidos e é excretado, de forma similar, pela urina e pelas fezes em humanos e em ratos. Os compostos orgânicos também são bem absorvidos pelos tecidos e excretados principalmente pelas fezes.

A toxicidade dos compostos de arsênio no animal depende da espécie do animal, da valência do composto, sua solubilidade, forma de exposição e das taxas de absorção e excreção. Uma pesquisa mostrou que após a ingestão de compostos inorgânicos (arsenato e arsenito), poderia ocorrer metilação in vivo, sendo o composto metilado encontrado na urina. Compostos de arsênio parecem ser oxidados in vivo de trivalente para pentavalente; no entanto, o contrário não ocorre (NAT, 1980).

Nos animais, a intoxicação por arsênio, em baixas concentrações, pode provocar a inflamação das membranas das mucosas do trato respiratório superior, diarréia, eczema, falta de coordenação motora. No entanto, o envenenamento por arsênio em concentrações elevadas provoca a morte do animal em poucos dias. Os

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

sintomas da intoxicação por arsênio inorgânico variam com a quantidade e a forma de administração e incluem cólica abdominal, vômito, diarréia, forte depressão e dermatites, usualmente devido ao aumento da permeabilidade capilar e necrose celular. Em cavalos, os sinais em casos agudos de intoxicação incluem traumatismo cerebral, causado por sucessivas batidas com a cabeça na parede e sinais de dor intensa. Porém, os animais podem sobreviver a uma única dose oral alta. Neste caso, quase todos os compostos de arsênio administrados são excretados em poucos dias.

4.3.1. Determinação de arsênio como exame *antidoping* em cavalos de corrida

Existem diversas histórias sugerindo a origem da palavra doping. Na área dos esportes eqüestres, em 1900 a palavra foi definida como um preparado de drogas com o objetivo de influenciar o desempenho dos cavalos de corrida (Higgins, 2006). Um truque muito conhecido dos vendedores de cavalos e que tem o objetivo de mascarar a real idade do cavalo é administrar arsênio ao animal, pois este pode atuar como um forte estimulante. Desta forma, quando administrado em altas doses orais, em cavalos mais idosos, o arsênio torna o pêlo mais brilhante e o animal apresenta uma aparência mais jovem. No entanto, este efeito passa em poucos dias, fazendo com que o cavalo perca o vigor apresentado anteriormente (Loren, 2001).

A FEI (Federação Eqüestre Internacional) é o órgão que promove, regula e administra as competições internacionais, possuindo um código de conduta especificamente formulado para proteger a saúde do cavalo, além de regras rigorosas no que diz respeito ao controle de medicação e exames antidoping. No caso do controle de medicação, tem-se o objetivo de garantir a imparcialidade, promovendo uma igualdade na competição. Diferente dos atletas humanos, os cavalos não podem decidir se desejam tomar um dado medicamento, por isto existe um forte fator ético quando se decide administrar um remédio no animal. A Federação é clara ao distinguir medicação, isto é, tratamento veterinário com o objetivo de garantir a saúde do animal e doping, intenção deliberada de afetar o desempenho de um cavalo ou para mascarar um problema de saúde do animal. Desta forma, os testes para detectar a presença de substâncias proibidas são uma

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

importante função da FEI. No entanto, tornou-se difícil afirmar que um resultado de um exame antidoping era positivo, baseado apenas na detecção de traços de uma droga administrada em um cavalo, por razões clínicas legítimas, dias ou mesmo semanas antes de uma corrida, quando ainda não era possível influenciar o desempenho do cavalo. Desta forma, foi necessário estabelecer níveis para substâncias terapêuticas, através de um rigoroso estudo de excreção da maioria dos produtos médicos veterinários. Sendo assim, foram estabelecidos limites para um certo número de produtos terapêuticos, usando modelos farmacocinético/farmacodinâmico, baseados nas concentrações das drogas no plasma e na urina do cavalo (Higgins, 2006). No caso do arsênio, um acordo internacional determina um limite de 300 μg L^{-1} de arsênio na urina do cavalo (IFHA, 2005).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

4.4.
Espécies de arsênio no ambiente e estabilidade das soluções

Arsênio pode ser descrito como um semi-metal (metalóide) formador de compostos covalentes ou espécies aniônicas, possuindo os estados de oxidação –3, 0, +3 e +5. Na natureza, o arsênio existe no estado elementar em 3 formas alotrópicas (alfa ou amarelo, beta ou preto e gama ou cinza).

As principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente são os oxiácidos de As(III) e As(V). Dependendo do meio, o As(V) é frequentemente encontrado desprotonado, ou seja, como o ânion arsenato, em contraste com o oxiácido de As(III), que permanece em sua forma neutra. A Tabela 2 mostra as principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente.

Tabela 2. Principais espécies de arsênio encontradas no meio ambiente. (Adaptada de Tonietto, 2005).

Composto	Abreviatura	Fórmula Química
Arsenito	As (III)	AsO_3^{3-}
Arsenato	As (V)	AsO_4^{3-}
Ácido monometilarsenoso	MMA (III)	$CH_3As(OH)_2$
Ácido monometilarsínico	MMA (V)	$CH_3AsO(OH)_2$
Ácido dimetilarsenoso	DMA (III)	$(CH_3)_2AsOH$
Ácido dimetilarsínico	DMA (V)	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Arsenocolina	AsC	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$
Arsenobetaína	AsB	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
Arsina e derivados	AsH_3, $MeAsH_2$, Me_2AsH	$(CH_3)^xAsH^{3-x}$ (x = 0-3)
Ácido fenil arsênico	PAA	$C_6H_5AsO(OH)_2$

Diversos compostos de arsênio têm sido identificados em amostras biológicas. No entanto, arsênio elementar e trióxido de arsênio são as principais partículas encontradas em depósitos atmosféricos. Em solos e na água, o arsenato é tido como a forma termodinamicamente mais estável; porém, arsenato e arsenito podem se interconverter sob condições oxidantes ou redutoras e sofrer processos de metilação, como apresentado através do esquema simplificado da transformação do arsênio no meio ambiente (Cornelis, 2005):

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

	red.		red		
H_3AsO_4	↔	H_3AsO_3	→	$CH_3AsO(OH)_2$ →	$(CH_3)_2AsO(OH)$
Arsenato	ox.	Arsenito	metilação	$MMAA^V$	$DMAA^V$
					Ác. Cacodílico

A estabilidade das soluções de arsênio foi estudada através da comparação entre a estocagem de soluções a temperatura ambiente e 4º C e revelou que soluções de espécies orgânicas de arsênio permaneceram estáveis durante um longo tempo, enquanto que soluções de espécies inorgânicas ficaram estáveis apenas se estocadas sob refrigeração (Cornelis, 2003).

Estudos realizados mostraram que soluções puras de As(III), As(V), MMA, DMA, arsenobetaína e arsenocolina permaneceram estáveis por mais de 1 ano, se estocadas no escuro e se o pH foi devidamente ajustado. Não foi observada nenhuma degradação, mesmo a uma temperatura de 40º C. Entretanto, foi possível observar degradação da solução, quando esta é uma mistura de espécies de arsênio, com ou na ausência de sais inorgânicos.

Em outro estudo, com soluções contendo misturas de espécies de arsênio, foram observadas reações de oxidação e metilação. Após 4 meses de estocagem a 20 º C, na presença de luz, verificou-se que todo arsenito foi oxidado a arsenato. Uma solução igual, se estocada no escuro, mesmo a 40º C, mostrou que apenas uma pequena fração do arsenito sofreu transformação, devido à atividade microbiológica.

Um estudo realizado com mistura de As(V), DMA e arsenocolina, estocada a 20 e 40º C, revelou a produção de MMA após 2 meses, enquanto As(III) foi formado após 4 meses a 20º C. A 40º C, a formação de As(III) foi observada após 2 meses e desapareceu após 4 meses. Quando a mistura foi estocada a 4º C, nenhuma alteração na composição das espécies foi observada (Cornelis, 2003)

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

4.5.
Análise de especiação de arsênio

Diversos métodos têm sido utilizados para a determinação da concentração total de arsênio. As técnicas colorimétricas e voltamétricas têm sido substituídas por espectrometria de absorção ou emissão atômica, melhorando os limites de detecção. Com o uso do ICPMS, foi possível reduzir o limite de detecção para menos de 1 pg mL^{-1} de As em solução. Os métodos diretos, como por exemplo, espectrometria de fluorescência por raios-X e LA-ICPMS, têm sido utilizados para a determinação da concentração total de arsênio em diferentes tipos de amostras sólidas (Cornelis, 2005).

A biomonitoração da exposição ocupacional por arsênio leva à necessidade de estudar diferentes espécies de arsênio: As(III), As(V), MMA, DMA, arsenobetaína, arsenocolina e arseno-sacarídeos em vários tipos de amostra: sangue, plasma, urina e tecidos. É importante a quantificação de cada uma das espécies para que se possa identificar a causa da exposição e o metabolismo de tais espécies no corpo.

Nas análises de especiação elementar, a preparação da amostra é muito importante para que sejam mantidas as suas características originais. Dependendo do método a ser utilizado, existem diversos procedimentos a serem realizados antes da análise, tais como digestão, filtração, preservação e/ou pré-redução. O analista, ao realizar estas etapas, deve tomar todas as precauções para que não ocorra nenhuma alteração química nas espécies. No caso da especiação do arsênio, deve-se tomar extremo cuidado com relação à amostragem, pois a remoção da amostra do seu meio natural faz com que ocorra distúrbio no equilíbrio das espécies. Em amostras aquosas, podem ocorrer processos de oxidação, fazendo com que apenas arsenato seja encontrado na amostra no momento da análise.

Para o estudo da especiação de arsênio, normalmente utilizam-se técnicas de separação cromatográficas como HPLC, cromatografia gasosa (GC), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e eletroforese capilar, todas acopladas com algum tipo de detector. Tais acoplamentos resultam em poderosas técnicas para especiação elementar, permitindo a obtenção de limites de detecção extremamente baixos quando se utiliza detectores adequados (p.ex. ICPMS, AFS,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

AAS). No caso do arsênio (e de alguns outros elementos: p.ex.: Sb, Hg, Se, Te, Ge, e Bi), a técnica de geração de hidretos (HG), ou de vapor frio (CV) no caso do mercúrio, pode ainda melhorar os limites de detecção e, adicionalmente, possibilitar um recurso complementar para análise de especiação, uma vez que apenas o estado de oxidação menor do elemento (p.ex. AsIII, SbIII, SeIV) pode ser diretamente transformado em hidreto volátil através da reação com borohidreto de sódio ou com outro reagente adequado (Welz, 1985).

Diversas revisões já foram publicadas abordando a especiação de arsênio em diferentes tipos de amostra por exemplo, Cullen (1989) e Melamed (2005). Por isso, não se tem neste trabalho a intenção de fazer uma revisão completa sobre este assunto, sendo feitas apenas algumas citações sobre o uso da eletroforese capilar como técnica de separação para a especiação deste elemento.

A eletroforese capilar com detecção UV indireta foi usada por Naidu *et al*. (2000) para desenvolver um método para a determinação de algumas espécies de arsênio: AsO_2^-, AsO_4^{3-} e DMA(V). O tampão de corrida utilizado foi o cromato e a detecção foi feita em comprimento de onda de 254 nm. A metodologia foi aplicada para a análise de amostras de solo.

Yin *et al*. (2002) usaram o acoplamento CE-AFS com geração de hidretos para desenvolver a análise de especiação de quatro formas tóxicas de arsênio: arsenito, arsenato, MMA(V) e DMA(V). O tampão empregado foi o fosfato (pH = 6,5). O sistema foi usado na análise de amostras de sedimento e os limites de detecção das espécies ficaram na faixa de 9 - 18 μg L^{-1} nos extratos.

Chen *et al*. (2005) estudaram a separação de três espécies de arsênio: AsO_2^-, AsO_4^{-3} e DMA, usando o fluxo eletroosmótico normal e revertido. A detecção foi no UV no comprimento de onda de 185 nm. O tampão de separação foi uma solução de fosfato 20 mmol L^{-1}. Para melhorar o limite de detecção, foram usadas técnicas de pré-concentração, obtendo um LD de menos que 1 μmol L^{-1} para as espécies de arsênio. A metodologia foi aplicada na especiação de As em água.

Yin (2004) desenvolveu um método de pré-concentração em linha, com geração de hidretos, para o acoplamento entre a eletroforese capilar e a espectrometria de fluorescência atômica. O sistema foi usado para separar as espécies As(III), As(V), MMA(V) e DMA(V). O limite de detecção para as espécies ficou na faixa de 5,0 - 9,3 μg L^{-1}.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA

O estudo da especiação de arsênio foi realizado por Yeh & Jiang (2004) para a determinação de seis espécies: As(III), As(V), MMA(V), DMA(V), AsB e AsC. O tampão de separação foi o Tris (pH = 9,0), contendo dodecil sulfato de sódio. A metodologia foi aplicada na análise de materiais de referência de tecidos de peixe e ostras e em amostras.

A eletroforese capilar acoplada ao ICP-OES foi utilizada por Suarez & Gine (2005) para separar espécies inorgânicas de arsênio. Os pesquisadores montaram um sistema de geração de hidretos em linha para permitir o acoplamento entre os dois sistemas.

Akter *et al*. (2005) compararam o desempenho de CE-UV, HG-AAS e LC-ICPMS para a especiação de arsênio em amostras de águas. As espécies estudadas foram arsenito (As^{III}), arsenato (As^{V}) e DMA(V). Os LD ficaram na faixa de 0,10 a 0,19 µg L^{-1} para HG-AAS, 100 a 500 µg L^{-1} para CE-UV e 0,1 a 0,2 µg L^{-1} para LC-ICPMS. O DPR para área do pico foi menor que 5 %, exceto para CE-UV que foi de 9 %.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0212144/CA