

1 INTRODUÇÃO

Vivemos em um mundo em contínuo desenvolvimento, no qual a indústria química tem permitido melhorar, de forma evidente, a qualidade de vida de seus habitantes. No entanto, as atividades humanas vêm produzindo mudanças nos níveis naturais de distintos componentes do ambiente terrestre, entre os quais se encontram os metais e metalóides. Afortunadamente, estes contaminantes normalmente não são absorvidos por inalação nem por contato com a pele, embora tenham o potencial de fazê-lo mediante os alimentos que ingerimos. Portanto, é relevante ter consciência que os alimentos supõem uma fonte de nutrientes, mas também de contaminantes. O controle de qualidade de alimentos vem sendo objeto de uma constante evolução, visando produzir e oferecer ao consumidor produtos de origem animal e vegetal absolutamente de acordo com as normas específicas de segurança sanitária.

Com o decorrer do tempo, a Química Analítica veio alterando seu enfoque na área dos alimentos, pois a despeito dos protocolos oficiais para a determinação dos componentes majoritários, como proteínas, açúcares e gorduras, os avanços recentes dão-se na determinação dos componentes presentes em menores quantidades, mas nem assim menos importantes.

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais e semi-metais, dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até o ser humano. Eles são requeridos em baixas concentrações e seu excesso pode danificar sistemas biológicos, portanto, a determinação destes elementos em produtos comestíveis é um aspecto relevante na análise de alimentos. Entretanto, sabe-se hoje que o conhecimento apenas da concentração total destes elementos pode não ser suficientemente informativo, visto que sua ação no organismo depende de sua forma físico-química. Daí, a importância da análise de especificação de metais e metalóides, ou seja, a determinação da concentração das formas físico-químicas individuais destes elementos que, em conjunto, constituem a sua concentração total, possibilitando a obtenção de informações que permitirão melhor avaliação quanto a sua toxicidade devido a bioabsorção, biodisponibilidade, etc.

No caso de óleos vegetais, a concentração de metais traço é um critério importante para a avaliação de sua qualidade em relação às características desejáveis. Vários estudos descreveram os efeitos prejudiciais destes metais no sabor e estabilidade oxidativa dos óleos. Em particular, metais como cobre e o níquel têm um efeito catalítico no mecanismo de autoxidação. Além disso, estes metais estão sujeitos a legislação (865-SVS-MS de 1998).

Em geral, os vegetais constituem uma parte importante da dieta humana uma vez que contêm hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e minerais, sendo que constituem a base da alimentação de muitos povos. As fontes de sua contaminação por metais ou semi-metais podem ser os solos e águas usados durante o cultivo. Estes elementos podem também ser transportados pelo material particulado atmosférico e depositados nas folhas. De forma geral, as fontes da contaminação de vegetais incluem ainda fertilizantes e pesticidas, entre outros.

A presente tese está dividida em três partes. A primeira corresponde ao desenvolvimento da análise direta para a determinação de Cu e Ni em óleos vegetais. Utilizando a mesma estratégia da amostragem direta para sólidos, as amostras foram pesadas diretamente na plataforma de grafite, com sua posterior inserção no tubo de grafite e determinação instrumental. As condições analíticas (temperaturas de pirólise e atomização) foram otimizadas para a determinação de Cu e Ni nas amostras citadas. O método foi validado, utilizando dois procedimentos comparativos, EPA 3031 e EPA 3051. Esta parte da tese gerou uma publicação: M. N. Matos Reyes and R.C. Campos, "Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Talanta*, 2006, 70, 929-932.

A segunda parte diz respeito à determinação do conteúdo total de elementos formadores de hidretos, As, Bi, Sb, Se e Te em alimentos por HG-AFS, que gerou a publicação M.N. Matos Reyes, M.L. Cervera, R.C. Campos and M. de la Guardia, "Determination of As, Sb, Se, Te and Bi in Spanish vegetables, legumes and cereals by HG AFS" (em anexo).

A terceira parte corresponde ao desenvolvimento de um procedimento de análise de especiação não cromatográfico de arsênio, em vegetais, por espectrometria de fluorescência atômica após geração de hidretos (HG AFS), utilizando um sistema de equações lineares, obtido a partir da redução em diferentes condições e após otimização dos parâmetros analíticos referentes à HG AFS, tais como concentração de redutor e carreador, volume de injeção da

amostra e presença de bobina de reação. Esta parte do trabalho gerou duas publicações que foram aceitas para publicação: M. N. Matos Reyes, M.L. Cervera, R.C. Campos and M. de la Guardia, “Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry” e M. N. Matos Reyes, M.L. Cervera, R.C. Campos and M. de la Guardia “Evaluation of ultrasound-assisted extraction for the determination of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry” (em anexo).

1.1. Óleos vegetais

1.1.1. Generalidades

A indústria de óleos vegetais ocupa um lugar estratégico no contexto da indústria alimentícia. O Brasil ocupa a posição de maior produtor e consumidor da América Latina, sendo que a história dos óleos vegetais no Brasil foi marcada por épocas distintas. Na fase pioneira dos anos 50 predominou o óleo de algodão; no início dos anos 60, o uso do óleo de amendoim e a partir de 1972, surgiu a cultura da soja, inaugurando uma nova fase que iria marcar definitivamente a evolução dos agronegócios em oleaginosas¹.

Em 2004, o Brasil produziu cerca de 63 milhões de toneladas de soja. A maior parte é direcionada para a industrialização do óleo. Os azeites e óleos vegetais são constituídos predominantemente por ésteres de glicerol com três ácidos orgânicos, chamados ácidos graxos, formando os triglicerídios. Os óleos são alimentos energéticos, pois fornecem 9,5 kcal g⁻¹ quando metabolizados no organismo humano, enquanto os carboidratos e proteínas fornecem apenas cerca de 4 kcal g⁻¹; são fonte de vitaminas e de ácido linoleico (essencial ao homem e não metabolizado no organismo humano)¹.

É importante conhecer a diferença entres os azeites, azeites virgens e óleos:

- Azeite, óleo vegetal que não é extraído por solventes químicos e não sofre o processo de refinação.
- Azeites virgens são aqueles obtidos por prensagem a frio e não refinados.
- Óleos são em geral, obtidos por prensagem, extração com solventes e posterior purificação e refino.

1.1.2. Presença de metais nos óleos vegetais

Os metais traço presentes em óleos e diferentes tipos de gorduras podem ter origem natural ou estarem presentes devido a diferentes processos físicos ou químicos, assim como devido à corrosão dos equipamentos usados nos processos de preparação (Fe, Ni)². A concentração dos metais traço em óleos vegetais é um importante critério para a avaliação da sua qualidade visando uma boa conservação e armazenamento³. Muitos relatórios têm descrito os efeitos prejudiciais que os metais traço têm no sabor e na estabilidade oxidativa dos óleos. Por exemplo, o cobre e o níquel têm um efeito catalítico no mecanismo do autoxidação. Além disso, alguns destes metais estão sujeitos à legislação de alimentos⁴⁻⁶. Entretanto, a determinação de metais traço em óleos vegetais é ainda um desafio analítico, devido às baixas concentrações e às dificuldades que se apresentam devido às características da matriz.

1.2. Alimentos

1.2.1 Generalidades

Os alimentos de origem vegetal são especialmente ricos em água, carboidratos e fibra, fornecendo pouca gordura, com exceção dos óleos, e nenhum colesterol. A proteína aportada, em quantidade moderada, é de menor qualidade que a de origem animal, mas em absoluto não menos importante; estão presentes, ainda, praticamente todos os minerais (embora, no caso do ferro, este seja de escassa biodisponibilidade), além das vitaminas hidrossolúveis.

Os cereais são, em sua maioria, plantas cultivadas por seus grãos comestíveis, assim como pelas suas sementes⁷. O cultivo de grãos tem crescido em uma proporção muito grande em todo o mundo e provê mais energia aos seres humanos do que qualquer outro tipo de planta. Em alguns países em desenvolvimento, os grãos de cereais constituem praticamente a dieta completa

da população. Os mais utilizados na alimentação humana são o trigo, o arroz e o milho, embora também sejam importantes a cevada, o centeio e aveia.

Em particular, o arroz representa um dos cereais mais importantes no mundo, sendo a base da dieta para mais de um bilhão de seres humanos. Em comparação com os frutos do mar, que apesar de se associarem a uma maior quantidade de arsênio ingerido na dieta, e que o fazem pela arsenobetaína, espécie não tóxica, o arroz é uma planta bio-acumulativa das espécies de arsênio mais tóxicas⁸. Apesar disto, existem poucos registros disponíveis relacionados à especiação de arsênio em arroz. Em termos de estudo de risco, a especiação de arsênio em arroz é particularmente importante, visto que não só é a base da dieta alimentícia de muitas populações, como também por poderem conter uma quantidade relativamente alta de arsênio inorgânico, sua forma mais tóxica, se comparado a outros alimentos⁹⁻¹¹.

Já a acelga é um vegetal com quantidades insignificantes de carboidratos, proteínas e gorduras, visto que a maior parte de seu peso é formado por água. Este vegetal se destaca pelo maior conteúdo de magnésio, sódio (responsável em parte de seu sabor tão marcado), iodo, ferro e cálcio, estes dois últimos menos biodisponíveis do que os que procedem dos alimentos de origem animal (produtos lácteos, carnes e peixes)⁷. As berinjelas, comparadas com outras olerícolas, contém uma quantidade intermédia de fibras, mais abundante na casca e nas sementes. O aporte de seus sais deve-se ao potássio, o mineral mais abundante, e em sua composição se contabilizam quantidades discretas de fósforo, cálcio, magnésio e ferro. Quanto à sua carga vitamínica, sobretudo folatos e vitamina C, não resulta significativa em comparação com o resto das hortaliças. As propriedades dietéticas saudáveis atribuídas à berinjela se devem a seus componentes antioxidantes, responsáveis de seu ligeiro sabor amargo⁷.

1.2.2 Presença de metais em vegetais

As substâncias tóxicas e persistentes no meio ambiente acumulam-se continuamente devido às atividades antrópicas. Em relação a isto, um dos problemas principais para a ecologia é o caminho destes metais, os quais se encontram disseminados inclusive nos alimentos, podendo em alguns casos, causar efeitos nocivos e irreversíveis para o homem¹².

Os elementos traço têm uma função importante no crescimento e saúde dos seres humanos. Participam por exemplo das funções biológicas das vitaminas, dos hormônios, das enzimas e de algumas proteínas. Geralmente, a rota que seguem os metais traço é solo → plantas → animais.

Além dos elementos minoritários e principais (H, C, Ca, Cl, K, Mg, N, Na, O, P e S) os elementos traço essenciais para seres humanos incluem Co, Cr, Cu, F, Fe, I, Mb, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V e Zn¹³. Alguns outros podem ser encontrados nas partes comestíveis das plantas, e esta pode ser a razão pela qual alguns elementos podem sofrer exposição acidental, como no caso do As, Cd, Cu, ou Pb¹⁴.

As fontes da contaminação dos vegetais incluem a erosão, os fertilizantes, pesticidas, substâncias orgânicas, lama de águas residuais, entre outras¹⁵. Além disso, a absorção ao nível foliar de elementos transportados por via aérea tem sido identificada como uma rota importante de acumulação elementar nos tecidos da planta^{13,16}.

1.3. Elementos objetos de estudo

1.3.1. Arsênio

O arsênico (As_2O_3) tem uma trágica história relacionada a envenenamentos homicidas e suicidas. A popularidade do seu uso para esses fins estaria muito mais relacionada à sua disponibilidade, ao baixo custo e ao fato de ser inodoro e sem gosto, do que à sua eficácia tóxica, pois a morte pelo arsênio é sempre lenta e dolorosa, diferindo, por exemplo, do cianeto.

Arsênio é um metalóide, muito quebradiço, cristalino, e sob aquecimento oxida-se rapidamente para óxido arsenioso. Pode apresentar-se em duas formas alotrópicas: o cinza metálico e o amarelo, e ocasionalmente, ser encontrado na forma livre; porém, o mais comum é na forma de minerais. O mineral mais comum e rico em arsênio é arsenopirita.

O arsênio pode existir em quatro estados de oxidação: arsenato(+5), arsenito(+3), arsina (-3) e o elementar (0). As espécies solúveis geralmente ocorrem nos estados de oxidação +3 e +5. O arsênio elementar não ocorre

naturalmente no ambiente. Em meio fortemente redutor, podem existir As(0) e As(-3). A estabilidade e a predominância das espécies de arsênio em meio aquático dependem do pH.

O arsênio raramente ocorre na forma livre; geralmente encontra-se ligado ao enxofre, oxigênio e ferro¹⁷. O arsênio trivalente, As(III), é altamente reativo quando covalentemente ligado aos ditíois vicinais¹⁸. Os tíois reduzem derivados de As(V). Em experimentos laboratoriais, foi observada a inativação de enzimas (piruvato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase) e de proteínas contendo grupos tíois¹⁸, pelo As(III).

Os derivados de arsênio apresentam diferentes toxicidades, dependendo da forma química. A toxicidade dos derivados arseniais diminui da seguinte forma: arsina (-3) → derivados orgânicos da arsina → arsênio inorgânico (+3) → arsênio orgânico (+3) → arsênio inorgânico (+5) → derivados orgânicos pentavalentes (+5) → derivados de arsênio e arsênio elementar. Nesta escala, a toxicidade do As(III) é cerca de 10 vezes mais que a do As(V)¹⁸. A ordem de toxicidade dos compostos de arsênio é As(III) > As(V) > DMA > MMA > As(0) > arsenobetaína. Em nível quantitativo, a dose letal 50 (LD₅₀) do As(III) se situa em 34,5 mg kg⁻¹ e a do As(V) em 41 mg kg⁻¹. O DMA e o MMA, muito menos tóxicos, apresentam LD₅₀ de 1200 mg kg⁻¹ e 1800 mg kg⁻¹, respectivamente. Dado que a arsenobetaína apresenta uma toxicidade muito baixa, não se pode determinar com exatidão seu LD₅₀, embora tenha sido estimada superior a 10000 mg kg⁻¹¹⁹. Nos monitoramentos ambientais ou biológicos, é importante, pois conhecer as espécies químicas presentes e, para isso, é necessário fazer a análise de especificação. Ela desempenha um importante papel na avaliação da toxicidade causada por derivados de arsênio.

Nos Estados Unidos, 90% do consumo de trióxido de arsênio destina-se à preservação da madeira, para evitar deterioração e ataque de insetos. A mistura mais comum é a que contém é CrO₃, CuO e As₂O₅ na proporção de 47,5; 18,5 e 34%, respectivamente, sendo conhecida a mistura como CCA²⁰. Na agricultura, os derivados inorgânicos do arsênio foram usados desde a metade do século XIX até meados do século XX nas culturas de algodão, para eliminar lagartas, como herbicida no combate às ervas daninhas, e nas culturas de maçã e de batatas²⁰. A sua utilização caiu em desuso devido à sua alta toxicidade, tanto durante o processo de fabricação quanto na aplicação na agricultura, causando problemas de envenenamento acidental, além do aparecimento de agrotóxicos orgânicos mais eficientes no combate às pragas. Atualmente, nos Estados Unidos, ainda são permitidos alguns agrotóxicos organoarseniais²⁰.

Derivados arilarseniais (ácido p-aminofenilarsônico) são misturados nas rações para aves e suínos, como promotor do crescimento e no controle de enteropatites em perus²¹. Já o trióxido de arsênio e o ácido arsênico ainda são usados como clareadores e dispersantes de bolhas de ar na produção de garrafas de vidro e outras vidrarias²². O arsênio elementar é usado na produção de ligas não-ferrosas, principalmente de ligas de chumbo para a fabricação de baterias e para melhorar a resistência do latão à corrosão. Faz parte de dispositivos semicondutores (incluindo diodos de emissão de luz), lasers, circuitos integrados e células solares²².

A utilização de derivados de arsênio como medicamento é muito antiga. Os derivados inorgânicos do arsênio foram muito utilizados até a metade do século XX para o tratamento de leucemia, psoríase e asma crônica. Na década de 1970, na medicina ocidental, o seu uso foi praticamente abolido²⁰. Nos últimos anos, renasceu o interesse na utilização de solução 1% de arsenito de sódio (solução de Fowlers) no tratamento de leucemia promielocítica aguda²¹.

O arsênio pode ser lançado na atmosfera tanto por fontes naturais, assim como pela atividade humana, em geral por processos com grande desprendimento de calor, como fundições, usinas geradoras de eletricidade a partir da queima do carvão, incêndios florestais e atividade vulcânica. Processos biológicos, como a biometilação e redução microbiana também contribuem para a carga de arsênio na atmosfera, gerando compostos voláteis de arsênio. O arsênio é lançado na atmosfera principalmente associado a materiais particulados, podendo ser disperso pelos ventos. Quanto ao tempo de permanência do arsênio na atmosfera, a estimativa é que seja em torno de nove dias, dependendo do tamanho das partículas a que o arsênio esteja agregado e das condições atmosféricas²¹.

A presença, a distribuição e as interações do arsênio em águas formam um conjunto mais complexo e dinâmico, de transformações físicas e químicas. Além dos processos biológicos de metilação e redução, o comportamento químico dos derivados de arsênio é influenciado pelo pH e potencial redox do meio, além dos processos de adsorção e dessorção em sedimentos e argilas.

Os derivados de arsênio tendem a ser adsorvidos pelo solo, provenientes da deposição do material particulado presente na atmosfera ou de formas transportadas pela água. No sentido inverso, a erosão provocada pelo vento e pela chuva pode levar o arsênio presente no solo para atmosfera e para os rios e lençóis freáticos. Entretanto, as distâncias percorridas pelo arsênio liberado pela ação da água tendem a ser pequenas, porque ele é novamente readsorvido pelo

solo²¹. A passagem do solo para o ar também pode ocorrer pela ação de microorganismos, que reduzem pequenas quantidades de arsênio a suas formas voláteis²³. Os compostos inorgânicos de arsênio, nos estados de oxidação +3 e +5, como ácido arsenioso e ácido arsênico, são as formas mais abundantes no solo, mas espécies metiladas e os ácidos monometilarsênico e dimetilarsínico já foram detectados em solo²³.

A carga corpórea do arsênio para a população em geral é devida, principalmente, à ingestão de alimentos e de bebidas. Os frutos do mar são as principais fontes de arsênio na forma de arsenobetaina (forma que apresenta baixa toxicidade), enquanto os grãos apresentam a maior contribuição de arsênio inorgânico²⁴. A ingestão diária de arsênio varia de acordo com os hábitos alimentares de cada população. Dependendo da região, a água pode ser uma fonte significativa de arsênio. A dose interna de arsênio inorgânico pode ser medida pela concentração dos metabólitos de arsênio na urina. O processo de metilação é o mais eficiente e aumenta com a idade.

A absorção de derivados inorgânicos de arsênio é função da solubilidade em água, tanto para via inalatória, quanto para a via digestiva. As formas solúveis de arsênio são absorvidas através das membranas celulares de forma passiva e ativa – esta última utiliza a mesma proteína carreadora do fosfato²⁵. A taxa de absorção inalatória de compostos de arsênio inorgânico varia, dependendo do tamanho da partícula inalada, que vai determinar a taxa de deposição nas vias aéreas e nos alvéolos. Derivados de arsênio inorgânico têm alta taxa de absorção pelo trato gastrointestinal saudável, variando de 55 a 95%. Esta variação decorre em função de se tratar do arsenito ou do arsenato. O índice de 95% baseia-se em estudos que não detectaram mais do que 5% do arsênio ingerido nas fezes²⁶. Os estudos sobre absorção de metais e metalóides utilizam, em geral, a metodologia de verificar a taxa de recuperação dos elementos ou seus metabólitos na urina ou nas fezes, após ingestão, inalação ou contato dérmico.

Depois de absorvido tanto pela via inalatória quanto pela digestiva ou dérmica, os derivados solúveis de arsênio inorgânico são distribuídos para praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo. Os dados disponíveis para distribuição a partir da via inalatória são poucos e restritos a estudos experimentais apenas. Estudos com derivados orgânicos por via inalatória são ainda mais raros e sugerem que o DMA administrado por via intra-traqueal distribui-se por todos os órgãos²⁰. O número de artigos disponíveis na literatura que versam sobre distribuição após exposição por via digestiva é maior e inclui

investigações em humanos. Estudos realizados em autópsias de pessoas expostas não ocupacionalmente, ingerindo alimentos ou água contaminados por arsênio, mostram que existe tendência a altas concentrações em tecidos com queratina, como cabelos e unhas, e tendência oposta, a pouca deposição e acúmulo, em vísceras, por exemplo²⁷. O compartimento sangüíneo mostra níveis centenas de vezes menores que as vísceras, em consonância com a distribuição dos derivados inorgânicos para os tecidos a partir do sangue. A forma trivalente do arsênio é a predominante nos tecidos estudados. A hierarquia de depósito de arsênio nos órgãos poderia ser definida da seguinte forma: fígado → rins → músculos → coração → baço → pâncreas → pulmões → cérebro (cerebelo → tecido encefálico) → pele → sangue²⁸.

Diferentemente de outros metais de importância toxicológica, como o chumbo e o cádmio, o arsênio sofre biotransformação envolvendo basicamente dois processos. Um deles é a conversão de As(III) em As(V), por reações de oxidação. O outro processo envolve metilação do arsênio com produção de dois metabólitos básicos: o MMA (ácido monometilarsênico) e o DMA (ácido dimetilarsênico), nas células hepáticas principalmente. Esse processo de metilação sugere um mecanismo de defesa frente ao arsênio inorgânico absorvido, pois as formas orgânicas metiladas apresentam menor toxicidade e são mais facilmente excretáveis pela urina. Parece haver um mecanismo de tolerância aos efeitos de absorção crônica de arsênio inorgânico relacionado ao aumento da taxa de metilação ao longo do tempo²⁰.

O arsênio é rapidamente biotransformado. O As(V) é reduzido a As(III) através de oxidação da glutathione (GSH) a disulfeto de glutathione (GSSG). As proteínas ligantes de arsenito previnem, inicialmente, o contato e o acúmulo de arsenito tóxico nos tecidos, até tornarem-se saturadas, quando, então, o arsenito torna-se disponível para o processo de metilação²⁴. Em seguida, o arsenito formado é metilado originando MMA e DMA.

No processo de biotransformação do arsênio, o DMA é o metabólito mais importante quanto à quantidade recuperada na urina. Estudos em humanos mostram que a hierarquia de produção de metabólitos e formas inorgânicas trivalentes e pentavalentes após absorção é a seguinte: DMA na proporção de 40 a 60%, as formas de arsênio inorgânico penta e trivalente, na proporção de 20 a 25% e, em seguida, o MMA com 15 a 20%²⁰. Essas proporções podem variar, dependendo da idade.

1.3.2. Antimônio

O antimônio é em geral considerado um elemento não essencial e tóxico, embora existam autores que lhe atribuem certa essencialidade. O antimônio é um contaminante atmosférico comum, procedente das emissões industriais, dos automóveis, da incineração de lixo, da fumaça do tabaco, etc., mas a exposição das pessoas, em geral, deve-se majoritariamente aos alimentos.

As atividades humanas estão produzindo um aumento na mobilização de antimônio. Assim, por exemplo, no Japão, utilizam-se 20000 toneladas de antimônio cada ano, enquanto que só são utilizadas 100 toneladas de arsênio²⁹. Este processo vem produzindo um desequilíbrio nas concentrações naturais de antimônio e arsênio nos ambientes contaminados. O tráfego de automóveis é uma importante fonte de antimônio no meio ambiente, visto que este elemento é utilizado em líquidos de freio e na fabricação de pneumáticos.

O Sb(III) é aproximadamente 10 vezes mais tóxico do que o Sb(V). O Sb(III) se oxida facilmente a Sb(V) em meio neutro; no entanto, em meio ligeiramente ácido, pode permanecer estável durante anos³⁰.

Com um comportamento químico e toxicológico similar ao arsênio, o antimônio trivalente concentra-se nos glóbulos vermelhos e no fígado, enquanto que a forma pentavalente concentra-se no plasma e é excretada mais rapidamente³¹. O Sb(III) concentra-se preferentemente no fígado, enquanto que o Sb(V) o faz no tecido ósseo³². Por analogia com o arsênio, supõe-se que o antimônio possa ser metilado nos organismos vivos, embora não se conheça com certeza este processo.

Por inalação, o antimônio produz irritação das mucosas e a longo prazo, pode provocar edema pulmonar e enfisema. Por ingestão, pode produzir, segundo a quantidade ingerida e o tempo de exposição, vômitos e diarreia³³.

1.3.3. Selênio

O selênio foi identificado pela primeira vez como elemento essencial em 1957, por Schwartz e Foltz, que descobriram que este elemento prevenia a degeneração necrótica do fígado em estágios de carência de vitamina E.

O selênio se obtém como subproduto do refino do cobre. Utiliza-se na indústria eletrônica (fabricação de semicondutores, células fotoelétricas,

câmaras, etc.), em cerâmica e vidros, xerografia e pigmentos, fabricação de agentes de vulcanização, inseticidas, repelente de insetos, fotografia (fotos com efeito sépia), medicina e aditivos alimentares.

Os níveis de selênio em água podem oscilar entre 0,1 e 400 $\mu\text{g L}^{-1}$, segundo as características geológicas da região. Portanto, a ingestão diária de selênio depende das condições regionais, que influenciam os conteúdos de selênio na água, leite, pastos, tipo de dieta, etc³³.

O papel biológico do selênio nos mamíferos é atribuído à presença de selenocisteína em cada um dos quatro centros catalíticos da enzima glutathionperoxidase. Esta enzima utiliza como substrato a glutathiona, para reduzir os peróxidos presentes nas células, e desta forma protege as membranas, proteínas e ácidos nucléicos da oxidação devida a radicais livres. Também participa no metabolismo das gorduras, junto com a vitamina E. No entanto, existe uma estreita faixa entre o nível de concentração considerado como essencial e o tóxico. As doses tóxicas de selênio podem ser da ordem de 100 a 300 vezes as requeridas para funções essenciais³³.

O selênio, em concentrações tóxicas, pode produzir graves transtornos, desde unhas fracas com manchas e lesões na pele até transtornos neurológicos, incluindo anestesia periférica, hiperreflexia, convulsões e, em casos extremos, paralisia e alteração da função motora.

O selênio incorpora-se ao organismo fundamentalmente pelo consumo de peixe, carnes, alimentos lácteos e cereais. Se o consumo diário é inferior a 8 μg , pode-se produzir uma deficiência de selênio e uma menor atividade da glutathiona-peroxidase. A deficiência de selênio produz distrofia muscular, necrose hepática, dano muscular e ósseo.

Estima-se que o corpo humano contém entre 3 e 15 mg de Se^{34} . A forma química do selênio influi significativamente na proporção e velocidade de absorção. Assim sendo, o selênio elementar é pouco absorvido, enquanto que os derivados orgânicos presentes em cultivos enriquecidos de levedura e o selenito são facilmente absorvidos e se utilizam como suplementos alimentares.

O selênio tem tendência a se concentrar no fígado, rins e no cabelo, mas não se produzem acumulações importantes graças aos mecanismos de excreção. O selênio no organismo sofre diversas biotransformações, que incluem processos de redução e metilação ou incorporação direta às proteínas (selenocisteína, selenometionina). O selênio segrega-se no leite, em concentrações controladas, já que existem mecanismos de controle na transferência de selênio³⁵.

Existem inúmeros estudos sobre a toxicidade do selênio. Durante as décadas de 1970 e 1980, realizaram-se estudos em diversas regiões da China com o intuito de erradicar a doença de Keshan, produzida por um déficit de selênio na alimentação. Administravam-se suplementos de selenito à população em estudo, em quantidades que oscilavam de $710 \mu\text{g dia}^{-1}$ (nas crianças menores de 5 anos) até $5700 \mu\text{g dia}^{-1}$ em adultos, conseguindo uma redução de 82% da doença, sem serem observados sinais de toxicidade³⁶.

A LD_{50} para selênio em ratos, quer dizer, a dose que se espera produza a morte de 50% da população em estudo, é de 7 mg kg^{-1} para o NaSeO_3 ³⁷ e $3,15 \text{ mg kg}^{-1}$ para o NaSeO_4 ³⁸. Portanto, o Se(IV) é mais tóxico que o Se(VI) e o estado de oxidação do selênio é uma informação importante para estimar sua toxicidade.

1.3.4. Telúrio

O telúrio é um elemento não essencial e tóxico em doses relativamente altas. Sua toxicidade é comparável à do selênio, pois tem um comportamento químico semelhante.

É obtido, principalmente, como subproduto da produção de cobre, chumbo, níquel, prata e ouro. É utilizado em algumas ligas de aço e bronze, em corantes, na fabricação de cerâmicas e em componentes eletrônicos e semicondutores. O telúrio está amplamente distribuído na natureza, sendo liberado nas emissões industriais e na combustão do carvão.

Estima-se uma ingestão total diária (TDI) de $100 \mu\text{g}$ de telúrio³⁴, sendo que as bebidas e alimentos processados podem conter quantidades adicionais de telúrio introduzidas durante seu processo de preparação ou armazenamento. Algumas plantas acumulam o telúrio do solo, como o alho, que pode ter concentrações de 75 mg kg^{-1} ³⁹. O telúrio pode substituir o enxofre na formação de queratina, acumulando-se no cabelo de maneira semelhante ao selênio.

Os temperos, produtos lácteos (leite, manteiga, queijo), nozes e peixes contêm quantidades significativas de telúrio. Alguns recipientes podem conter telúrio, pelo que alimentos envasados em latas de alumínio podem apresentar concentrações mais altas de telúrio⁴⁰.

O telúrio se acumula no fígado e se elimina principalmente pela bÍlis e urina, também podendo se segregar no leite e suor. Os teluratos são menos tÓxicos que os teluritos, embora não se conheçam casos graves de intoxicação por telúrio. A dose letal de telúrio em ratos (LD_{75}) é de 2,25 – 2,5 mg kg^{-1} , para o Na_2TeO_3 e entre 20 - 30 mg kg^{-1} , para o Na_2TeO_4 ⁴¹.

1.3.5. Bismuto

O bismuto pode ser classificado como um elemento de baixa toxicidade e de função biolÓgica desconhecida⁴². O bismuto é produzido como subproduto do refino do chumbo e do cobre. Tem-se utilizado derivados de bismuto desde o sÉculo XIX para tratar doenças gastrintestinais como a colites e a diarréia. Recentemente foi proposto que o Bi é o ingrediente ativo para erradicar a *Helicobacter Pyloridis*, bactéria que causa úlcera de estÓmago.

O óxido de bismuto e germânio é utilizado na fabricação de cristais utilizados em radiologia, visto que neutralizam os raios gama. Também é utilizado como aditivo na fabricação de aços e alumínio (incrementando a dureza e resisténcia à corrosão), como catalisador na produção de acrilonitrila e acroleina e na fabricação de plásticos. O oxiclureto de bismuto utiliza-se como base de inúmeros cosméticos, batons, pós, esmaltes para unhas, etc.

As principais espÉcies de bismuto em água são o $BiOH^{2+}$ e o BiO^+ , segundo o pH em que se encontrem. Os nÍveis de bismuto nos alimentos geralmente são relativamente baixos (menos de 10 $\mu g L^{-1}$ em água normal), e não se conhecem problemas de saúde produzidos por sua contaminação, embora o bismuto possa ser encontrado em quantidades importantes em cosméticos e certos medicamentos³³.

A baixa toxicidade dos compostos de bismuto é atribuída à sua baixa absorção pelo organismo, seja por inalação, ingestão ou contato com a pele. É excretado fundamentalmente através da urina e podem ser encontrados traços de bismuto no leite e na saliva.

Embora os casos de intoxicação por bismuto sejam muito raros, no caso de toxicidade crnica se produz uma fraqueza geral, perda do apetite, febre, diarréia, dermatites e inclusive nefropatia⁴⁰. Espera-se um aumento da

quantidade de bismuto no meio ambiente, devido à sua maior utilização como substituto do chumbo na fabricação de tintas.

1.4. Análise por especiação química

Uma vez que uma série de metodologias vem sendo permanentemente apresentada na literatura, para a identificação e quantificação das espécies presentes em uma amostra, o termo especiação vem sendo empregado amplamente, porém com diferentes significados, incluindo a transformação das espécies e sua distribuição, entre outros. Numa tentativa de organizar as terminologias, três divisões da IUPAC, a saber, a Comissão de Técnicas Macroquímicas e Análise de Traços, a Comissão de Química Fundamental e Ambiental e a Comissão de Toxicologia se reuniram e elaboraram o documento, "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches"⁴³. Ratificando-se que a padronização de terminologias facilita a comunicação, principalmente em áreas interdisciplinares, onde as informações poderão ser utilizadas por cientistas, legisladores, consumidores e mídia.

Com referência a este conceito, geoquímicos e químicos ambientais têm aplicado a palavra especiação química para descrever as transformações físico-químicas que ocorrem com um mesmo elemento durante determinados processos. O termo especiação também é frequentemente utilizado para indicar a atividade analítica de espécies químicas e medidas de sua distribuição. Algumas vezes, é utilizado significando que o método fornece informações sobre a forma em que o elemento se encontra presente, como por exemplo, distinguir derivados organomercuriais de outros compostos de mercúrio. A IUPAC sugere a denominação de análise de especiação, quando for feita referência à atividade analítica de identificação e medição de espécies químicas. Finalmente, o termo também é utilizado para indicar a distribuição de espécies em determinada amostra. A IUPAC recomenda que o termo especiação seja usado desta forma.

A importância da especiação e da especiação analítica para a ciência ambiental, biologia e medicina reflete-se na crescente quantidade de artigos, livros publicados, congressos dedicados ao tema e no constante progresso alcançado. A principal razão é que a toxicidade, biodisponibilidade, o transporte,

em suma, as propriedades físico-químicas de um elemento podem diferir grandemente, dependendo de sua forma química^{44,45}. Logo, informar o conteúdo total de um elemento não é suficiente na avaliação de seu potencial de ação. O desenvolvimento de métodos analíticos precisos e seletivos para a determinação destas diferentes espécies é, pois, de extrema importância para uma estimativa realista dos riscos toxicológicos ou do comportamento ambiental de um dado elemento⁴⁶.

1.5. Especificação de arsênio em alimentos

O arsênio inorgânico compreende as espécies mais tóxicas de As presentes em alimentos e água. Tem sido classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como um cancerígeno para os seres humanos⁴⁷.

Para a avaliação do impacto ambiental, o conhecimento do conteúdo total de arsênio fornece pouca informação, uma vez que as diferentes espécies de As conferem diferentes graus de toxicidade, nos diversos ambientes. Nos ambientes aquáticos, o As pode existir sob forma solúvel, adsorvido a partículas sólidas, complexado a colóides e/ou ácidos húmicos, entre outros e a coexistência de várias espécies nas interfaces água-sedimento, água-ar, sedimento-ar é bastante possível⁴⁸.

Tanto a reação de redução, quanto a metilação do As, podem ocorrer mediante processos químicos ou microbiológicos. A biota pode absorver o arsenato, reduzindo-o a arsenito e metilando-o a espécies menos tóxicas, como os ácidos monometilarsênico-MMA(V) e o dimetilarsínico-DMA(V), que são finalmente excretados.

Alguns autores⁴⁹⁻⁵¹ relataram a existência de As em sedimento e solo, majoritariamente como As(III) e As(V), sendo que o DMA(V) e o MMA(V) não foram detectados ou encontrados com valores abaixo de 5%. Recentemente, a presença de MMA(III) e de DMA(III) foi detectada na urina de pessoas que consumiam água com teores elevados de As⁵². Quase duas dúzias de espécies de arsênio podem ser encontradas atualmente nos sistemas ambientais e biológicos. As espécies mais tóxicas do arsênio, como o arsenito e arsenato, têm sido ligadas ao incremento do risco de câncer, além de doenças cardiovasculares⁵³. As formas metiladas do arsênio, tais como ácido

metilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), são significativamente menos tóxicas que as formas inorgânicas. É importante considerar que muitas pesquisas têm sido realizadas no estudo de diferentes espécies químicas do arsênio em organismos marinhos. No entanto, poucos estudos têm sido realizados em relação à especiação em alimentos de origem terrestre, o qual considera de fato o arsênio em níveis de ng g^{-1} ^{9,54,55}.

Nos últimos dez anos, foram desenvolvidos muitos métodos para a análise de especiação de baixas concentrações de arsênio orgânico e inorgânico, em diversas amostras, acoplando as técnicas cromatográficas à gás e à líquido, um detector específico. A determinação quantitativa de uma mistura de espécies de arsênio, em matrizes complexas normalmente requer o poder de separação de um método cromatográfico e um sistema específico de detecção de arsênio.

Estudos de análise de especiação de arsênio em frutos do mar^{56,57}, peixe⁵⁸⁻⁶⁰ e cereais^{60,61} são os mais freqüentes. Existem apenas alguns poucos estudos de análise de especiação de arsênio em vegetais cultivados em solos com níveis normais de arsênio⁶²⁻⁶⁵, devido à falta de sensibilidade suficiente das ferramentas de avaliação analítica. Helgesen and Larsen⁶² compararam as espécies de arsênio presentes em cenouras de solos contaminados e não contaminados, enquanto que Heitkemper et al estudaram as espécies de As presentes em cenouras, amostras liofilizadas de maçã⁶⁴ e em produtos de alimentação infantil⁶⁵. Entretanto, a maior parte dos estudos foi realizada em plantas terrestres cultivadas em substratos contaminados^{62,66-70}.

Técnicas cromatográficas incluem a redução de arsênio inorgânico, MMA e DMA, aos seus respectivos hidretos voláteis, separando as várias espécies de arsênio de suas matrizes, e pré-concentrando-as em colunas cromatográficas submetidas a baixa temperatura; as espécies são liberadas seletivamente, por aquecimento, antes da detecção. Este processo é também conhecido como “purge and trap”, e se aplica também a outros elementos formadores de hidretos. Embora esse método seja muito sensível, sua precisão depende fortemente da vazão do gás de purga, do tipo de fase adsorvente e tamanho da coluna, assim como da vazão do gás de arraste para o detector (ICP-MS, ICP-OES, AFS)⁷¹⁻⁷³.

A cromatografia à líquido permite a separação de um grande número de espécies organometálicas visto os diferentes tipos de coluna que existem no mercado (adsorção, troca iônica-catiônica e aniônica, permeação em gel, fase reversa), no entanto, é necessário acoplar ao cromatografo detectores com alta sensibilidade de maneira que a determinação de diferentes espécies seja viável apesar de se encontrar em baixos níveis de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1}).

As diferentes espécies de As (arsenocolina, arsenobetaína, As(III), As(V), DMA e MMA) podem ser separados em uma coluna aniônica (Hamilton PRP- X-100) e posteriormente são quantificados por ICP-OES e/ou ICP-MS^{74,75}. A determinação destas espécies por HG AAS faz necessária a transformação da arsenobetaína e arsenocolina em espécies formadoras de hidretos mediante a foto-oxidação, utilizando uma lâmpada ultravioleta e persulfato de sódio como oxidante. Esta foto-oxidação acopla-se em linha pós-coluna HPLC-UV-HG-ICP-MS, HPLC-UV-HG-AFS^{74,76}.

O acoplamento da cromatográfica à líquido a detectores atômicos apresenta algumas dificuldades devido a i - diferenças entre as vazões de eluição cromatográfica e de nebulização do sistema atômico. Se a vazão de eluição é menor à de nebulização, é necessário o uso de uma vazão auxiliar que proporcionará uma diluição da amostra; o caso inverso, vazão de eluição maior do que a de nebulização ocasionará, dependendo do tipo de detector, o esfriamento da chama ou a extinção do plasma. ii – fases móveis orgânicas apresentam grandes interferências nos sistemas de detecção atômicos (fundo alto, instabilidades das chamas ou plasmas) o que obriga ao uso de corretores de deutério ou Zeeman no caso da espectrometria de absorção atômica.

1.6. Especiação não cromatográfica

O estudo sobre as diferentes formas químicas dos elementos tem tido um incremento considerável com o decorrer do tempo. Atualmente, a análise de especiação encontra-se relacionada à determinação das diferentes ligações químicas assim como os estados de oxidação de um elemento em uma amostra dada. Apesar de que tem existido um progresso significativo dos métodos de separação cromatográficos é importante lembrar que estes métodos representam a menor parte dos procedimentos de separação disponíveis em todos os laboratórios. Em alguns casos, diferentes sistemas de detecção podem ser utilizados visando a análise de especiação sem a necessidade da separação cromatográfica. Assim, a análise de especiação não cromatográfica apresenta-se com uma alternativa promissora na área de investigação além da sua aplicação no desenvolvimento de metodologias que facilitem este tipo de abordagem analítico.

Com o intuito de ter um conhecimento abrangente sobre a especiação não cromatográfica, realizou-se uma revisão completa das diferentes metodologias aplicadas em matrizes biológicas, ambientais e em alimentos. Esta revisão gerou uma publicação: Cláudio R. R. Bobeda, M. N. Matos Reyes, A. C. Costa Jr and R. C. Campos, "Non chromatographic methods using in speciation analysis: A review" (em anexo).

2 TECNICAS DE DETECÇÃO

2.1.

Técnicas de detecção para a determinação de elementos traço em óleos vegetais

Diversos procedimentos tem sido utilizados para a determinação, de elementos traço em óleos vegetais, abrangendo técnicas como absorciometria molecular^{77,78}, ativação por nêutrons⁷⁹, potenciometria^{80,81}, além da voltametria^{82,83}. Em relação às técnicas de espectrometria atômica, algumas determinações têm sido realizadas por ICP-OES^{6,84-86} e ICP-MS^{3,87,88}. No entanto, AAS é ainda a técnica mais citada^{3,89-109}. Não obstante, devido ao elevado conteúdo orgânico dos óleos vegetais, um pré-tratamento da amostra é freqüentemente necessário. Estes pré-tratamentos podem envolver a extração ácida^{9,89-92}, a extração em fase sólida²³, além de mineralização por via seca²⁴⁻²⁶ ou úmida^{78,84,85}, esta eventualmente assistida por microondas^{98,99}. A solubilização alcalina também tem sido proposta¹⁰⁰. Entretanto, estes procedimentos consomem muito tempo e apresentam riscos potenciais de contaminação da amostra, assim como perda de analito.

Diversos estudos têm sido realizados visando a comparação de algumas destas técnicas¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Na maioria das técnicas relacionadas à espectrometria atômica, as amostras devem ser líquidas e de baixas viscosidade e densidade, dados os sistemas pneumáticos de introdução de amostras, aos quais se associa o processo de nebulização, prévio à atomização. Já, devido à sua natureza, a espectrometria de absorção atômica no forno de grafite é uma técnica que pode lidar mesmo com amostras sólidas. No entanto, amostras viscosas apresentam dificuldades especiais: por exemplo, a injeção destas amostras via amostrador automático nem sempre propicia uma boa repetibilidade do volume, mesmo após diluição em solventes orgânicos ou do tratamento da superfície interna do capilar do amostrador. Essas dificuldades estão exemplificadas em alguns exames de proficiência recentes¹¹⁰ para a determinação de Cu em óleos comestíveis onde as recuperações individuais

variaram de 10 a 250%, enquanto que para o Ni estes resultados variam de 50 a 144%.

2.2.

Espectrometria de absorção atômica no forno de grafite (GF AAS)

GF AAS é considerada uma técnica bastante sensível para a determinação de elementos traço, com limites de detecção para diversos elementos, na faixa do sub-ng.mL⁻¹. Esta característica está relacionada à eficiência do transporte (90-100%) e ao longo tempo de residência dos analitos no volume de observação (0,1 - 0,5 s). Soma-se, ainda, a vantagem de poder utilizar pequenos volumes de amostras (5 a 50 µL).

O procedimento para a análise por GF AAS é, em princípio, bastante simples: adiciona-se certo volume (5-50 µL) de amostra à plataforma ou tubo do forno de grafite, via pipetador automático. Após a adição, o forno de grafite é aquecido, geralmente em três etapas de temperatura: secagem (em torno da temperatura de ebulição do solvente), pirólise (etapa onde a matriz, em parte ou no seu todo, é eliminada, sem que ocorra perda do analito e cuja temperatura irá depender da matriz e do elemento a ser determinado) e atomização, quando, em um curto período de tempo, o analito é levado à forma de átomos livres, gerando um sinal transiente, cuja área é proporcional à sua massa. Durante este processo é necessário fazer-se fluir pelo forno de grafite, para sua proteção, um gás inerte, a fim de se evitar a combustão do grafite a altas temperaturas; internamente, este gás flui das extremidades do forno para o seu interior, tanto para a proteção do grafite como para remover todos os concomitantes vaporizados durante as etapas de secagem e pirólise. Durante a atomização, o fluxo de gás interno é interrompido, a fim de, aumentando-se o tempo de residência do analito no caminho ótico, vir a ser obtida uma sensibilidade máxima. A etapa de pirólise é um dos pontos mais críticos no aumento da seletividade nas medidas por GFAAS. Muitas vezes, não é possível eliminar totalmente a matriz de amostras reais antes da etapa de atomização do analito e, principalmente por este motivo, são necessários corretores eficientes da absorção de fundo, isto é, a absorção causada pela presença de espécies que não os átomos do analito, no caminho ótico, que podem absorver no mesmo comprimento de onda que o da linha analítica.

Atualmente, as principais restrições à técnica de GFAAS são as dificuldades de análises multielementares e o ciclo de medida por amostra relativamente longo, 1 a 3 minutos. Equipamentos relativamente recentes, mas já descontinuados, permitiam a determinação simultânea de alguns elementos (de 6 a 8), pela combinação dos feixes óticos de diferentes lâmpadas. E, em relação aos programas de temperatura razoavelmente longos, responsáveis maiores pelo tempo de análise, deve-se considerar, que, muitas vezes, eles substituem o pré-tratamento da amostra, que de outro modo seria realizado na bancada, com maiores riscos de contaminação e perdas, além do consumo de reagentes. A GFAAS permite, pois a análise de amostras com um pré-tratamento mínimo e, nesse sentido, ela permanece insuperável na determinação de traços. Amostras sólidas e líquidos viscosos são possíveis de analisar, inclusive por introdução direta, em contraste com outras técnicas de espectrometria atômica, nas quais as amostras devem apresentar baixa viscosidade e densidade^{111,112}.

2.3.

Técnicas para a determinação de As, Sb, Se, Te e Bi em olerícolas, leguminosa e graos

AAS tem sido a técnica mais utilizada para a determinação de elementos traço em alimentos. No entanto, outras técnicas têm sido utilizadas para a determinação do conteúdo total de As, Sb, Se, Te e Bi em diferentes alimentos.

O conteúdo total de Se, Br, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Rb, Sb, Sc, Sr, Th e Zn foi determinado em 6 cereais, 9 vegetais, 20 ervas e temperos indianos por análise por ativação por nêutrons (INAA)¹¹³. Já o As tem sido objeto de vários estudos em diferentes regiões do Chile, devido à contaminação natural ocorrida. Por exemplo, em um dos estudos 16 produtos agrícolas foram analisados por HG AAS, sendo encontrados altos níveis de As em amostras de espinafre^{114,115}. HG AFS e GFAAS foram utilizadas para a determinação de Sb total em amostras de solo e de alfalfa¹¹⁶. Um procedimento de separação e pré-concentração foi desenvolvido para a determinação de Se em alho por GFAAS¹¹⁷.

Como foi citado anteriormente, o arroz é um dos cereais mais estudados sendo que varias pesquisas têm sido voltadas para ele. Por exemplo, foi realizado um estudo para a determinação de As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, e Zn em arroz do Uruguai por AAS¹¹⁸. Já outros estudos

utilizaram outras técnicas analíticas para a determinação de As¹¹⁹. Outro elemento relevante no estudo dos cereais é o Se, quantificado, por exemplo, em cereais e produtos de padaria por FI-HG-GFAAS¹²⁰. Já para a determinação simultânea de As e Se total em ervas medicinais chinesas, foi proposto um método baseado na determinação por HG AFS¹²¹. Em relação ao Te um método baseado na combinação de HG AAS e a pré-concentração do analito por co-precipitação foi proposto para a sua determinação¹²².

2.4.

Espectrometria de Fluorescência Atômica com geração de hidretos (HG AFS)

Dentre as técnicas citadas para determinação de elementos traço, a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) tem recebido, até agora, menor atenção. De 1960 a 1970, os métodos de absorção atômica foram a fronteira na determinação de traços. De 1970 a 1980, a espectrometria de emissão atômica com fontes de plasma indutivamente acoplado (ICP) e de plasma de corrente direta (DCP) tomaram o lugar do desenvolvimento de ponta. Em 1980, com a formulação do conceito STPF, a GFAAS reinicia o caminho para atingir o estágio tecnológico atual, enquanto que, na década de 1990, as pesquisas de fronteira na espectrometria atômica para a determinação de traços voltam-se para o ICP-MS. No entanto, apesar de não ter sua história contada com a mesma ênfase, a técnica de fluorescência atômica oferece grandes vantagens em termos de linearidade e níveis de detecção, pois atualmente, a sensibilidade tem melhorado muito em função da qualidade das lâmpadas empregadas como fonte de excitação. Suas limitações, como o espalhamento e fundo (background), dependem da matriz das amostras e do ambiente de atomização. Daí que a detecção por fluorescência atômica, quando acoplada à técnica de geração de hidretos, dada à intrínseca separação do analito da matriz oferece sensibilidade e especificidade¹²³, e limites de detecção comparáveis ao ICP-MS. Isto se deve ao fato de que, havendo separação do analito da matriz, são minimizadas as chances de supressão (quenching) do sinal de fluorescência pelos concomitantes da amostra passando a atomização a se dar em um ambiente favorável ao relaxamento radiativo (fluorescência).

O atomizador é uma chama de difusão hidrogênio-ar que, rica em radicais H facilita o processo de atomização dos hidretos gerados. Além disto, o custo é

reduzido, oferecendo um sistema de detecção atrativo para a determinação de arsênio e outros elementos formadores de hidretos voláteis em amostras em nível de traços¹²⁴. Afortunadamente, estes elementos formadores de hidretos, inclusive o arsênio, podem ser detectados por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) na região do ultravioleta, abaixo de 259 nm. É claro que, para se obter bons limites de detecção, é necessária uma fonte de excitação de alta intensidade de radiação, pois o sinal de fluorescência é proporcional a esta intensidade. Por isto mesmo, além de intensa, a fonte deve ser estável, para que a relação sinal/ruído seja a mais favorável possível. A ausência destas características foi possivelmente, a razão pela qual a AFS não foi muito utilizada no passado. Recentemente, lâmpadas do tipo “boosted-discharge” (BDHCL) tornaram-se comercialmente disponíveis e têm se mostrado uma boa fonte de excitação para a AFS^{125,126}.

A AFS é uma técnica de análise elementar que envolve o uso de uma fonte de luz para excitar átomos livres a um nível de energia mais alto que o fundamental. A excitação dos átomos do analito é seguida por um processo de relaxamento que envolve a emissão de radiação de fluorescência, de comprimento de onda igual ao fornecido pela fonte. A radiação que parte da fonte de excitação não deve alcançar o detector (geralmente, uma fotomultiplicadora), e isto é facilitado pela minimização do espalhamento na célula de atomização, pelo uso de filtros adequados e pelo desenho do equipamento. As aplicações analíticas em AFS empregam transições na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético, e sua utilização na análise quantitativa tem seu fundamento na relação que, em determinadas condições, pode ser estabelecida entre a intensidade de emissão e a concentração de analito^{127,128}.

2.4.1. Tipos de fluorescência

Podem ser distinguidas duas regiões de fluorescência segundo a faixa de comprimentos de onda na qual se situa a radiação fluorescente, na zona de raios X e UV-Visível. A primeira corresponde aos elétrons das camadas mais profundas, conhecida com o nome de fluorescência de raios X, e se aplica fundamentalmente à análise elementar na fase sólida. Na segunda participam os

elétrons de valência, conhece-se como fluorescência atômica, e se aplica em amostras no estado líquido e gasoso.

A fluorescência atômica consiste na emissão ótica a partir de átomos que excitados a níveis energéticos superiores por absorção da radiação eletromagnética. Na fluorescência atômica, os átomos do analito são excitados por uma fonte externa a um estado eletrônico de alta energia. Estes podem voltar a seu estado fundamental emitindo um fóton de várias formas. Segundo os níveis implicados nos processos de excitação e relaxamento podem-se distinguir 5 tipos de fluorescência¹²⁹:

- a. Fluorescência de ressonância, na qual participa um único nível superior e inferior de energia, portanto, o comprimento de onda de absorção é igual ao de emissão.
- b. Fluorescência de linha direta, o elétron excitado retorna a um nível de energia superior ao de origem. O comprimento de onda é maior do que o absorvido. O resto de energia pode-se perder por emissão de outro fóton ou por desativação por colisões.
- c. Fluorescência em cascata: a absorção vá seguida de desativação por colisões até um nível excitado de menor energia e de emissão de radiação de menor energia do que a absorvida. Estas duas últimas são fluorescências de Stokes visto que o comprimento de onda de emissão é maior do que o de excitação.
- d. Fluorescência assistida termicamente: o elétron atinge, depois da absorção, outro estado excitado pela excitação não radiante (colisão com espécies energéticas presentes na chama, etc.). No processo de fluorescência retorna-se ao estado fundamental ou a outro de maior energia do que este. O comprimento de onda emitido pode ser menor ou maior do que o absorvido. Se é menor trata-se de fluorescência anti-Stokes.
- e. Fluorescência “sensibilizada”: o átomo excitado depois da absorção transfere parte ou toda a sua energia a um átomo de distinta natureza, e é este quem emite radiação quando retorna a um estado de inferior energia.

O tipo de fluorescência que tem uma maior aplicação analítica é a fluorescência de ressonância, visto que as probabilidades de transição são maiores e, portanto também se obtém intensidades de fluorescência maiores.

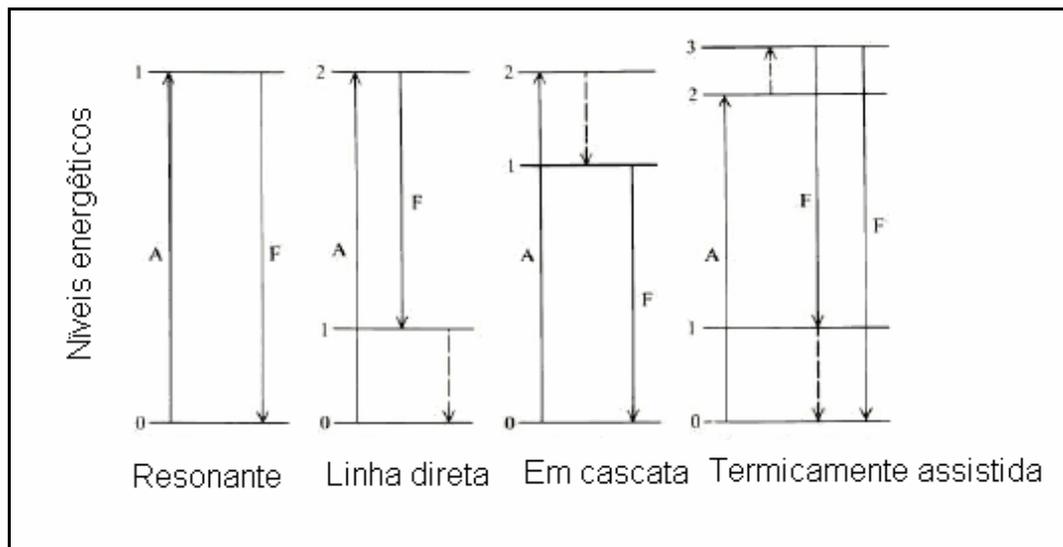


Figura 1. Tipos de fluorescência¹²⁹.

2.4.2. Componentes do espectrômetro de fluorescência atômica

Os componentes básicos de um espectrômetro de fluorescência são: uma fonte de radiação para promover a excitação dos átomos que se encontram no atomizador; o atomizador é, normalmente, uma chama (podendo também ser um forno de grafite ou um plasma); um sistema ótico foca a radiação da fonte no atomizador, de onde a radiação de fluorescência é observada em ângulo reto em relação à radiação incidente (ou de excitação) e selecionada em função do comprimento de onda que se pretende medir, sendo esta a radiação que alcança o detector-fotomultiplicador; daí segue-se o amplificador e, finalmente, o registrador. Normalmente, a fonte é modulada eletronicamente e o amplificador trabalha na mesma frequência que a da fonte, para que outras linhas ou bandas procedentes da chama, distintas da fluorescência, não sejam amplificadas e medidas e, portanto não interfiram na medida analítica.

A fonte de radiação é empregada para excitar os átomos presentes na célula atômica e, por ser a intensidade de fluorescência proporcional ao número de átomos excitados, é claramente vantajoso empregar uma fonte de radiação intensa para se obter o máximo sinal de fluorescência. Essas fontes de radiação podem ser classificadas em convencionais e de laser.

As fontes de excitação convencionais mais empregadas são fundamentalmente de dois tipos, fontes contínuas e de linhas. As fontes contínuas mais empregadas são as lâmpadas de alta pressão de xenônio formadas por um tubo de sílica contendo xenônio a 30 atm e dois eletrodos de tungstênio separados entre si por alguns milímetros, entre os quais se produz a descarga que origina a emissão contínua. Em princípio, as fontes contínuas apresentam algumas vantagens importantes frente às fontes de linhas, já que tornam possível a análise multielementar de forma simples e barata; não emitem linhas espectrais na região típica de fluorescência atômica e a emissão é muito intensa na região do visível. Sua intensidade diminui na região do ultravioleta, particularmente em comprimentos de onda menores que 250 nm. A desvantagem dessas lâmpadas é que elas podem provocar interferências espectrais, preferindo-se, então, as fontes de linhas.

As fontes de linhas mais empregadas são as lâmpadas de cátodo ôco (HCL), lâmpadas de cátodo oco de alta intensidade (HI-HCL) e fundamentalmente, a lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL), ainda que existam outros tipos de lâmpadas. As lâmpadas de cátodo ôco convencionais são as mesmas que as desenhadas para a absorção atômica, porém sua intensidade relativamente baixa, não as torna muito adequadas para fluorescência. Entretanto, é possível pulsar estas lâmpadas com altas correntes, assegurando que a corrente média durante o ciclo não exceda ao valor máximo recomendado pelo fabricante.

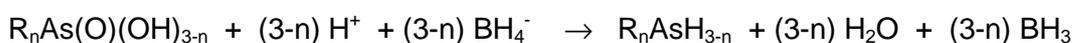
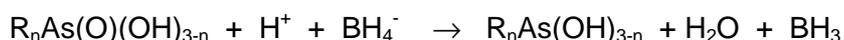
Atualmente, encontram-se disponíveis as lâmpadas do tipo Boosted – Discharge Hollow Cathode Lamps (BDHCL) que fornecem intensidades maiores para muitos elementos quando comparadas às lâmpadas normais de cátodo ôco, operadas do mesmo modo^{127,128}. A lâmpada consiste num anodo localizado na parte posterior de um cátodo cilíndrico. Assim, uma descarga primária incide entre o cátodo e o anodo para excitar os átomos do elemento de interesse, como numa lâmpada de cátodo ôco. No entanto, uma descarga auxiliar incide entre o emissor do elétron e o anodo, passando através da nuvem primária aumentando a intensidade de emissão.

A célula de atomização mais empregada em fluorescência atômica é a chama, ainda que, atualmente, a investigação esteja centrada em atomizadores alternativos, como fornos, filamentos e plasmas. Chamas usuais, como acetileno ou óxido nítrico acetileno apresentam dificuldades para o relaxamento radiativo, por facilitarem processos não radiativos, dada sua alta temperatura, que aumenta a probabilidade de interação entre os átomos excitados e espécies

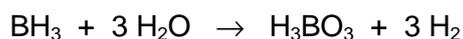
presentes na chama. Felizmente, os hidretos covalentes voláteis podem ser atomizados em chamas ar-hidrogênio, mais frias, a partir de mecanismo que envolve os radicais H, presentes nesta chama. Devido à sua menor temperatura, os processos de relaxamento não radiativo são desfavorecidos, aumentando-se a probabilidade de fluorescência. As chamas de difusão argônio/hidrogênio ou nitrogênio/hidrogênio têm sido utilizadas quase exclusivamente para a atomização do hidreto. O gás auxiliar inerte e o hidrogênio liberado podem ser conduzidos dentro de tais chamas, sem alterar significativamente as características de combustão.

A detecção da radiação se realiza mediante fotomultiplicadores usuais. A amplificação do sinal pode ser feita por um sistema de corrente contínua; porém o sistema de corrente modulada é melhor, pois se obtém melhores relações sinal/ruído.

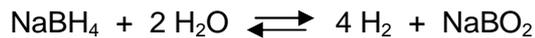
Ainda que em AFS se tenha investigado mais sobre as melhorias na instrumentação do que sobre suas reais aplicações, há um constante aumento nas aplicações analíticas da técnica, sendo atualmente possível a determinação de mais de 40 elementos, em distintos tipos de amostras^{127,128}. As etapas mais críticas na análise por fluorescência atômica, prévia à geração de hidretos são o pré-tratamento da amostra, o efeito do estado de oxidação do analito no sinal analítico e o controle das interferências. A redução dos analitos a seus hidretos se realiza habitualmente com tetrahidroborato de sódio em duas etapas. Na primeira o elemento é reduzido, se for o caso, de seu estado de oxidação +5 a seu estado +3, e, na segunda, dá-se a geração do hidreto correspondente. No caso do As, por exemplo:



O borano gerado por estas reações hidrolisa-se, dando como produtos o ácido bórico e o hidrogênio gasoso¹³⁰.



O tetrahidroborato de sódio decompõe-se imediatamente em condições ácidas, e daí sua solução deve ser preparada em meio alcalino, com NaOH, para que se estabilize a fim de se evitar a hidrólise do NaBH₄ como se observa na seguinte reação:



Com a utilização da solução de tetrahidroborato de sódio, a formação dos hidretos é muito mais rápida, podendo variar de 10 a 30 s. Pode-se, ainda, produzir todos os hidretos voláteis de um grande número de elementos, além de se ter uma maior reprodutibilidade, pois o meio se apresenta mais homogêneo e a velocidade da reação é maior. Geralmente, a solução de tetrahidroborato de sódio é adicionada à solução acidificada da amostra. Para arrastar o hidreto formado, faz-se passar uma corrente de gás inerte através da solução, em um separador gás-líquido.

Alguns dos elementos que formam hidretos podem existir em diferentes estados de oxidação, que apresentam não somente diferentes biodisponibilidades e toxicidades, senão também um comportamento diferente durante o pré-tratamento e a produção do sinal analítico. Além disso, algumas espécies orgânicas, como por exemplo, a arsenobetaina, a arsenocolina e o tetrametilarsênio não formam hidretos, enquanto outras, como o arsenato, MMA e DMA, podem produzir sinais em um grau diferente, no entanto, sempre em menor nível do que o arsenito.

A maior parte dos elementos capazes de formar hidretos (como o As, Sb, Se e Te) pode existir em diferentes estados de oxidação. A formação do hidreto correspondente depende deste estado, visto que unicamente se formam de maneira quantitativa e rápida a partir do estado de oxidação III (As, Sb) ou IV (Se, Te) e, portanto, para determinar os conteúdos totais é necessário reduzi-los previamente. O Bi não precisa de uma etapa de pré-redução, pois o estado (V) é metaestável, portanto, ele se encontra sempre como Bi(III). O NaBH_4 é capaz de reduzir parcialmente o As(V) e o Sb(V), mas a velocidade da reação de redução é mais lenta do que a de formação do hidreto, obtendo-se um menor sinal do que para as espécies reduzidas correspondentes. Por exemplo, a eficiência na geração da arsina a partir do As(V) está na faixa de 65 - 67%. Já o MMA forma um hidreto monometilado (AsH_2CH_3), enquanto que o DMA forma um hidreto dimetilado $\text{HAs}(\text{CH}_3)_2$ ¹²⁶. A eficiência na atomização é maior para a arsina do que para os hidretos metilados, o que explica o menor sinal do MMA e DMA.

Já os hidretos do selênio (H_2Se) e telúrio (H_2Te) só se formam a partir das espécies reduzidas: o Se(VI) e Te(VI) são menos reativos frente ao NaBH_4 e não se reduzem a Se(IV) e Te(IV). Nem mesmo o HCl (inclusive em uma concentração de 6 mol L^{-1}) à temperatura ambiente, é capaz de reduzi-los

quantitativamente, o que torna indispensável uma etapa de pré-redução eficiente. A redução do selênio é favorecida com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração do HCl; no entanto, as condições ótimas dependem de cada amostra e da forma de pré-tratamento da mesma. A pré-redução do Se(VI) a Se(IV), utilizando HCl e Br^- pode ser realizada em condições mais suaves, embora também seja necessário aquecer acima de 50 °C durante aproximadamente 15 minutos^{131, 132}. O KI é um agente redutor largamente utilizado na redução de Sb(V), As (V) e MMA além de evitar a interferência devida ao I_3^- . O papel redutor do KI se vê reforçado pela presença do ácido ascórbico, visto que, o iodeto se regenera continuamente pela oxidação do ácido citado.

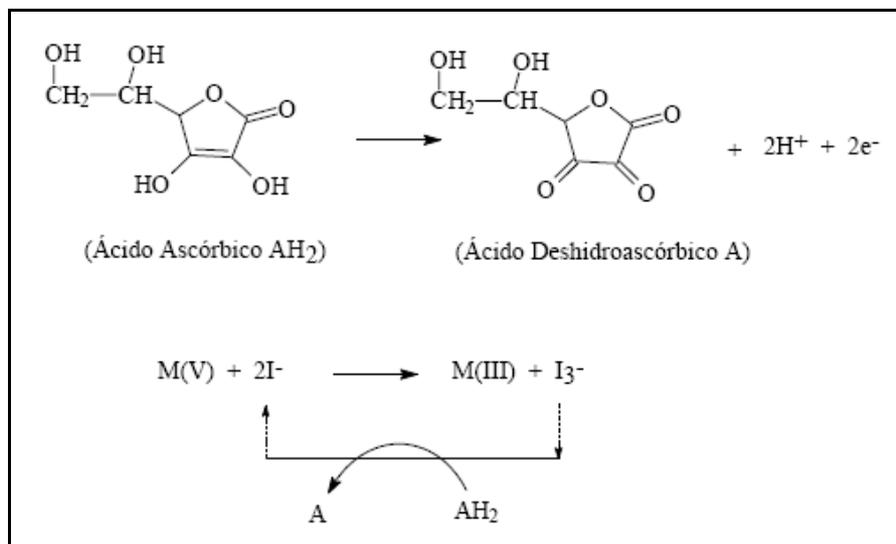


Figura 2. Reações redox do sistema M(V)/KI/ácido ascórbico, sendo M=As(V) ou Sb(V)¹³³

2.4.3. Interferências

As interferências mais importantes na fluorescência atômica com geração de hidretos devem-se, fundamentalmente, à inibição parcial ou total da formação ou liberação dos hidretos voláteis da fase líquida. Estas interferências devem-se à existência de reações competitivas entre a formação/liberação dos distintos

hidretos da fase líquida, com outros possíveis processos. Entre eles está a adsorção dos hidretos gerados sobre a superfície de partículas coloidais de metais precipitados, formados também por redução do borohidreto, envolvendo fundamentalmente metais de transição, tais como o Cu, Ni, Co e o grupo do Pt. Para eliminar ou minimizar estas interferências, se podem utilizar diferentes aproximações: diluir a amostra, aumentar a acidez da solução ou introduzir agentes quelantes ou complexantes (como L-cisteína, KI, ácido ascórbico, EDTA, etc).