

1

Introdução e objetivo

1.1.

Fosforescência na temperatura ambiente em substrato sólido

Em 1944, Lewis e Kasha¹ identificaram o fenômeno de fosforescência como resultado da transição de uma população do estado excitado tripleto para o estado fundamental. Em 1957, Kiers, Britt e Wentworth¹ avaliaram o potencial da fosforescência como base de técnicas analíticas altamente seletivas por causa da especificidade do fenômeno e da razoável resolução provocada pela maior separação espectral entre as bandas de excitação e de emissão radiativa. Em 1958, Feed e Salmre¹ descreveram a construção de um fosforoscópio (aparato mecânico rotativo para rejeição de fluorescência e espalhamento e, conseqüentemente isolamento de fosforescência) que foi usado na determinação analítica de diversas drogas. Mais tarde, em 1963, Latz e Winefordner descreveram um espectrofluorímetro modificado para detecção de fosforescência e reportaram a primeira aplicação analítica da técnica: a determinação da aspirina no soro sangüíneo. Desde então, muitos grupos de pesquisa se dedicaram na viabilização da fosforimetria como técnica analítica de rotina, valorizando sua seletividade e sensibilidade, decorrentes de um ambiente espectral potencialmente de baixo sinal de fundo.

Por ser um fenômeno quanto-mecanicamente “proibido” e de maior tempo de vida, condições especiais devem ser proporcionadas para que intensa fosforescência possa ser observada. Na fosforimetria tradicional, utiliza-se uma matriz congelada a 77 K, de modo a proferir rigidez suficiente aos luminóforos (moléculas luminescentes) e com isso aumentar a eficiência da desativação radiativa do estado excitado tripleto em relação aos processos não-radiativos.

O posterior desenvolvimento das técnicas fosforimétricas na temperatura ambiente trouxe uma maior versatilidade para o uso rotineiro

das técnicas baseadas na fosforescência molecular, visto que a técnica tradicional é experimentalmente trabalhosa e sofrível com relação a repetitividade das medições.

A fosforescência e a fluorescência são fenômenos-base das técnicas analíticas que envolvem a detecção óptica e análise espectral da luz emitida pela substância que realiza transição do estado eletrônico excitado para o estado eletrônico fundamental¹.

No caso dos compostos orgânicos, a excitação de uma molécula usualmente resulta na promoção de um elétron do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para um orbital desocupado de menor energia (LUMO). A multiplicidade do estado inicial é geralmente singleto de onde a molécula é promovida para um estado excitado singleto (transição permitida) ou, via cruzamento intersistemas, para um estado excitado tripleto (transição proibida). A diferença entre os estados singleto e tripleto é resultado da orientação final do spin do elétron promovido¹. Na Figura 1, um diagrama modificado de Jablonskii ilustra o mecanismo do processo que envolve a promoção de moléculas para o estado excitado e as subseqüentes transições radiativas e não-radiativas que competem para desativação das mesmas, trazendo-as para o estado fundamental¹. O processo físico envolvido na população e na desativação do estado tripleto também é mostrado na Figura 1 onde são indicadas as seguintes etapas do processo: absorção (A), relaxamento vibracional (RV), conversão interna (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS) e fosforescência (P)¹.

A fotoluminescência (fosforescência e fluorescência) possui várias características definidas, entre elas podem-se citar os espectros característicos de emissão e de excitação, a eficiência quântica luminescente, o tempo de vida e a polarização da radiação emitida. Os espectros de emissão e de excitação são os primeiros parâmetros a se destacar, pois refletem as energias relativas dos níveis envolvidos no processo luminescente e, logo, são propriedades características de cada substância de interesse. Os espectros de emissão fosforescente de uma espécie química aparecem em frequências menores quando comparados com os de emissão fluorescente. A eficiência quântica da emissão

determina a intensidade da luminescência observada, sendo um parâmetro molecular intrínseco, ou seja, característico de cada substância sob condições específicas de temperatura, e de outros fatores ambientais¹.

O isolamento da fosforescência dos fenômenos radiativos mais rápidos (fluorescência e espalhamentos) se baseia pela diferença entre os tempos de vida dos fenômenos. O tempo de vida das moléculas orgânicas na fluorescência é da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} s, enquanto que na fosforescência acontece na ordem de 10^{-3} a 10^{-1} s¹. A diferença no tempo de vida da fosforescência pode também ser usada para resolver misturas de substâncias que exibem espectros similares, mas que emitem radiação com diferentes tempos de vida. Esse tipo de técnica é denominada de temporalmente resolvida. Por último, a polarização é uma outra característica física importante, pois se pode fazer uso dela para diferenciar transições $\pi\pi^*$ das $n\pi^*$ ¹. Para a maioria dos HPA, que envolvem somente transições $\pi\pi^*$, a fosforescência é geralmente fora de plano polarizado.

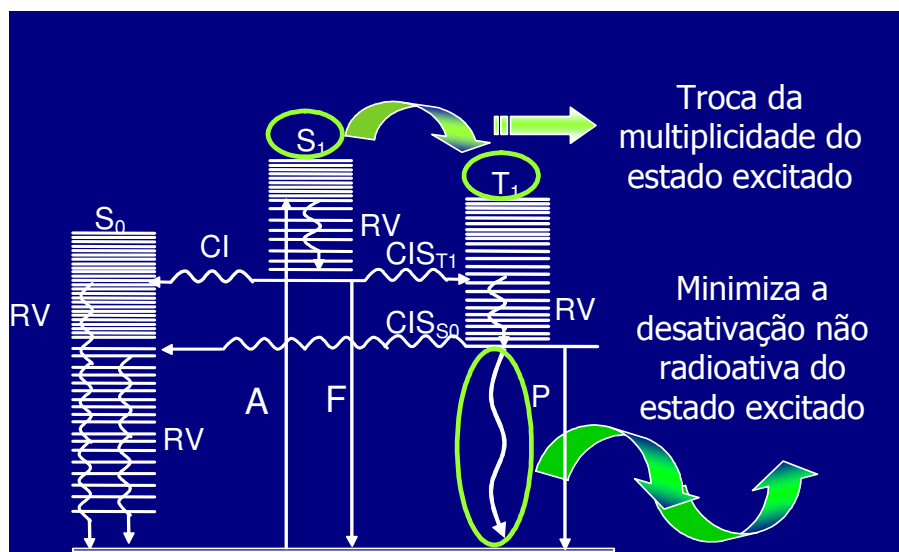


Figura 1: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Vo-Dinh, John Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), conversão interna (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS) e fosforescência (P).

Em 1967, Roth, observou intensa fosforescência na temperatura ambiente para uma variedade de substâncias orgânicas suportadas em

celulose, atribuindo essas emissões a fenômenos de superfície. Schulman e Walling, em 1972–73 investigaram fosforescência na temperatura ambiente de substâncias em uma variedade de suportes, entre eles: sílica gel, alumina, papel, entre outros e observou ainda que a adsorção da molécula em substrato sólido provia a rigidez requerida para minimizar fenômenos de atenuação colisional (quenching) e a desativação não-radiativa do estado tripleto¹. O substrato sólido, nesses casos, foi fundamental para permitir a observação de fosforescência. Entre diversos materiais pesquisados para servir de substrato sólido, a celulose, na forma de papel de filtro ou papel cromatográfico, é o que tem sido mais utilizado desde então para viabilizar a observação de fosforescência em temperatura ambiente. A celulose tem custo baixo e é compatível com a utilização dos mais variados sais de átomos pesados, que são utilizados como indutores e amplificadores de fosforescência. Esses indutores viabilizam a ocorrência das normalmente pouco prováveis transições tripleto-singlete, por meio de acoplamento spin-orbital. Na celulose, a interação responsável pelo “enrijecimento” do analito são as ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila da celulose² e a inclusão dos analitos nos poros do papel.

Em resumo, para se utilizar essa técnica fosforimétrica suportada em papel, a solução carreadora de analito (volumes de até 10 μ L) são depositados no substrato, em geral após a deposição de outros coadjuvantes (soluções de sais de átomos pesados, soluções de modificadores de superfície, etc) e, após secagem do substrato, a fosforescência é medida em atmosfera inerte³. Para minimizar a fosforescência natural do papel (sinal de fundo), deve-se realizar um tratamento, que consiste em uma etapa de lavagem com água fervente com posterior exposição à radiação com lâmpada ultravioleta. Esse procedimento degrada componentes luminescentes do papel (ligninas e hemiceluloses) diminuindo significativamente o sinal de fundo do substrato e, com isso, melhorando os limites de detecção da técnica fosforimétrica em substrato sólido².

1.1.1.

Espectrofotometria luminescente sincronizada

Um recurso da espectrofotometria de luminescência usado para melhorar ainda mais a seletividade das determinações é a varredura sincronizada⁴.

Na varredura luminescente convencional, o espectro de emissão pode ser monitorado pela varredura do comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) enquanto a substância luminescente é excitada em comprimento de onda máximo de excitação fixo (λ_{exc}), e vice versa para a obtenção do espectro de excitação³. Na varredura luminescente sincronizada o λ_{exc} e o λ_{em} são variados simultaneamente enquanto o intervalo de comprimento de onda $\Delta\lambda$ ($\lambda_{exc} - \lambda_{em}$) é mantido constante. Esse recurso permite maximizar o espectro da substância cujo $\Delta\lambda$ característico é selecionado, minimizando a contribuição espectral de substâncias concomitantes cujos valores de $\Delta\lambda$ são diferentes do utilizado⁴.

1.1.2.

Parâmetros que afetam a intensidade de sinal

Vários fatores afetam a fosforescência das substâncias de interesse quando imobilizados em substrato de celulose. Entre estes fatores destacam-se: a natureza do sistema de solventes (incluindo a basicidade ou a acidez desse meio), onde o luminóforo é dissolvido e usado para carrear o analito para o substrato; a presença de sais de átomos pesados (indutores e amplificadores de fosforescência), modificadores de superfície do substrato (sulfactantes); prévia exposição à radiação UV, entre outros. Todos esses fatores devem ser levados em consideração quando se desenvolve um método baseado na SS RTP.

Estudos têm mostrado a importância da escolha do sistema de solventes na intensidade da fosforescência observada no substrato¹. Dois critérios devem ser considerados na escolha do solvente. Primeiramente, a solubilidade do analito no meio e em segundo lugar, a compatibilidade química entre o solvente e o substrato utilizado. A incompatibilidade

química entre amostra, solvente e substrato pode afetar na reprodutibilidade do processo de adsorção do luminóforo no substrato, conseqüentemente afetando a precisão das análises quantitativas¹. Além do mais, o sistema de solvente empregado não deve absorver no comprimento de onda o qual o analito é excitado. No caso da SS RTP, usando substrato de celulose, o etanol ou a mistura etanol-água vem comumente sendo usada, especialmente para HPA¹.

Para a celulose, o sal de átomo pesado e as moléculas do soluto podem ocupar espaços intersticiais entre as fibras do substrato. O sal de átomo pesado é utilizado para produzir o efeito externo do átomo pesado, que pode produzir um aumento significativo do sinal fosforescente, decorrente do acoplamento spin-orbital⁵ no qual o estado tripleto adquire algumas características de singleto e vice-versa. Essa condição aumenta a probabilidade do cruzamento intersistemas (CIS) transferindo a população excitada do estado singleto para o estado excitado tripleto, aumentando a velocidade de desativação radiativa tripleto-singleto. Essa melhoria na eficiência da população e da despopulação radiativa do estado tripleto aumenta a probabilidade da fosforescência ocorrer³. Conclui-se, então, que a presença de átomos pesados no substrato sólido (na forma de sais inorgânicos)⁷ pode diminuir a intensidade fluorescente e o tempo de vida da fosforescência, aumentando a probabilidade de observação de sinal fosforescente.⁸ Tradicionalmente os átomos pesados mais utilizados são tálio, iodo, prata, chumbo, mercúrio e cádmio. No entanto é inviável prever qual desses átomos irá favorecer a fosforescência de um determinado analito, por isso a necessidade de se realizar um estudo sistemático preliminar para cada um.

Com relação ao efeito a exposição das soluções de analito à radiação UV, esta pode gerar derivados fotoquímicos com características fosforescentes distintas das dos compostos originais, podendo ser vantajoso do ponto de vista analítico, por causa de um aumento da intensidade de sinal e/ou modificando as posições das bandas espectrais. Um outro fator importante na etapa de prospecção de um bom sinal fosforescente é o controle da acidez e basicidade da solução carreadora de analito. Espécies com cargas têm probabilidade maior de fosforescer,

pois espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular depois de absorvidas no papel, produzindo uma melhor condição de imobilização.⁹ O efeito da concentração hidrogeniônica do meio carreador pode exercer grande influência no sinal fosforescente, sendo largamente dependente da classe de moléculas analisadas. Esse parâmetro é de extrema importância para melhorar a sensibilidade da técnica SS RTP.¹⁰

A presença de oxigênio no meio é outro fator importante, pois este provoca a diminuição do sinal fosforescente e do tempo de vida da fosforescência.⁴ O oxigênio é um atenuador de fosforescência que atua pela desativação colisional com troca de energia, promovendo o retorno da população das espécies de interesse no estado excitado tripleto para o fundamental sem emissão de radiação.

1.2.

Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são, por definição, compostos binários formados por carbono e hidrogênio, com estrutura que consiste de pelo menos 2 anéis aromáticos, de 5 ou 6 átomos de carbono condensados. Os HPA são poluentes orgânicos de grande persistência (POP) ambiental, e muitos deles e/ou seus derivados são potencialmente carcinogênicos e ou/ mutagênicos. Dados sobre a carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPA e seus derivados encontram – se na Tabela 1.

Tabela 1: Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPA.

(Bouchez et al., 1996 a partir de dados do IARC, 1986)

<i>HPA</i>	<i>Carcinogenicidade</i>	<i>Genotoxicidade</i>	<i>Mutagenicidade</i>
Fluoreno	I	L	-
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzofluorantenos	S	I	+
Ciclopenta(cd)pireno	L	S	+
Benzo(a)antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Trifenileno	I	I	+
Benzo(e)pireno	I	L	+
Benzo(a)pireno	S	S	+
Perileno	I	I	+
Dibenzo(ac)antraceno	L	S	+
Dibenzo(ah)antraceno	S	S	+
Dibenzo(aj)antraceno	L	I	+
Benzo(ghi)perileno	I	I	+
Antantreno	L	I	+
Coroneno	I	I	+
Dibenzo(ae)fluoranteno	L	N	
Dibenzopireno	S	I	+
2-nitronaftaleno	N	L	-
1-nitropireno	I	S	+
Dinitropireno			+

“S”: suficientes; “I”: insuficientes; “L”: limitados; “N”: não carcinogênico. Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica e mutagenicidade. Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo), - (negativo).

1.2.1.

Aspectos Históricos

Segundo Costa¹¹ pode-se considerar como o início da química dos HPA o isolamento do benzo[a]pireno (BaP) do carvão, em 1931 e, subsequente, a sua síntese no mesmo ano. A identificação do BaP como uma nova substância química, em 1933, permitiu demonstrar que esta substância era um forte agente cancerígeno em animais.¹²

De acordo com uma revisão bibliográfica¹¹, as primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HPA foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram cancerígenos em animais (Passey, 1922) e, também pela atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental (Leiter, 1943). Posteriormente, a atividade biológica dos HPA foi também observada em extratos de material particulado ambiental coletado do "smog" fotoquímico de Los Angeles (Waller, 1952).

O BaP foi identificado em fuligem doméstica e posteriormente em material particulado ambiental. Em 1970 o BaP (e outros HPA) foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, e como constituinte de aerossóis urbanos.¹²

Nos anos 70 foi reconhecido o excesso de carcinogenicidade dos extratos de partículas atmosféricas até então atribuído ao BaP, demonstrado que a atividade cancerígena não era somente devida a esta substância mas, também, à presença de outras substâncias orgânicas ainda desconhecidas e também presentes no material orgânico policíclico de fontes de emissão primárias.¹²

Também nos anos 70 foi introduzido um método muito sensível e eficaz para a determinação da mutagenicidade de substâncias químicas, por meio de ensaios envolvendo bactérias do gênero *Salmonella* (ensaio de mutagenicidade ou "Teste de Ames – *Salmonella*").¹³ A partir desta época muita atenção tem sido dada a avaliação de HPA em matrizes ambientais e biológicas. Os 16 principais HPA recomendados pela EPA para o monitoramento biológico estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Nomes e abreviaturas dos HPA recomendados pela EPA.

HPA	Abreviatura	HPA	Abreviatura
Naftaleno	N	Benzo[g,h,i]perileno	BgP
Antraceno	A	Acenafteno	Ac
Pireno	Pi	Acenaftileno	Ace
Criseno	Cri	Fluoreno	Fl
Fenantreno	Fe	Fluoranteno	Fluo
Benzo[a]pireno	BaP	Benzo[k]fluoranteno	BkFluo
Dibenzo[a,h]antraceno	DiBahA	Benzo[b]fluoranteno	BbFluo
Benzo[a]antraceno	BaA	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	IndP

1.2.2.

Principais Fontes Emissoras

Os HPA são emitidos por fontes naturais e antropogênicas. A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antropogênicas representam o principal processo de produção de HPA.¹⁴

A queima de combustíveis como petróleo e seus derivados, carvão, madeira, gás de carvão etc; produz HPA e muitos outros poluentes atmosféricos. A quantidade e os tipos de HPA formados dependem das condições específicas do processo de combustão e do tipo de combustível, sendo que processos mais eficientes emitem menores quantidades de HPA. A fumaça de cigarro, queimadas e calefação (especialmente em países de clima temperado) são importantes fontes de HPA e de seus derivados.¹⁵

Os HPA são oriundos também de fontes tecnológicas que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão interna, que é o principal emissor destas substâncias para o ambiente, pois este tipo de motor é o mais comum em diversos veículos de transporte de cargas e passageiros. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial (e.g., produção de alumínio) e de

incineração (principalmente de rejeitos químicos) e podem emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta.¹⁶

As fontes veiculares de emissão têm uma grande importância devido à complexidade e quantidade, cada vez maior, de material que é lançado na atmosfera. O material particulado emitido por veículos a diesel, por exemplo, é constituído principalmente de carbono elementar que atua como superfície de condensação de HPA e de outros compostos aromáticos.

1.2.3.

HPA e o Meio Ambiente

A atmosfera constitui um importante meio de transporte para os compostos orgânicos e inorgânicos emitidos por fontes naturais e antropogênicas (resultantes da ação/atividade humana). Os HPA podem estar presentes na atmosfera tanto em forma vapor quanto adsorvidos no material particulado.^{11, 16}

A importância ambiental dos HPA e de seus derivados está muito bem estabelecida e aceita pela comunidade científica. Os estudos sobre essa classe de compostos englobam uma grande variedade de aspectos como cinética e produtos de reações em fase vapor, desenvolvimento de metodologias analíticas e estudos de campo sobre concentrações atmosféricas, síntese, atividade cancerígena e mutagênica e processos de remoção da atmosfera.^{11, 16}

As transformações químicas dos HPA na atmosfera são estudadas desde 1956 quando foram publicados os trabalhos pioneiros de Falk et al. Outras matrizes como hidrosfera, solo, biota, alimentos, etc, têm sido objeto de atenção e pesquisas nessa área.^{11, 17}

Os nitroderivados dos HPA (NHPA) também são emitidos para atmosfera em processos de combustão, porém, em menores quantidades que os HPA. Contudo, a formação de NHPA na atmosfera predomina sobre o processo de emissão direta.

1.2.4. HPA e a Saúde pública

A contaminação de rios, mares e florestas e, também da atmosfera, pode causar danos irreparáveis à natureza e à saúde humana. A ação maléfica dos HPA sobre os organismos vivos pode ser exercida diretamente e, principalmente, através de seus derivados, cujos efeitos de muitos deles ainda não são totalmente conhecidos.

Os efeitos dos HPA sobre a saúde humana estão diretamente associados ao mecanismo de contaminação que ocorre principalmente através da inalação de aerossóis atmosféricos. As mais importantes vias de exposição são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada. No caso de seres humanos, outros importantes modos de exposição aos HPA são: o hábito (ou vício) de fumar, a inalação (passiva) de fumaça de cigarros e a exposição ocupacional em atividades e processos envolvendo a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos (IPCS, 1998).

HPA já foram detectados em alimentos brutos e processados. A presença de HPA em alimentos brutos de origem vegetal pode ser creditada principalmente à deposição atmosférica. Animais aquáticos, como mexilhões e ostras que tendem a acumular HPA podem, eventualmente, representar outra forma de aporte destes compostos aos seres humanos e a outros animais.¹⁸ Em alimentos processados, a presença de HPA está associada ao alimento *in natura* ou ainda a alguma etapa de processamento, como é o caso da defumação ou fritura dos alimentos.¹⁸

Na atmosfera os HPA estão distribuídos entre a fase gasosa e o material particulado atmosférico em função das condições ambientais (principalmente da temperatura) e das constantes físico-químicas do composto em questão. A maior parte dos HPA presentes em material particulado atmosférico se concentra nas partículas de menor diâmetro aerodinâmico¹⁹ que, devido às características do sistema respiratório humano, são capazes de atingir as vias respiratórias internas onde os processos de eliminação de HPA associados às partículas são lentos.

O trato respiratório pode ser convenientemente dividido em duas regiões distintas: a região extratorácica constituída pelas vias nasal e oral, faringe e laringe; e a região intratorácica que inclui os brônquios, traquéia e alvéolos. Devido à deposição de partículas ambientais e organismos, a região extratorácica é muito susceptível a infecções e doenças respiratórias. A deposição de partículas na região extratorácica é considerada a primeira linha de defesa contra a penetração de partículas nas vias mais profundas, mas também é reconhecido como um sítio de efeitos tóxicos. A região intratorácica, por sua vez, é dividida em região traqueobronquial e região alveolar onde geralmente ocorre o câncer de pulmão e outras enfermidades crônicas¹¹.

Partículas menores têm um tempo de residência maior na região intratorácica, permanecendo por semanas e até anos em contato direto com a membrana alveolar. O estudo da distribuição do BaP no Rio de Janeiro, utilizando um impactador em cascata, indica que os HPA estão preferencialmente adsorvidos em partículas menores, com diâmetro aerodinâmico entre 0,05 e 0,26 μ m.¹⁹ Outros estudos indicam que 95% dos HPA estão associados a partículas menores que 10 μ m de diâmetro o que corresponde àquelas consideradas inaláveis (diâmetro de partícula $\leq$ 15 μ m). Isto aumenta a possibilidade de absorção pelo organismo devido a eficiente deposição intratorácica¹¹.

Como os compostos que tendem a concentrar-se em partículas são os mais pesados, para os quais se tem maior interesse toxicológico por serem os mais carcinogênicos (Tabela 1), e como os processos de combustão (principalmente veicular) tendem a formar partículas muito finas, a inalação de HPA durante a respiração é muito importante, o que faz com que tenha sido observada boa correlação entre os marcadores de exposição a HPA como 1-hidroxipireno (1-OHP) e a poluição atmosférica¹¹.

A avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer benefícios à população, particularmente quando se sabe que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas

externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes.

1.2.5. Monitoramento biológico

A biotransformação de HPA em organismos vivos está bem estudada e pode representar uma forma de redução dos níveis ambientais destas substâncias. Porém, a metabolização dos HPA pode ter dois papéis antagônicos nestes organismos, podendo levar à formação de substâncias mais tóxicas e servir como mecanismo de detoxificação. Um exemplo é a presença de conjugados de 1-hidroxipireno com β -O-glicosídeos e β -O-glicorínídeos em plantas.^{11, 20}

A procura de bioindicadores confiáveis para o estudo da exposição humana aos HPA e seus derivados constitui ainda matéria para muita pesquisa. Alguns indicadores específicos como, por exemplo, o 1-OHP tem sido utilizado com sucesso nos estudos da exposição humana a determinados HPA.

No conhecimento do paradigma clássico exposição–doença, os marcadores biológicos de exposição e efeito são de grande utilidade na produção de informações que permitem a adoção de medidas preventivas. Assim, a importância e atualidade do tema, em conjunção com as limitações atualmente disponíveis, justificam investimentos científicos e fazem com que esta área de estudo seja bastante atraente e relevante.

Geralmente, os HPA são metabolizados em diferentes poli-hidroxi-HPA, com exceção do pireno que é quase que completamente (cerca de 90%) metabolizado a 1-OHP em todas as espécies animais estudadas.^{6,11} Sendo o 1-OHP o principal metabólito do pireno, este tem sido amplamente utilizado como indicador de exposição aos HPA. O nível de 1-OHP presente na urina, por exemplo, reflete a exposição global a HPA, considerando sua exposição por via respiratória e por via cutânea. Na avaliação da exposição ocupacional aos HPA, deve-se considerar o estilo de vida do trabalhador, como o hábito de fumar, a alimentação, a poluição

atmosférica da região de sua residência e do trabalho, pois estes fatores influenciam na excreção urinária de 1-OHP.^{6,11}

1.2.6. Aplicações

1.2.6.1. Bílis de peixes

Os HPA, por serem formados por anéis aromáticos múltiplos, são mais resistentes a biodegradação microbiológica, sendo bastante persistentes no ambiente. Eles são fortemente adsorvidos nos sedimentos, persistindo ali por muitos anos. Alguns exemplos mais comuns de HPA provenientes do petróleo e de seus derivados são o pireno, o criseno, o naftaleno, o antraceno, o fenantreno, o benzopireno e seus vários isômeros e derivados.

Embora os efeitos tóxicos dos HPA sobre os organismos sejam bem documentados, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de carcinogênese. Acredita-se que as posições relativas dos anéis aromáticos tenham um papel importante na determinação do nível de sua ação carcinogênica. Os HPA considerados como os carcinógenos mais potentes possuem uma “região de baía” formada por ramificação na seqüência dos anéis benzênicos. Esse tipo de organização dos átomos de carbono concede um alto grau de reatividade bioquímica. Na verdade, os derivados dos HPA, obtidos por meio de diversas reações metabólicas no organismo, são agentes carcinogênicos mais potentes que os HPA não substituídos originais. Segundo GESAMP (The Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection)²¹ há fortes evidências que os HPA são capazes de causar câncer em peixes e moluscos. Sua atividade mutagênica está fortemente relacionada com o formato e estrutura molecular. Portanto, a forma molecular dos isômeros dos HPA está diretamente relacionada com a atividade biológica e conseqüentemente com sua toxicidade. Tumores em organismos marinhos como moluscos briozoários e algas estão associados à contaminação por aromáticos / poliaromáticos.

Estudos com animais reportam alterações enzimáticas nas mucosas do trato gastrointestinal e aumento no peso do fígado, a partir da ingestão de HPA (efeito agudo). Distúrbios no fígado, sistema imune, leucemia, câncer e tumores no pulmão e estômago são alguns dos efeitos reportados pela ação destes compostos. Os compostos aromáticos mais solúveis penetram na corrente sanguínea a partir da pele ou da ingestão, podendo ser filtrados pelo sistema excretor e eliminados na urina. Esses compostos aromáticos têm potencial capacidade de causar danos nas células sanguíneas, nos tecidos ósseos (medula óssea) e no sistema nervoso. Eles causam também irritações e dermatite na pele, mucosa e olhos. A tendência de estes compostos serem incorporados nos tecidos adiposos (gordurosos) e de causarem danos em órgãos como fígado e rins de seres humanos tem sido comprovada²¹, podendo também afetar de forma análoga o tecido de vertebrados marinhos após um derrame de óleo. Considerável conhecimento já existe sobre os efeitos dos hidrocarbonetos do petróleo no ser humano. No entanto, apesar dos estudos crescentes, pouca informação está disponível sobre os efeitos específicos destas substâncias nos organismos marinhos, especialmente após acidentes envolvendo vazamento de óleo no oceano.²¹

A toxicidade aguda (exposição em curto período de tempo, mas em elevadas concentrações) e a toxicidade crônica (exposição longa, e com baixas concentrações) geram respostas diferentes nos organismos e na comunidade como um todo. A tendência de se classificar uma situação como menos estressante que a outra deve ser considerada com muita cautela, pois as consequências destes impactos são resultantes de uma complexa variedade de interações e características do ambiente, dos organismos atingidos, e do próprio óleo. Da mesma forma as respostas do ecossistema ao estresse são complexas e difíceis de serem interpretadas.

Quanto à transformação, a primeira que ocorre nos organismos é a formação de um anel epóxido do lado oposto de uma ligação C=C no HPA, que na presença de água produz dois grupos hidroxilas nos carbonos adjacentes, e que após epoxidação, podem produzir um composto carcinogênico. Pela adição de H⁺, esta molécula pode formar um cátion estável que se liga às moléculas do DNA induzindo mutações e

finalmente câncer. As reações metabólicas de formação do epóxido e a adição de água fazem parte das tentativas do corpo de introduzir grupos hidroxila na estrutura das moléculas hidrofóbicas, e, desse modo, torná-las solúvel para que possam ser eliminadas.²²

Estudos preliminares empregando HPA radiomarcados mostraram que as concentrações mais altas de radioatividade (primariamente na forma de metabólitos de hidrocarbonetos polares) são encontradas no sistema hepatobiliar de peixes expostos aos hidrocarbonetos.²³ Esses resultados levaram ao desenvolvimento de um método semiquantitativo que estima as concentrações de compostos aromáticos fluorescentes em bile de peixes utilizando a técnicas de HPLC com detecção fotométrica.²² Atualmente, este é o único método de rotina disponível para avaliação de hidrocarbonetos em peixes de forma relativamente rápida e de custo acessível.²⁴ Algumas aplicações práticas foram apresentadas em biomonitoramentos baseados nesta técnica.^{25, 26, 27, 28}

Apesar dos diversos estudos já realizados em vertebrados, existem poucos que reportam o metabolismo e excreção de HPA. Como exemplos, aparecem os trabalhos de *Stroomberg et al*²², que observaram a formação de metabólitos de pireno em isópodes terrestres (*Porcellio scaber*), e trabalho de *Watson*²², que desenvolveu um método de análise de urina de *Carcinus maenas* para a determinação de metabólitos de fenantreno por HPLC. Embora o uso de metabólitos como marcadores seja promissor do ponto de vista da avaliação ambiental em rotina ou em casos de derrames de óleo, estudos de validação da técnica analítica e de seleção dos organismos mais adequados necessitam ser conduzido antes de sua aplicação. Neste tipo de aplicação, geralmente existe a necessidade de se utilizar técnicas analíticas distintas para a HPA, sendo uma técnica mais simples e de baixo custo para detectar a presença de HPA (“técnica de screening”) e uma outra mais elaborada e complexa capaz de identificar seletivamente os compostos inicialmente ingeridos pelo animal e aqueles presentes como produtos de sua transformação, os chamados metabólitos. Como técnica de “screening” a fluorimetria tem sido aplicada com sucesso²⁴. Já, técnicas de separação baseadas nas cromatografias em fase gasosa e em fase líquida seguido por detecção

fluorimétrica ou de massas são exemplos que permitem a determinação sensível e seletiva dos diferentes HPA presentes em uma amostra.

O desenvolvimento de métodos analíticos baseados em uma técnica alternativa às aquelas já mencionadas pode ser de interesse, se a mesma unir simplicidade e baixo custo com a capacidade de proporcionar detecção e quantificação seletiva de diferentes HPA. Nesse trabalho, a fosforimetria na temperatura ambiente suportada em celulose tem o potencial de unir essas características, sendo proposta para a avaliação da contaminação por óleo em populações de peixes (“Tainhas”), em especial a espécie *Mugil liza* (Tainha), usada como biomonitor de contaminação na Baía da Guanabara²⁴, podendo assim confirmar a ocorrência ou não de fontes de poluição crônica que afetariam a qualidade do pescado.

A *Mugil liza* tem o corpo escuro do dorso superior, prateado nos lados e no peito e percorridos por estrias longitudinais escuras aproximadamente paralelas, que passam pelo centro das escamas. A base da nadadeira peitoral possui uma mancha negra. A figura 2 mostra algumas “tainhas” após coleta no curral, ainda dentro barco.



Figura 2 Tainhas após coleta em curral

1.2.6.2. Cachaça

Em geral, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio pode servir como precursores de HPA^{29,30}, Acredita-se que no

mecanismo de formação de HPA durante a combustão incompleta de material orgânico esteja envolvido dois processos distintos: a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis (pirólise). Estas e outros radicais se recombinaem para produzir moléculas maiores e mais estáveis de HPA (pirossíntese). Uma vez formados os HPA podem sofrer reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas com grande número de anéis condensados.³⁰ Os HPA não são obrigatoriamente fracionados em fragmentos menores antes da pirossíntese, podendo resistir a essa fragmentação parcial seguida pela hidrogenação dos seus radicais primários.

Outras fontes de contaminação por HPA podem ser identificadas nos alimentos e bebidas. Por exemplo, estudos na Holanda demonstraram que a ingestão de açúcar puro e produtos açucarados são fontes importantes de HPA na dieta da população. As análises destes produtos indicaram teores de criseno de até $36 \mu\text{g kg}^{-1}$.³¹ As análises de amostras de açúcares comerciais brasileiros indicaram a presença de HPA em concentrações que variam de 0,25 a $0,83\text{mg kg}^{-1}$.³² Na Alemanha. The German Society for Fat Science fixou o teor total de HPA em alimentos, sendo os limites estabelecidos entre $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ para os de alta massa molecular (1,2-benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[ghi]perileno e benzo[a]antraceno).^{33, 34}

A existência de HPA em bebidas não é novidade, pois foram constatadas as presenças de benzopireno, benzofluoranteno e de criseno em uísques (atribuída a queima da turfa) em teores de 0,03 a $0,08\mu\text{g L}^{-1}$.³² Segundo a legislação escocesa as concentrações máximas toleradas de HPA em alimentos são de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenatreno e antraceno e de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para fluoranteno, pireno e criseno.³⁵

A colheita da cana-de-açúcar no Brasil ocorre todo ano entre os meses de maio e novembro, geralmente após a queima dos canaviais.³⁶ Este procedimento de queima resulta em contaminação ambiental, pois partículas de palha queimada (fuligem), bem como inúmeros compostos tóxicos, dentre os quais os HPA são introduzidos na atmosfera. Estudos

realizados em amostras de fuligem da cana-de-açúcar queimada indicam a presença dos seguintes HPA: naftaleno, acenaftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, 1,2-benzo[e]pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]pireno, 1,2-benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[ghi]perileno.³⁶ Apesar de bebidas contaminadas por HPA serem potencialmente prejudiciais à saúde^{35,37}, até o momento, no Brasil, não existe legislação específica sobre o assunto.

Além de proveniente da queima da cana, a presença de HPA em cachaça pode ocorrer a partir de contaminações nas etapas do processo de produção, tais como: (i) o emprego de lubrificantes nos equipamentos; (ii) a utilização de recipientes não-adequados para o armazenamento da bebida; (iii) tanques revestidos com resinas asfálticas; (iv) pelo açúcar adicionado na bebida e (v) durante a maturação da bebida em tonéis de madeira tratada termicamente.^{36,38} Estudos para o conhecimento do perfil químico das aguardentes brasileiras em relação ao seu teor de HPA³² já foram realizados usando uma adaptação da metodologia existente por HPLC-UV³⁶ para a análise de HPA na tentativa de diferenciar aguardentes provenientes de cana queimada e não queimada. Pela aplicação do método de análise de componentes principais (PCA) aos resultados obtidos foram mostrados que os teores médios de HPA, isolados e totais para aguardentes produzidas com cana queimada são sempre bem superiores ao das aguardentes produzidas com cana não-queimada. Fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno e benzo[e]pireno não foram detectados em aguardentes produzidas com cana não-queimada. Já o benzo[a]pireno, benzo[b]pireno, o benzo[a]antraceno e o benzo[e]pireno, segundo os resultados obtidos, são os HPA que mais contribuem para as aguardentes produzidas com cana queimada. Nas aguardentes provenientes de cana não queimada não foi detectada a presença de antraceno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]pireno e benzo[a]pireno.³²

A fosforimetria na temperatura ambiente suportada em celulose pode ser um método alternativo para quantificação e controle das

especificações quanto à presença e quantidade de HPA em produtos brasileiros, seja ele para consumo interno e/ou destinado à exportação.

1.3.

Fosforimetria na determinação de HPA

Os HPA apresentam fosforescência de fraca intensidade devido a grande energia que separa os estados excitados tripleto e singleto e ao fraco acoplamento spin-orbital inerente nessas moléculas¹. No entanto, os primeiros estudos envolvendo fosforimetria já reportavam o uso do efeito externo do átomo pesado para induzir e amplificar a fosforescência desses compostos. Para as primeiras abordagens da fosforimetria, realizada em meio congelado a 77K, o efeito externo era conseguido por meio de iodetos ou brometos de alquila, pois em geral os cristais congelados mais transparentes eram obtidos com misturas e solventes orgânicos (por exemplo: o EPA – éter/pentano/álcool propílico, 5/5/2 v/v/v). Com o advento do uso de substratos sólidos, principalmente o de celulose, cresceu a possibilidade de se aproveitar o efeito externo de outros átomos de grande número de massa na forma de sais inorgânicos depositados no substrato. Devido ao efeito diverso nas características fosforescentes dos HPA e dos CPA (compostos policíclicos aromáticos),¹ o uso desses sais foi proposto em metodologias de identificação de HPA, sendo que a determinação seletiva, usando o efeito externo do átomo pesado, foi sugerido por Vo-Dinh em alguns dos seus artigos³⁹ e descrito em seu livro sobre análise química de CPA.⁴ Surpreendentemente, são poucos os métodos descritos na literatura que fazem uso desse efeito seletivo.⁴⁰ Isso se deve provavelmente ao número reduzido de grupos de pesquisa que trabalham no desenvolvimento de métodos fosforimétricos. Mais recentemente, um número maior de trabalhos descreve métodos fosforimétricos para HPA, no entanto, esses são baseados na indução direta de fosforescência em soluções aquosas ou em microemulsões aquosas⁵. A desvantagem dessas abordagens em relação à técnica em substrato sólido é a limitação do uso de átomos pesados (meio aquoso é

compatível somente com iodetos, brometos e sais de tálio) provocado pela necessidade de desoxigenação química da solução com sulfito de sódio. O sulfito de sódio torna esses meios aquosos básicos demais para sustentar concentrações altas de sais de prata, chumbo cádmio entre outros.

A maioria dos métodos SS RTP reportados são aplicados em amostras simples como água de chuva e de rios.^{3,7} Pré-concentração dos HPA em membranas após separação em fase sólida tem sido propostos. Nesses casos, a medição é feita diretamente nas membranas secas depois de tratadas com soluções de sais de átomos pesados.^{3,7} O uso de laser foi proposto para a excitação seletiva de HPA. A vantagem dessa abordagem é a possibilidade de se usar efeito externo de átomo pesado comum a muitos HPA (o do tálio, por exemplo) e seletivamente excitar cada HPA na sua região característica do espectro usando essa fonte de banda espectral fina.⁴²

1.4. Objetivo

Neste trabalho, a fosforimetria à temperatura ambiente em substrato sólido (SS RTP) é proposta como técnica analítica alternativa sensível e seletiva que permite o desenvolvimento de método de baixo custo para a detecção e quantificação de criseno e de pireno em amostras de bísis, extraída de peixe da espécie *Mugil liza*, e em cachaça, para a avaliação dos teores dessas substâncias em amostras comerciais.

O objetivo do presente trabalho é desenvolver, otimizar, validar e estimar a incerteza de metodologias baseada na SS RTP, usando a sistemática de trabalho mostrada a figura 3. A SS RTP é uma técnica muito atrativa do ponto de vista espectroanalítico por ser a fosforescência um fenômeno intrinsecamente seletivo. Essa técnica pode ser uma interessante alternativa às técnicas usadas atualmente para determinação de HPA tais como HPLC-fluorescência e GC-MS.

Outra vantagem da SS RTP é a sua capacidade para análise ultra-
traço (determinação traço em micro-quantidades de amostra), o que é

vantajoso quando se tem disponível pequena quantidade de amostra (por exemplo, no caso da bilis de peixe). Além disso, a SS RTP tem capacidade de permitir a determinação seletiva de substâncias muito semelhantes, explorando pequenas diferenças nas características fosforescentes das mesmas, sem a necessidade de separação física prévia de componentes da amostra. Além disso, de o equipamento utilizado para estas medições é de fácil manuseio e o custo operacional da técnica é relativamente baixo.

Pretende-se também mostrar, por meio de tratamento estatístico e utilização de material de referencia certificado, que a SS RTP possui robustez estatística (nível de 95% de significância) quando comparada a outras técnicas de referência aqui comentadas.

O trabalho envolveu as seguintes etapas:

- Desenvolvimento de método fosforimétrico para determinação seletiva de criseno e de pireno mostrando o potencial da técnica na determinação de outros 7 HPA (benzo[a]pireno, antraceno, 1-OH pireno, fluoranteno, fenantreno, benzo[ghi]perileno e 1,2 benzoantraceno). Esse estudo foi subdividindo em: (i) estudo das características fosforescentes (estudos preliminares) dos 9 HPA utilizando condição de imobilização substrato sólido e temperatura ambiente e em função de variáveis como a natureza do indutor de fosforescência, (ii) a influência de modificadores de superfície do substrato, (iii) a influência do tratamento UV da amostra, (iv) a variação da concentração hidrogeniônica do meio carreador de analito para o substrato, (v) otimização das condições experimentais de pireno e de criseno pelo uso conjunto de estudos univariados e multivariados e (vi) estudos de seletividade (determinações simuladas com os 9 HPA).
- Validação do método, obtendo as características que descrevem a linearidade, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), robustez, precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e tendência e recuperação (comparação com MRC e entre métodos).

- Estimativa das incertezas pelo método clássico e simulação de Monte-Carlo, aplicando o método fosforimétrico desenvolvido, otimizado e validado em matriz biológica e em cachaça e/ou adaptando o método para aplicação em bÍlis de peixe (matriz complexa) e em cachaça (matriz simples).

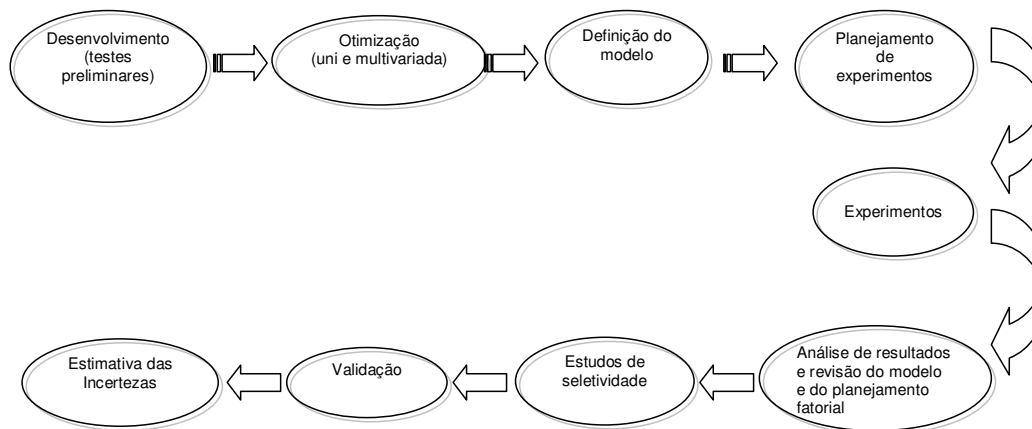


Figura 3 : Fluxo da estratégia inicial para desenvolver, otimizar, validar e estimar a incerteza de metodologia baseada na SS RTP para determinação seletiva de criseno e pireno.