



## 15° Congresso de Iniciação Científica

### **DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL E INORGÂNICO EM TECIDOS BIOLÓGICOS ATRAVÉS DE INJEÇÃO EM FLUXO ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA (FI-AFS)**

#### **Autor(es)**

GABRIEL GUSTINELLI ARANTES DE CARVALHO

#### **Orientador(es)**

José Roberto Ferreira

#### **1. Introdução**

A toxicidade dos elementos químicos, como o mercúrio, está intimamente relacionada à sua forma química. Compostos orgânicos mercuriais, principalmente metilmercúrio, são reconhecidos há muitas décadas por serem mais tóxicos que as espécies inorgânicas deste metal (Domi, 2005; Storelli et al., 2001). Devido a seu caráter lipofílico, compostos organomercuriais podem atravessar membranas biológicas e fixar-se às proteínas através dos grupos sulfidrilas (Boening, 2000; Cabañero, et al., 2005), principalmente nas do sistema nervoso central, conferindo o potencial neurotóxico deste elemento (Grandjean et al., 1997). Análises de mercúrio total em certos tipos de amostra podem não ser completamente aceitáveis, uma vez que proporcionam uma informação parcial sobre a toxicidade oferecida à saúde e ao ambiente (Puk e Weber, 1994). Desta forma, técnicas de especiação química de elementos traços em amostras biológicas estão ganhando importância, uma vez que a toxicidade de muitos elementos não depende somente de sua concentração, mas principalmente de sua forma química. Neste sentido, várias técnicas e métodos para a separação das espécies químicas de mercúrio foram desenvolvidas nas últimas décadas, como extração da fase orgânica a partir de solventes orgânicos, cromatografia gasosa (GC) e líquida (HPLC), espectrometria de massas acoplado indutivamente ao plasma induzido (ICP-MS) e fluorescência de raio-X. A espectrometria de absorção atômica (AAS) é sem dúvida a técnica mais utilizada para a determinação de mercúrio total em todo o mundo. Estudos conduzidos por Tao et al. (1998), Tao et al. (1999), Barbosa et al. (2004) e Torres et al. (2005) descreveram extrações de diferentes espécies químicas de mercúrio de tecidos biológicos utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em temperatura ambiente, sendo a detecção do elemento obtida por diferentes métodos analíticos. Os teores totais de mercúrio podem ser determinados através de pré-oxidação com  $\text{KMnO}_4$ , conforme descrito por Guo e Baasner (1993). Mercúrio inorgânico é determinado através da complexação da fase orgânica com L-cisteína, onde a etapa de redução é verificada somente para  $\text{Hg}^{2+}$  (Magos, 1971; Tao et al., 1999). As formas orgânicas são determinadas pela diferença entre os teores totais e os inorgânicos. O acoplamento de técnicas de geração de vapor frio à espectrometria de fluorescência atômica (AFS) resulta em melhor sensibilidade, ou seja, limites de detecção mais baixos,

proporcionando uma ferramenta analítica muito eficiente e de baixo custo para determinações de mercúrio (Morita et al., 1995).

## 2. Objetivos

O objetivo deste artigo é apresentar um método simples e rápido para análises de mercúrio total e inorgânico em tecidos biológicos, a partir da extração a frio pelo TMAH seguida pela detecção por AFS.

## 3. Desenvolvimento

Todos os reagentes utilizados nas etapas experimentais possuem grau analítico, isentos de mercúrio. A água desmineralizada de alta pureza (18,2 M $\Omega$ cm) foi produzida através de sistema Milli-Q (Millipore, Belford). Utilizou-se metodologia baseada nos ensaios conduzidos por Tao et al. (1998), Tao et al. (1999), Barbosa et al. (2004) e Torres et al. (2005), a qual consistia em extração dos analitos do tecido biológico através do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH - Sigma-Aldrich, Milwaukee). Para tanto, adicionou-se 50mg de amostra e 4,0mL de TMAH 25% (m/v) em frascos tipo Falcon de polipropileno. A extração procedeu-se em temperatura ambiente sob sonicação, durante 30 minutos (Santos Jr et al., 2006). Diluiu-se a amostra até o volume de 50,0 mL. O sistema de fluxos foi constituído de uma bomba peristáltica (Ismatec® IPC) e de um injetor manual (Figura 1). As análises se deram a partir de injeção em fluxo de 500 $\mu$ L de amostra em solução carregadora HCl 0,1% (v/v) destilado (Merck, Darmstadt) (Figura 1). Para a determinação de mercúrio total, solução de KMnO<sub>4</sub> 0,25% (m/v) (Merck, Darmstadt) foi adicionada em linha na amostra para oxidar a matéria orgânica, formando íons Hg<sup>2+</sup>, conforme proposto por Guo e Baasner (1993). Posteriormente, esta solução foi reduzida na presença de SnCl<sub>2</sub> 5,0% (m/v) (Merck, Darmstadt) em HCl 10% (v/v), reduzindo-se o mercúrio para a forma de Hg<sup>0</sup>, o qual foi separado da fase líquida na câmara de separação líquido-gasosa (CS), e retirado pelo gás de arraste (argônio 0,3Lmin<sup>-1</sup>). Este vapor de analito foi direcionado para detecção através de uma membrana de Nafion® a fim de reduzir-se a umidade do vapor. A Figura 1 ilustra o diagrama de fluxo utilizado. A presença de cloridrato de hidroxilamina (Merck, Darmstadt) para neutralizar o excesso de KMnO<sub>4</sub> também foi avaliada. O mercúrio inorgânico foi determinado adicionando-se L-cisteína 0,5% (m/v) (Fluka, Buchs) à amostra, objetivando a formação de complexos sulfomercuriais com as espécies orgânicas de mercúrio, impedindo-as de serem reduzidas pela ação do SnCl<sub>2</sub> (Tao et al., 1999), o qual foi adicionado à amostra na concentração de 5,0% (m/v) em meio de HCl 10,0% (v/v) (Figura 1). As determinações de mercúrio foram realizadas através da Espectrometria de Fluorescência Atômica (AFS), utilizando-se o detector Merlin (PS Analytical Ltd. Kent, UK). Figura 1. Sistema de injeção em fluxo para determinação de mercúrio total e inorgânico em tecidos biológicos por Espectrometria de Fluorescência Atômica (AFS). A = Amostra; C = HCl 0,1%; R1 = KMnO<sub>4</sub> 0,25% ou L-cisteína 0,5%; R2 = SnCl<sub>2</sub> 5,0%; BP = Bomba peristáltica; IM = Injetor Manual; CS = câmara de separação líquido-gasosa; VA = 500 $\mu$ L; L1 = 40cm; L2 = 30cm, MN = membrana de Nafion®. Construiu-se 2 curvas de calibração analítica, 0 a 5,0  $\mu$ gL<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e 0 a 1,0  $\mu$ gL<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>. Para a validação do método empregado, realizou-se o teste de recuperação dos analitos, utilizando-se como material de referência certificado o DORM-2, constituído de tecido muscular liofilizado de peixe (dogfish), produzido pelo National Research Council of Canadá - NRCC, cuja concentração de mercúrio total é 4,64 ( $\pm$ 0,26) mgkg<sup>-1</sup> Hg e orgânico (metilmercúrio) é 4,47 ( $\pm$ 0,32) mgkg<sup>-1</sup> Hg.

## 4. Resultados

Neste experimento foram construídas 2 curvas de calibração, uma de metilmercúrio para determinação dos teores totais e a outra de Hg<sup>2+</sup> para determinação dos inorgânicos (Figura 2). O fato de ambos analitos se apresentarem em concentrações diferentes na amostra demandou esta condição. Figura 2. Curvas de calibração construídas com soluções padrão de metilmercúrio e Hg<sup>2+</sup>. A concentração de mercúrio total encontrada na amostra foi de 4,60 mgKg<sup>-1</sup> Hg, e a de inorgânico foi de 0,40 mg.kg<sup>-1</sup>Hg. A diferença entre a primeira e segunda revela a fração orgânica, 4,20 mg.kg<sup>-1</sup> Hg, correspondente ao metilmercúrio. Recuperações da ordem de 99% e 93,9% foram obtidas para a quantidade total e orgânica,

respectivamente, conforme exposto na Tabela 1. Tabela 1. Concentrações de mercúrio total e orgânico (metilmercúrio) (mgKg<sup>-1</sup> Hg) em tecido muscular de dogfish (DORM-2, NRCC) obtidos neste estudo e os valores certificados. Os experimentos indicaram que o reagente TMAH mostra-se efetivo na extração dos analitos a frio em banho ultrasônico a partir da concentração de 6,25% (v/v) para Hg total e 12,5% (v/v) para inorgânico. Verificou-se o papel fundamental do KMnO<sub>4</sub> adicionado em linha na oxidação da matéria orgânica presente na amostra, liberando os íons Hg<sup>2+</sup> na solução, conforme descrito por Guo e Baasner (1993). Este oxidante mostrou-se eficiente nas concentrações compreendidas entre 0,25 e 0,5% (m/v). Em concentrações inferiores a 0,25%, a decomposição não se mostra completa, oxidando parcialmente as espécies de mercúrio. Contudo, quando em excesso, KMnO<sub>4</sub> compromete o potencial redutor do SnCl<sub>2</sub>, reduzindo a formação de vapor frio (Hg<sup>0</sup>) e a intensidade do sinal. Verifica-se KMnO<sub>4</sub> em excesso através da coloração rósea no percurso analítico após confluência com SnCl<sub>2</sub>, ou seja, em L2 (Figura 1). Observou-se que cloridrato de hidroxilamina 1,0% (m/v) quando adicionado na solução de SnCl<sub>2</sub>, com o objetivo de reduzir o KMnO<sub>4</sub> em excesso, não aumentou a intensidade do sinal, indicando que o potencial redutor do SnCl<sub>2</sub> é suficiente para garantir a total redução dos analitos nestas condições de análise. Na determinação das frações inorgânicas, avaliou-se a intensidade do sinal utilizando-se L-cisteína 0,5 e 1,0% (m/v). Esta última proporcionou respostas mais efetivas, conforme estudos realizados por Tao et al. (1999). Para estas determinações, não houve a necessidade de diluir as amostras, pois o analito (Hg<sup>2+</sup>) encontrava-se em baixas concentrações (0,17 mgKg<sup>-1</sup> Hg). Além disso, a especiação química resultante da detecção das espécies inorgânicas é favorecida quando há matéria orgânica, já que as formas orgânicas podem estar presas a ela, impedindo-as de possível redução pelo SnCl<sub>2</sub>, caso a complexação pela L-cisteína não seja efetiva.

## 5. Considerações Finais

Para a extração completa dos analitos são necessárias concentrações de TMAH superiores a 15% (v/v). Para a determinação dos teores totais é fundamental a adição de KMnO<sub>4</sub> em linha para a oxidação da matéria orgânica. O papel da L-cisteína na formação de complexos com as espécies orgânicas é o ponto fundamental na especiação química, mostrando grande eficiência tanto como soluções-padrão (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e Hg<sup>2+</sup> equimolares), como para as demais amostras biológicas. As concentrações de SnCl<sub>2</sub> utilizadas foram suficientes para a redução dos analitos, mas devem ser estudadas com mais afinco, a fim de se reduzir suas concentrações. Este trabalho foi realizado com o apoio da FAPESP (00/14460-3) e do CNPq (110751/2005-1).

## Referências Bibliográficas

BARBOSA, F.; PALMER, C. D.; KRUG, F. J.; PARSONS, P. J. Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 1000-1005, 2004.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351, 2000.

CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÂMARA, C. Effect of Animal Feed Enriched with Se and Clays on Hg Bioaccumulation in Chickens: In Vivo Experimental Study. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2125-2132, 2005.

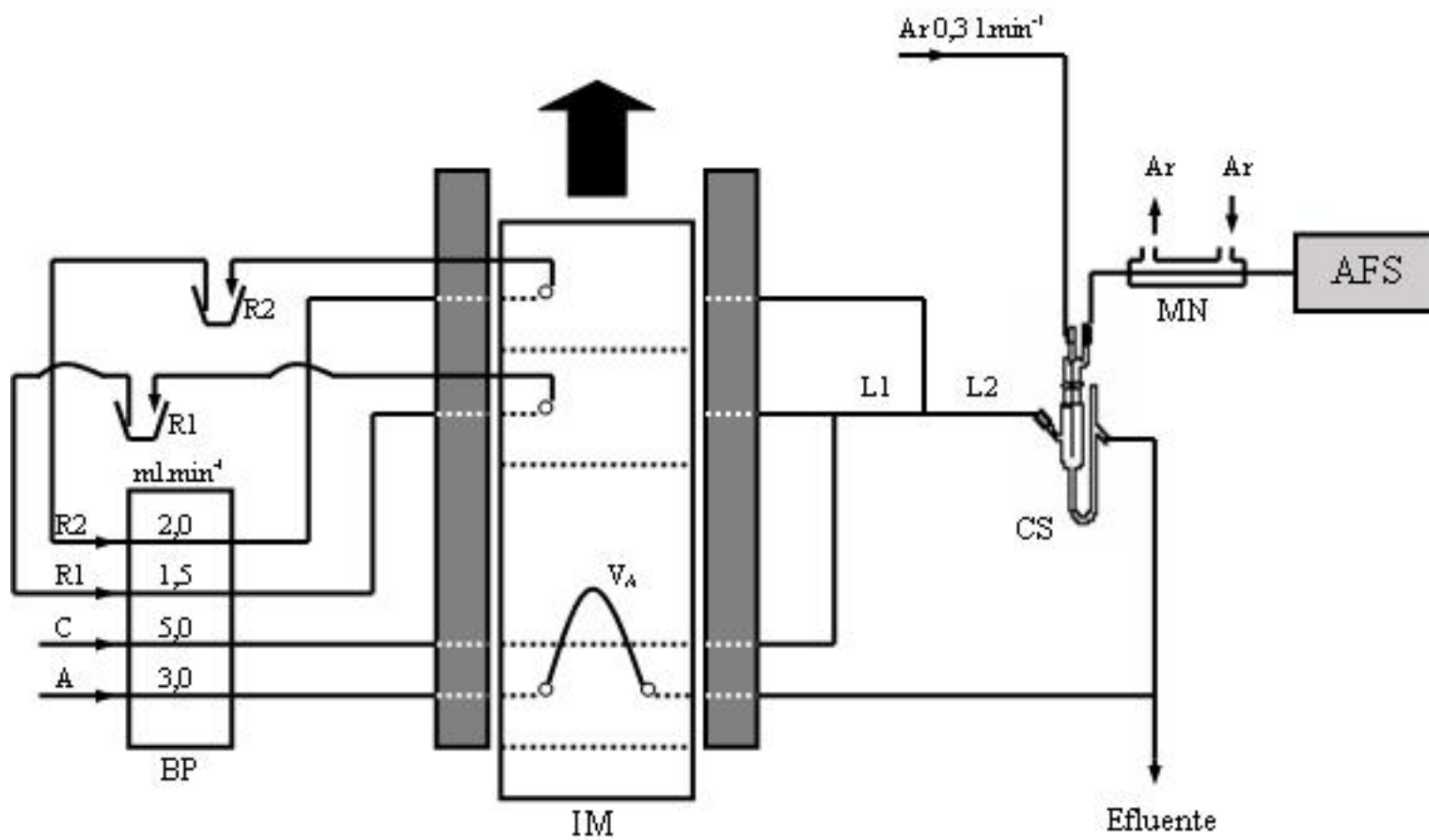
DOMI, N.; BOUQUEGNEAU, J. M.; DAS, K. Feeding ecology of five commercial shark species of the Celtic Sea through stable isotope and trace metal analysis. **Marine Environmental Research**, v. 60, p. 551-569, 2005.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.;

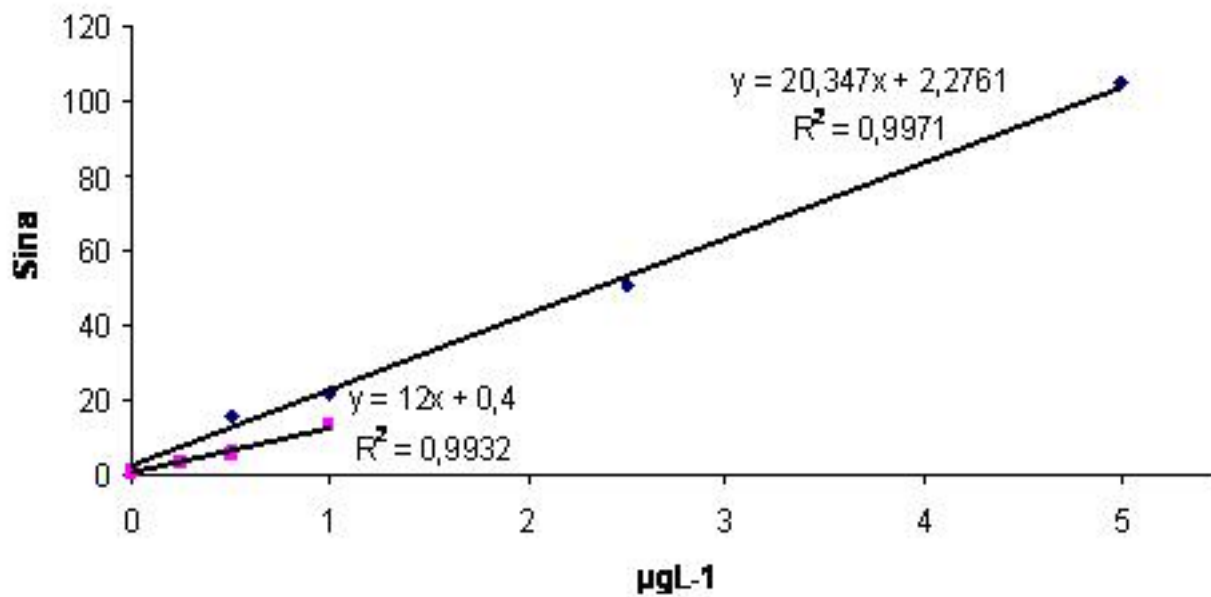
- SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P. J. Cognitive deficit in 7 year old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, n. 6, p. 417-428, 1997.
- GUO, T.; BAASNER, J. On-line microwave sample pretreatment for the determination of mercury in blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1927-1936, 1993.
- MAGOS, L. Selective Atomic-absorption Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Undigested Biological Samples. **Analyst**, v. 96, p. 847-853, 1971.
- MORITA, H.; TANAKA, S.; SHIMOMURA, S. Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 50, n. 1, p. 69-84, 1995.
- PUK, R.; WEBER, J. H. **Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. Applied Organometallic Chemistry**, v. 8, p. 293-302, 1994.
- SANTOS Jr, D.; KRUG, F. J.; PEREIRA, M. G.; KORN, M. Currents on ultrasound assisted extraction for sample preparation and spectroscopic analytes determination. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 3, p. 305-321, 2006.
- STORELLI, M. M.; GIACOMINELLI, S. R.; MARCOTRIGIANO, G. O. Total mercury and methylmercury in tuna fish and sharks from the south Adriatic Sea. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, n. 13, p. 101-106, 2001.
- TAO, G.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E. Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapor generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion. **The analyst**, v. 123, p. 1215-1218, 1998.
- TAO, G.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E. Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 1929-1931, 1999.
- TORRES, D. P.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J. Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 20, p. 289-294, 2005.

## Anexos

---



◆ Metilmercúrio ■ Hg<sup>2+</sup>



<b>Material de Referência Certificado</b>	<b>Hg total (ngKg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hg orgânico (metilmercúrio) (ngKg<sup>-1</sup>)</b>
<b>DORM-2</b>		
<i>Certificado</i>	4,64 ±0,26	4,47 ±0,32
<i>Obtido</i>	4,60 ±0,05	4,20 ±0,07
<i>Recuperação (%)</i>	99,13	93,95