

3

Métodos analíticos empregados na determinação de mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (MeHg) em amostras de peixes

A determinação dos baixos níveis de mercúrio encontrados em amostras ambientais e biológicas, geralmente na faixa de nanogramas por grama, impõe certas exigências na escolha do método empregado tais como: disponibilidade do equipamento, a complexidade do processamento das amostras, a reprodutibilidade dos resultados, a sensibilidade do aparelho e o limite de detecção do método empregado (WHO, 1989).

Os métodos empregados na determinação das concentrações de mercúrio e metilmercúrio em amostras biológicas sofrem certas interferências principalmente no que se refere à contaminação em laboratório, dos reagentes ou ainda perdas do analito durante o processo de abertura da amostra, por isso são necessários cuidados adicionais durante todo o procedimento analítico (Berman, 1979).

Os métodos analíticos mais utilizados na determinação de HgT são: métodos colorimétricos – fluorimétrico, espectrometria de absorção atômica por vapor frio (EAS-VF) e absorção atômica por ativação de nêutrons e para MeHg são: cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, espectrometria de absorção atômica por ativação de nêutrons, espectrometria de fluorescência atômica, espectrometria de massa acoplada com plasma e espectrometria de absorção molecular etc. (Sanz-Medel et al., 2002; Chan & Sadana et al., 1993; Berman, 1979).

Para se separar o MeHg do HgT em amostras ambientais e biológicas podem ser utilizadas técnicas baseadas na extração por solventes (Westöö, 1967), volatilização (Zelenko e Kosta, 1973), troca iônica (May et al., 1987), destilação

(Horvat et al., 1988) e decomposição alcalina (Bloom, 1989; Akagi e Nishimura, 1991).

A determinação do mercúrio pelo método colorimétrico com a formação do complexo de ditizonato de mercúrio em solução ácida foi utilizada como base na maioria dos métodos empregados nas décadas de 50 e 60. Kudsk (1964) e Smart et al. (1969) descreveram o procedimento para a dosagem de mercúrio total em amostras ambientais. Essas amostras sofreriam uma digestão úmida com posterior extração com ditizona, formando então, o complexo ditizonato de mercúrio, que possui cor alaranjada. Este método é extremamente susceptível à interferência de outros metais, principalmente cobre, que por ventura possam estar presentes na matriz. Além disso, este método é sensível aos raios ultravioletas que podem transformar a cor alaranjada em esverdeada muito rapidamente, indicando a quebra do complexo ditizonato de mercúrio (Berman, 1979).

Em condições ideais é possível se detectar através do método colorimétrico $0,05 \text{ ug.g}^{-1}$ de mercúrio na maioria dos produtos alimentícios e nos tecidos musculares. Porém, a diminuição da ação dos interferentes torna o método muito trabalhoso (Chilov, 1975).

A espectrofotometria de absorção atômica por vapor frio é atualmente a técnica mais utilizada para a determinação de HgT, pois possui vantagens tais como: simplicidade, rápida resposta analítica, boa sensibilidade e baixo custo de operação (WHO, 1976; Welz, 1985; Chan & Sadana, 1993).

O método mais utilizado foi desenvolvido em 1968 por Hatch e Ott sendo modificado por Uthe et al. (1970) e posteriormente por Burrows (1975). O procedimento consiste basicamente em uma mineralização oxidante (mineralização ácida úmida) seguida da redução do mercúrio ao seu estado elementar, empregando-se o cloreto estânico ou o borohidreto de sódio como agente redutor (Welz, 1985). O mercúrio na forma de vapor é então arrastado por meio de uma corrente de gás para dentro da célula de absorção. Este vapor de

mercúrio será então dosado por absorção atômica a 253,7 nm (Berman, 1979; Chan & Sadana, 1993). O limite de detecção é de aproximadamente de 1-5 ng de Hg (WHO, 1976). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na dosagem de mercúrio total em sedimentos, solos e amostras biológicas, e também em produtos alimentícios (WHO, 1976; Welz, 1985; Chan & Sadana, 1993).

Foi observado no decorrer deste estudo, que para a dosagem do mercúrio total presente no tecido muscular dos peixes, não foi necessário a utilização de reagentes ultra-puros. Os brancos obtidos empregando-se reagentes P.A. obtiveram valores médios em torno de 0,264 unidades de absorvância.

Atualmente, a técnica de pré-concentração por amalgamação tem sido muito utilizada associada à determinação do HgT, tanto em ouro, como em prata, permitindo a eliminação de diversos interferentes e minimizando o risco de contaminação. O mercúrio liberado após a amalgamação é determinado por espectrofotometria de absorção atômica sem chama. Este método é rápido, sensível, de simples execução e apresenta limite de detecção na faixa de 0,5 ng de mercúrio (Chilov, 1975; Burrows, 1975; WHO, 1976; Welz, 1985).

A determinação dos baixíssimos níveis de MeHg encontrados em amostras ambientais e biológicas, geralmente na faixa de ngg^{-1} , impõe exigências especiais no momento de seleção do método a ser empregado, tais como: disponibilidade do equipamento, tempo de operação, complexibilidade do processamento das amostras, reprodutibilidade e o limite de detecção (WHO, 1976 e 1990).

Inúmeros métodos analíticos são empregados na dosagem de MeHg, porém a cromatografia gasosa com detetor de captura de elétrons (CG-DCE) é a mais utilizada quando há necessidade de se medir seletivamente o MeHg (WHO, 1990). Há ainda, outros sistemas empregados para a detecção de MeHg tais como: cromatografia líquida de alta pressão (CLAP) seguida por detecção na espectrometria de absorção atômica pela técnica de vapor frio (EAS-VF) e a etilação em fase gasosa seguida de separação criogênica por cromatografia gasosa

(CG) e detecção através de espectrometria de fluorescência atômica pela técnica do vapor frio (EFA-VF) (Bloom, 1989; Horvat et al., 1997).

A cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa com grande área superficial denominada fase estacionária, e um líquido que percola através dela, denominada fase móvel. A afinidade da amostra por uma das fases determinará sua partição entre as fases móvel e estacionária e também o tempo de retenção na fase estacionária. (Harris, 1999).

Existem vários critérios de classificação para os diferentes métodos cromatográficos dependendo do enfoque de cada autor. O mais comum é aquele no qual é levada em consideração a superfície em que ocorre a separação: se dentro de um tubo (geralmente vidro ou metal) a técnica é denominada cromatografia de coluna (Lanças, 1993), e a coluna é considerada o principal componente do sistema cromatográfico uma vez que nela ocorrerá a separação.

As colunas de vidro são mais baratas, relativamente fáceis de serem preparadas e inertes à maioria dos compostos; sua maior limitação é a fragilidade. As colunas de metal, aço inoxidável, são amplamente utilizadas, principalmente na forma espiralada, o que permite uma grande extensão de compactação em um pequeno volume. Quanto ao seu diâmetro interno pode variar entre 2 ou 4 mm para as convencionais e menor ou igual 0,5 mm para as capilares (Kehrig, 1999).

As colunas podem ser recheadas ou tubulares abertas. Uma coluna recheada é preenchida com partículas contendo uma fase estacionária e, uma coluna tubular aberta é um capilar oco estreito com a fase estacionária cobrindo as paredes internas (Harris, 1999).

De acordo com a fase móvel utilizada a cromatografia em coluna (cromatografia de adsorção) poderá ser classificada em: cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Onde, em uma a fase móvel é um líquido, na outra esta mesma fase é um gás inerte.

Na cromatografia gasosa o gás inerte é chamado gás de arraste e este irá carrear as moléculas a serem separadas através da coluna. A fase estacionária é um sólido de grande área superficial, usualmente um adsorvente. A adsorção diferencial dos componentes na mistura a ser separada sobre a superfície sólida é a base para a separação cromatográfica. Os fatores mais importantes na eficiência de detecção de uma separação cromatográfica são: área do pico, tempo de retenção, eficiência de separação e resolução dos picos (Lanças, 1993; Harris, 1999).

A área do pico permite determinar a concentração de cada componente separado na coluna. O tempo de retenção é o tempo medido desde o momento da injeção da amostra até que ela alcance o detector. Este tempo é característico do soluto, da fase móvel, da fase líquida, do fluxo do gás de arraste e da temperatura da coluna. A eficiência da coluna será determinada em função da distribuição de cada componente durante a corrida cromatográfica. Quanto maior for o tempo para eluição de um pico, mais largo ele será e conseqüentemente menos eficiente será a separação. Assim, picos estreitos demonstram maior eficiência de separação e, portanto maior facilidade de quantificação das espécies eluídas. Logo, a eficiência da coluna é altamente dependente da escolha apropriada da velocidade do gás de arraste. Já a resolução, é uma medida quantitativa da separação entre dois picos consecutivos (Harris, 1999; Kehrig, 1999).

Após a separação dos componentes de uma mistura na coluna cromatográfica, eles deverão ser detectados na saída desta coluna, onde podem ser identificados e medidos. Este detector pode ser sensível à concentração (apresenta resposta proporcional à concentração de um componente da amostra na fase móvel) ou à massa do analito (apresenta resposta proporcional à quantidade do componente que chega ao detector por unidade de tempo). Um bom detector deve apresentar as seguintes características:

- Alta sensibilidade – gerar um elevado sinal elétrico para uma concentração de analito baixa.

- Baixo nível de ruído – detectar amostras com baixas concentrações.
- Ampla faixa de linearidade – sinal produzido pelo detector deve ser proporcional à concentração da amostra (Kehrig, 1999).

O detector por captura de elétrons é especialmente sensível a moléculas que contêm halogênios, carbonilas conjugadas, nitrilas, nitrocompostos e compostos organometálicos, mas é relativamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas. O gás que entra no detector é ionizado por elétrons de alta energia (“partículas beta”) emitidos de uma lâmina contendo ^{63}Ni radioativo. Os elétrons assim formados são atraídos para o anodo, produzindo uma pequena corrente estável. Quando as moléculas do constituinte com alta afinidade por elétrons entram no detector, este captura alguns elétrons. O detector responde variando a frequência de pulsos entre o anodo e o catodo para manter uma corrente constante (Harris, 1999).

Antes mesmo da injeção da amostra no cromatógrafo ela sofre processo de extração que tem como objetivo separar o composto em estudo dos possíveis interferentes presentes na matriz. No caso da extração do metilmercúrio normalmente utiliza-se a ditizona.

A ditizona (difeniltiocarbazona) é um composto verde; solúvel em solventes orgânicos apolares como, por exemplo, benzeno, tolueno e tetracloreto de carbono e é insolúvel em água abaixo do pH 7. Ela forma complexos vermelhos hidrófobos com a maioria dos íons metálicos di- e trivalentes (Harris, 1999).

Para se empregar a solução de ditizona é necessário purificá-la a fim de eliminar seu produto de oxidação, difeniltiocarbadiazona. A purificação é realizada através da extração de uma solução concentrada de ditizona com uma solução diluída de hidróxido de sódio; na qual as impurezas são extraídas. Acidificando-se esta solução alcalina, a ditizona precipita na forma de finos cristais que são reextraídos com solvente orgânico (Kehrig, 1999).

