4
Materiais e Métodos

4.1.
Descontaminação do material

Todo o material empregado, no preparo e na análise da amostra, sofreu descontaminação para assegurar que não havia mercúrio retido em suas paredes. Primeiro, o material foi lavado com detergente e água, a seguir foi colocado de molho em uma solução de extran 10 % por no mínimo 48 horas. Decorrido este período, o material foi lavado com água deionizada e deixado de molho por 24 horas em uma solução de HNO_3 15 %.

4.2.
Metodologia de preparo e coleta das amostras

Em setembro de 2003 (final do outono e início da primavera) foram obtidos na colônia de pesca da Praia de Mauá, município de Magé, no estuário da Baía de Guanabara 15 indivíduos de *Micropogonias furnieri* - corvina (peixe carnívoro), 14 indivíduos de *Bagre spp.* - bagre (peixe onívoro), e 15 indivíduos de *Mugil liza* - tainha (peixe planctívoro) a fim de que fossem determinadas a concentração de HgT e MeHg no tecido muscular, no fígado e na gônada de cada indivíduo. Essas amostras foram coletadas no final do inverno de acordo com as normas estabelecidas pela FAO (1983), para que desta maneira fosse possível aplicar um tratamento estatístico aos resultados.

Após a coleta, os peixes foram pesados e medidos e as idades das tainhas e corvinas determinadas com auxílio da curva de crescimento.

A metodologia de coleta e preparo da amostra é esquematizada na Figura 6.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

O peixe foi colocado em uma placa de vidro com sua cabeça voltada para a esquerda e sua nadadeira caudal para a direita. A seguir retirou-se a pele que fica acima da linha lateral com auxílio de um bisturi de aço inoxidável. Posteriormente, foram retirados cerca de 10 g do músculo dorso-lateral esquerdo e guardado em saquinho de plástico sob refrigeração. O peixe foi aberto e dele foi retirado o fígado e a gônada que também foram colocados em saquinhos plásticos e guardados sob refrigeração. Desta amostra assim preparada foram pesadas as quantidades necessárias para a determinação de HgT e MeHg.

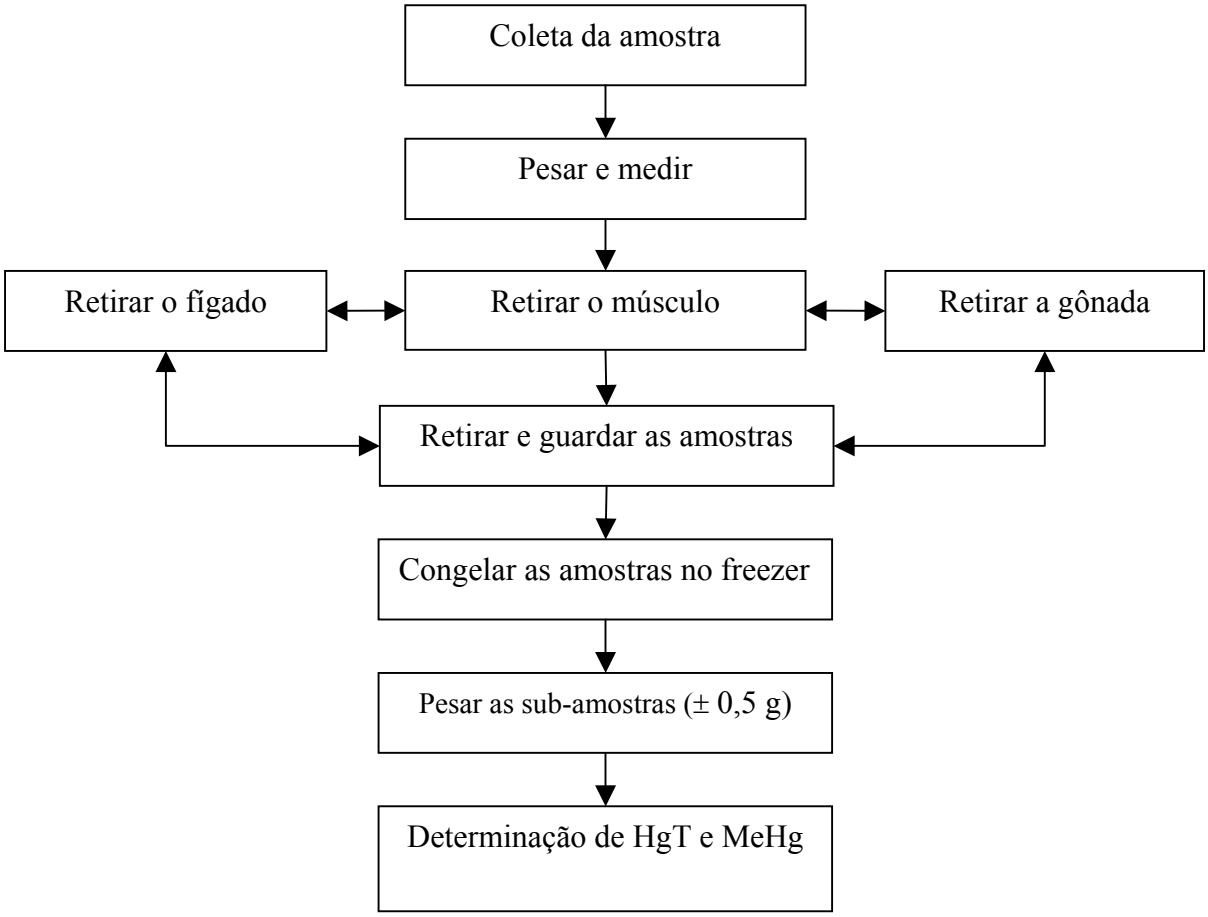

Figura 6: Metodologia de preparo da amostra

4.3. Preparação dos padrões de calibração

Foram preparadas soluções estoque dos padrões de MeHgCl (100 $\mu g.ml^{-1}$), e $HgCl_2$ (1000 $\mu g.ml^{-1}$). E a partir destas soluções foram feitas, por diluição, as

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

soluções que foram empregadas para se construir as curvas analíticas de calibração dos aparelhos que determinam o metilmercúrio ($MeHg^{+}$) e mercúrio total (THg) nas amostras.

4.3.1.
Estudo da precisão e exatidão para determinação de mercúrio total (HgT)

A partir da solução padrão de $HgCl_2$ (1000 $\mu g.ml^{-1}$) foram preparadas as seguintes diluições: 10 $\mu g.ml^{-1}$, 20 $\mu g.ml^{-1}$ e 30 $\mu g.ml^{-1}$ (n = 3). Com base nesses resultados foi construída a curva de calibração do aparelho (Figura 7).

A leitura do valor de absorvância, é feito em altura de pico, no modo pico máximo do aparelho. O espectrofotômetro empregado foi um EAA Varian modelo 1475 munido de dispositivo para determinar o elemento em estudo por absorção atômica sem chama, através da geração de vapor frio (Varian VGA–76). Os parâmetros instrumentais utilizados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Principais parâmetros instrumentais utilizados na determinação de HgT

Comprimento de onda	253,7
Abertura de fenda	0,5 nm
Corrente da lâmpada	4 mA
Fluxo de ar	1 $Lmin^{-1}$
Tempo de agitação	60 s
Volume da amostra	20 mL
Registro do sinal	Digital em pico máximo

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

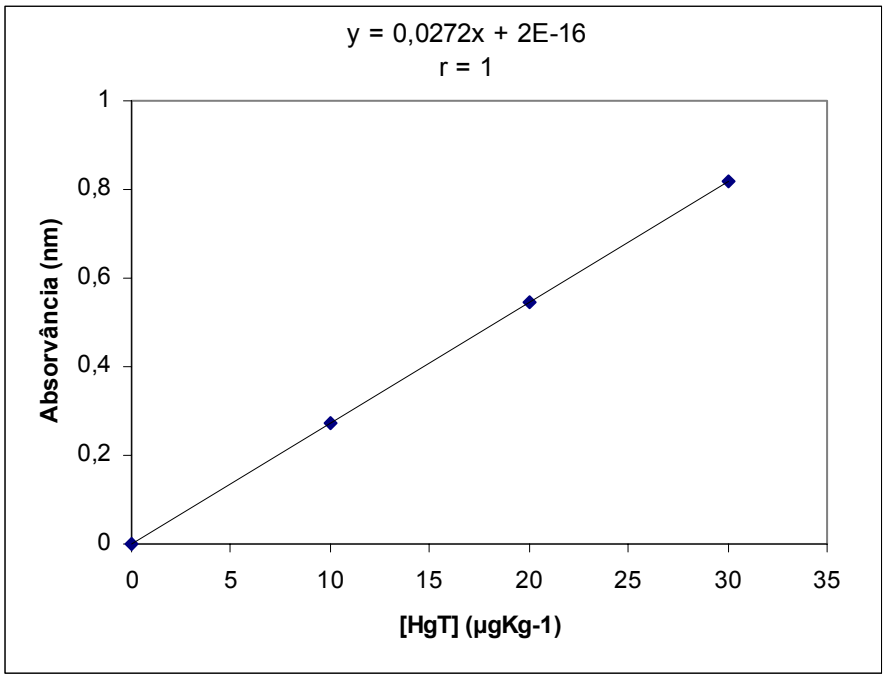

Figura 7: Curva analítica de HgT

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

4.3.2. Estudo da precisão e exatidão para análise de MeHg

A partir da solução padrão de MeHgCl (100 µg.ml^{-1}) em tolueno foram preparadas as seguintes diluições (com tolueno): 0,1µg.ml^{-1} a 1 µg.ml^{-1}. Com base nesses resultados foi construída a curva analítica de calibração do cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons. A curva analítica de calibração do cromatógrafo e a verificação da faixa de linearidade do detector foram checadas mediante injeções, em triplicata, de 10 µL das soluções padrões. A diferença entre as áreas ou entre as alturas dos picos em diferentes injeções de MeHgCl deve ser < 4% (Hight e Capar, 1983). Na Figura 8 encontra-se o cromatograma com o pico característico do MeHg.

Figura 8: Pico característico do MeHg (*corresponde ao tempo de retenção: 2,94 min.)

Para determinar o MeHg das amostras, utilizou-se um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu modelo GC-14B, equipado com detetor de captura de elétrons e coluna de vidro empacotada Sciences Japan (Fase líquida: Hg-20, e Suporte Uniport Hp – 60/80 Mesh, Gl Sciences – Japan) com diâmetro interno de 3 mm e comprimento de 100 cm. Na ponta da coluna, no lado da injeção da amostra adicionou-se 0,2 g de cristais de cloreto de sódio (NaCl), previamente aquecidos a 400 °C para descontaminação. O gás de arraste e de "make-up" empregado foi o nitrogênio ultra puro (99,999%) ou 5.0. Na Tabela 6 encontram-se outras informações instrumentais e operacionais.

Tabela 6: Principais parâmetros instrumentais utilizados na determinação do MeHg

Fluxo total do gás de arraste N_2	40 $mL.min^{-1}$
Fluxo do gás do make up N_2	2 $mL.min^{-1}$
Temperatura da coluna	155 °C
Temperatura do injetor	180 °C
Temperatura do detetor (DCE)	250 °C
Corrente	2 mA

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

4.3.3.
Análise estatística dos dados

Foi utilizado o pacote estatístico Statistica 5.0, para Windows, para análise dos dados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste W (Shapiro-Wile). Como os dados apresentaram uma distribuição não-normal, foram então, utilizados testes não paramétricos. Aplicou-se o teste de correlação de Spearman (R) para verificação da existência de correlação entre as variáveis comprimento total e peso, em relação a concentração de mercúrio total e de metilmercúrio. Através do teste de Kruskal-Wallis (ANOVA) foi avaliada a significância das diferenças entre as concentrações determinadas para os tecidos e órgãos dos organismos, bem como entre os níveis tróficos e as espécies. O teste Mann-Whitney foi utilizado para se comparar as concentrações estudadas com alguns parâmetros bióticos dos organismos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

4.4.
Métodos analíticos empregados

4.4.1.
Determinação de mercúrio total (HgT)

Alíquotas de aproximadamente 0,5 g de músculo e fígado e 0,8 g de gônada (p.u.) foram retiradas com o auxílio de um bisturi com lâmina de aço inoxidável, pesadas em balança analítica (AB204-Mettler) de precisão igual a 0,1 mg e transferidas para tubos de ensaio para posterior digestão ácida. As amostras em triplicatas juntamente com os brancos dos reagentes e o material de referência foram colocadas em banho de gelo, adicionados 1,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 3,0 mL de mistura sulfonítrica ($H_2SO_4 + HNO_3$) 1:1 v/v. Este tratamento, digestão ácida, favorece a total quebra das ligações químicas das moléculas da matriz, liberando o mercúrio para a solução. Em seguida as amostras foram levadas ao banho-maria a 60ºC até sua total solubilização, aproximadamente 1 h, e então resfriadas em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 5,0 mL de permanganato de potássio ($KMnO_4$) 6 % à solução digerida, e esta foi retornada ao aquecimento

em banho-maria a 60ºC por mais 15 min para garantir que todo o mercúrio estivesse em seu estado superior de oxidação (Hg^{2+}). Decorrido este período as amostras foram deixadas em repouso durante a noite. No dia seguinte, o meio que se encontrava fortemente oxidante foi neutralizado com 1 mL de cloridrato de hidroxilamina ($HONH_3$ + NaCl) 12% e o volume aferido a 25 mL com água Milli-Q, realizando-se a leitura logo em seguida (modificado de Malm et al., 1989). As leituras foram realizadas através de espectrofotometria de absorção atômica com gerador de vapor frio (AAS um AA 1475 Varian VGA –76). Na figura 9 está representado o fluxograma deste método analítico.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

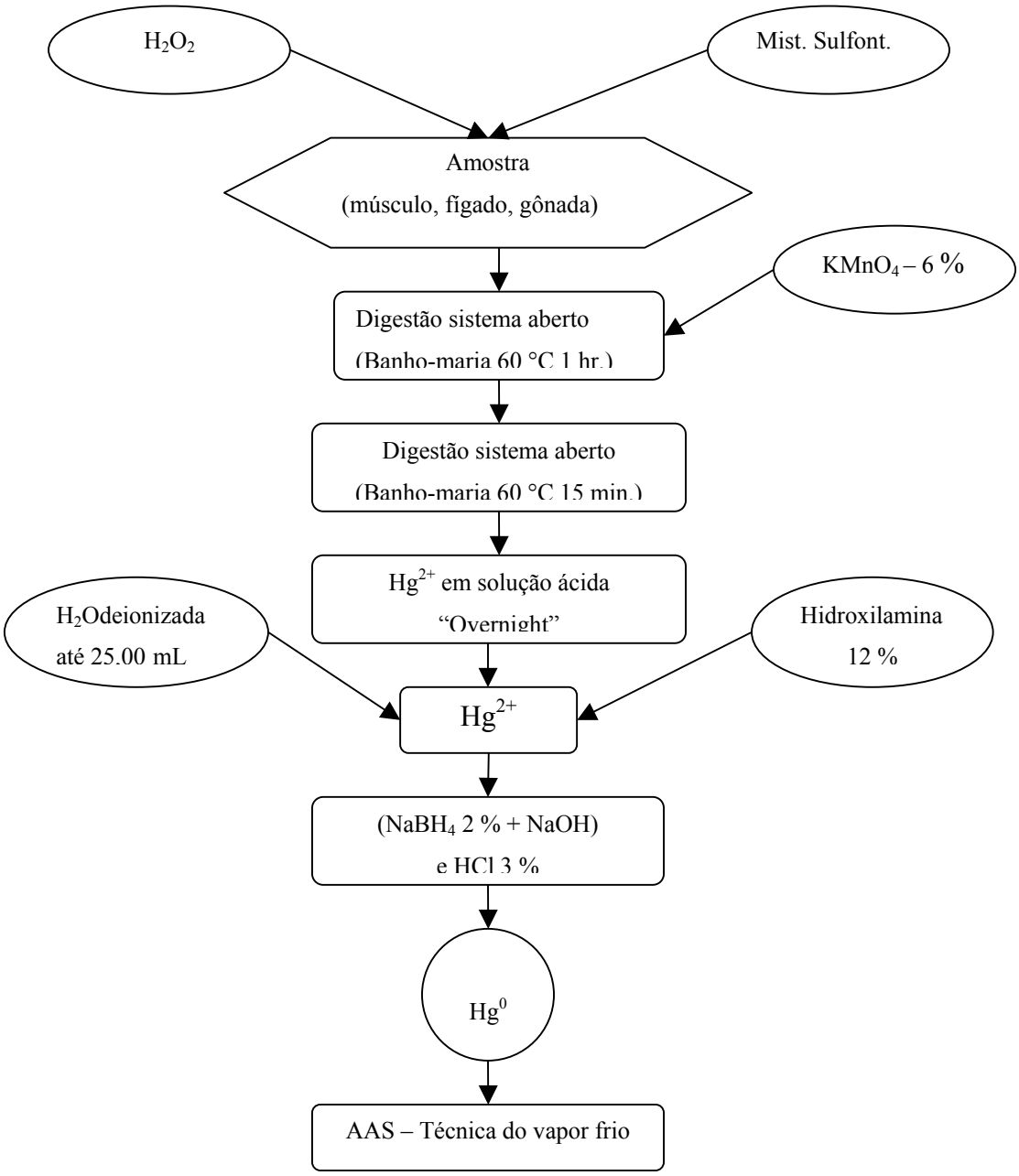

Figura 9: Fluxograma de determinação da amostra e determinação do HgT

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

4.4.2.
Cálculo das concentrações de HgT

Os cálculos das concentrações finais de HgT, em μgKg^{-1}, no tecido muscular e nos órgãos das espécies estudadas, foram feitos, levando-se em consideração o peso úmido da semi-amostra do organismo, a média de no mínimo três leituras de absorvância, o valor da leitura da absorvância do branco e um fator de correção proveniente da curva analítica (coeficiente angular). Sendo assim, o cálculo da concentração de HgT é:

$$[HgT] = \frac{(C_{amostra} - C_{branco}) \times V_{final}}{m_{amostra}}$$

onde:

$C_{amostra}$ = Concentração média das amostras

C_{branco} = Concentração média do branco

V_{final} = 25,00 mL

$m_{amostra}$ = massa da amostra

4.4.3.
Determinação de metilmercúrio (MeHg)

O método utilizado na determinação do MeHg foi desenvolvido por Akagi e Nishimura (1991) no National Institute for Minamata Desease (NIMD) e adaptado pela Dra. Helena do Amaral Kehrig no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca (LREPF). É um método complexo porém, com alta sensibilidade, e se baseia em uma combinação de extrações com solventes e compostos orgânicos.

A extração do MeHg da amostra (aproximadamente 0,5 g no músculo e fígado e 0,8 g na gônada peso úmido), foi submetida a uma digestão a 100 °C por cerca de 40 min., em sistema fechado, com 10,0 mL de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) 1 N. O extrato, após resfriamento a temperatura ambiente, foi acidificado com 10,0 mL de ácido clorídrico (HCl) 1 N e lavado com 5,0 mL de n-hexano. Após a remoção da camada orgânica, o MeHg foi extraído com 10,0 mL de uma solução purificada de ditizona-tolueno 0,05 %. A solução de ditizona foi purificada com igual volume de hidróxido de sódio

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

(NaOH) 0,1 N pouco antes de ser utilizada. O excesso de ditizona da solução de ditizonato de metilmercúrio-tolueno foi retirado com auxílio de duas lavagens consecutivas com 5,0 mL de NaOH 0,1 N. Desta solução foram retirados 4,0 mL que foram purificados com 2,0 mL de uma solução 0,01 % de sulfeto de sódio (Na_2S) em NaOH 0,1 N – Etanol (1:1). O excesso de íons sulfeto da solução que contém o MeHg, foram removidos através de borbulhamento (50 $mL.min.^{-1}$) durante 5 min. com N_2 e algumas gotas de HCl 1 N. Adicionou-se, então, 2,0 mL de solução tampão Walpole (pH 3) e reextraiu-se o MeHg da camada inorgânica com 1,0 mL de ditizona-tolueno 0,05 % purificada. O excesso de ditizona da solução de ditizonato de metilmercúrio-tolueno foi retirado com auxílio de duas lavagens consecutivas com 5,0 mL de NaOH 0,1 N e uma outra lavagem com água purificada. O extrato de ditizonato de metilmercúrio-tolueno foi submetido ao CG-DCE, onde o MeHg foi identificado e quantificado.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

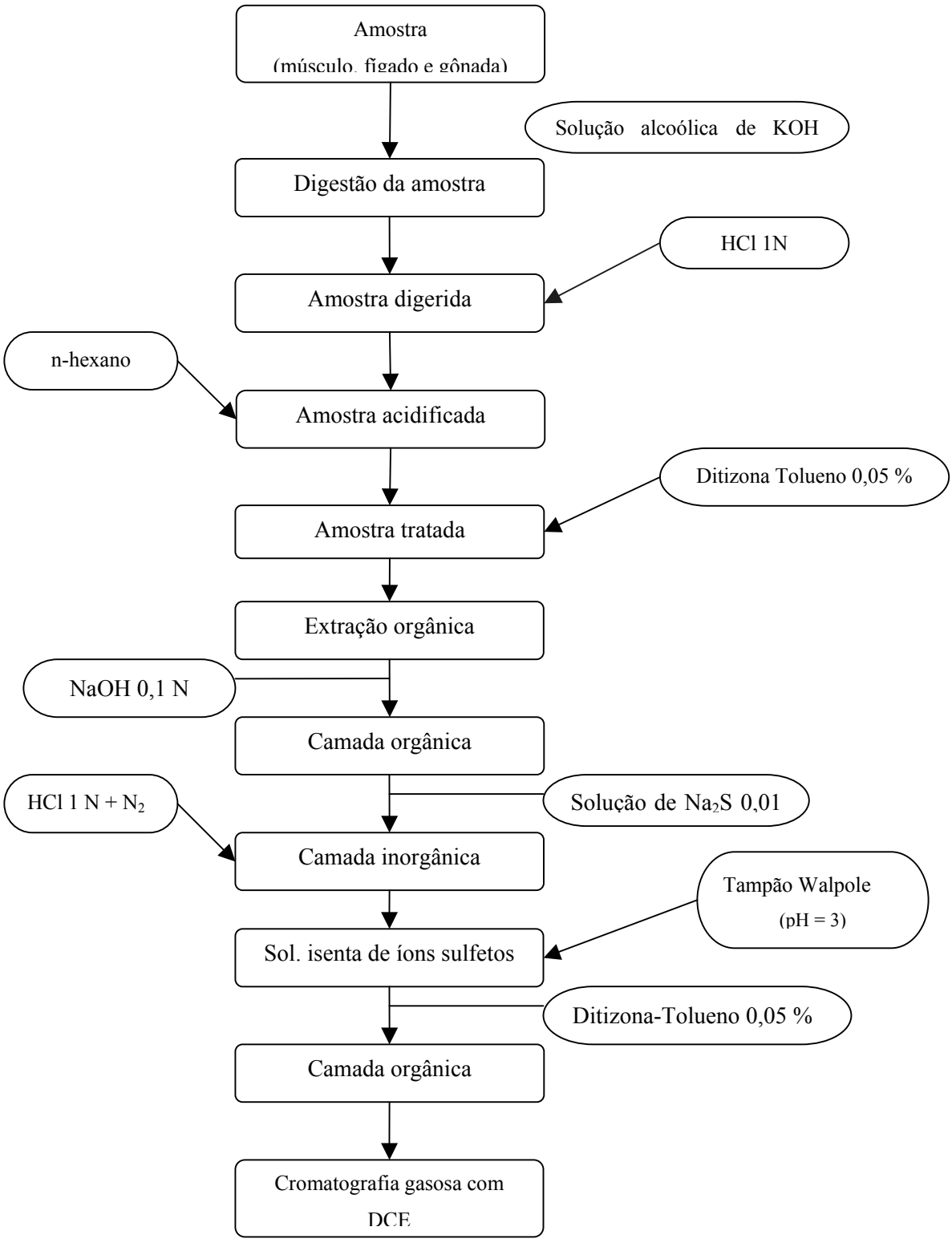

Figura 10: Fluxograma da digestão e determinação de HgT

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA

4.4.4.
Cálculo da concentração de MeHg

O cálculo das concentrações finais de MeHg bem como, a razão de metilmercúrio em relação ao mercúrio total (% MeHg), em $\mu g g^{-1}$, no tecido muscular e nos órgãos dos peixes, foram feitos, levando-se em consideração o peso úmido da amostra (músculo, fígado e gônada) do organismo. Assim os cálculos para a concentração de MeHg e % MeHg são:

$$[MeHg] = \frac{(C_{amostra} \times V_{inicial} \times A) \times V_{final}}{(a \times m_{amostra} \times V_{extração})}$$

onde:

$C_{amostra}$ = Concentração média da amostra

$V_{inicial}$ = 10,00 mL

A = área do pico do padrão

a = área do pico da amostra

$m_{amostra}$ = massa da amostra

$V_{extração}$ = 4,00 mL

V_{final} = 1,00 mL

$$\% \text{ MeHg} = \frac{[MeHg] \times 100}{[HgT]}$$

onde:

[MeHg] = Concentração de metilmercúrio

[HgT] = Concentração de mercúrio total

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220296/CA