



UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO
EM PEIXES APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO**

Lucas Schmidt

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2011

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO EM PEIXES APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO

por

Lucas Schmidt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria
(RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em
Química**

Santa Maria, RS, Brasil

2011

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO EM PEIXES
APÓS DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO**

Elaborada por

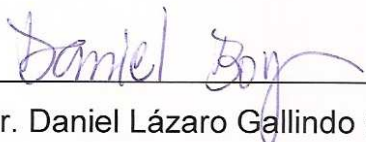
Lucas Schmidt

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM-RS)



Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges (UFSC-SC)



Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler (UFSM-RS)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, pela oportunidade, orientação, amizade, incentivo constante para meu crescimento pessoal e pelo exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges pelas importantes sugestões e contribuições como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, pela amizade, ensinamentos e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Juliano S. Barin, co-orientador, e Prof. Dr. José Neri Gottfried Paniz e Prof. Dr. Edson Irineu Müller pela amizade, incentivo e contribuição para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental da UFSM, pelo convívio, amizade e troca de idéias sobre os assuntos mais diversos que contribuíram para o meu crescimento pessoal. Agradeço em especial aos amigos Cezar A. Bizzi, Fábio A. Duarte e Clarissa M. Moreira pelas constantes sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, pelo sempre dedicado auxílio.

Ao amigo Prof. Dr. Eduardo M. Ethur e Dra. Miriam I. Marchi, pela amizade e incentivo durante a minha iniciação científica na UNIVATES.

Ao amigo André L. Eckert pela amizade de longa data e apoio oferecido desde a minha chegada em Santa Maria.

E, finalmente, agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, Celestino e Fátima e minha irmã Kelly, pelo exemplo de honestidade e caráter.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Mercúrio - Aspectos Gerais	4
2.1.1 Espécies inorgânicas de Hg	4
2.1.2 Espécies orgânicas de Hg.....	4
2.2 Toxicidade	5
2.3 Transporte e ciclo biogeoquímico do Hg	8
2.3.1 Transformações e estabilidade das espécies de Hg	10
2.3.2 Hg em peixes	12
2.4 Análise de especiação de Hg	13
2.4.1 Armazenamento e preservação da amostra.....	14
2.4.2 Técnicas para a determinação de espécies de Hg.....	16
2.5 Determinação de espécies de Hg por LC-CVG-ICP-MS	17
2.5.1 Geração química de vapor de Hg.....	19
2.5.2 Métodos de extração	20
2.6 Biodisponibilidade de espécies elementares em alimentos.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Instrumentação.....	28
3.2 Materiais diversos	30
3.3 Reagentes	31

3.4	Otimização das condições de operação do sistema LC-CVG-ICP-MS.....	32
3.5	Amostra.....	33
3.6	Tratamento preliminar da amostra para os processos de cocção	34
3.7	Caracterização da amostra	34
3.8	Processo de cocção	34
3.8.1	Critérios para a seleção da massa, volume, ingredientes e recipientes.....	34
3.8.2	Cozimento	35
3.8.3	Fritura	36
3.8.4	Assagem	37
3.8.5	Preparo do peixe cru	37
3.9	Tratamento preliminar – Secagem e moagem	38
3.10	Decomposição da amostra para determinação de Hg total.....	39
3.10.1	Determinação do teor de carbono residual remanescente na solução do extrato da amostra após decomposição	40
3.11	Otimização do método de extração	40
3.12	Avaliação da eficiência do método de extração	41
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42
4.1	Otimização do sistema LC-CVG-ICP-MS	43
4.1.1	Ajuste do instrumento de ICP-MS	43
4.1.2	Ajuste dos parâmetros da separação cromatográfica – LC.....	43
4.2	Otimização da etapa de extração.....	47
4.2.1	Escolha da concentração da solução extratora.....	47
4.2.2	Avaliação do tempo de extração	48
4.2.3	Efeito da massa de amostra na eficiência de extração das espécies de Hg.....	49
4.2.4	Ensaio de recuperação de analito	51

4.3	Parâmetros de mérito do método de especiação de Hg empregado	.52
4.4	Otimização dos processos de cocção	52
4.5	Caracterização das amostras de peixes – macro e micronutrientes	..55
4.6	Determinação de Hg total em peixes57
4.7	Avaliação do comportamento das espécies de Hg em peixes após diferentes processos de cocção61
4.8	Considerações finais – benefícios e riscos no consumo de peixes67
5	CONCLUSÕES70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS71

LISTA DE FIGURAS

-
- Figura 1. Imagem digital do efeito da exposição de Hg em células nervosas de *Lymnaea*. (a) antes; (b) durante; e (c) e (d) depois da exposição ao Hg (figura adaptada de Leong, C.C. W.²²). 7
- Figura 2. Estrutura química do composto (a) D-penicilamina e (b) 2,3-dimercaptopropanol.³³ 8
- Figura 3. Ciclo do Hg no meio ambiente.⁶ 9
- Figura 4. Esquema geral de um instrumento de ICP-MS, destacando as principais partes deste (adaptado de PerkinElmer⁸⁰). 18
- Figura 5. Esquema do sistema LC-CVG-ICP-MS (adaptado de Moreira, C.¹⁰⁸). R₁. Solução acidificante (HCl 1 mol L⁻¹), R₂. Solução redutora [NaBH₄ 0,2% (m/v)]; D. Descarte; 1. Fase móvel (L-cisteína 0,1% (m/v)); 2. Desgaseificador a vácuo; 3. Bomba cromatográfica; 4. Injetor e alça de amostragem (200 µL); 5. Pré-coluna C18 (4 × 3 mm); 6. Coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), 7. Bomba peristáltica; 8. Confluência; 9. Separador gás-líquido; 10. Tocha e plasma; 11. Espectrômetro de massa..... 28
- Figura 6. Esquema do sistema FI-CVG-ICP-MS (adaptado de Moreira, C.¹⁰⁸). A. Amostra; C. Carregador da amostra (H₂O); R₁. Solução acidificante (HCl 1 mol L⁻¹), R₂. Solução redutora [NaBH₄ 0,2% (m/v)]; L. Alça de amostragem (100 µL); D. Descarte; a. 10 cm; b. 40 cm; 1. Bomba peristáltica; 2. Injetor-comutador; 3. Confluência; 4. Separador gás-líquido; 5. Tocha e plasma; 6. Espectrômetro de massa..... 30
- Figura 7. Representação da morfologia externa das espécies de peixes utilizadas para a avaliação do comportamento das espécies de Hg frente a diferentes métodos de cocção. (a) Abrótea (*Brotula barbata*); (b) Salmão (*Salmo salar*); (c) Linguado (*Paralichthys patagonicus*); (d) Atum (*Thunnus albacares*); (e) Cabrinha (*Prionotus punctatus*) e (f) Pirarucu (*Arapaima gigas*).¹⁰⁹ 33
- Figura 8. (a) Sistema utilizado para o processo de cozimento; (b) Sistema utilizado para o processo de fritura. 36

Figura 9.	Sistema utilizado para o processo de assagem das amostras. Esquerda: forno estufa; Direita: assadeira de vidro provida com grelha de vidro e amostra.....	37
Figura 10.	Fluxograma das etapas envolvidas nos processos de cocção, tratamento preliminar, preparo e análise da amostra.	38
Figura 11.	Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , na concentração de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) de cada espécie.....	44
Figura 12.	Representação estrutural da molécula de cisteína complexada com ambas as espécies de Hg. a) $\text{Hg}(\text{Cys})_2$; b) $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$. ³³	44
Figura 13.	Influência da vazão da fase móvel (L-cisteína 0,1% m/v) na separação das espécies de Hg com a coluna C18. Cromatogramas de uma amostra de peixe tainha (<i>Mugil brasiliensis</i>) enriquecida com 15 ng g^{-1} (como Hg) de ambas as espécies de Hg.....	46
Figura 14.	Recuperação de Hg total na fase sobrenadante do extrato em diferentes concentrações do extrator (L-cisteína).	48
Figura 15.	Influência do tempo de repouso sobre a eficiência de extração das espécies de Hg.....	48
Figura 16.	Eficiência de extração de Hg em diferentes faixas de massas de amostra (n = 2).....	50
Figura 17.	Aspecto do extrato antes e após a etapa de extração das espécies de Hg em amostra liofilizada de peixe.....	51
Figura 18.	Amostra de linguado (CRU) crua; e após os processos de: (C) cozimento; (F) fritura; e (A) assagem.	54
Figura 19.	Eficiência de extração e concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos culinários (n = 2).....	62
Figura 20.	Estrutura de proteínas desnaturadas e hidrolisadas (adaptado de Hill <i>et al.</i> ¹³⁹).	66
Figura 21.	Relação da proporção dos teores de Se e Hg presentes nas amostras de peixes <i>in natura</i> (n = 3).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições recomendadas para a preservação e armazenamento de soluções contendo espécies de Hg (adaptado de Parker ⁶²).	15
Tabela 2.	Condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS.....	29
Tabela 3.	Resultados do ensaio de recuperação de analito nas amostras de peixes (CRU1).....	51
Tabela 4.	Absorção e perda de gordura nas amostras de peixes após o processo de fritura e assagem, respectivamente.....	54
Tabela 5.	Composição centesimal presentes nas amostras de músculo de peixe <i>in natura</i> (n = 3).	55
Tabela 6.	Concentrações de metais e não-metais presentes nas amostras liofilizadas de músculo de peixe <i>in natura</i> (n = 3).....	56
Tabela 7.	Balanço de massas de Hg total nas amostras de peixes após os tratamentos culinários (concentração de Hg remanescente no tecido de peixe após os diferentes tratamentos e concentração de Hg transferido para a água de cozimento, óleo de fritura e gordura extraída durante a assagem.....	58
Tabela 8.	Teor de carbono residual remanescente na solução do extrato das amostras liofilizadas de peixes <i>in natura</i> após a decomposição por micro-ondas (n = 3).	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês, *atomic fluorescence spectrometry*.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CRM, material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*.

CVG, geração de vapor químico, do inglês, *chemical vapor generation*.

CVG-AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor químico, do inglês, *chemical vapor generation atomic absorption spectrometry*.

CVG-AFS, espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor químico, do inglês, *chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry*.

EPA, Agência de Proteção Ambiental, do inglês, *Environmental Protection Agency*.

FDA, Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês, *Food and Drug Administration*.

G/L, separador gás/líquido.

GC, cromatografia a gás, do inglês, *gas chromatography*.

GF-AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *graphite furnace atomic absorption spectrometry*.

ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*.

ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively plasma optical emission spectrometry*.

ID, diluição isotópica, do inglês, *isotopic dilution*.

ips, impactos por segundo.

IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

LC, cromatografia a líquido, do inglês, *liquid chromatography*.

LD, limite de detecção.

LQ, limite de quantificação.

m/z, razão massa/carga.

MW, radiação micro-ondas, do inglês, *microwave radiation*.

PEEK, poli(éter éter cetona), do inglês, *polyetheretherketone*.

PTFE, politetrafluoretileno, do inglês, *polytetrafluoroethylene*.

RSD, desvio padrão relativo, do inglês, *relative standard deviation*.

SPE, extração em fase sólida, do inglês, *solid phase extraction*.

US, ultrassom, do inglês, *ultrasound*.

v/v, volume/volume.

WHO, Organização Mundial de Saúde, do inglês, *World Health Organization*.

ΔT , diferença de temperatura.

RESUMO

A maioria dos estudos avaliando as espécies de Hg em peixes tem sido feita com peixes *in natura* e as poucas pesquisas envolvendo a avaliação de Hg em peixes após algum processo de cocção, envolvem somente a determinação total de Hg e não apresentam conclusões claras sobre o comportamento dessas espécies de Hg. Considerando as temperaturas relativamente altas, geralmente usadas para o preparo de peixes e as características voláteis de algumas espécies de Hg, este trabalho objetivou avaliar o comportamento das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ após diferentes tratamentos culinários em seis diferentes espécies de peixes. Avaliaram-se três diferentes processos de cocção (cozimento, fritura e assagem), além da amostra crua. Além disso, foi avaliada a influência de três diferentes condições para cada tratamento (adição de sal, adição de sal e limão, e sem adição de condimentos). Todos os componentes envolvidos, como sal, limão, óleo e água usados durante os processos de cocção foram coletados para avaliar possíveis interconversões ou perdas de Hg total (balanço de massa para cada processo). Após cada tratamento culinário as amostras de peixe foram liofilizadas e cominuidas em moinho criogênico. Para o método de extração das espécies de Hg foi utilizada uma solução de L-cisteína 0,6% (m/v). Parâmetros como tempo e temperatura de cocção, além da massa e formato da amostra, foram todos previamente otimizados e selecionados. Também foram avaliados parâmetros do método de especificação, tais como: concentração do extrator, tempo de extração, massa de amostra e teste de recuperação de analitos (Hg^{2+} e CH_3Hg^+). As espécies de Hg foram identificadas e quantificadas por cromatografia a líquido com geração química de vapor pós-coluna acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-CVG-ICP-MS). A exatidão do método foi avaliada usando o material de referência certificado (DORM-2) e concordâncias acima de 97% foram obtidas para CH_3Hg^+ e Hg total. O desvio padrão relativo do método proposto foi inferior a 5,5%. Limites de detecção de 1,7 e 2,3 ng g^{-1} foram obtidos para o Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , respectivamente. Perdas de Hg de até 33% foram observadas depois do processo de fritura. Entretanto, não foram constatadas conversões significativas entre as espécies de Hg em nenhum tratamento culinário.

ABSTRACT

Most of studies evaluating Hg in fish have been developed using fresh fish and the few studies involving the assessment of Hg in fish after cooking process, involve only the determination of total Hg and no clear conclusions have been reported. Considering the relatively high temperatures used for the preparation of fish and the volatile characteristics of some Hg species, this study aimed to evaluate the behavior of species of Hg (Hg^{2+} and CH_3Hg^+) after different cooking treatments in six different species of fish. Three different cooking procedures (cooking with water, frying and roasting) were evaluated, in addition to *in natura* samples. Moreover, the influence of three different conditions (containing salt, salt and lemon, and without seasonings) was evaluated for each treatment. All additives involved, like salt, lemon, oil and water used during the cooking procedure were collected to evaluate the mass balance of total Hg, including its possible losses. After each culinary treatment, samples were freeze-dried and ground in a cryogenic mill. For the extraction method of Hg species a solution of 0.6% (m/v) L-cysteine was used. Parameters such as time and cooking temperature and the mass and shape of sample were previously selected and optimized. Parameters of the speciation method were also evaluated such as: concentration of extractant solution, extraction time, sample weight and analyte recovery test (CH_3Hg^+ and Hg^{2+}). Mercury species were identified and quantified by liquid chromatography-chemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-CVG-ICP-MS). The accuracy was evaluated using certified reference material of dogfish muscle (DORM-2) and an agreement better than 97% with reference values was obtained for CH_3Hg^+ and total Hg. The relative standard deviation of the proposed method was below 5.5%. The limit detection of 1.7 and 2.3 ng g^{-1} as Hg for Hg^{2+} and CH_3Hg^+ , respectively, were obtained. Losses of Hg species up to 33% were detected after frying procedure. However, no significant conversions between Hg species in any culinary treatment were observed.

1 INTRODUÇÃO

Mercúrio é um elemento que ocorre naturalmente na crosta terrestre. As principais formas de emissão natural de Hg são decorrentes da desgaseificação da crosta terrestre e atividades vulcânicas. Entretanto, as emissões mais significativas deste metal ao meio ambiente ocorrem por fontes antropogênicas.¹⁻³

Este metal pode ser encontrado no meio ambiente sob diversas formas químicas com diferente potencial toxicológico. Todas as espécies de Hg são consideradas tóxicas, porém as espécies orgânicas possuem um grau de toxicidade maior que as inorgânicas. O metilmercúrio (CH_3Hg^+) é considerado uma das espécies mais tóxicas dentre estas. Uma vez formado, o CH_3Hg^+ entra na cadeia alimentar através da rápida difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática. Devido à biomagnificação durante a cadeia trófica, o CH_3Hg^+ atinge teores máximos em tecidos de peixes do topo da cadeia alimentar e, como resultado, cerca de mais de 90% do Hg total é encontrado na forma de CH_3Hg^+ , a mais tóxica.⁴⁻⁶ Deste modo, o consumo de peixe é a principal fonte de contaminação de Hg ao ser humano. Por outro lado, o peixe é fonte rica de selênio, ácidos graxos poliinsaturados e proteína de excelente qualidade.⁷⁻⁹

Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estabeleceu que a carne de peixe para consumo humano não deve possuir concentração de Hg acima de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Além disso, é recomendado o consumo de até 400 gramas de peixe por semana para um adulto de aproximadamente 60 kg.¹⁰ Já a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) e a Agência de Proteção Ambiental (EPA) recomendam, para as pessoas que consomem regularmente peixes, evitar o consumo de peixes predadores, pois estes contêm altos níveis de Hg. A recomendação é para o consumo de peixes de nível trófico baixo e ricos em ácidos graxos ômega-3. Já para mulheres gestantes, a recomendação é ainda mais restrita, limitando o consumo destes peixes para cerca de 350 g por semana.¹¹

Em vista disso, uma série de estudos de especiação de Hg se tornaram indispensáveis para um melhor esclarecimento do que realmente acontece ao longo

de seu ciclo biogeoquímico. Atualmente há vários trabalhos relacionando diversos temas com os mais diferentes métodos analíticos. No entanto, a maioria dos estudos avaliando este metal em peixes foi desenvolvida em peixes *in natura*, e as poucas pesquisas envolvendo a avaliação de Hg em peixes após algum processo de cocção, envolvem somente a determinação total de Hg.

Portanto, este trabalho tem como objetivo a avaliação do comportamento das espécies de Hg (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) após diferentes tratamentos culinários em seis diferentes espécies de peixes. Embora existem diversos estudos na literatura sobre especiação de Hg em peixes, ainda pouco se sabe do que acontece com as espécies de Hg durante diferentes processos de cocção. Além disso, foram avaliadas e otimizadas as condições dos tratamentos culinários, tais como: formato e massa da amostra, recipiente, temperatura e tempo do procedimento de cocção. Além disso, também foram avaliadas condições como concentração do extrator, tempo de extração, massa de amostra e teste de recuperação do analito.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica está dividida em três partes principais. Na primeira parte, são abordados os aspectos gerais sobre as características físico-químicas, toxicidade, transporte e ciclo biogeoquímico das espécies de Hg. Na segunda parte são apresentados os assuntos relacionados com a análise de especiação de Hg, principalmente em peixes. Na terceira parte é feita uma abordagem sobre a biodisponibilidade elementar em alimentos e a influência de processos de cocção na mesma.

2.1 Mercúrio - Aspectos Gerais

O Hg elementar (Hg^0) é o único metal líquido em condições normais de temperatura e pressão, possui relativamente alta pressão de vapor (31 mg m^{-3} a 30°C). Além disso, possui alta lipossolubilidade, dissolvendo-se facilmente em gordura.⁶ Encontra-se distribuído no planeta com os seguintes isótopos naturais e abundância de: ^{202}Hg (29,8%), ^{200}Hg (23,13%), ^{199}Hg (16,84%), ^{201}Hg (13,22%), ^{198}Hg (10,02%), ^{204}Hg (6,85%) e ^{196}Hg (0,15%).¹²

As principais utilizações deste metal incluem as amálgamas dentárias, interruptores de inclinação, termômetros, lâmpadas, pigmentos, baterias, reagentes, barômetros, entre outros.¹⁻² O Hg pode ser encontrado sob diversas formas, sendo as principais o Hg elementar (Hg^0), o mercúrio inorgânico (Hg^{2+} e Hg_2^{2+}) e inúmeras espécies orgânicas.

2.1.1 Espécies inorgânicas de Hg

As espécies inorgânicas podem ser encontradas com estados de oxidação 1+ ou 2+, sendo que os compostos Hg^{2+} são mais facilmente encontrados na natureza. Geralmente este cátion está associado a cloretos, nitratos, sulfatos e sulfetos. Já os compostos monovalentes de Hg, que na verdade é um íon diatômico (Hg_2^{2+}), são mais raros de serem encontrados no meio ambiente. Esta forma monovalente é encontrada somente na forma de dímeros salinos, como Hg_2Cl_2 (calomelano), sendo relativamente muito menos tóxica que HgCl_2 (sublimado), que foi muito usada na medicina até o século passado.^{6,13}

2.1.2 Espécies orgânicas de Hg

Existem diversos compostos orgânicos de Hg. Estes compostos são caracterizados essencialmente por ligações covalentes. Geralmente o Hg está associado a compostos do tipo RHgX e RHgR' , onde X representa um halogênio e R e R' representam grupos orgânicos como metila, etila e fenila.

O CH_3Hg^+ é a espécie de Hg mais comum dentre suas formas orgânicas. Em contraste, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ são raramente encontrados no meio

ambiente. Estas espécies eram utilizadas como biocidas, tendo seu uso proibido atualmente na maioria dos países.¹⁴⁻¹⁵

A estabilidade termodinâmica destas espécies orgânicas de Hg depende, principalmente, das forças de ligação envolvidas C—Hg. No caso do $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, a ligação C—Hg possui grande estabilidade frente a soluções fracamente básicas e ácidas. No entanto, essa ligação é facilmente clivada homoliticamente sob ação de radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta ($< 254 \text{ nm}$) em fase gasosa, produzindo radicais $\text{CH}_3\text{Hg}^\bullet$ e CH_3^\bullet que, por sua vez, podem ser rapidamente reduzidos a CH_4 e Hg^0 .¹⁶

Como esperado de um ácido mole de Lewis, o CH_3Hg^+ forma complexos extremamente fortes com Se e S. A alta afinidade por grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) no qual estão presentes em proteínas justifica seu potencial toxicológico.¹⁷ Já com halogênios ele forma complexos estáveis na seguinte ordem $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$.¹⁸ Espécies de Hg associados com grupos orgânicos etila e fenila são raramente encontrados na natureza, sendo provenientes geralmente de produtos ou subprodutos de sínteses em indústrias químicas.

2.2 Toxicidade

O Hg é altamente tóxico, especialmente quando metabolizado na forma de CH_3Hg^+ . Diversos estudos relatam que a toxicidade do CH_3Hg^+ é cerca de 100 vezes maior do que a toxicidade do Hg inorgânico.¹⁴ Dependendo do nível de exposição, a dose metabolizada pode ser prejudicial e/ou fatal. Cerca de 80% do vapor de Hg inalado é absorvido no sangue através dos pulmões, podendo provocar efeitos nocivos para o sistema nervoso, digestivo, respiratório, imunológico, além dos rins e pulmões.¹⁹

A exposição do ser humano a este elemento deveu-se, principalmente, a sua aplicação na medicina e indústria. Nestes casos, a exposição era principalmente devida à inalação de Hg elementar, o qual sofre reação de oxidação formando Hg inorgânico. Atualmente, são raros os relatos de envenenamento com o Hg inorgânico.¹⁶ No entanto, intoxicações com Hg orgânico se tornaram mais comuns, principalmente para consumidores de peixes que, atualmente, é considerada a principal fonte de exposição de Hg ao ser humano.

A principal fonte de exposição humana ao Hg é através do consumo de peixes contaminados por este metal, sendo que a principal espécie de Hg em músculo de peixe é na forma de CH_3Hg^+ (> 90%).^{4-6,20} A intoxicação por Hg danifica células do sistema nervoso central, podendo provocar distúrbios visuais como escotomas (visão turva) e redução do campo visual. Além disso, pode causar ataxia (baixa coordenação para caminhar), parestesia (insensibilidade na pele), perda de audição, disartria (dificuldade na articulação das palavras), deterioração mental, tremor muscular, distúrbio da motilidade e, nos casos de exposição grave, paralisia e morte.^{10,21-22}

Todas as formas de Hg atravessam a placenta, mas somente o CH_3Hg^+ tende a concentrar-se no cérebro do feto de mamíferos e pássaros.^{16,23} Dentre todos os organismos vivos, a espécie humana é a que apresenta menor eficiência na defesa contra o efeito do CH_3Hg^+ , uma vez que esta espécie tem um tempo de meia-vida relativamente longo, de 44 a 80 dias, e sua excreção pode ocorrer via fezes, leite materno e urina.²⁴

Um caso conhecido mundialmente ocorreu na Baía de Minamata no Japão em 1953, onde uma grande indústria despejava nas águas da baía uma grande quantidade de CH_3Hg^+ produzido como sub-produto da produção de acetaldeído. A principal fonte de alimento da população de Minamata eram peixes provenientes desta baía que estavam altamente contaminados com este metal.^{4,13,25-26} Na época este caso ficou conhecido como a “doença de Minamata”, pois no primeiro momento ninguém sabia o que realmente estava acontecendo, primeiro gatos e pássaros começaram a demonstrar comportamentos relativamente estranhos e, posteriormente, os seres humanos.

Pesquisas desenvolvidas na Universidade de Calgary no Canadá evidenciaram como íons de Hg alteram a estrutura da membrana celular de neurônios nascentes. Neste estudo, Leong *et al.*²² isolaram neurônios do tecido cerebral de uma espécie de caracol para monitorar o comportamento dos neurônios frente a baixas concentrações de Hg (10^{-7} mol L⁻¹). Foi observada uma rápida degeneração da estrutura do neurônio após a aplicação de uma solução de Hg (Figura 1). Foi constatado, ainda, que o Hg se liga à tubulina (proteínas que suportam a estrutura do neuróide) recém formadas impedindo que elas se ligassem uma as outras. Como consequência estas se degeneraram, deixando o neuróide

despojado de sua estrutura de apoio, o que acarreta a destruição da célula (neurônio).²²

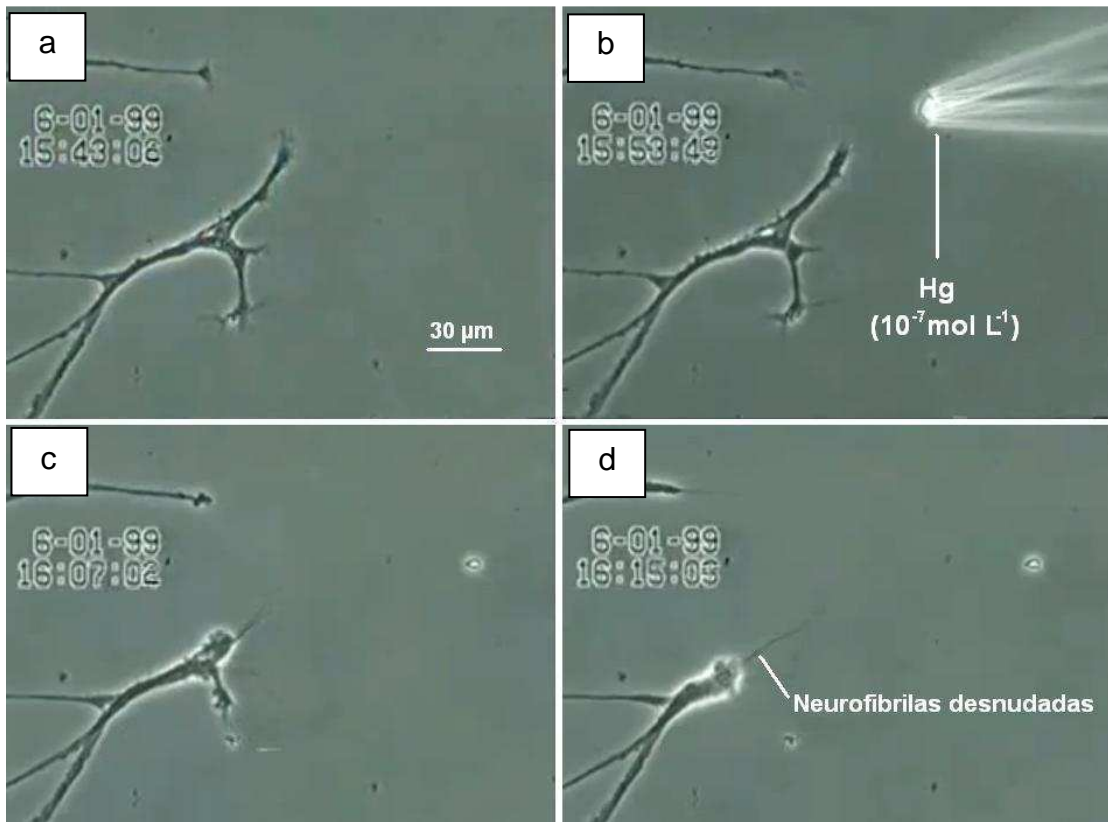


Figura 1. Imagem digital do efeito da exposição de Hg em células nervosas de *Lymnaea*. (a) antes; (b) durante; e (c) e (d) depois da exposição ao Hg (figura adaptada de Leong, C.C. W.²²).

Estudos recentes sugerem que o Hg pode não ter nenhum limiar seguro do qual não ocorra algum efeito nocivo a saúde. No entanto, com o intuito de assegurar a saúde pública, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu recomendações para limites de ingestão semanal tolerável de 1,6 µg de CH₃Hg⁺ por kg de peso corpóreo humano.¹⁰

A grande preocupação do estudo e controle do CH₃Hg⁺ deve-se, principalmente, à capacidade dele ser bioacumulado e de se biomagnificar ao longo das cadeias alimentares.^{4,27-28} No organismo, o Hg se liga preferencialmente a grupos sulfidrilas (–SH) presentes nas proteínas e, em menor grau, por grupos fosforilas, carboxílicos, amidas e amins.²⁶ Além disso, a afinidade por grupos selenóis (–SeH) é ainda maior que por grupos sulfidrilas. Portanto, o Hg pode ser considerado um potente desnaturador de proteínas e inibidor de aminoácidos, interferindo nas funções das células, especialmente nos neurotransmissores cerebrais.^{6,21-22}

Atualmente, existem estudos que indicam tratamentos de desintoxicação de Hg com o uso de agentes complexantes, como 2,3-dimercaptopropanol e D-penicilamina (Figura 2). Estas moléculas possuem grupos funcionais sulfidrilas ($-SH$) que se ligam ao metal de maneira mais forte que com os grupos funcionais de enzimas ou proteínas do nosso organismo. Em função deste efeito, o Hg complexado pode ser solubilizado e excretado do organismo de forma mais rápida e mais eficiente, quando comparado à forma natural de excreção.²⁹⁻³¹ Porém, este tratamento deve ser efetuado com precaução, uma vez que dependendo do caso clínico do paciente, este pode ter uma ação contrária, aumentando ainda mais a absorção no organismo.³²

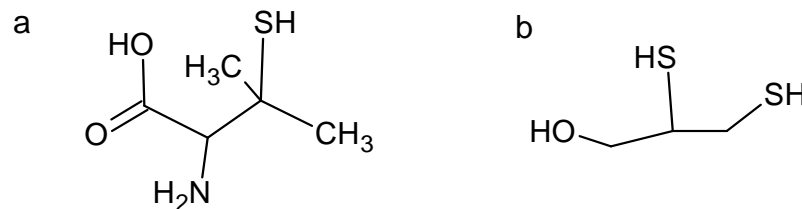


Figura 2. Estrutura química do composto (a) D-penicilamina e (b) 2,3-dimercaptopropanol.³³

2.3 Transporte e ciclo biogeoquímico do Hg

O entendimento do ciclo biogeoquímico do Hg é de suma importância para prever o efeito da exposição deste metal sobre os seres humanos, bem como para avaliar a qualidade de vida em diferentes ecossistemas. As atividades humanas influenciam significativamente no ciclo biogeoquímico do Hg o que, conseqüentemente, pode alterar a biodisponibilidade dessas espécies na biota.

No meio ambiente o Hg pode se encontrar em diversas formas físicas e químicas. A conversão entre essas diferentes espécies é devida ao ciclo biogeoquímico do Hg. Este ciclo é caracterizado pelas várias rotas que este elemento pode fazer entre o sistema ar, água e solo (terra). O Hg é volatilizado a partir do solo e da água para a atmosfera e seguido da deposição deste na superfície terrestre e em águas superficiais. Em cada ambiente ele pode ser transformado em novas espécies através de processos de oxidação-redução

(redox), de alquilação e desalquilação.^{4,6} No entanto, as formas químicas mais comumente encontradas no meio ambiente são Hg^0 , Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$.

As fontes naturais mais significativas de emissão de Hg são os processos de desgaseificação da crosta terrestre e vulcões em atividade. Já as emissões por fontes antropogênicas são variadas. Podem ser de origem de rejeitos de produtos eletrônicos, pesticidas, fungicidas, tintas, rejeitos de indústrias de cloro-soda, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, garimpos de ouro, entre outros.¹⁻³ Em 1989, estimou-se que as emissões naturais de Hg foram entre 25.000 a 125.000 toneladas por ano.²⁴ As emissões antrópicas, que se devem principalmente às atividades industriais, contribuíram em cerca de 55% da emissão total de Hg ao meio ambiente.

A distribuição das diversas espécies de Hg encontradas no meio ambiente é regulada por processos físicos, químicos e biológicos, os quais ocorrem geralmente nas interfaces ar/água e água/sedimento. A Figura 3 mostra um esquema do ciclo do Hg no ambiente e sua acumulação em seres vivos. Neste esquema é possível observar a distribuição das espécies de Hg nos diferentes ecossistemas.

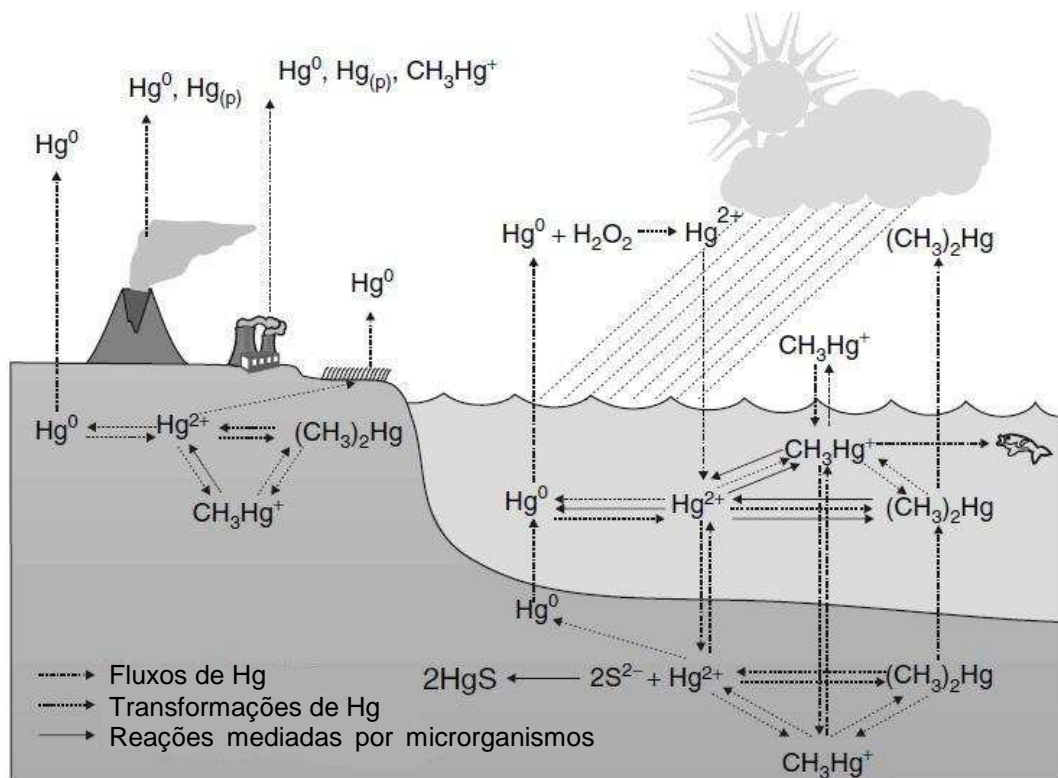


Figura 3. Ciclo do Hg no meio ambiente.⁶

As principais transformações do Hg no meio ambiente estão relacionadas com as espécies iônicas Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . Estas são fortemente complexadas por ácidos húmicos, fúlvicos e outras moléculas orgânicas presentes no mesmo ecossistema. Além disso, o Hg pode formar complexos com íons OH^- e Cl^- solúveis no ambiente aquático, sendo que a capacidade adsortiva de Hg decresce na seguinte ordem: $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl} > \text{Hg}(\text{OH})_2 > [\text{HgCl}_3]^- > [\text{HgCl}_4]^{2-}$. No entanto, substâncias orgânicas com grupos tióis ou selenóis se ligam ainda mais fortemente às espécies de Hg. Este é um dos motivos pelo qual os organismos aquáticos ricos em proteínas (grupos tióis e selenóis) acumulam grandes quantidades de Hg.¹⁶

Apesar de peixes e frutos do mar serem a principal fonte de exposição de Hg na alimentação, atualmente o CH_3Hg^+ tem sido encontrado também em animais terrestres. Hoje em dia, com a utilização de farinha de peixe como fonte de proteína em rações utilizadas na suinocultura, avicultura, piscicultura e pecuária, a incidência de Hg nestas fontes de alimento tem aumentado consideravelmente.³⁴⁻³⁵

No Brasil, mais especificamente na Amazônia, a principal fonte de emissão antrópica de Hg para o meio ambiente é oriunda de garimpos de ouro. Durante o processo de purificação (amalgamação) do ouro, quantidades variáveis de Hg são liberadas na forma elementar para o ar, rios e solos, o que resulta em um ambiente altamente contaminado.³ Segundo Lacerda³, nas últimas décadas, o Brasil liberou para o meio ambiente centenas de toneladas de Hg, principalmente devido a extração de ouro na região Amazônica.³⁶ Estudos recentes^{3,37-41} demonstram que na Amazônia existe uma grave contaminação deste metal nos sedimentos e águas próximos de zonas de mineração, o que provavelmente é a causa de contaminação dos peixes da região, principalmente as espécies carnívoras. Nesta região existem duas principais formas de contaminação humana por Hg: primeira a exposição ocupacional através da inalação direta do vapor de Hg durante o processo de amalgamação e a segunda é através do consumo de peixes contaminados.

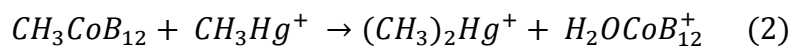
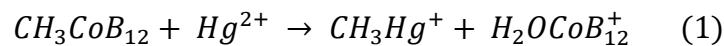
2.3.1 Transformações e estabilidade das espécies de Hg

A metilação do Hg tem recebido grande atenção desde a descoberta da grande toxicidade do CH_3Hg^+ e dos altos níveis desta espécie em organismos aquáticos. Esta transformação pode ocorrer através de processos bióticos e

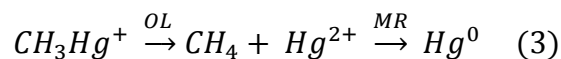
abióticos. O acoplamento de um grupo metílico ao Hg muda as propriedades físicas e químicas deste elemento, o que influencia diretamente na toxicidade, mobilidade e ciclo biogênico.¹⁶

Há diversos estudos sobre a metilação do Hg. Isto porque a metilação do Hg aumenta a lipossolubilidade e, conseqüentemente, a bioacumulação em seres humanos e animais. Este processo, geralmente, é realizado por microrganismos presentes em solos, principalmente em sedimentos de ambientes aquáticos como lagos, rios e mares.^{16,42} Atualmente diferentes tipos de bactérias já são conhecidas por catalisarem a biometilação do Hg tanto em ambientes aeróbicos quanto anaeróbicos. Neste sentido, as bactérias sulfato-redutoras são consideradas como as que mais contribuem para o processo de metilação do Hg.^{16,43-46}

No entanto, pode ocorrer a metilação abiótica do Hg. Esta, que é caracterizada como um processo químico, pode ocorrer por via não enzimática ao reagir com a metilcobalamina ($\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$) excretada pelas bactérias ou adicionadas *in vitro*. A metilcobalamina é conhecida como uma doadora de grupos metila na forma de carbânion (CH_3^-) ao Hg^{2+} (Reações 1 e 2).¹⁶



Existem também bactérias capazes de desmetilar, ou seja, quebrar a ligação Hg—C e ainda reduzir o Hg^{2+} formado para a forma elementar através das enzimas *organomercurial-lyase* (OL) e mercúrio redutase (MR).¹⁶ Como pode ser observada na reação 3.



A desmetilação dos metais tem recebido pouca atenção se comparada com a metilação. Entretanto, é também importante, pois representa uma forma de reduzir a biodisponibilidade do Hg na cadeia alimentar.

Na atmosfera, ou em ambientes sob incidência de radiação ultravioleta, pode ocorrer a fotólise de compostos orgânicos de Hg. Por exemplo, a fotólise de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ em 254 nm na atmosfera produz as espécies radicalares $\text{CH}_3\text{Hg}^\bullet$ e CH_3^\bullet .

Em solventes orgânicos, o CH_3HgI é clivado sob UV ($< 313 \text{ nm}$) gerando CH_3^\bullet por quebra da ligação C—Hg. Já o $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Hg}$ em solventes orgânicos também pode ser fotolizado, além de poder ser decomposto termicamente.¹⁶ A energia de comprimentos de ondas de 120, 240 e 340 nm é equivalente à 998, 499 e 352 kJ mol⁻¹, respectivamente.¹⁶

O Hg sofre muitas transformações químicas no ecossistema (Figura 3), principalmente no meio aquático, onde o Hg^{2+} se liga a radicais metila, formando compostos organometálicos, majoritariamente CH_3Hg^+ e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$. A formação destas espécies aumenta a dispersão do Hg em muitos ambientes, pois esta espécie se liga a proteínas de organismos aquáticos e passa a se acumular ao longo da cadeia trófica.^{37,39,47}

2.3.2 Hg em peixes

A contaminação por Hg em peixes, principalmente na forma de CH_3Hg^+ é uma preocupação mundial de saúde pública uma vez que esta é a forma química mais tóxica do Hg ao ser humano. O risco é ainda maior para populações ribeirinhas e em regiões onde a principal fonte de proteína na dieta é o consumo de peixe. Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o tipo de peixe a ser consumido. Peixes do topo da cadeia trófica, por exemplo, acumulam uma quantidade relativamente superior de Hg quando comparados a peixes de nível trófico baixo, como herbívoros e detritívoros.^{37,39} A quantidade de CH_3Hg^+ aumenta conforme a cadeia trófica cresce, ou seja, peixes herbívoros possuem aproximadamente 70% do Hg na forma de CH_3Hg^+ . Já peixes predadores, como o tubarão, podem alcançar cerca de 100% do Hg na sua forma orgânica.⁴⁷ O tempo de meia vida do CH_3Hg^+ em peixes é relativamente longo, sendo de, aproximadamente, 2 anos.⁴⁸⁻⁴⁹

Dentre as fontes de exposição humana por intermédio da dieta alimentar, o consumo de carne de baleia é uma fonte dominante e excessiva de CH_3Hg^+ . Peixes como o salmão apresentam um risco relativamente menor. O que pode ser observado é que a contaminação humana por Hg depende não somente da quantidade de peixe consumida, mas também, da espécie de peixe. De um modo geral, peixes de nível trófico baixo são conhecidos como herbívoros e detritívoros, os

de nível trófico intermediário são os onívoros, e os de nível trófico elevado são os piscívoros (predadores).⁵⁰

Atualmente, sabe-se que um dos principais fatores da bioacumulação de Hg em peixes é devido a sua interação com proteínas. Em 2003, Harris *et al.*⁵¹ evidenciaram com o uso da espectroscopia de absorção de raios-X, a dominância do complexo CH₃Hg—SH em músculos de peixe, evidenciando a grande interação do Hg com os grupos sulfidrilas presentes em proteínas.

Como uma forma de assegurar e prevenir a população de possíveis contaminação de Hg provenientes do consumo de peixe, a portaria Nº 67, de 13 de novembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu como limite máximo de 0,5 mg kg⁻¹ de Hg em peixe.⁵² No entanto, apesar da existência deste tipo de legislação, o controle da concentração deste contaminante em peixes é considerado uma tarefa difícil, muitas vezes exigindo instrumentação analítica não presente em muitos laboratórios de controle de qualidade.

2.4 Análise de especiação de Hg

O interesse em determinar a concentração de Hg para avaliar o seu impacto no meio ambiente resultou em um grande progresso no desenvolvimento de técnicas e métodos analíticos para a determinação deste elemento.

Devido à grande diferença de toxicidade entre as espécies de Hg, muitos métodos analíticos foram propostos para a determinação de espécies de Hg em diversos tipos de matrizes, em especial, peixes. Geralmente, esses métodos envolvem uma série de etapas como: pré-tratamento, estocagem, extração das espécies, tratamento preliminar, separação das espécies e análise quantitativa das diferentes espécies de Hg.^{6,47,53}

Segundo a IUPAC (*International Union for Pure and Applied*) análise de especiação química é a área da química analítica em que se busca identificar e quantificar individualmente uma ou mais espécies químicas contida em uma dada amostra.⁵⁴

Hoje em dia, a análise de especiação de metais e organo-metais tornou-se de suma importância para uma boa gestão ambiental, principalmente devido à forte

relação da toxicidade com a forma química em que o metal se encontra. Sendo assim, o conhecimento das concentrações relativas das espécies químicas presentes em um determinado ambiente tem se tornado um tópico relevante para a avaliação do nível de toxicidade.^{49,55-58} Por exemplo, o cromo na forma de Cr(III) é um oligoelemento essencial para o metabolismo de lipídeos, glicose e proteínas. Já o cromo na forma de Cr(VI) é considerado carcinogênico.⁵⁹ No caso do Hg, todas as formas são tóxicas ao ser humano. No entanto, dependendo da espécie química em que este se encontra, a toxicidade pode aumentar centenas de vezes.⁶⁰ Portanto, o objetivo da análise de especiação é a obtenção de maior ciência das espécies que estão sendo estudadas: sua massa, composição, estabilidade, ciclo geoquímico e biológico, transformações e interações dessas espécies com a matéria do meio. Visto nisso, a análise de especiação de Hg continua sendo o assunto de muitas pesquisas. O conhecimento do ciclo geoquímico e biológico, assim como as transformações que este sofre em diferentes condições, são de sumo interesse para elucidar e tentar avaliar a melhor maneira de remediar certos danos que este elemento causa ao meio ambiente e seres humanos.

Durante as últimas décadas, muitos métodos analíticos contribuíram significativamente para uma melhor elucidação da química do Hg em ambientes naturais, incluindo o uso de equipamentos e técnicas altamente sensíveis e seletivas. Estas melhorias permitiram a determinação da concentração total e de espécies majoritárias de Hg em diferentes ecossistemas (ar, água, sedimentos e organismos vivos).^{18,47,61}

2.4.1 Armazenamento e preservação da amostra

A amostragem, armazenamento e a manipulação da amostra são tarefas geralmente indispensáveis na análise de especiação de Hg. Durante estas etapas deve-se garantir a integridade das espécies presentes na amostra, ou seja, prevenir a degradação e/ou conversão de uma espécie de Hg em outra. Compostos orgânicos de Hg podem ser degradados por ação microbiológica, oxidação química e radiação na faixa do UV.⁶¹ Devido à suscetibilidade à degradação que pode ser promovida pela exposição à radiação UV, as amostras devem ser armazenadas ao abrigo da luz. Em alguns casos, possíveis processos de metilação ou desmetilação

por microrganismos podem ser minimizados pela filtração prévia da amostra em membranas com 0,45 μm .⁶²

Outros parâmetros que devem ser considerados são o tipo de frasco e a solução em que a amostra deve ser armazenada. Na Tabela 1 pode-se observar alguns tipos de materiais, preservantes e condições de armazenamento considerados adequados para amostras aquosas e soluções de referência.⁶²

Tabela 1. Condições recomendadas para a preservação e armazenamento de soluções contendo espécies de Hg (adaptado de Parker⁶²).

Espécies	Recipiente	Preservação	Armazenamento	Estabilidade
Hg total	Vidro ^a ou PTFE	BrCl	-	< 1 ano
CH ₃ Hg ⁺	Vidro ^a ou PTFE	HCl 0,4% v/v H ₂ SO ₄ 0,2% v/v	4 °C ao abrigo da luz	6 – 12 meses
Hg ⁰	Vidro ^a	-	4 °C ao abrigo da luz	1 dia
(CH ₃) ₂ Hg	Vidro ^a	-	4 °C ao abrigo da luz	1 dia
Hg ²⁺ _(aq)	Vidro ^a ou PTFE	-	4 °C ao abrigo da luz	2 – 5 dias

^a Recipiente com tampa de PTFE.

Normalmente, o armazenamento de amostras que contenham espécies de interesse voláteis de Hg, como Hg⁰ e (CH₃)₂Hg, não são recomendadas pois essas espécies são altamente instáveis, as perdas por volatilização ocorrem entre 10 e 20 h. Para amostrar, o recipiente de coleta deve ser purgado com um gás inerte, e as espécies (Hg⁰ e (CH₃)₂Hg) devem ser retidas em uma armadilha (*trap*) adequada, como ouro ou uma coluna de carvão ativado. O manuseio laboratorial do (CH₃)₂Hg deve ser feito com extremo cuidado, sendo que este composto é considerado de extrema toxicidade.^{6,62-63} Um acidente com bastante repercussão nos meios científicos ocorreu em 1997 com a Dra. Karen E. Wetterhahn, uma pesquisadora experiente e renomada no meio científico. Ela morreu vítima do (CH₃)₂Hg, após possível derramamento de algumas gotas deste sobre sua luva de látex. O (CH₃)₂Hg permeou através da luva e atingiu a pele da pesquisadora. Os efeitos característicos pela contaminação de Hg foram praticamente instantâneos e, em poucos dias, resultou em sua morte.¹⁷

Apesar de haver trabalhos de determinação de (CH₃)₂Hg em peixes, água e sedimentos, poucos determinam esta espécie de Hg em peixes e somente alguns trabalhos⁶³ avaliam outras espécies de Hg, como etilmercúrio (C₂H₅Hg⁺); e fenilmercúrio (C₆H₅Hg⁺), uma vez que estas espécies não são comumente encontradas em organismos aquáticos.

Em geral, para o armazenamento e estocagem de amostras biológicas como peixes, recomenda-se a liofilização e armazenamento em refrigerador na ausência de luz.⁶³

2.4.2 Técnicas para a determinação de espécies de Hg

A determinação de espécies de Hg em material biológico pode ser feita pelo emprego de uma ampla variedade de métodos analíticos. Alguns métodos reportados na literatura determinam as espécies de Hg orgânica e inorgânica indiretamente, por diferença entre a determinação do Hg total e uma das espécies com uma detecção seletiva.^{18,64-65} Além disso, a determinação das diferentes espécies de Hg também pode ser empregando técnicas hifenadas. Este tipo de determinação das espécies de Hg representa uma tendência no desenvolvimento de metodologias analíticas, na qual geralmente estão associados a uma técnica de separação acoplada a um sistema de detecção. A separação das espécies de Hg pode ser efetuada através de diversos procedimentos e, dentre estes, destacam-se a extração seletiva com solventes^{63,66}, a redução diferencial^{63,67-68}, a adsorção/dessorção^{63,66}, a complexação⁶³, e técnicas cromatográficas, com ênfase para a cromatografia a gás (GC)^{12,63,69} e a LC^{12,63} com ou sem etapa de derivatização.⁶³

Após a etapa de separação, faz-se necessária uma etapa de detecção das espécies de Hg. Dentre as técnicas de detecção que podem ser usadas na determinação de espécies de Hg pode-se citar a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS), e técnicas de detecção que geralmente utilizam uma etapa prévia de derivatização das espécies, como a geração química de vapor (CVG) acoplada à espectrometria de absorção atômica (AAS), a espectrometria de fluorescência atômica (AFS)⁶⁹, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).^{12,70-71} Além disso, existem métodos de especiação de Hg que utilizam técnicas como a voltametria de pulso anódico diferencial⁷²⁻⁷³ e a determinação de CH_3Hg^+ baseada em sua transformação específica a metano após tratamento enzimático.⁷⁴

Adicionalmente, dependendo da técnica de determinação utilizada, uma etapa de derivatização dos analitos pode ser imprescindível. A derivatização consiste em modificar as propriedades químicas e físicas do analito, como o ponto de ebulição, a solubilidade e a polaridade. Para que a separação de compostos organometálicos não voláteis seja realizada por GC, a derivatização dos analitos pode ser essencial para que se obtenham espécies voláteis e termicamente estáveis antes da separação. As técnicas de derivatização mais usadas são a CVG usando tetrahidroborato de sódio (NaBH_4), e as reações de alquilação com tetraetilborato de sódio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) e reagentes de Grignard. Esta última técnica não é muito utilizada, devido ao elevado tempo necessário e o grande número de etapas envolvidas durante a modificação química do analito.^{6,18,47,54}

Uma das técnicas que tem sido bastante utilizada nos últimos anos é a cromatografia a líquido com geração química de vapor pós-coluna acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-CVG-ICP-MS). Esta técnica apresenta grande facilidade de acoplamento, além da possibilidade de determinação isotópica.

2.5 Determinação de espécies de Hg por LC-CVG-ICP-MS

A principal vantagem da LC é a sua versatilidade, ou seja, a possibilidade e facilidade de acoplamento com diferentes tipos de detectores, ampla opção de fases móveis que podem ser empregadas em sistemas de separação de fase normal ou fase reversa. Praticamente todos os métodos de separação das espécies de Hg por LC reportados na literatura foram baseados na separação em fase reversa.⁶³ A separação destas espécies está associada à interação de cada espécie com a fase estacionária da coluna cromatográfica. Desta forma, o uso de complexantes antes da adição da amostra na coluna torna-se geralmente necessário para a obtenção de uma boa resolução. O mecanismo de separação, que geralmente está associado a colunas cromatográficas, é o mecanismo de partição líquido-líquido (principal mecanismo de colunas fase reversa). Dentre as colunas de fase reversa mais amplamente usadas, destacam-se as fases estacionárias do tipo organosilanos, como octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18).

Os estudos para o acoplamento de sistemas cromatográficos (GC e LC) com técnicas de espectrometria atômica foram iniciados nos anos 70 e 80 por Van Loon⁷⁵ e Suzuki⁷⁶. A técnica empregada era, principalmente, AAS e ICP-OES.⁷⁷ No entanto, essas técnicas são relativamente menos sensíveis que a técnica de ICP-MS. Assim, anos mais tarde, surgiram os primeiros trabalhos acoplando a LC ao ICP-MS, e, desta forma, permitindo alcançar limites de detecção (LDs) relativamente menores, além de fornecer informações isotópicas de cada elemento.⁷⁸⁻⁷⁹

A técnica de ICP-MS baseia-se no emprego de um plasma, uma fonte de alta energia, para obtenção de átomos no primeiro estado de ionização (M^+). Subsequentemente, os íons gerados no plasma são separados em um analisador de massa de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e detectados por uma eletromultiplicadora. Na Figura 4 está representado o esquema de um instrumento de ICP-MS com seus principais componentes.⁸⁰

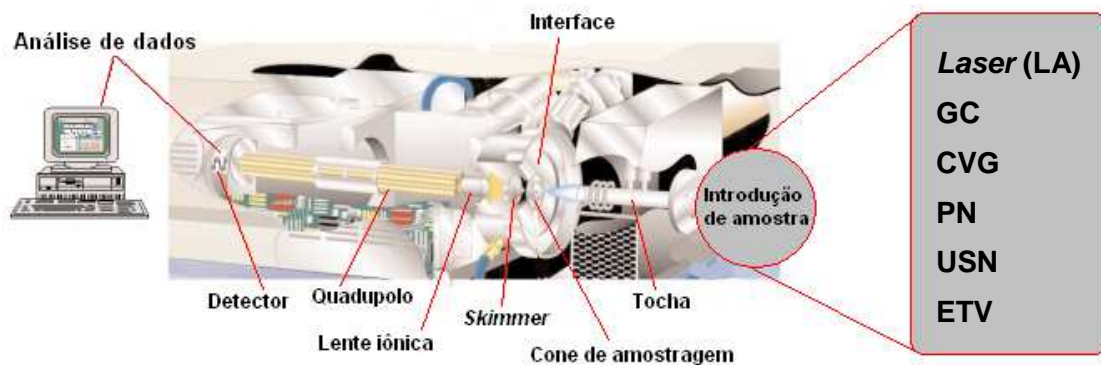


Figura 4. Esquema geral de um instrumento de ICP-MS, destacando as principais partes deste (adaptado de PerkinElmer⁸⁰).

A introdução da amostra no equipamento geralmente é na forma líquida. Neste caso, com auxílio de um nebulizador pneumático (PN) ou ultra-sônico (USN), a amostra é transformada na forma de um aerossol para a introdução no plasma. No entanto, além dos sistemas de nebulização, a introdução pode ser realizada por vaporização eletro térmica (ETV), GC, CVG e ablação com raios *laser* (LA).⁸¹

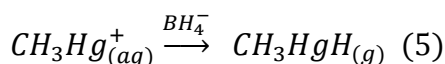
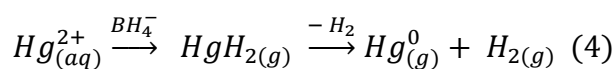
O Hg possui o primeiro potencial de ionização relativamente elevado quando comparado aos outros elementos, ou seja, dentre os metais é o que possui o primeiro potencial de ionização mais elevado de todos (10,44 eV). Tal fato sugere que o Hg pode ser facilmente afetado por variações na energia proveniente do plasma. O Hg também tem um elevado número de isótopos naturais (7), todos com menos de 30% de abundância, o que diminui ainda mais a detectabilidade no MS.

Outro inconveniente, é a grande facilidade do Hg ser adsorvido no sistema de introdução de amostra, ocasionando um pronunciado efeito memória.⁸²⁻⁸³ Existem trabalhos que utilizam compostos que possuem uma alta afinidade com o Hg (complexantes com grupos sulfidrilas ou amalgamação com ouro) para estabilizar o transporte deste elemento até o plasma, minimizando possíveis adsorções no sistema de introdução e, conseqüentemente, reduzindo o efeito memória.^{82,84-85} No entanto, praticamente todos estes inconvenientes observados frente à nebulização convencional (PN ou USN) podem ser resolvidos pelo simples acoplamento do sistema de CVG como sistema de introdução de amostra, uma vez que a CVG tem a capacidade de minimizar as interferências espectrais e não espectrais.

2.5.1 Geração química de vapor de Hg

A CVG é um processo de derivatização química. No caso do Hg, a derivatização consiste em uma reação de redução química das espécies de Hg em uma forma de Hg que seja volátil para o sistema de introdução de amostra do equipamento. Os agentes redutores mais utilizados para a CVG são o SnCl₂ e o NaBH₄. No entanto, o NaBH₄ é um agente redutor mais forte, e ao contrário do SnCl₂ que reduz somente o Hg²⁺ a Hg⁰, o NaBH₄ tem a capacidade de reduzir tanto Hg²⁺ a Hg⁰ quanto a sua forma orgânica CH₃Hg⁺ ao seu respectivo hidreto (CH₃HgH).⁸⁶⁻⁸⁷

O mecanismo da geração das espécies voláteis com NaBH₄ em meio ácido ocorre, conforme descrito nas reações 4 e 5.⁸⁸



A CVG possui elevada eficiência de introdução de amostra, podendo alcançar até 100%. Conseqüentemente, podem ser alcançados limites de detecção (LD) de cerca de 100 vezes menores aos obtidos em técnicas que empregam somente a nebulização pneumática. Outra grande vantagem desta técnica é a minimização ou, até mesmo, eliminação de interferências não espectrais no sinal analítico.^{79,81}

2.5.2 Métodos de extração

O método de extração em análise de especiação química visa a liberação do analito da matriz da amostra sem alterar a informação sobre as diferentes espécies. Dessa forma, não é possível utilizar reagentes e meios agressivos, como agentes oxidantes fortes ou combustão, pois estes não preservam a integridade das espécies químicas.⁶¹ Como espécies de metais, especialmente organometálicas tendem a ser vinculadas fortemente à matriz (por forças de adsorção, iônicas ou interações de Van der Waals), o processo de extração deve ter energia suficientemente maior que a interação da espécie com a matriz e suficientemente menor que a energia de degradação da espécie.⁶¹ Portanto, nem sempre é possível encontrar uma condição adequada para extração das espécies de interesse de uma dada matriz, o que faz com que esta etapa seja considerada a mais crítica da análise de especiação.

Muitos métodos de extração utilizados atualmente são baseados na extração líquido-líquido (LLE), destilação por arraste a vapor, extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração com fluido supercrítico (SFE)⁸⁹ e extração com soluções complexantes ou lixiviantes.⁹⁰ Dentre estes procedimentos, a extração com complexantes pode ser o principal método na extração de espécies de Hg em matrizes biológicas.

Em geral, considera-se uma solução adequada para a extração de espécies metálicas em amostras biológicas, aquele extrator que tenha a função de liberar o analito da matriz por enfraquecimento da interação com a matriz e/ou por dissociação dos sítios ativos da matriz, além de estabilizar a espécie por solvatação ou complexação desta, evitando a re-adsorção na matriz da amostra. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o rendimento de extração. Estes parâmetros são essenciais para avaliar se o método proposto para análise de especiação resultará em uma extração qualitativa e quantitativa de cada espécie.⁶

Na literatura são reportados diversos métodos de extração de espécies de Hg em materiais biológicos. Em geral, o maior desafio encontrado para esse tipo de amostra consiste em extrair o Hg da interação forte com grupos sulfidrilas provenientes das proteínas. A maioria das escolhas de extratores de Hg são baseadas no princípio de Pearson,⁹¹ que classificou os ácidos e bases de Lewis em ácidos e bases duros e moles. As principais características dos ácidos e bases

moles são o elevado tamanho, a baixa relação carga/raio e a alta polaridade, enquanto que os ácidos e as bases duras são pequenos e suas nuvens eletrônicas não sofrem distorções significativas, resultando em uma baixa polaridade.

Um dos primeiros métodos para a extração de espécies de Hg em alimentos, mais precisamente em peixes, é o método de Westöö, que foi desenvolvido em 1966. Este método libera a espécie de CH_3Hg^+ de proteínas por deslocamento dos grupos sulfidrilas com uma série de etapas envolvendo o uso de solventes orgânicos, ácidos inorgânicos e complexantes, seguida de técnicas de separação como a cromatografia em camada delgada (TLC) e a GC. Este método pode ser considerado relativamente moroso e caro, além de não apresentar coerência com os preceitos da química verde.⁹²

Um método amplamente empregado na extração de espécies de Hg de materiais biológicos é baseado na hidrólise alcalina da matriz. Dissolução da matriz com soluções de KOH em metanol e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) têm sido propostas para a liberação de CH_3Hg^+ sem a quebra da ligação C–Hg.^{12,53,69} No entanto, em algumas condições, a extração com TMAH pode provocar a metilação do Hg^{2+} durante o processo de extração, resultando em um resultado superestimado em relação a concentração original de CH_3Hg^+ na amostra.⁹³

Dentre as substâncias mais utilizadas durante a etapa de extração de Hg em materiais biológicos, uma atenção especial deve ser dada à cisteína, assim como outros compostos contendo grupos sulfidrilas.^{63,85} O mecanismo de extração destes compostos está associado com a ação complexante dos grupos sulfidrilas com as espécies de Hg. Harris *et al.*⁵¹ usando a técnica de espectroscopia de absorção de raios-X, observaram a complexação de espécies de CH_3Hg^+ com compostos sulfidrilas presentes em tecidos de peixe-espada, o que serviu para comprovar que uma das principais interações do CH_3Hg^+ foi com a cisteína.

Outros métodos de extração são baseados na utilização de energias alternativas, como a energia ultra-sônica e radiação micro-ondas, para auxiliar a etapa de extração. No entanto, essas energias devem ser usadas com cuidado, principalmente a ultra-sônica, uma vez que conversões de espécies de Hg causadas por esta energia têm sido reportadas por diversos autores.^{86,94-95}

Porém, um bom conhecimento e controle da energia ultra-sônica pode auxiliar de forma significativa o método de extração. Batista *et al.*⁹⁶ desenvolveram um método rápido de extração de espécies de Hg em peixes com a utilização da energia

ultra-sônica. Para a extração das espécies de Hg foi utilizada uma solução extratora contendo L-cisteína, mercaptoetanol e HCl. A separação das espécies foi feita com a utilização da LC, em uma coluna C8, com tempo de separação de 5 min. Após a etapa de separação, a determinação foi feita por ICP-MS. Recuperações maiores que 90% foram observadas para as três espécies de Hg analisadas. O LD obtido foi de 0,25 ng g⁻¹, 0,10 ng g⁻¹, e 0,20 ng g⁻¹ para Hg²⁺, CH₃Hg⁺ e C₂H₅Hg⁺, respectivamente.

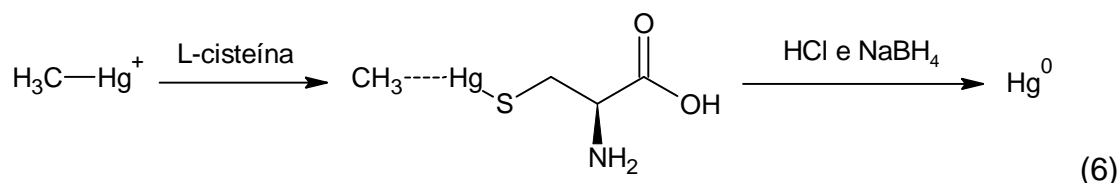
Já Capelo *et al.*⁸⁶ propuseram um método de especiação de Hg em amostras aquosas baseado na oxidação de espécies orgânicas de Hg para Hg²⁺, via sonólise (formação de radicais livres via energia ultra-sônica). Neste procedimento, as espécies foram reduzidas pela utilização de NaBH₄ e a determinação foi feita por CVG-AAS. As espécies orgânicas foram determinadas por diferença entre a determinação do Hg²⁺ (sem sonólise) e Hg total (via sonólise). O LD do método foi de 0,4 µg L⁻¹.

Chiou *et al.*⁷⁰ desenvolveram um método para extração de Hg em amostras de peixe utilizando extração assistida por micro-ondas. Uma mistura de complexantes com grupos sulfidrilas (L-cisteína e 2-mercaptoetanol) foi usada para a extração de três espécies de Hg. Neste trabalho foi utilizada uma coluna de fase reversa (C8) e como fase móvel uma solução de L-cisteína 0,05% m/v e 2-mercaptoetanol 0,05% v/v. A técnica de LC-CVG-ICP-MS permitiu a separação e detecção das três espécies de Hg. Os LDs obtidos foram 0,06 ng mL⁻¹, 0,05 ng mL⁻¹ e 0,09 ng mL⁻¹ para Hg²⁺, CH₃Hg⁺ e C₂H₅Hg⁺, respectivamente. Neste trabalho, recuperações de 98,2 ± 5,5% foram obtidas para CH₃Hg⁺.

Hight e Cheng⁹⁷ avaliaram a estabilidade de espécies de Hg em amostras de peixe utilizando uma solução extratora contendo L-cisteína 1% (m/v), e concluíram que o CH₃Hg⁺ manteve-se estável por 96 h. A determinação foi feita com a técnica LC-ICP-MS, usando uma coluna C-18 e como fase móvel uma solução de L-cisteína 0,1%. Recuperações de 94 e 98% foram obtidas para o CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, respectivamente.

Recentemente, Wang Z.-h. *et al.*⁹⁸ sugeriram um mecanismo em que a L-cisteína forma complexos com o Hg orgânico enfraquecendo a ligação C-Hg. Utilizando as técnicas de LC-CVG-AFS sem sistema de oxidação pós coluna e nem aquecimento da cela de quartzo, eles observaram que este complexo na presença de HCl e KBH₄ quebrava a ligação C-Hg, gerando Hg⁰, que por sua vez era

rapidamente reduzido para a forma elementar (Hg^0). O mecanismo sugerido por Wang Z.-h. está descrito na reação 6.



Tal mecanismo é um indício de que a determinação indireta de Hg (sem o uso de técnicas cromatográficas) com sistema CVG, onde alguns trabalhos justificam a degradação das espécies de Hg pela L-cisteína durante a etapa de extração, pode não ser devido ao método de extração e sim devido ao sistema de redução no sistema CVG associado com enfraquecimento da ligação C—Hg proporcionado pela interação Hg—L-cisteína.

2.6 Biodisponibilidade de espécies elementares em alimentos

Nas últimas décadas uma ampla variedade de métodos analíticos e estudos de biodisponibilidade, interações, metabolismo e toxicidade foram desenvolvidos para a avaliação de espécies de Hg em alimentos. Apesar deste tipo de pesquisa ainda ser objeto de muito estudo, há ainda áreas carentes pouco exploradas e elucidadas.⁹⁹

Sabe-se que cerca de 77% da produção mundial de frutos do mar é destinada ao consumo humano.¹⁰⁰ Desta, uma proporção considerável sofre algum tipo de tratamento de preparo de cocção antes de ser ingerido na dieta. Durante o processo de cocção, é comprovado que o emprego de altas temperaturas levam à degradação e/ou solubilização de muitos nutrientes, vitaminas e lipídeos.¹⁰¹⁻¹⁰² Ou seja, qualquer composto presente no alimento (macronutriente, micronutriente ou um contaminante) pode ser afetado pelo calor, pH e/ou força iônica presente na etapa de cocção.

Muitos pesquisadores têm abordado os riscos de envenenamento de CH_3Hg^+ através do consumo de peixes, sendo que a maioria dessas informações são baseadas em estudos feitos com peixes crus. No entanto, o conhecimento das espécies de Hg disponíveis em peixe cru pode ser um resultado não representativo do que é realmente ingerido na dieta.

Morgan *et al.*¹⁰³ estudaram o efeito da concentração de Hg em peixes amplamente consumidos nos Estados Unidos da América frente a processos popularmente usados na região no preparo culinário de peixes (fritura, assagem, cozimento e defumagem). A concentração de Hg total foi maior após todos os procedimentos de cocção. No entanto, eles concluíram que este aumento ocorreu devido à perda de umidade e gordura durante cada processo de cocção, indicando que a concentração de Hg manteve-se constante.

Torres-Escribano *et al.*¹⁰⁴ avaliaram a bioacessibilidade de Hg em 4 espécies de peixes predadores bastante consumidos na Espanha após o processo de assagem. O teste de bioacessibilidade foi desenvolvido por digestão gastrointestinal *in vitro*. Neste estudo não foram observadas perdas de Hg total após o processo de assagem. No entanto, o Hg bioacessível foi reduzido significativamente após a assagem (de $42 \pm 26\%$ na amostra cru para $26 \pm 16\%$ na amostra assada). A determinação de Hg total foi realizada por CVG-AFS. O LD do método analítico foi de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$.

Farias *et al.*¹⁰⁵ avaliaram o efeito de 3 diferentes processos de cocção (cozido, assado e frito) na concentração de Hg total em 12 espécies de peixes do rio Amazonas. A determinação do Hg total foi realizada pela técnica de CVG-AAS. Para alguns peixes, os resultados de Hg total entre o peixe cru e depois da cocção mostraram variações de concentração significativas. Os processos de fritura e cozimento resultaram em maiores perdas de Hg para peixes detritívoros e carnívoros, e para o processo de assagem foi observada maior perda de Hg para peixes onívoros e herbívoros.

Recentemente (2011), Moreda-Piñero *et al.*⁹⁹ descreveram uma visão geral da importância de métodos analíticos que visam estudar não somente a concentração de contaminantes em alimentos, mas também estudar a bioacessibilidade e biodisponibilidade destes frente a digestões gastrointestinais *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, eles consideraram a necessidade da avaliação do efeito de processos de cocção de alimentos frente a bioacessibilidade, biodisponibilidade, estabilidade, e transformações de espécies químicas durante testes *in vivo* e *in vitro*. Neste estudo eles frisaram que a biodisponibilidade e bioacessibilidade de espécies de As, Se e Hg são afetados pela matriz da amostra, processos de tratamento (como o cozimento), e as condições experimentais aplicadas para a digestão gástrica e intestinal (pH, temperatura e tempo de

residência). Finalmente, eles ressaltaram que as condições de análise de especiação (preparo de amostra, separação e detecção) devem ser avaliadas e otimizadas para estas novas pesquisas.

Devesa *et al.*¹⁰⁶ estudaram o efeito da temperatura de cocção na conversão de espécies de As orgânico em frutos do mar. Foram avaliados três processos de cocção (assado, frito e grelhado) com diferentes temperaturas. As espécies foram extraídas com metanol e água e separadas por LC em colunas de troca iônica. Os resultados obtidos mostraram que em todas as amostras estudadas, a concentração do íon tetrametilarsênio (TMA^+) foi maior após o processo de cocção, possivelmente devido à degradação térmica da arsenobetaína (AB). A toxicidade de As no organismo humano depende da forma química que ele se encontra. O TMA^+ é considerada uma das espécies orgânicas mais tóxicas de As, enquanto a AB praticamente não apresenta toxicidade. Os autores concluíram que apesar de As estar presente majoritariamente na forma menos tóxica (AB) em frutos do mar, o processo de cocção pode alterar essa forma para uma forma mais tóxica e assim aumentar o risco à saúde para o consumidor.

Health *et al.*¹⁰⁷ efetuaram um trabalho envolvendo a análise de especiação de As na dieta humana avaliando o balanço de massa. O experimento foi conduzido por 10 dias com dois voluntários. Foi monitorada a quantidade de As na água de consumo, alimentos, além da urina, para construir o balanço de massa de As absorvido e excretado na dieta. Neste estudo, foi observado que cerca de 58 e 69% do As ingerido na dieta do primeiro e segundo voluntário, respectivamente, eram excretados pela urina, majoritariamente na forma de ácido dimetilarsênico (DMA). Os autores concluíram que o estudo proposto pode ser aplicado como uma ferramenta para um melhor esclarecimento de quais espécies químicas são metabolizadas e/ou transformadas no organismo humano através da dieta.

Laird *et al.*⁹⁰ realizaram um estudo avaliando a biodisponibilidade de espécies de Hg na dieta humana após um experimento *in vitro* de uma digestão gastrointestinal. Eles simularam a digestão de 16 tipos diferentes de alimentos e analisaram a concentração de Hg total por CVG-AAS, enquanto as espécies de Hg foram determinadas por LC-CVG-AFS. Para a extração das espécies de Hg foi utilizado uma solução complexante contendo tioureia ($\text{CS}(\text{NH}_2)_2$) e um ácido lixiviante (HCl). Neste estudo eles demonstraram que a quantidade de Hg biodisponível é independente da quantidade original no alimento. Adicionalmente, os

resultados indicaram uma conversão de CH_3Hg^+ para Hg^{2+} , provavelmente devido à influência de microrganismos desmetiladores presentes na digestão gastrointestinal.

Entretanto, até o momento, a maioria dos estudos avaliando Hg em peixes foi desenvolvida em peixes crus, e as poucas pesquisas envolvendo a avaliação de Hg sobre o efeito de processos de cocção, envolvem somente a determinação total deste, e não possuem conclusões claras.

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em seis diferentes espécies de peixes após diferentes tratamentos culinários.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são descritos os métodos de tratamento culinário ao qual as amostras foram submetidas, assim como as otimizações do método de especiação empregados para a avaliação do comportamentos das espécies de Hg por LC-CVG-ICP-MS.

3.1 Instrumentação

A análise de especificação de Hg foi feita usando a LC-CVG-ICP-MS. A ilustração do sistema utilizado pode ser observada na Figura 5.

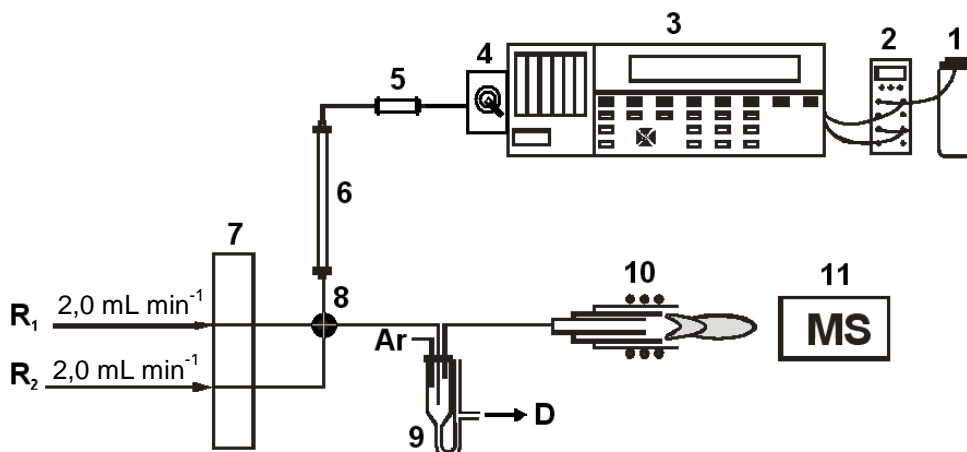


Figura 5. Esquema do sistema LC-CVG-ICP-MS (adaptado de Moreira, C.¹⁰⁸). R₁. Solução acidificante (HCl 1 mol L⁻¹), R₂. Solução redutora [NaBH₄ 0,2% (m/v)]; D. Descarte; 1. Fase móvel (L-cisteína 0,1% (m/v); 2. Degaseificador a vácuo; 3. Bomba cromatográfica; 4. Injetor e alça de amostragem (200 µL); 5. Pré-coluna C18 (4 x 3 mm); 6. Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), 7. Bomba peristáltica; 8. Confluência; 9. Separador gás-líquido; 10. Tocha e plasma; 11. Espectrômetro de massa.

Para a separação das espécies de Hg, utilizou-se um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para LC (modelo Series 200, PerkinElmer) equipado com uma válvula injetora Rheodyne (modelo 7725i, EUA), uma alça de amostragem de poli(etercetona) (PEEK) com capacidade de 200 µL, um degaseificador a vácuo (modelo Series 200 Vacuum Degasser, PerkinElmer, EUA). Para a separação das espécies de Hg, uma coluna de fase reversa Supelco (Discovery C18, 250 x 4 mm, 5 µm de diâmetro de partícula) e uma pré-coluna (Phenomenex, C18, 4 x 3 mm) foram utilizadas. A vazão da fase móvel foi mantida em 1,0 mL min⁻¹, em condição isocrática. A injeção das soluções na alça de amostragem do cromatógrafo foi feita com uma seringa com capacidade para 1,0 mL, munida com um filtro de membrana descartável de PTFE (0,45 µm). Foram utilizados tubos de PEEK (Upchurch Scientific, EUA) com 254 µm de diâmetro interno para conectar a coluna cromatográfica com a bomba do LC.

Com auxílio de uma confluência de acrílico, a saída da coluna de LC foi conectada a um sistema contínuo de geração de vapor químico (CVG). Uma bomba

peristáltica de oito canais (Gilson MiniPlus 3, França), foi utilizada juntamente com tubos de Tygon para a propulsão das soluções através da tubulação de PTFE (i.d. = 0,8 mm) até o separador gás-líquido (L = 10 cm; i.d. = 1,5 cm), confeccionado em vidro no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da UFSM.

Tabela 2. Condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS.

Parâmetros	Condições
LC	
Coluna	C18 (250 mm × 4 mm, 5 µm)
Fase móvel (L-cisteína), % (m/v)	0,1 (pH 4,0) (1,0 mL min ⁻¹)
Volume de injeção, µL	200
CVG	
Solução acidificante (HCl), mol L ⁻¹	1,0 (2,0 mL min ⁻¹)
Solução redutora (NaBH ₄), % (m/v)	0,2 (2,0 mL min ⁻¹)
Vazão do gás de arraste (Ar), L min ⁻¹	1,12
ICP-MS	
Potência do gerador de RF, W	1300
Gás principal, L min ⁻¹	15
Gás auxiliar, L min ⁻¹	1,2
Cone de amostragem e "Skimmer"	Pt
m/z monitorado	202
"Dwell time", ms	250
Lente iônica	"Auto lens off"
Modo de medida	"Peak hopping"
Modo de operação do detector	"Dual"

O vapor das espécies de Hg geradas foi introduzido diretamente no equipamento de ICP-MS por um fluxo de argônio (99,998% de pureza, *White Martins*, Brasil). O controle da vazão de argônio foi feito através do *software* do equipamento de ICP-MS, uma vez que é o mesmo gás usado como gás de nebulização, quando o sistema de nebulização convencional é utilizado.

A determinação de Hg foi feita em um ICP-MS da PerkinElmer SCIEX (modelo ELAN[®] DRC II, EUA). A avaliação e os ajustes das condições de operação do instrumento de ICP-MS foram feitos de modo a se obter a maior razão sinal/ruído

para Hg (usando ^{202}Hg). As condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS são mostradas na Tabela 2.

Para a determinação de Hg total utilizou-se um sistema de injeção em fluxo com geração química de vapor acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FI-CVG-ICP-MS). Este sistema foi desenvolvido no próprio laboratório. A Figura 6 representa um esquema do sistema FI-CVG-ICP-MS usado neste trabalho.

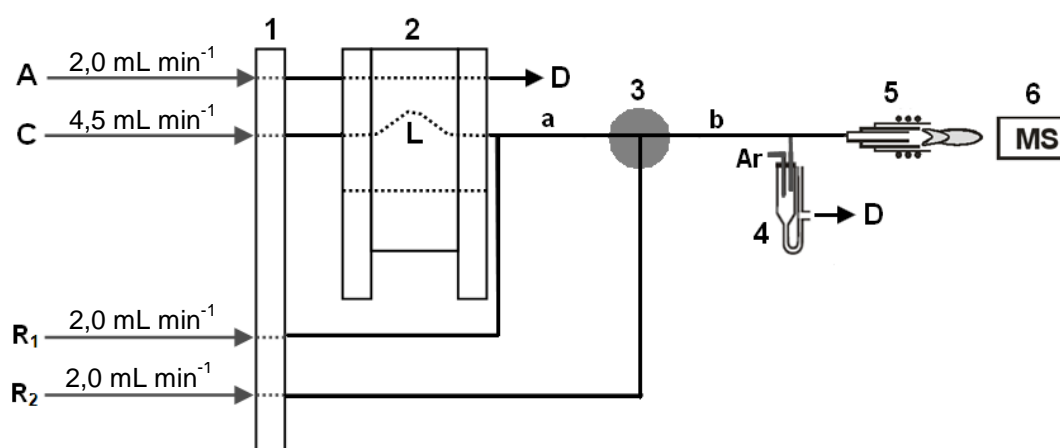


Figura 6. Esquema do sistema FI-CVG-ICP-MS (adaptado de Moreira, C.¹⁰⁸). A. Amostra; C. Carregador da amostra (H_2O); R_1 . Solução acidificante (HCl 1 mol L^{-1}), R_2 . Solução redutora [NaBH_4 0,2% (m/v)]; L. Alça de amostragem ($100 \mu\text{L}$); D. Descarte; a. 10 cm; b. 40 cm; 1. Bomba peristáltica; 2. Injetor-comutador; 3. Confluência; 4. Separador gás-líquido; 5. Tocha e plasma; 6. Espectrômetro de massa.

3.2 Materiais diversos

Todas as pesagens foram feitas em balança analítica Shimadzu (modelo AY220, Filipinas) com resolução de 0,0001 g.

Para o processo de cozimento e fritura foram utilizados béqueres de vidro borossilicato de 600 mL munidos com tampas de vidro relógio. Uma chapa aquecedora Marconi (modelo MA 239, Brasil) foi usada para aquecer os béqueres para o processo de cocção das amostras.

O processo de assagem foi feito em estufa Nova Ética (modelo 400/2ND, Brasil), utilizando assadeira de vidro com grelha de vidro, ambos desenvolvidos no próprio laboratório.

A secagem e a cominuição das amostras de peixes foram feitos em liofilizador Terroni (modelo LH2000/3, Brasil) e moinho criogênico Spex Certiprep[®] (modelo 6750 Freezer/Mill, EUA). Após a cominuição, as amostras foram armazenadas sob refrigeração e ao abrigo de luz.

Uma centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Brasil) com capacidade para 16 frascos de 15 mL ou 4 frascos de 50 mL foi utilizada para a centrifugação das soluções das amostras após as extrações.

Para os ajustes de pH da fase móvel foi utilizado um potenciômetro digital Metrohm (modelo 781 pH/Ion Meter, Suíça) com resolução de 0,01 unidades de pH.

A decomposição das amostras de peixes para a determinação de Hg total foi feita em forno de micro-ondas Multiwave 3000[®] (Anton Paar, Áustria) equipado com oito frascos de quartzo de 80 mL de capacidade, operando sob condições máximas de 280 °C e 80 bar de temperatura e pressão, respectivamente.

Os extratos e as soluções decompostas das amostras foram acondicionados em frascos de polipropileno (Sarstedt, Alemanha) com fundo cônico, graduados, com capacidade máxima de 15 mL e/ou 50 mL.

Toda vidraria utilizada neste trabalho foi descontaminada com solução de HNO₃ 3 mol L⁻¹ por um período de 24 horas e, posteriormente, enxaguada com água ultra-pura.

O *software* Chromera (PerkinElmer, versão 1.2, 2006) foi utilizado para a integração da área dos sinais cromatográficos obtidos durante a etapa de análise de especiação química das espécies de Hg.

O *software* ACD/ChemSketch versão 8.0 foi utilizado para desenhar as estruturas moleculares presentes neste trabalho.

3.3 Reagentes

A água utilizada foi previamente destilada, deionizada em uma coluna de troca iônica e purificada em um sistema Milli-Q[®] (Millipore, EUA), com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm. Ácido nítrico concentrado (65%, Merck, Alemanha) e HCl concentrado (36%, Merck) foram purificados em um sistema *sub-boiling* Milestone (modelo duoPUR[®] 2.01E, Itália).

A solução estoque de Hg^{2+} (1000 mg L^{-1}) foi preparada a partir de uma solução Titrisol[®] (Merck, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, com $1000 \pm 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg). A solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de CH_3Hg^+ foi preparada a partir da dissolução de CH_3HgCl (Aldrich, EUA) em metanol e armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz. Soluções estoque de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg em $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir das soluções estoque de 1000 mg L^{-1} . Estas soluções foram armazenadas (por no máximo 15 dias) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegidas da luz. Soluções apropriadas de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição das soluções de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg em solução de L-cisteína 0,6%.

O material de referência certificado (CRM) de peixe DORM-2 (Dogfish muscle) foi obtido do NRC - *National Research Council Canada*, (Ottawa, Canadá).

A solução de condimento contendo sal foi preparada a partir de NaCl (Merck, Alemanha) em água e suco de limão. Com o objetivo de se evitar valores de brancos altos, o suco de limão foi filtrado e a concentração de Hg total foi determinada antes de ser utilizado.

As soluções de HCl foram preparadas a partir da diluição do ácido concentrado em água. As soluções de tetraidroborato de sódio (NaBH_4) (Vetec, Brasil) 0,1% (m/v) foram preparadas diariamente pela dissolução do reagente sólido em solução de NaOH (Merck) 0,05% (m/v).

A fase móvel foi preparada diariamente pela dissolução do reagente L-cisteína.HCl.H₂O (Vetec, Brasil) em água.

Uma solução de metanol grau HPLC (Carlo Erba, Itália) a 20% (v/v) foi preparada pela diluição do solvente em água e utilizada para a limpeza diária e estocagem da coluna cromatográfica C18.

3.4 Otimização das condições de operação do sistema LC-CVG-ICP-MS

Tendo-se em vista a obtenção da melhor razão sinal/ruído para o isótopo ^{202}Hg , a concentração da solução de NaBH_4 foi variada entre 0,05 e 1,00% (m/v), mantendo-se a concentração de NaOH em 0,05% (m/v). A influência da vazão de Ar sobre o sinal analítico do ^{202}Hg foi avaliada entre 0,95 e $1,25 \text{ L min}^{-1}$.

Baseado em trabalhos anteriores^{95,98}, optou-se pela fase móvel L-cisteína 0,1%, pois esta conferiu desde o primeiro ensaio uma boa resolução dos picos em

um tempo relativamente curto. Dessa forma, foi otimizada somente a vazão da fase móvel.

3.5 Amostra

Para o desenvolvimento deste estudo, seis espécies de peixe foram adquiridas no mercado local. Para a escolha das espécies de peixes foram considerados diferentes teores de proteína e gordura, além da popularidade das mesmas pelos consumidores. Uma representação da morfologia externa, juntamente com os nomes de cada uma destas espécies está mostrada na Figura 7.

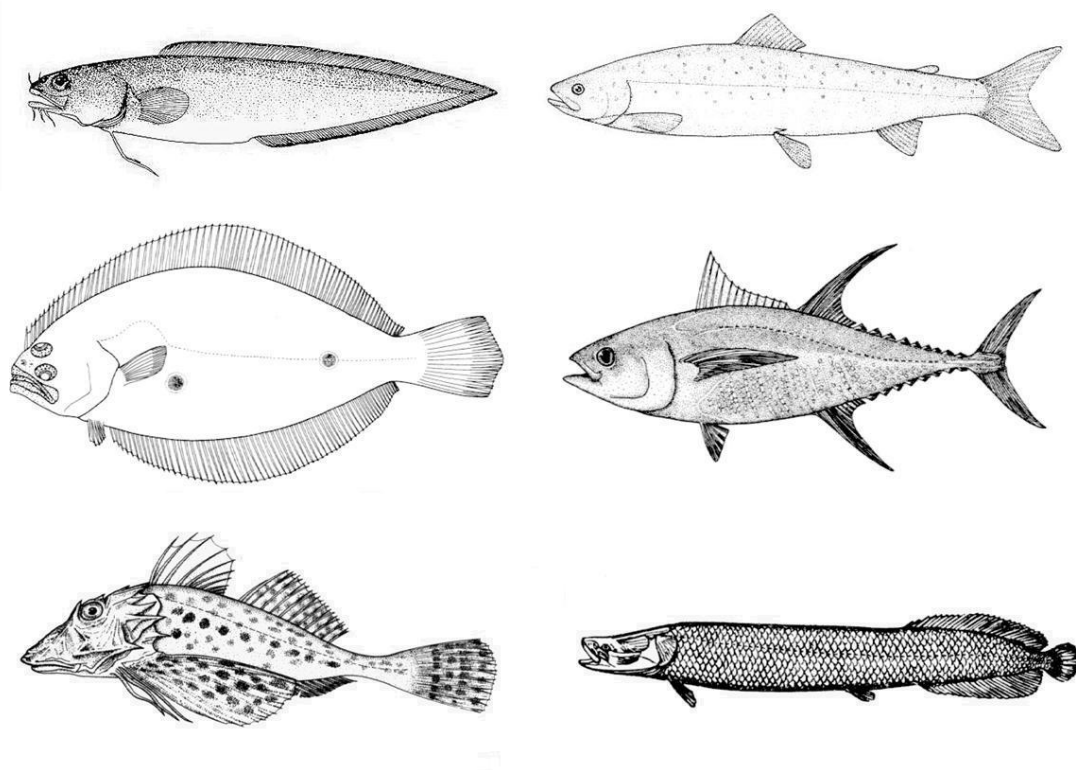


Figura 7. Representação da morfologia externa das espécies de peixes utilizadas para a avaliação do comportamento das espécies de Hg frente a diferentes métodos de cocção. (a) Abrótea (*Brotula barbata*); (b) Salmão (*Salmo salar*); (c) Linguado (*Paralichthys patagonicus*); (d) Atum (*Thunnus albacares*); (e) Cabrinha (*Prionotus punctatus*) e (f) Pirarucu (*Arapaima gigas*).¹⁰⁹

3.6 Tratamento preliminar da amostra para os processos de cocção

Primeiramente, cerca de 2 kg de músculo de cada espécie de peixe foi homogeneizado com auxílio de um liquidificador. Cada amostra homogeneizada foi fracionada em quatro contraprovas afim de manter as mesmas condições de congelamento e descongelamento, caso fosse necessário uma repetição de algum procedimento. Para o acondicionamento, as amostras foram congeladas a -20 °C em embalagens de polietileno.

Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 216 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹¹⁰ que dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços da alimentação, as amostras foram descongeladas ao abrigo de luz em refrigerador em torno de 4 °C sempre 24 horas antes do início dos procedimentos de cocção.

3.7 Caracterização da amostra

Inicialmente foi feita uma caracterização dos macronutrientes presentes em cada amostra de músculo de peixe pré-homogeneizado. Foram determinados o teor de umidade por secagem a 105 °C até peso constante (AOAC, 1990¹¹¹), lipídeos pelo método de Bligh and Dyer¹¹², proteína por Kjeldahl (AOAC, 1984¹¹¹) e cinzas por calcinação em mufla à 550 °C (AOAC, 1990¹¹¹). Além da determinação dos macronutrientes, foram determinadas, também, as concentrações de alguns micronutrientes e contaminantes por decomposição por via úmida em sistema fechado e determinação de metais (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Sr, Ti, V, Zn e Pb) e não-metals (As, P, Sb, S, Se) por ICP-OES e ICP-MS.

3.8 Processo de cocção

3.8.1 Critérios para a seleção da massa, volume, ingredientes e recipientes

Para a avaliação do comportamento das espécies de Hg frente a diferentes processos de preparo de cocção, foi necessária a padronização da massa e volume de cada amostra. Para isso, massas de amostra homogeneizada de 20 ± 2 g foram

moldadas em porções com tamanho aproximado de 5 × 3 × 1 cm. Para a moldagem, as amostras foram pressionadas manualmente em uma embalagem de polietileno.

As amostras de peixe foram avaliadas de acordo com 3 diferentes processos de cocção (cozido, frito e assado) e na forma crua (*in natura*). Investigou-se, também, a influência do uso de condimentos no preparo do peixe. Estes tratamentos culinários utilizados neste trabalho são comuns no preparo de peixes na culinária internacional.

Desta forma, foram avaliadas as 6 diferentes amostras de peixe, em 4 diferentes processos de preparo (cru, cozida, frita e assada), sendo que cada processo teve 3 variáveis: *i*) sem adição de condimentos; *ii*) com adição de sal; e *iii*) com adição de sal e suco de limão. Totalizando 12 tipos de preparos diferentes por cada espécie de peixe.

A quantidade de sal e suco de limão adicionados foram baseadas em receitas culinárias tradicionais. Todas as porções de amostras foram pesadas primeiramente em vidro relógio para a adição dos condimentos, e essa etapa foi efetuada sempre 20 min antes de cada processo.

Para uma melhor distribuição do sal na amostra, preparou-se uma solução de 200 mg L⁻¹ de NaCl em água e outra solução de 200 mg L⁻¹ de NaCl em suco de limão previamente filtrado. Estas soluções foram adicionadas sempre 20 min antes de cada processo de cocção na proporção de 150 µL g⁻¹ de amostra.

Optou-se pelo uso de recipientes de vidro para todos os processos com o objetivo de padronizar o tipo de material, facilitar a limpeza, e minimizar possíveis adsorções de Hg com metais provenientes de recipientes metálicos ou cerâmicos. Um outro fator é que, dentre os recipientes usados comumente para o preparo de alimentos, o vidro é o que confere menor transferência de contaminantes ao alimento (amostra).¹¹³⁻¹¹⁴

3.8.2 Cozimento

No processo de cozimento foram usados 150 g de água em um béquer de vidro de 600 mL (12 × 8 cm). A água foi aquecida até ebulição (≈100 °C) com auxílio de uma chapa aquecedora. Em seguida adicionou-se as 3 porções de 20 ± 2 g de músculo de peixe homogeneizado (sem adição de condimentos; com adição de sal;

e com adição de sal e suco de limão) em cada béquer e fez-se o cozimento por 10 min. Após o procedimento de cozimento, a água remanescente de cada béquer foi pesada e uma fração de 50 mL desta foi estocada para a investigação do balanço de massa das espécies de Hg.

3.8.3 Fritura

Neste processo, foram transferidas 3 alíquotas de 100 g de óleo vegetal de girassol para cada béquer de vidro de 600 mL, as quais foram aquecidas até a temperatura de 180 °C. Em seguida, foram adicionadas as 3 porções (sem adição de condimentos; com adição de sal; e com adição de sal e suco de limão) de 20 ± 2 g de músculo de peixe homogeneizado em cada béquer e procedeu-se a etapa de fritura por 5 min, virando a porção a cada 2,5 min com auxílio de um bastão de vidro. Após o procedimento de fritura, o óleo remanescente de cada béquer foi pesado e uma fração de 50 mL deste foi estocado para a investigação do balanço de massa das espécies de Hg. A Figura 8 mostra o sistema utilizado para o procedimento de cozimento e fritura.

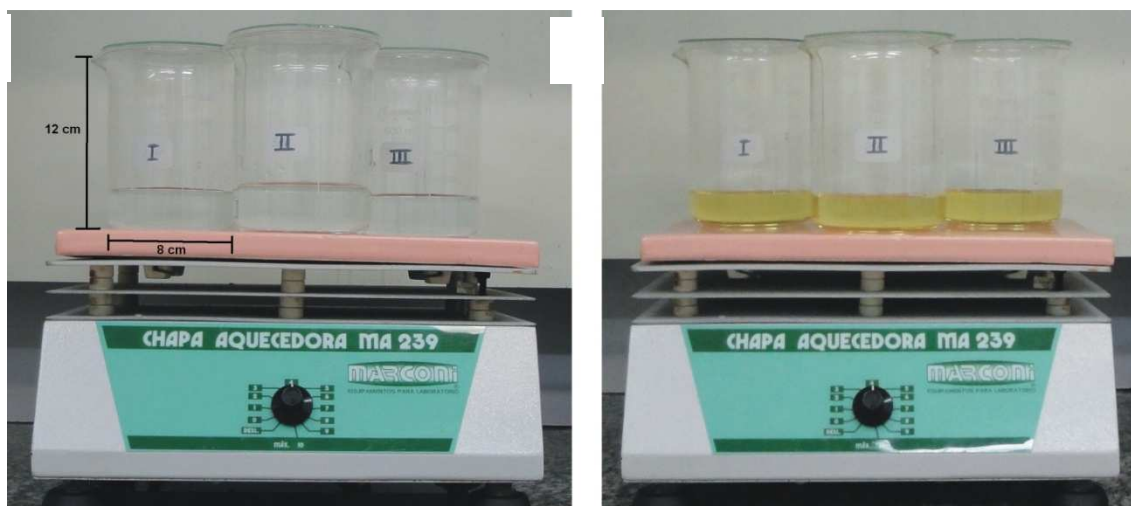


Figura 8. (a) Sistema utilizado para o processo de cozimento; (b) Sistema utilizado para o processo de fritura.

3.8.4 Assagem

Para o processo de assagem, foram adicionadas as 3 porções de músculo de peixe homogeneizado em cada assadeira provida com grelha de vidro. Em seguida, estas amostras foram encaminhadas para um forno pré-aquecido a 175 °C por 20 min. Após o procedimento de assagem, a gordura separada foi pesada e estocada para a investigação do balanço de massa das espécies de Hg. A Figura 9 mostra o sistema utilizado para o processo de assagem.



Figura 9. Sistema utilizado para o processo de assagem das amostras. Esquerda: forno estufa; Direita: assadeira de vidro provida com grelha de vidro e amostra.

3.8.5 Preparo do peixe cru

Para o preparo do peixe cru foram adicionados os condimentos (quando necessário) em cada porção 20 minutos antes de congelar a amostra para a secagem da mesma no liofilizador. O método de secagem pode ser mais bem compreendido no estudo em anexo deste trabalho (Anexo A).

Por fim, cabe ressaltar que foram otimizados o tempo de preparo de cada procedimento de cocção (cozido, frito e assado) com o objetivo de se obter um alimento (amostra) com a textura e consistência característica de cada processo. Otimizou-se o tempo de todos os testes de preparo com a amostra de linguado, utilizando massa e tamanho já pré-estabelecidos.

Na Figura 10 está representado o fluxograma das principais etapas envolvidas neste trabalho.

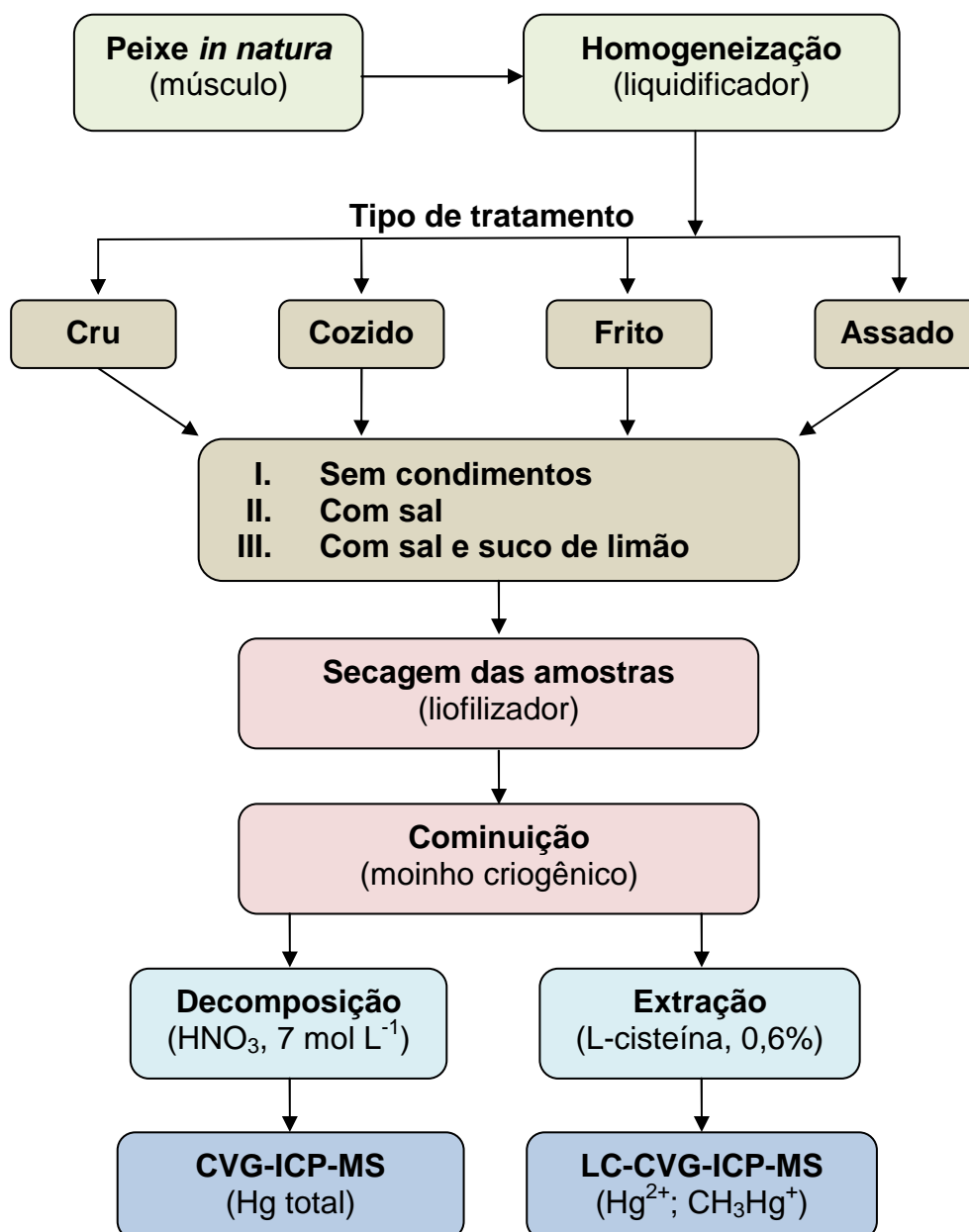


Figura 10. Fluxograma das etapas envolvidas nos processos de cocção, tratamento preliminar, preparo e análise da amostra.

3.9 Tratamento preliminar – Secagem e moagem

Após os procedimentos de cocção, todas as amostras processadas (inclusive as cruas) foram liofilizadas durante 24 h. Além de minimizar a degradação microbiana da amostra, a secagem das amostras facilitou a comparação dos resultados entre diferentes tipos de amostras, já que diferentes processos de cocção

alteram a proporção de umidade da mesma, dificultando a correlação entre os resultados.

Em seguida as amostras secas foram cominuídas em um moinho criogênico. O programa utilizado para a cominuição consistiu de uma etapa de pré-congelamento da amostra por 2 min, seguindo de uma etapa de moagem de 2,0 min a uma velocidade de 15 ips (impactos por segundo). Após a cominuição, as amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno (PP) de 15 mL e refrigeradas a 4 °C ao abrigo de luz, até o momento da análise.

Vale ressaltar que em todos os processos de cocção a temperatura foi controlada, e somente quando a temperatura atingisse o valor correspondente ao processo (100 ± 5 °C para o cozimento, 180 ± 5 °C para a fritura e 175 ± 2 °C para a assagem), o procedimento de cocção da amostra era iniciado.

3.10 Decomposição da amostra para determinação de Hg total

Para a decomposição das amostras de peixes (previamente liofilizadas e moídas), foram transferidas 200 ± 8 mg de amostra e adicionados 6 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} aos frascos de quartzo do forno de micro-ondas. Para a decomposição das amostras aquosas, como os brancos (soluções de condimentos e água) e as soluções de água dos processos de cozimento, foram transferidos $2,00 \pm 0,02$ g ao frasco de quartzo, seguida da adição de 4 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} e para a decomposição das amostras oleosas, como os brancos (óleo vegetal) e o óleo remanescente dos processos de fritura, foram transferidos $0,500 \pm 0,015$ g ao frasco de quartzo, seguida da adição de 6 mL de HNO_3 14 mol L^{-1}). Para a verificação da eficiência deste método de decomposição, a amostra de CRM DORM-2 foi decomposta (75 ± 2 mg) nas mesmas condições reacionais acima descritas para a decomposição das amostras de peixe.

Todas as misturas foram submetidas ao seguinte programa de tempo e potência da radiação micro-ondas: 5 min de rampa a 1000 W, seguido de uma etapa de 10 min a 1400 W com temperatura e pressão máximas limitada a 280 °C e 80 bar, respectivamente. Após o arrefecimento dos frascos (0 W, 20 min), a solução foi transferida para frascos graduados de polipropileno de 50 mL e o volume foi aferido

a 50 mL com água. Todas as decomposições foram efetuadas em duplicata e a determinação de Hg total foi feita por CVG-ICP-MS.

3.10.1 Determinação do teor de carbono residual remanescente na solução do extrato da amostra após decomposição

A eficácia da decomposição foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual remanescente no extrato das amostras decompostas. Esta determinação foi adaptada do procedimento descrito por Gouveia *et al.*¹¹⁵ As determinações foram feitas por ICP-OES, monitorando as linhas de emissão do carbono em 193,091 e 247,856 nm. Foi utilizado ítrio como padrão interno, o qual foi adicionado às amostras, brancos e soluções de referência a uma concentração final igual a 1,0 mg L⁻¹ e monitorada a linha de emissão 371,030 nm.

Para a determinação do carbono residual, foi necessária a remoção do CO₂ dissolvido nas soluções das amostras e referência. Deste modo, todas as amostras, brancos e soluções de referência, com o padrão interno, foram borbulhadas com um fluxo de gás inerte (Ar) durante 1 min para a remoção do CO₂ dissolvido nas mesmas.

3.11 Otimização do método de extração

Foram avaliados alguns parâmetros referentes ao procedimento de extração das espécies de Hg. Dentre estes foram avaliados: a concentração da solução extratora (monocloridrato de L-cisteína) e tempo de extração, mantendo-se fixo a massa de amostra em 80 ± 5 mg, o volume de 6 mL da solução extratora e a espécie de peixe (linguado).

Para os procedimentos de extração das espécies de Hg, cerca de 100 mg de amostra de peixe seco foram transferidos para frascos de polipropileno de 15 mL e adicionados de 6,0 mL da solução extratora nas concentrações de 0,3, 0,6, 1,0 e 1,5% (m/v) (adaptado de Hight e Cheng⁹⁷). Estas misturas foram submetidas a agitação manual por 1 min e mantida em repouso por 1 h. Em seguida, centrifugou-se a mistura e determinou-se a concentração de Hg total na fase sobrenadante por CVG-ICP-MS.

Adicionalmente, com a concentração do extrator que resultou na extração mais eficiente de espécies de Hg, foram avaliados diferentes tempos de repouso (0,5, 1, 3, 6, 12, 18, 24 e 72 h) da amostra em contato com o extrator. A partir das condições otimizadas (concentração do extrator e tempo de extração), avaliou-se, ainda, a robustez da faixa de massa de amostra (20 a 400 mg) capaz de ser empregada para uma extração eficiente.

Para a análise do extrato por LC-CVG-ICP-MS, as soluções foram centrifugadas por 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de PTFE (Chromafil Xtra) de 0,45 µm de tamanho de poro. Os brancos e soluções de referência foram preparados de maneira idêntica e todas as extrações foram efetuadas em duplicata.

3.12 Avaliação da eficiência do método de extração

A eficiência do método de extração foi avaliada através de teste de recuperação das espécies de mercúrio (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) enriquecidas nas amostras e pela determinação de Hg total e CH_3Hg^+ no material de referência certificado DORM-2. Para o enriquecimento das amostras, concentrações conhecidas das duas espécies foram adicionadas antes dos procedimentos de extração. As concentrações de cada espécie adicionadas foram escolhidas em função das concentrações das espécies naturalmente presentes na amostra e da diluição adotada para cada amostra.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os tópicos relacionados aos procedimentos de cocção, preparo de amostra e a análise de especiação química de Hg em amostras de peixes. Inicialmente é descrita a otimização dos parâmetros relacionados ao sistema LC-CVG-ICP-MS. Em seguida, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para o comportamento das espécies de Hg após os diferentes tratamentos culinários, bem como a avaliação da eficiência da extração, e avaliação dos parâmetros de mérito do método analítico utilizado.

4.1 Otimização do sistema LC-CVG-ICP-MS

4.1.1 Ajuste do instrumento de ICP-MS

Inicialmente, o instrumento de ICP-MS foi ajustado, no modo convencional de introdução de amostra (PN), com o objetivo de obter o máximo de intensidade para íons M^+ (monitorado pelo isótopo $^{115}\text{In}^+$, o qual deve ser 30.000 contagens s^{-1} , cps), mínima formação de íons M^{2+} (monitorado pela razão $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+ < 3\%$) e mínima formação de íons MO^+ (monitorado pela razão $\text{LaO}^+/\text{La}^+ < 3\%$). A determinação de Hg foi feita monitorando o ^{202}Hg , isótopo mais abundante do Hg (29,8%), por CVG-ICP-MS. Tanto a determinação total por CVG-ICP-MS, quanto a determinação das espécies por LC-CVG-ICP-MS, foram otimizadas, pela variação de parâmetros do sistema CVG, como a vazão do gás de arraste (Ar), concentração do acidificante (HCl) e concentração do agente redutor (NaBH_4). A vazão do gás de arraste foi avaliada de 0,95 a 1,25 L min^{-1} , sendo que a vazão foi fixada em 1,12 L min^{-1} , onde se obteve o sinal transiente reprodutível com a melhor razão sinal/ruído. As condições otimizadas estão apresentadas na Tabela 2 do item 3.1.

4.1.2 Ajuste dos parâmetros da separação cromatográfica – LC

Uma boa separação cromatográfica é dependente da afinidade das espécies (analito) pela fase móvel e fase estacionária (coluna cromatográfica). A coluna C18 é uma das colunas mais amplamente empregadas em análise de especiação de Hg com técnicas cromatográficas. Neste trabalho, todas as separações foram efetuadas usando uma coluna C18 como fase estacionária e uma solução de L-cisteína (0,1% m/v) como fase móvel. Essas condições foram baseadas em trabalhos de especiação de Hg que obtiveram uma boa resolução na separação das espécies de Hg.^{95,97} Essa combinação (fase móvel e fase estacionária), desde o primeiro momento, apresentou um bom desempenho na separação, ou seja, boa resolução de picos em um tempo relativamente curto (Figura 11). Desta forma, não foi avaliada outra fase móvel e/ou fase estacionária. O volume de solução injetado foi de 200 μL para todos os testes realizados. As otimizações foram feitas utilizando-se soluções de referência de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , diluídas na própria fase móvel.

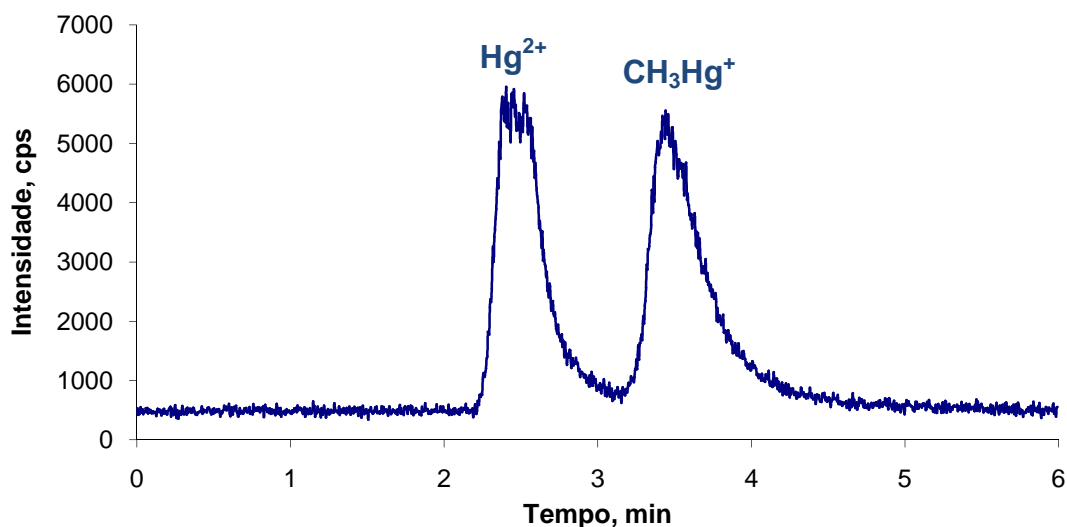


Figura 11. Cromatograma obtido a partir de uma solução contendo Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , na concentração de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) de cada espécie.

Relacionando as Figuras 11 e 12, pode se observar, que essa separação deve-se provavelmente à maior interação do grupo metila proveniente do complexo L-cisteinato de metilmercúrio (CH_3HgCys)⁸⁵ com o grupo octadecilsilano da coluna C18, o que resulta em um maior tempo de retenção para as espécies orgânicas de Hg.

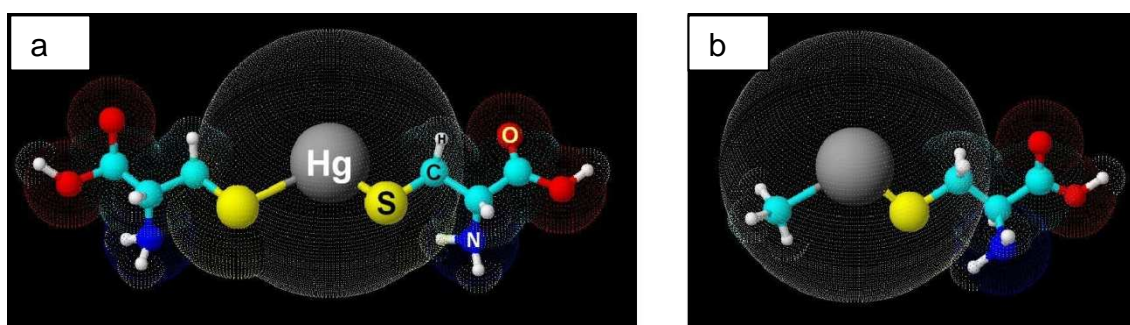


Figura 12. Representação estrutural da molécula de cisteína complexada com ambas as espécies de Hg. a) $\text{Hg}(\text{Cys})_2$; b) $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$.³³

A fase móvel utilizada mostrou-se bastante adequada para a técnica de introdução via CVG acoplada ao ICP-MS. Sabe-se que a introdução direta de soluções contendo elevados teores de carbono pode causar a instabilidade do plasma ou sua extinção, bem como formar depósitos de carbono na interface do instrumento. Além disso, soluções com alta pressão de vapor, como acetona e metanol usadas em muitas composições de fase móvel, podem ser introduzidas

juntamente com as espécies voláteis de Hg, podendo interferir no sinal do Hg, além de formarem aglomerados de carbono na interface do ICP-MS, acarretando uma perda de repetitividade entre as determinações.^{79,81,116-117} No caso da L-cisteína 0,1% (m/v), que foi empregada como fase móvel neste trabalho, este problema não é tão relevante, tendo em vista que a solução de L-cisteína apresenta baixa pressão de vapor (baixa volatilidade), portanto, o risco de transferência de carbono para o plasma é quase desprezível.

Neste trabalho também foram avaliadas vazões da fase móvel entre 0,75 à 1,25 mL min⁻¹. Observou-se que o melhor desempenho de separação foi com vazão de 1 mL min⁻¹. Em vazões acima de 1 mL min⁻¹, a pressão do sistema aumenta muito, o que pode resultar em danos à coluna cromatográfica. Além disso, nessa vazão existe um prejuízo de resolução na separação entre as espécies de Hg. Em vazões mais baixas, existe um aumento no tempo de retenção e na largura dos picos, prejudicando o limite de detecção (LD) do método. Como pode ser observado na Figura 13, o alargamento do pico é intimamente associado ao LD. Com o alargamento do pico, ocorre uma diminuição em sua altura e, conseqüentemente, seu contraste com a linha base também diminui. O alargamento relativamente mais pronunciado do sinal CH₃Hg⁺ em vazões mais baixas é devido à maior interação do grupo metila com a fase estacionária; já o alargamento do sinal do Hg²⁺ é, praticamente, imperceptível devido à inexistência de grupo orgânico com a espécie de Hg, portanto, essa espécie sai da coluna provavelmente próximo ao tempo morto da separação cromatográfica.

Para uma separação reprodutível das espécies de Hg, foi necessária uma etapa de condicionamento da coluna cromatográfica. Foi observado que a linha de base aumentava ao longo da eluição cromatográfica. Tal fato pode ser explicado pela presença de substâncias provenientes da matriz, solúveis na solução extratora e, com interações relativamente maiores com a fase estacionária que as espécies de Hg. Portanto, o condicionamento da coluna em um tempo de 5 min com a fase móvel foi necessário antes que as injeções subsequentes fossem feitas. A frequência analítica foi de 5 amostras por hora.

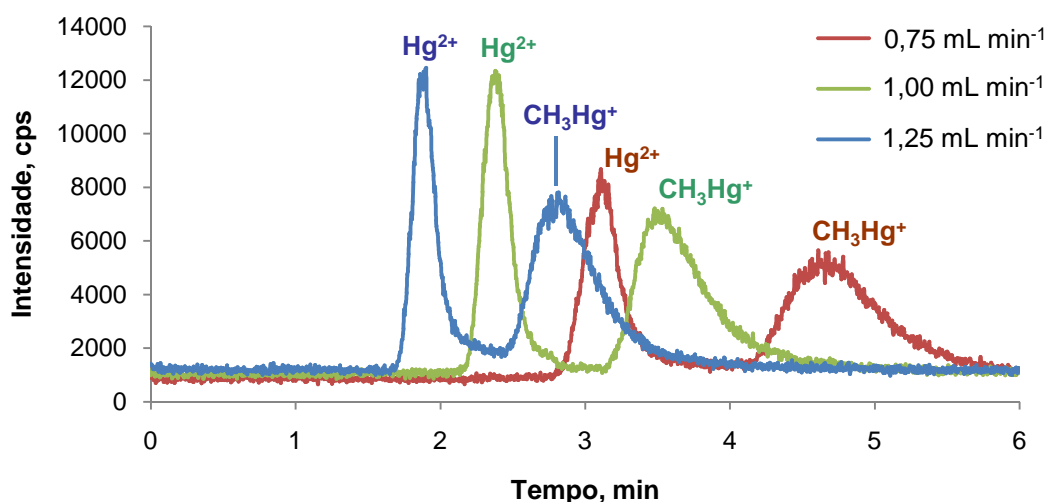


Figura 13. Influência da vazão da fase móvel (L-cisteína 0,1% m/v) na separação das espécies de Hg com a coluna C18. Cromatogramas de uma amostra de peixe tainha (*Mugil brasiliensis*) enriquecida com 15 ng g^{-1} (como Hg) de ambas as espécies de Hg.

Foi avaliada, ainda, a influência da concentração do agente redutor sobre a cinética de geração química de vapor das espécies de Hg. Portanto, a concentração do NaBH_4 foi avaliada de 0,05 até 1% (m/v), com o objetivo de alcançar a máxima intensidade de geração de espécies voláteis no sistema de CVG. Dentre essas condições, a concentração que apresentou o perfil de sinal mais estável, com boa reprodutibilidade e eficiência na redução das espécies de Hg foi a concentração de 0,2% (m/v) de NaBH_4 . A geração química de vapor das espécies de Hg estudadas ocorre através da formação de Hg^0 e CH_3HgH a partir de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , respectivamente. No entanto, de acordo com os estudos Wang Z-h *et al.*⁹⁸, a redução do CH_3Hg^+ complexado com L-cisteína ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$) com BH_4^- deve ser pela conversão direta a Hg^0 . Desta maneira, a introdução de Hg no plasma seria da mesma forma para ambas as espécies de Hg. Neste trabalho, as áreas integradas das espécies de Hg não apresentaram diferenças significativas ($t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, $\alpha = 0,05$) entre si, mostrando que a eficiência de introdução de ambas as espécies foi a mesma. No entanto, para afirmar que essa mesma eficiência de introdução é devida à conversão direta de ambas as espécies de Hg a Hg^0 , seria necessário utilizar uma outra técnica que não utilizasse uma fonte de energia térmica ou eletromagnética (UV) que pudesse causar a quebra da ligação C–Hg da molécula CH_3HgH . Essa técnica poderia ser a CVG-AAS.

4.2 Otimização da etapa de extração

Em análise de especiação de Hg, a composição da solução extratora é considerada o fator mais importante na eficiência de extração das espécies. Ela deve ser capaz de extrair quantitativamente as espécies de Hg, sem que haja perda de identidade das espécies. Além disso, a solução extratora deve ser de preferência solúvel na fase móvel da LC. Dessa forma, por agregar estas características, a L-cisteína foi selecionada como solução extratora para o estudo em questão.

4.2.1 Escolha da concentração da solução extratora

O efeito da concentração de L-cisteína sobre a eficiência de extração das espécies de Hg também foi avaliado. Para isso, utilizou-se cerca de 80 ± 5 mg de amostra liofilizada de peixe linguado e manteve-se o volume de extrator fixo em 10 mL, variando-se apenas a concentração de L-cisteína de 0,3 a 2,0% (m/v). A Figura 14 mostra a eficiência de recuperação da concentração total de Hg na fase sobrenadante de cada extrato. A eficiência de extração do extrator mostrou-se praticamente constante para todas as concentrações avaliadas. Foram observados valores um pouco subestimados quando uma solução de 0,3% (m/v) de L-cisteína foi utilizada, o qual apresentou uma eficiência de extração de $93,6 \pm 1,9\%$. No entanto, para todas as demais condições, uma eficiência superior a 97% foi observada. Sendo assim, a concentração 0,6% de L-cisteína foi selecionada como adequada e usada em todo o trabalho.

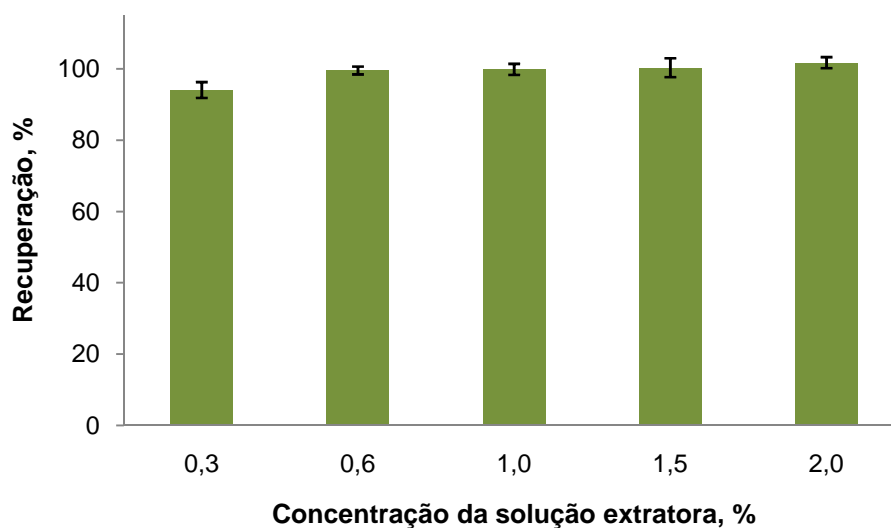


Figura 14. Recuperação de Hg total na fase sobrenadante do extrato em diferentes concentrações do extrator (L-cisteína).

4.2.2 Avaliação do tempo de extração

Para a avaliação do tempo de extração que resultasse em uma recuperação quantitativa, foram utilizados cerca de 80 ± 5 mg de amostra liofilizada de peixe abrótea em L-cisteína 0,6% (m/v), conforme otimização descrita no item 4.2.1. Foram avaliados diferentes tempos de contato da amostra com a solução extratora, variando de 30 min até 72 h de contato. Na Figura 15 está apresentada a influência do tempo de extração sobre a eficiência de extração das espécies de Hg.

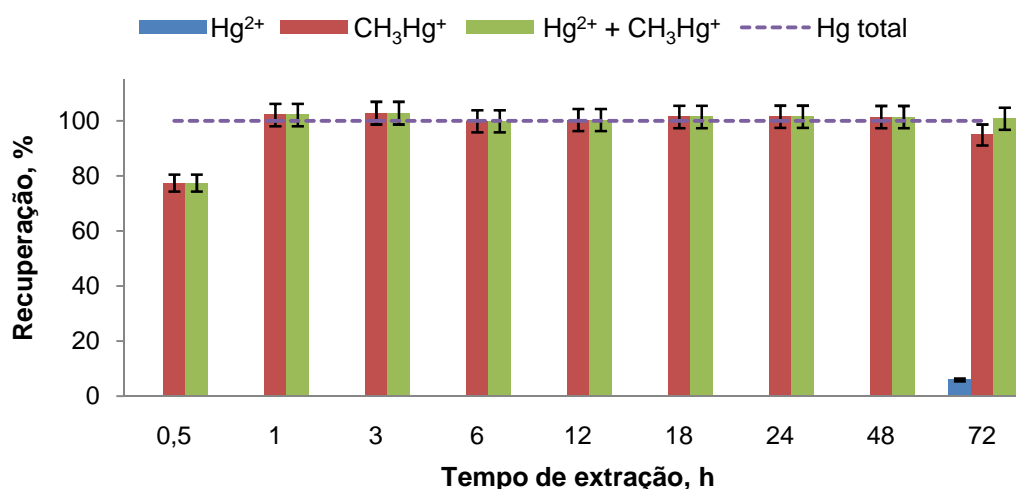


Figura 15. Influência do tempo de repouso sobre a eficiência de extração das espécies de Hg.

No gráfico da Figura 15 é possível observar uma faixa de tempo de extração onde praticamente a mesma eficiência pode ser observada nos tempos de extração de 1 a 48 h, a qual apresentou uma boa repetitividade e exatidão (< 3%). O único tempo de extração que apresentou eficiência de extração relativamente baixa, em torno de 77%, foi 30 min. Eficiências de aproximadamente 100% puderam ser observadas para todos os demais tempos de extração, a partir de 1h. No entanto, a força de interação das espécies de Hg em outras matrizes de amostra de peixe pode ser diferente e, conseqüentemente, a eficiência de extração também pode ser dependente desta. Então, a fim de garantir uma melhor robustez do método de extração, limitou-se a faixa de tempo para 6 a 24 h. Um efeito interessante pode ser observado no tempo de 72 h, onde o CH_3Hg^+ foi parcialmente convertido à Hg^{2+} . Porém, dois fatores que poderiam influenciar esta degradação, foram precavidos (o extrato foi mantido em repouso em temperatura ambiente e ao abrigo da luz). Um fator que poderia influenciar esta conversão seria a possibilidade da presença e crescimento de microrganismos desmetiladores provenientes do ambiente e/ou materiais utilizados para a etapa de extração.⁶²

4.2.3 Efeito da massa de amostra na eficiência de extração das espécies de Hg.

A eficiência de extração das espécies de Hg foi avaliada com a utilização de diferentes massas de amostra. Para este estudo, foi utilizada uma amostra liofilizada de abrótea. As condições previamente otimizadas nos itens 4.2.1 e 4.2.2 foram mantidas para este estudo. Foram avaliadas massas de amostra na faixa de 20 a 400 mg, sendo que massas acima de 400 mg não foram possíveis de serem injetadas no sistema cromatográfico, devido a impossibilidade da passagem do extrato através da membrana (PTFE de 0,45 μm de diâmetro de poro) utilizada previamente à injeção no sistema cromatográfico. Na Figura 16 estão apresentados os resultados de recuperação de Hg total em diferentes massas de amostra.

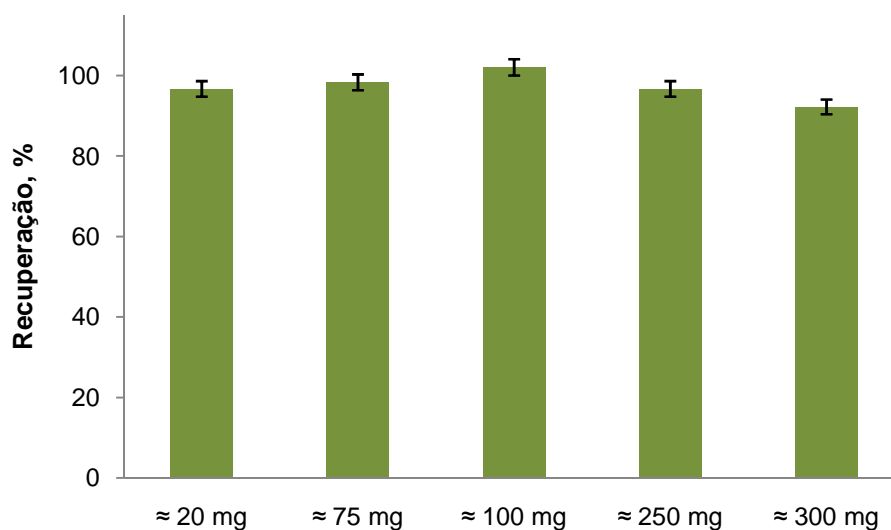


Figura 16. Eficiência de extração de Hg em diferentes faixas de massas de amostra (n = 2).

Conforme os resultados apresentados na Figura 16, observa-se que a concentração de L-cisteína é suficiente para a extração quantitativa de Hg até na faixa de massa mais alta avaliada (300 mg). Apesar de a extração nesta faixa de massa ter sido quantitativa¹¹⁸ (> 92% de recuperação), esta não foi utilizada, pois com a injeção desta faixa de massa no sistema cromatográfico, ocorre um aumento relativamente alto na pressão do sistema devido, possivelmente, a solubilização da matriz da amostra no extrato, como gordura e/ou proteína. Portanto, com o objetivo de evitar a depreciação rápida da vida útil da coluna cromatográfica, a faixa de massa de amostra utilizada para o procedimento de extração foi de 25 a 175 mg. Esta faixa de massa de amostra foi estimada com o fim de propor um método de extração mais versátil, ou seja, para amostras com teores baixos de Hg, pode-se utilizar massas maiores de amostra e, para amostras com teores altos de Hg, pode-se utilizar massas menores. No entanto, massas menores que 25 mg podem comprometer a representatividade da amostra, além de aumentar a incerteza de medição na etapa de pesagem.¹¹⁹

Na Figura 17 é mostrado o aspecto do extrato antes e após as etapas otimizadas dos itens 4.2.1, 4.2.2, e 4.2.3. Oitenta miligramas de amostra foram completamente dispersos na solução extratora após uma agitação manual do tubo graduado. Com o objetivo de maximizar a interação do extrator com a amostra, os tubos foram mantidos na posição horizontal durante o tempo de 6 a 24 h. Com este procedimento, aumentou-se a dispersão e, conseqüentemente, a interação do complexante (L-cisteína) com as espécies de Hg na matriz.

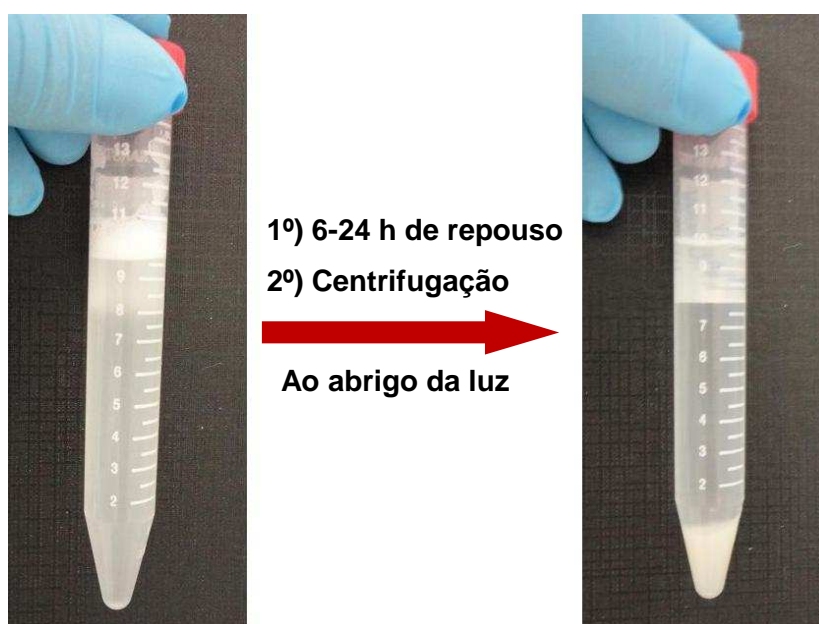


Figura 17. Aspecto do extrato antes e após a etapa de extração das espécies de Hg em amostra liofilizada de peixe.

4.2.4 Ensaios de recuperação de analito

Para avaliar a recuperação das espécies de Hg nas diferentes matrizes de amostra, foram adicionadas diferentes concentrações de ambas as espécies de Hg sobre cada amostra liofilizada. A concentração adicionada foi dependente da concentração original de Hg já presente em cada amostra. Conforme mostrado na Tabela 3, a recuperação das espécies de Hg foram quantitativas, demonstrando que a matriz não exerce influência significativa na etapa de extração.

Tabela 3. Resultados do ensaio de recuperação de analito nas amostras de peixes (CRU1).

Amostra	Recuperação (%)	
	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺
Abrótea	97	102
Atum	98	105
Cabrinha	96	102
Linguado	100	98
Pirarucu	98	108
Salmão	97	96

Adicionalmente, foi avaliada a exatidão do método através da análise do CRM, DORM-2. Concordâncias acima de 97% e desvio padrão relativo abaixo de 5,5% foram obtidas para a espécie CH_3Hg^+ e Hg total.

4.3 Parâmetros de mérito do método de especificação de Hg empregado

As espécies de Hg foram completamente separadas em 6,0 min com uma resolução maior que 2 entre os dois sinais analíticos de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . Em análises quantitativas usando técnicas cromatográficas, a resolução mínima requerida é 1,5 para todos os analitos,¹²⁰ ou seja, o método de separação empregado é relativamente rápido e eficiente. A quantificação das espécies de Hg foi conduzida por calibração externa (faixa de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg)), usando a área do sinal analítico de ambas as espécies de Hg para a integração do sinal. A curva de calibração analítica apresentou uma ótima correlação linear ($R^2 > 0,999$) para ambas espécies. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir do critério 3C e 10C , respectivamente, onde o C corresponde ao erro padrão da regressão linear da curva de calibração.¹²¹⁻¹²³ Limites de detecção de 1,7 e 2,3 ng g^{-1} foram obtidos para o Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , respectivamente. Além disso, o método apresentou uma faixa de robustez de 25 a 175 mg e 1 a 48 h para massa e tempo, respectivamente.

4.4 Otimização dos processos de cocção

Neste trabalho, levou-se em consideração a necessidade da padronização de alguns parâmetros envolvidos durante os processos de cocção. Conforme descrito no item 3.8.1, a massa, volume, ingredientes e recipientes empregados durante o processo de cocção, foram todos padronizados com o objetivo de melhor comparação entre o efeito do processo de cocção nas espécies de Hg. Vale ressaltar, que todas as etapas envolvendo o processo de cocção, como secagem e moagem, foram feitas em ambientes com baixa luminosidade, a fim de minimizar ao máximo a possível influência da radiação UV na amostra. Este tipo de precaução foi tomada em virtude de que $\lambda < 254 \text{ nm}$ possuem energia suficiente para quebrar homoliticamente a ligação C—Hg da espécie CH_3Hg^+ ,¹⁶ o que poderia resultar em

valores que não expressassem a verdadeira concentração de espécies de Hg na amostra.

A escolha da temperatura de cada processo foi baseada nos processos de cocção mais empregados na cozinha tradicional. Também investigou-se a influência do aumento da força iônica e decréscimo do pH no comportamento das espécies de Hg. Para isso, foram adicionados sal (NaCl) e suco de limão, ingredientes amplamente usados como temperos em peixes. Como não foi encontrada quantidade definida de suco de limão utilizada no preparo de peixes para o consumo humano, neste estudo padronizou-se a quantidade tanto de sal quanto de suco de limão com o objetivo de relacionar de maneira igual os resultados obtidos.

A determinação do tempo de cocção de cada processo foi baseada em testes prévios com a amostra de peixe linguado. Deste modo, observou-se o tempo necessário para que a amostra (sem a adição de condimentos) atingisse as características de cada processo de cocção (textura e cor). O tempo otimizado para essa amostra foi padronizado para todas as outras (abrótea, atum, cabrinha, pirarucu e salmão). Na Figura 18 estão mostrados o tempo e o aspecto da amostra de peixe (linguado) após cada processo de cocção. A partir desse momento, com intuito de facilitar a apresentação e a interpretação dos resultados, os peixes crus, cozidos, fritos e assados serão simbolizados pelas siglas, “Cru”, “C”, “F”, e “A”, respectivamente, seguido do número do condimento usado [sem condimentos (1); com sal (2); e com sal e limão (3)].

Como pode ser observado na Figura 18, os processos de cocção alteram o aspecto do produto *in natura*, provavelmente, devido à desidratação do alimento por evaporação de água, coagulação de proteínas pela perda de água, além do aumento de massa nas amostras fritas, devido à absorção de óleo vegetal pela amostra. A coloração da carne processada se deve a outros fatores, como a caramelização de carboidratos e/ou reação de Maillard. Estes mesmos efeitos já haviam sido observados por outros autores.¹²⁴⁻¹²⁵ Portanto, com o objetivo de se obter uma padronização entre os resultados, as amostras foram liofilizadas após cada processo de cocção e através do valor da umidade de cada amostra, estimou-se por cálculo indireto (por diferença de massa úmida e após a liofilização), o teor de gordura absorvido nas amostras fritas e o teor de gordura extraída das amostras assadas. Na Tabela 4, estão apresentados os teores de gordura absorvida e extraída nos processos de fritura e assagem, respectivamente. Estes teores foram

levados em consideração na expressão dos resultados para todas as amostras fritas e assadas. Todos os resultados da concentração total e da especiação de Hg foram expressos em massa seca do peixe *in natura*.

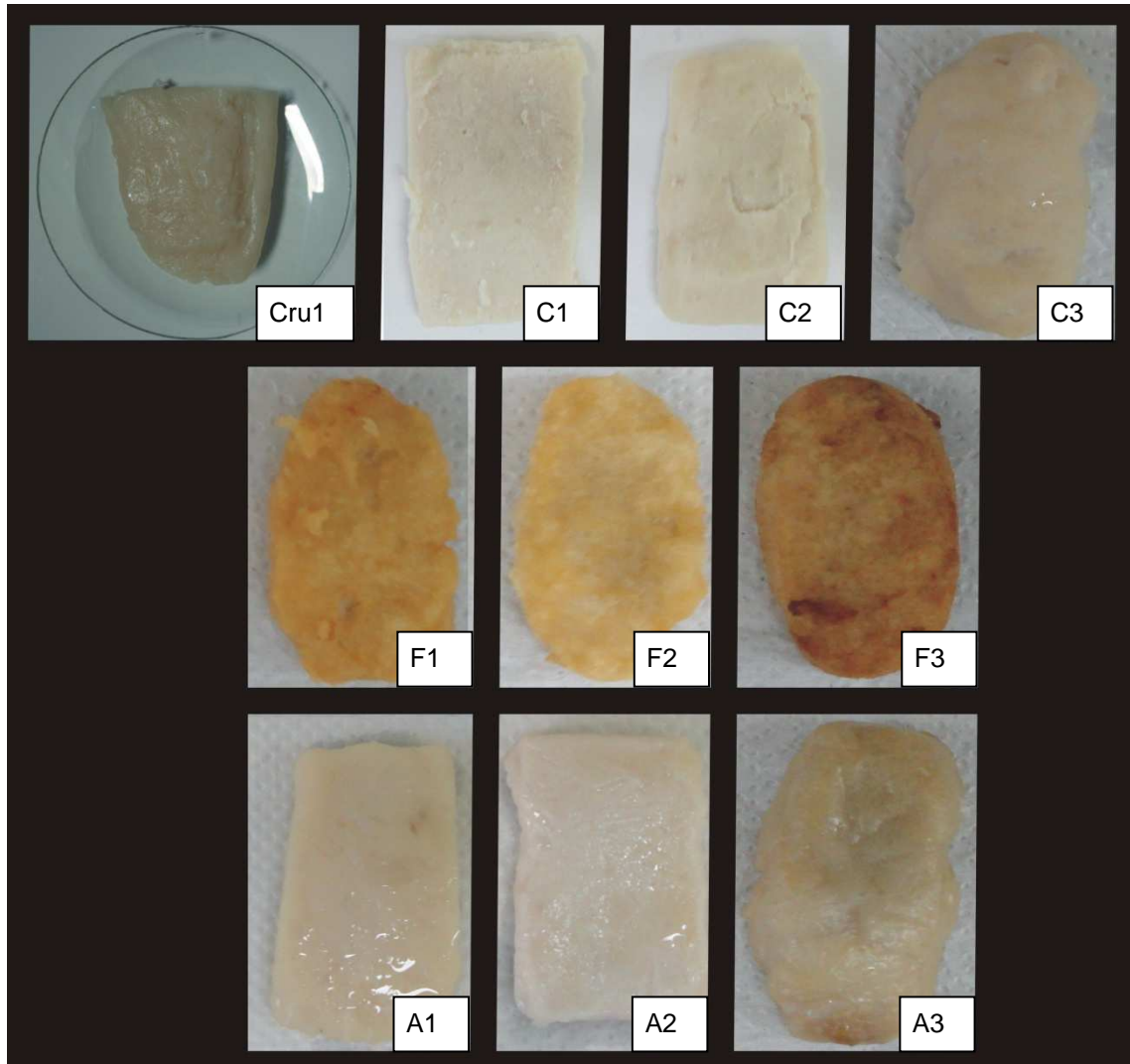


Figura 18. Amostra de linguado (CRU) crua; e após os processos de: (C) cozimento; (F) fritura; e (A) assagem.

Tabela 4. Absorção e perda de gordura nas amostras de peixes após o processo de fritura e assagem, respectivamente.

Amostra	Massa absorvida (%)			Massa perdida (%)		
	F1	F2	F3	A1	A2	A3
Abrótea	7,6	7,8	7,7	0,0	0,0	0,1
Atum	18,6	19,2	6,8	0,4	0,5	0,1
Cabrinha	12,2	14,9	12,6	1,6	1,0	1,6
Linguado	8,8	3,6	5,8	0,0	0,0	1,1
Pirarucu	7,5	6,1	6,5	0,6	0,2	0,8
Salmão	9,2	8,0	7,3	7,4	3,3	1,2

A absorção de massa mais expressiva da amostra de atum deve-se possivelmente ao fato de que a amostra apresentou maior porosidade em sua forma que as demais amostras, conseqüentemente, maior superfície de contato para o óleo vegetal ser absorvido na amostra.¹²⁶

4.5 Caracterização das amostras de peixes – macro e micronutrientes

O conhecimento dos constituintes majoritários presentes na amostra é de suma importância para a avaliação das possíveis afinidades do Hg com a matriz da amostra. Portanto, fez-se uma análise da composição centesimal nas amostras de peixes. Na Tabela 5 estão apresentados os teores de umidade, proteína, lipídeos, e minerais (cinzas) nas amostras de peixe *in natura*.

Tabela 5. Composição centesimal presentes nas amostras de músculo de peixe *in natura* (n = 3).

Amostra	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Gordura (%)
Abrótea	86,4 ± 0,1	0,75 ± 0,06	13,1 ± 0,1	0,71 ± 0,02
Atum	72,3 ± 0,3	1,50 ± 0,21	25,6 ± 0,1	1,36 ± 0,03
Cabrinha	79,3 ± 0,2	0,55 ± 0,03	18,3 ± 0,1	1,84 ± 0,04
Linguado	81,9 ± 0,1	1,87 ± 0,12	15,1 ± 0,1	1,53 ± 0,01
Pirarucu	75,1 ± 0,3	1,33 ± 0,08	18,6 ± 0,1	2,39 ± 0,08
Salmão	70,4 ± 0,2	1,59 ± 0,24	19,8 ± 0,2	7,50 ± 0,35

Além disso, foram determinadas as concentrações de alguns contaminantes e micronutrientes presentes nas amostras. Na Tabela 6 estão apresentados as concentrações de alguns metais e não metais presentes nas amostras de peixe *in natura* estudadas neste trabalho.

Tabela 6. Concentrações de metais e não-metais presentes nas amostras liofilizadas de músculo de peixe *in natura* (n = 3).

	Abrótea	Atum	Cabrinha	Linguado	Pirarucu	Salmão	LD
Al^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3,61 ± 0,62	5,89 ± 0,10	13,2 ± 0,2	10,5 ± 1,8	6,32 ± 0,82	2,82 ± 0,15	0,86
As^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	8,89 ± 0,21	2,68 ± 0,04	1,42 ± 0,03	0,185 ± 0,035	0,078 ± 0,002	0,690 ± 0,013	0,006
Ba^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,367 ± 0,010	1,23 ± 0,03	< 0,065	0,332 ± 0,044	< 0,065	< 0,065	0,065
Cd^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< 0,088	< 0,088	< 0,088	< 0,088	< 0,088	< 0,088	0,088
Cr^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,586 ± 0,050	0,292 ± 0,059	< 0,116	0,736 ± 0,285	0,644 ± 0,083	0,525 ± 0,035	0,12
Cu^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,30 ± 0,07	2,92 ± 0,05	1,36 ± 0,03	1,13 ± 0,09	1,59 ± 0,17	1,34 ± 0,02	0,05
Fe^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	12,0 ± 1,4	36,5 ± 0,6	6,60 ± 0,13	3,11 ± 0,71	2,97 ± 0,28	6,15 ± 0,43	0,11
Li^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,220 ± 0,007	0,135 ± 0,002	0,220 ± 0,012	0,220 ± 0,017	0,136 ± 0,012	0,130 ± 0,005	0,052
Mn^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2,91 ± 0,09	0,247 ± 0,005	1,21 ± 0,02	0,387 ± 0,039	0,477 ± 0,041	0,259 ± 0,013	0,014
Ni^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< 0,38	< 0,38	< 0,38	< 0,38	< 0,38	< 0,38	0,38
Pb^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,084 ± 0,008	0,083 ± 0,002	0,783 ± 0,030	0,072 ± 0,019	0,063 ± 0,004	0,053 ± 0,018	0,001
Sb^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,003 ± 0,001	0,027 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,109 ± 0,006	0,010 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,001
Se^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,99 ± 0,13	2,67 ± 0,05	1,70 ± 0,03	0,971 ± 0,128	0,761 ± 0,028	0,772 ± 0,034	0,38
Sr^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	7,73 ± 0,15	2,73 ± 0,05	8,62 ± 0,16	1,42 ± 0,14	0,388 ± 0,044	2,39 ± 0,10	0,003
Ti^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,403 ± 0,020	0,611 ± 0,042	1,69 ± 0,03	1,77 ± 0,31	0,121 ± 0,016	0,304 ± 0,093	0,007
V^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	0,15
Zn^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	21,4 ± 0,5	32,5 ± 0,5	15,5 ± 0,3	18,8 ± 1,9	30,0 ± 3,1	11,6 ± 0,3	0,3
Ca^a (mg g^{-1})	1,89 ± 0,04	0,386 ± 0,008	2,18 ± 0,08	0,332 ± 0,026	0,404 ± 0,022	0,655 ± 0,016	0,0005
K^a (mg g^{-1})	6,06 ± 0,10	8,75 ± 0,20	9,40 ± 0,20	12,8 ± 1,3	12,5 ± 1,3	9,70 ± 0,35	0,01
Mg^a (mg g^{-1})	0,757 ± 0,024	0,734 ± 0,030	0,886 ± 0,021	0,915 ± 0,094	1,05 ± 0,12	0,826 ± 0,014	0,0004
Na^a (mg g^{-1})	4,64 ± 0,17	17,2 ± 0,4	4,63 ± 0,09	15,1 ± 1,5	5,37 ± 0,49	5,40 ± 0,25	0,01
P^a (mg g^{-1})	3,54 ± 0,15	4,41 ± 0,09	5,26 ± 0,08	11,1 ± 0,8	4,86 ± 0,08	6,23 ± 0,18	0,01
S^a (mg g^{-1})	9,52 ± 0,21	8,81 ± 0,20	8,97 ± 0,36	7,88 ± 0,57	11,5 ± 0,4	7,07 ± 0,43	0,005
N^c (%, m/m)	15,4 ± 0,2	14,8 ± 0,1	14,2 ± 0,1	13,4 ± 0,1	12,0 ± 0,1	10,7 ± 0,1	0,1

^a ICP-OES; ^b ICP-MS; ^c Kjeldahl.

A legislação vigente (ANVISA) estabelece limites máximos de alguns contaminantes inorgânicos em peixes (As, Cd, Hg e Pb).¹²⁷ De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, somente a amostra de peixe abrótea encontrou-se imprópria para o consumo humano, esta amostra apresentou o teor de As cerca de 20% acima do limite máximo recomendado pela ANVISA. Ou seja, com exceção da amostra abrótea, todos os teores de contaminantes inorgânicos estabelecidos pela legislação vigente estariam abaixo do limite máximo aceitável.

Apesar de se saber que o Hg presente em tecido de peixe está majoritariamente ligado às proteínas (por grupos –SH e –SeH), não foi constatada nenhuma relação entre a perda de Hg e a concentração de S e Se.

Cabe ressaltar que uma relação entre o teor de Hg e a incidência da concentração de outro contaminante que não possua afinidade com o Hg não é válida neste trabalho, justamente pelo fato das amostras serem de espécies e regiões diferentes. Deste modo, os nutrientes e contaminantes avaliados neste trabalho têm como objetivo principal conhecer um pouco da matriz da amostra onde o Hg está presente. A seguir, nos itens 4.7 e 4.8 serão discutidas as possíveis interações do Hg com a matriz da amostra.

4.6 Determinação de Hg total em peixes

Todas as amostras de peixes (liofilizadas e cominuídas) foram decompostas em forno de micro-ondas, juntamente com o material de referência certificado (DORM-2), conforme descrito no item 3.10. Neste trabalho, levou-se em consideração a importância do balanço de massas durante todos os processos de cocção. Sendo assim, foram decompostas as amostras do óleo usado no processo de fritura, água do processo de cozimento, e a massa (gordura) remanescente na assadeira após o processo de assagem. Os valores obtidos para Hg total nessas amostras foram adotados como referência do total das espécies de Hg para a análise de especiação. As concentrações de Hg total determinadas nas amostras decompostas estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Balanço de massas de Hg total nas amostras de peixes após os tratamentos culinários (concentração de Hg remanescente no tecido de peixe após os diferentes tratamentos e concentração de Hg transferido para a água de cozimento, óleo de fritura e gordura extraída durante a assagem).

Amostra	Hg remanescente no tecido do peixe		Hg transferido para a água de cozimento (C-A), óleo de fritura (F-O) e gordura extraída durante a assagem (A-G)		Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	Tratamento*	Média \pm SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fase	Média \pm SD (ng g^{-1})	
Abrótea	Cru1	0,324 \pm 0,015	-	-	0,324
	Cru2	0,324 \pm 0,013	-	-	0,324
	Cru3	0,311 \pm 0,015	-	-	0,311
	C1	0,261 \pm 0,008	C1-A	< 0,1	0,261
	C2	0,275 \pm 0,024	C2-A	< 0,1	0,275
	C3	0,276 \pm 0,020	C3-A	< 0,1	0,276
	F1	0,218 \pm 0,015	F1-O	< 0,4	0,218
	F2	0,224 \pm 0,007	F2-O	< 0,4	0,224
	F3	0,207 \pm 0,019	F3-O	< 0,4	0,207
	A1	0,273 \pm 0,013	A1-G	< LD**	0,273
	A2	0,274 \pm 0,034	A2-G	< LD**	0,274
	A3	0,266 \pm 0,014	A3-G	< LD**	0,266
Atum	Cru1	0,210 \pm 0,005	-	-	0,210
	Cru2	0,210 \pm 0,015	-	-	0,210
	Cru3	0,211 \pm 0,015	-	-	0,211
	C1	0,211 \pm 0,014	C1-A	< 0,1	0,211
	C2	0,211 \pm 0,014	C2-A	< 0,1	0,211
	C3	0,211 \pm 0,015	C3-A	< 0,1	0,211
	F1	0,163 \pm 0,011	F1-O	< 0,4	0,163
	F2	0,157 \pm 0,012	F2-O	< 0,4	0,157
	F3	0,162 \pm 0,006	F3-O	< 0,4	0,162
	A1	0,199 \pm 0,010	A1-G	0,754 \pm 0,065	0,199
	A2	0,186 \pm 0,005	A2-G	0,990 \pm 0,062	0,187
	A3	0,178 \pm 0,008	A3-G	0,253 \pm 0,023	0,178
Cabrinha	Cru1	0,322 \pm 0,010	-	-	0,322
	Cru2	0,321 \pm 0,011	-	-	0,321
	Cru3	0,322 \pm 0,011	-	-	0,322
	C1	0,321 \pm 0,010	C1-A	< 0,1	0,321
	C2	0,314 \pm 0,010	C2-A	< 0,1	0,314
	C3	0,311 \pm 0,004	C3-A	< 0,1	0,311
	F1	0,310 \pm 0,009	F1-O	< 0,4	0,310
	F2	0,301 \pm 0,012	F2-O	< 0,4	0,301
	F3	0,269 \pm 0,009	F3-O	< 0,4	0,269
	A1	0,315 \pm 0,018	A1-G	4,63 \pm 0,26	0,320
	A2	0,293 \pm 0,011	A2-G	3,07 \pm 0,21	0,296
	A3	0,298 \pm 0,019	A3-G	4,22 \pm 0,25	0,302

*Cru = cru; C = cozimento; F = fritura; A = assagem.

1 = sem condimentos; 2 = com adição de sal; 3 = com adição de sal e suco de limão.

**Dependente da massa de gordura extraída.

Tabela 7 (Continuação). Balanço de massas de Hg total nas amostras de peixes após os tratamentos culinários (concentração de Hg remanescente no tecido de peixe após os diferentes tratamentos e concentração de Hg transferido para a água de cozimento, óleo de fritura e gordura extraída durante a assagem).

Amostra	Hg remanescente no tecido do peixe		Hg transferido para a água de cozimento (C-A), óleo de fritura (F-O) e gordura extraída durante a assagem (A-G)		Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	Tratamento*	Média \pm SD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fase	Média \pm SD (ng g^{-1})	
Linguado	Cru1	0,048 \pm 0,002	-	-	0,048
	Cru2	0,049 \pm 0,003	-	-	0,049
	Cru3	0,048 \pm 0,003	-	-	0,048
	C1	0,047 \pm 0,004	C1-A	< 0,1	0,047
	C2	0,047 \pm 0,004	C2-A	< 0,1	0,047
	C3	0,048 \pm 0,005	C3-A	< 0,1	0,048
	F1	0,046 \pm 0,003	F1-O	< 0,4	0,046
	F2	0,047 \pm 0,001	F2-O	< 0,4	0,047
	F3	0,046 \pm 0,002	F3-O	< 0,4	0,046
	A1	0,045 \pm 0,002	A1-G	< LD**	0,045
	A2	0,042 \pm 0,004	A2-G	< LD**	0,042
	A3	0,042 \pm 0,003	A3-G	0,437 \pm 0,039	0,042
	Pirarucu	Cru1	1,20 \pm 0,03	-	-
Cru2		1,20 \pm 0,03	-	-	1,20
Cru3		1,20 \pm 0,03	-	-	1,20
C1		1,19 \pm 0,03	C1-A	8,90 \pm 0,50	1,20
C2		1,17 \pm 0,04	C2-A	8,57 \pm 0,49	1,18
C3		1,19 \pm 0,04	C3-A	9,05 \pm 0,51	1,20
F1		1,02 \pm 0,03	F1-O	< 0,4	1,02
F2		1,03 \pm 0,05	F2-O	< 0,4	1,03
F3		0,921 \pm 0,045	F3-O	< 0,4	0,921
A1		1,07 \pm 0,06	A1-G	5,97 \pm 0,40	1,08
A2		0,992 \pm 0,048	A2-G	1,99 \pm 0,14	0,994
A3		1,07 \pm 0,04	A3-G	8,92 \pm 0,54	1,08
Salmão		Cru1	0,031 \pm 0,002	-	-
	Cru2	0,031 \pm 0,003	-	-	0,031
	Cru3	0,030 \pm 0,003	-	-	0,030
	C1	0,030 \pm 0,003	C1-A	< 0,1	0,030
	C2	0,030 \pm 0,001	C2-A	< 0,1	0,030
	C3	0,028 \pm 0,004	C3-A	< 0,1	0,028
	F1	0,027 \pm 0,002	F1-O	< 0,4	0,027
	F2	0,026 \pm 0,001	F2-O	< 0,4	0,026
	F3	0,026 \pm 0,003	F3-O	< 0,4	0,026
	A1	0,026 \pm 0,002	A1-G	2,71 \pm 0,15	0,029
	A2	0,026 \pm 0,002	A2-G	1,13 \pm 0,08	0,027
	A3	0,026 \pm 0,001	A3-G	0,463 \pm 0,037	0,027

*Cru = cru; C = cozimento; F = fritura; A = assagem.

1 = sem condimentos; 2 = com adição de sal; 3 = com adição de sal e suco de limão.

**Dependente da massa de gordura extraída.

Dentre as amostras de peixe estudadas, a amostra de peixe pirarucu foi a que apresentou a maior concentração de Hg, resultando na concentração de Hg de 1,20

$\mu\text{g g}^{-1}$. Isso se deve, provavelmente, ao fato deste peixe ser proveniente da região Amazônica, onde é sabido que há muitas áreas de garimpos de ouro, dentre estas, muitas ilegais. O uso de Hg na amalgamação de ouro é a principal fonte antrópica de emissão de Hg ao meio ambiente no Brasil.³

Apesar das amostras não serem oriundas da mesma região, é possível notar uma relação entre o nível trófico e o teor de Hg acumulado nas amostras. Todos os peixes estudados possuem hábitos alimentares carnívoros; no entanto, com graus predatórios diferentes. Ou seja, o salmão possui hábitos alimentares de nível trófico relativamente menor que as demais espécies estudadas, e foi este o que apresentou a menor concentração de Hg. Já o pirarucu, que é considerado uma espécie predadora do topo da cadeia alimentar na região amazônica, alcançou a maior concentração de Hg entre as amostras estudadas. No entanto, nenhuma das espécies de peixe estudadas ultrapassou o valor recomendado pela ANVISA, que é de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ para espécies predadoras e $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para espécies não predadoras e produtos de pesca para o Hg total em peixes (expresso em massa úmida).¹²⁷ Dessa forma, todas as espécies de peixes estudadas estariam aptas para serem consumidas.

As fases de cada tratamento culinário (água de cozimento, o óleo de fritura e a gordura removida da amostra durante a assagem) foram analisadas a fim de comprovar a extração do Hg da amostra durante cada etapa de tratamento. No entanto, a maioria dessas fases analisadas encontrou-se abaixo do LD do método analítico, e as fases que puderam ser quantificadas não continham todo o Hg extraído da amostra antes do tratamento culinário (amostra *in natura*). Ou seja, se a perda de Hg se deu por extração, o Hg, pode ter sido adsorvido na superfície do vidro (béquer e assadeira) ou, o que pode ser considerado o mais provável, o Hg pode ter sido reduzido e volatilizado para a atmosfera. Efeito similar foi também observado por Limaverde Filho *et al.*¹²⁸

A exatidão do método de determinação de Hg total foi avaliada através da análise do material de referência certificado DORM-2. Os resultados obtidos apresentaram boa precisão e exatidão, com valores de desvio padrão relativo (RSD) menores que 4,1% e erro relativo menor do que 0,3%. Os LDs obtidos para este método foram de $0,9 \text{ ng g}^{-1}$ de Hg para a amostra liofilizada de peixe, de $0,1 \text{ ng g}^{-1}$ de Hg para a água remanescente após cozimento, e de $0,4 \text{ ng g}^{-1}$ de Hg para o óleo remanescente após fritura.

Avaliou-se também a eficiência do procedimento de decomposição, através da determinação do teor de carbono residual remanescente na solução do extrato da amostra. Os valores determinados de carbono residual remanescente no extrato da amostra após a decomposição estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Teor de carbono residual remanescente na solução do extrato das amostras liofilizadas de peixes *in natura* após a decomposição por micro-ondas (n = 3).

Amostra	Teor de carbono residual, mg L⁻¹
Abrótea	56,9 ± 5,1
Atum	121 ± 2
Cabrinha	128 ± 2
Linguado	47,8 ± 4,4
Pirarucu	137 ± 12
Salmão	44,6 ± 2,4

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, o teor de carbono residual remanescente na solução do extrato da amostra está relativamente abaixo do risco de interferências espectrais e não espectrais geralmente observadas na técnica de ICP-MS.¹²⁹⁻¹³⁰ Dessa forma, o método de decomposição utilizado foi considerado eficiente para a massa e matriz de amostra empregada.

4.7 Avaliação do comportamento das espécies de Hg em peixes após diferentes processos de cocção

A avaliação do comportamento das espécies de Hg após os tratamentos culinários foi efetuada aplicando as condições otimizadas do item 4.2. As concentrações das espécies de Hg após os diferentes tratamentos culinários estão apresentados em forma de gráfico, como pode ser observado na Figura 19.

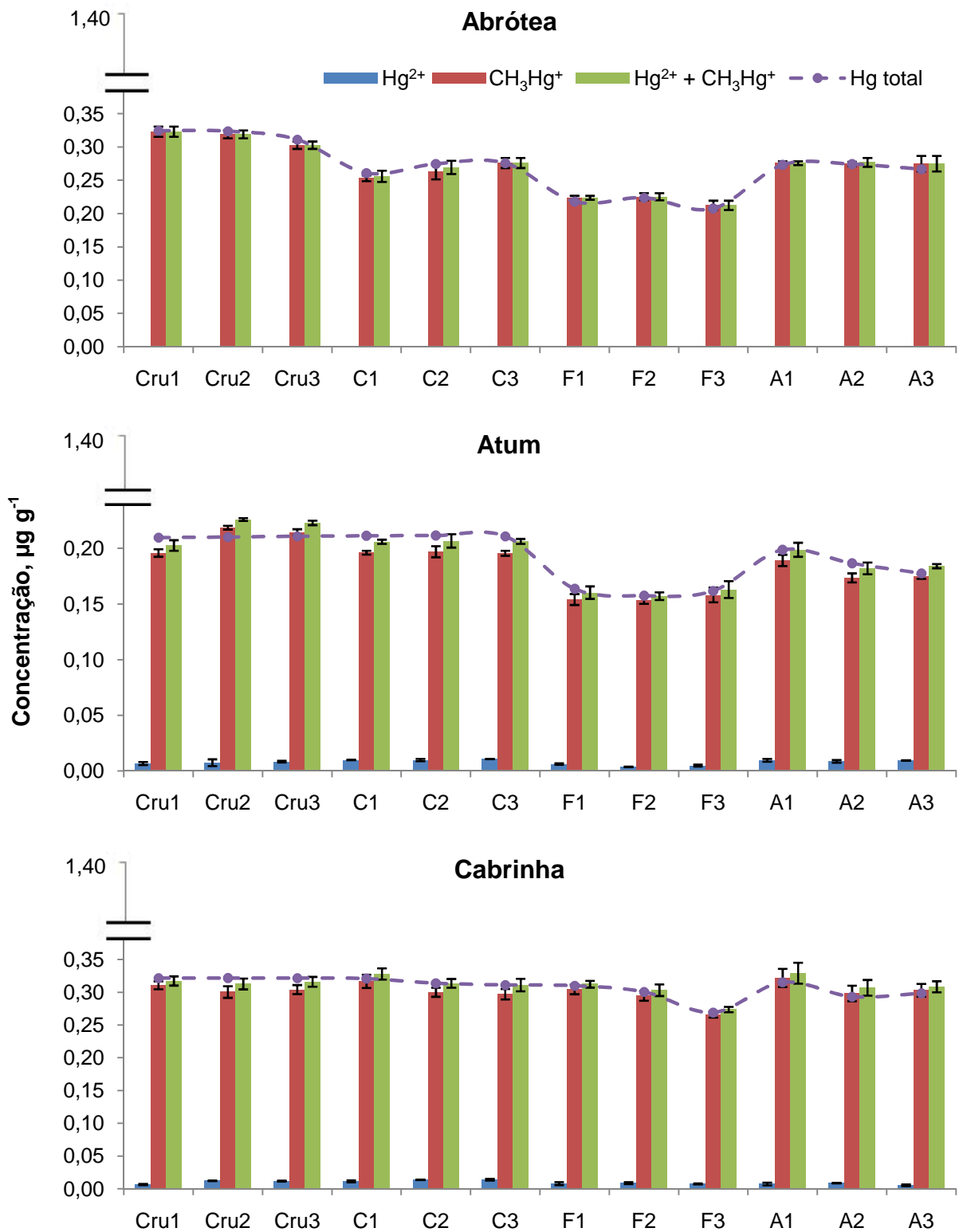


Figura 19. Eficiência de extração e concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos culinários ($n = 2$).

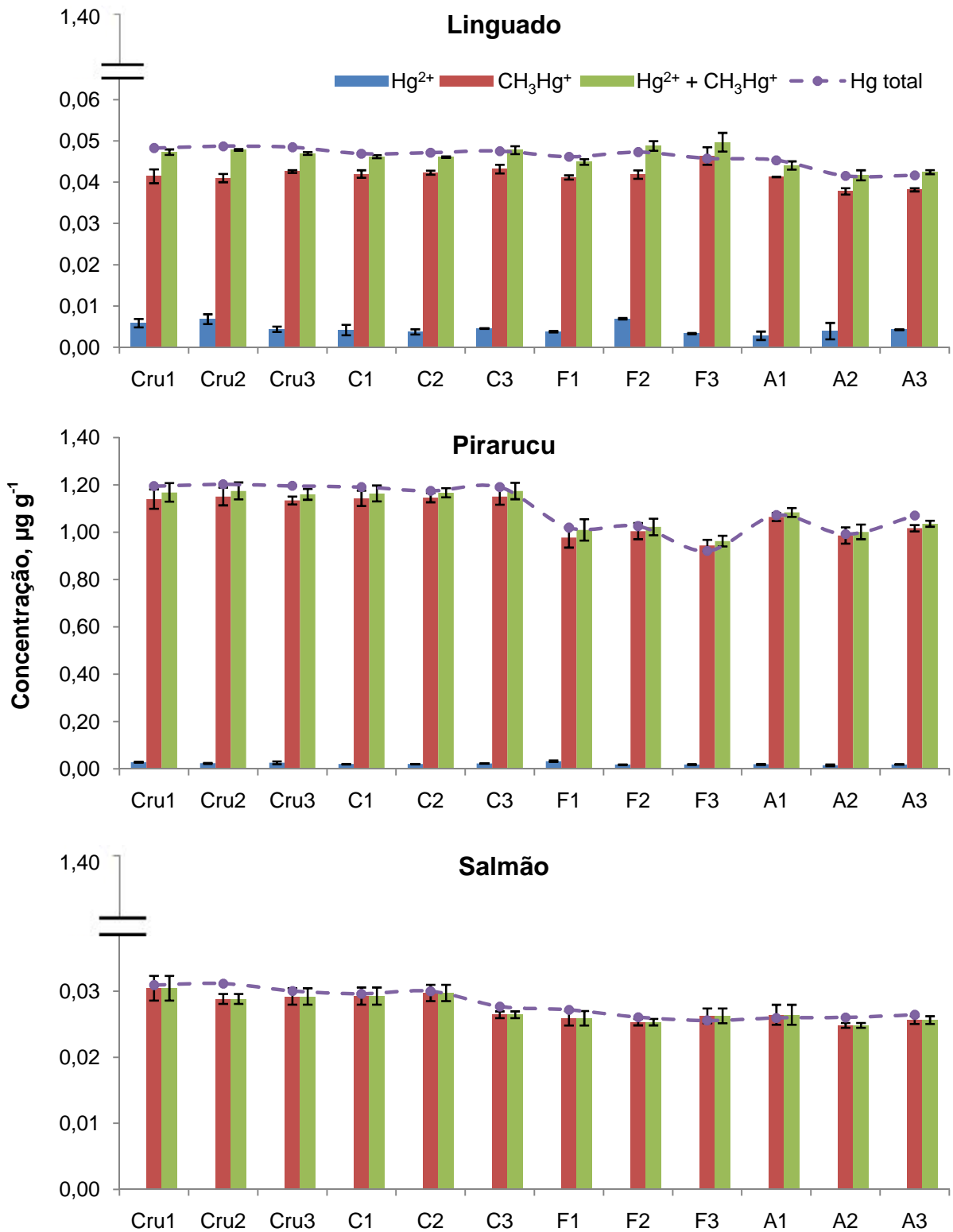


Figura 19 (CONTINUAÇÃO). Eficiência de extração e concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos culinários ($n = 2$).

Dentre os diferentes tratamentos culinários, observou-se perdas de Hg mais significativas nas amostras de peixe que passaram pelo procedimento de fritura. No

entanto, essa perda não apresenta a mesma proporção entre as diferentes espécies de peixes. As perdas de Hg mais significativas foram observadas na amostra abrótea, onde essa alcançou perdas de até 33% durante o processo de fritura.

O fato de uma amostra perder mais Hg que outra, deve-se possivelmente à força de interação da espécie de Hg com a matriz da amostra e/ou pela característica física da amostra (ex.: porosidade do tecido) na permeação do óleo e/ou água provenientes do processo de cocção, uma vez que esses poderiam extrair (lixiviar) o Hg da matriz através da permeação destas soluções pela amostra. No entanto, esse efeito, às vezes, pode ser dificultado, pois quando a carne sofre um tratamento térmico (como assagem, fritura e cozimento), forma-se uma superfície (capa) de proteína coagulada em torno da carne, impedindo a perda de líquido¹³¹⁻¹³². Deste modo, essa proteção poderia impedir também a perda de minerais e contaminantes, como o Hg. O efeito de formação dessa capa (proteína coagulada) na superfície da amostra foi observado em todos os tratamentos de cocção deste trabalho. Este efeito é mais pronunciado quanto maior o choque térmico (ΔT entre a amostra e o meio de cocção). Ou seja, quanto mais rápida for a formação dessa capa protéica, menos óleo será absorvido e conseqüentemente menos massa a amostra perderá.¹³¹ Tal efeito pôde ser destacado quando o procedimento de fritura das amostras de peixe foi feito.

Conforme os resultados experimentais indicam, a predominância do $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$ no músculo de peixe justificaria as pequenas perdas de Hg após os diferentes tratamentos culinários, pois sabe-se que a interação do Hg com grupos sulfidrila é relativamente alta. De acordo com Lemes e Wang,⁷¹ CH_3Hg^+ em músculo de peixe está quase exclusivamente como $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$. Neste trabalho, os autores determinaram 3 diferentes espécies de CH_3Hg^+ em músculo de peixe, dentre estas, o complexo L-cisteinato de metilmercúrio ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$), glutationato de metilmercúrio ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Glu})$), e haletos de metilmercúrio (CH_3HgX).

Desta maneira, a remoção desta espécie de Hg da matriz da amostra somente com o tratamento térmico e solventes (como a água e o óleo vegetal) de interação relativamente baixas (quando comparado com a L-cisteína) é ineficaz. Entretanto, um estudo efetuado por Li *et al.*¹³³ constataram que o complexo de $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cys})$ presente como contaminante em grãos de arroz pode ser parcialmente convertido à CH_3HgX ($X =$ ligantes inorgânicos pequenos, tais como Cl^- e OH^-) após

o processo de cozimento do arroz com água em temperatura de ebulição (≈ 100 °C). Porém, eles não explicaram os motivos para esta conversão.

A perda de CH_3Hg^+ observada nas amostras de peixes após os diferentes processos de cocção pode ser causada pela perda da integridade do complexante e/ou troca do grupo doador de elétrons do complexante presente na matriz da amostra com ânions X^- (X = ligantes inorgânicos pequenos, tais como Cl^- e OH^-), possivelmente devido à desnaturação ou até mesmo hidrólise de proteínas que podem ocorrer durante os processos de cocção¹³⁴⁻¹³⁷. Ou seja, tanto a troca iônica¹²⁶ quanto a desnaturação (ou hidrólise) de proteínas geram, na sua integridade, ligantes nucleófilos relativamente menores (Figura 20), o que possivelmente poderia acarretar em uma maior mobilidade do CH_3Hg^+ , e conseqüentemente, maiores perdas do mesmo por lixiviação. Segundo Huff-Lonergan e Lonergan¹³⁴, o processo de cocção promove a desnaturação de proteínas pelo calor alterando os espaços interfibrilares do tecido muscular, provocando uma diminuição na capacidade de retenção de água. Leander *et al.*¹³² relatam que com o aumento da temperatura, ocorre o encurtamento dos sarcômeros das fibras musculares, forçando a saída dos fluidos e ocasionando as chamadas “perdas pela cocção”.

Desta forma, para a confirmação desta hipótese seria necessário utilizar outro método de preparo de amostra que mantivesse a integridade do CH_3Hg^+ ligado ao seu complexo, seguida de uma técnica de análise que identificasse os possíveis complexos moleculares ligados ao cátion CH_3Hg^+ . Um método que pode ser usado para este fim, é o uso das técnicas de ESI-MS para a identificação e caracterização molecular de toda espécie e a confirmação da presença de Hg nesta estrutura molecular pela técnica de ICP-MS,¹³⁸ porém, esta técnica não estava disponível quando da execução do presente trabalho.

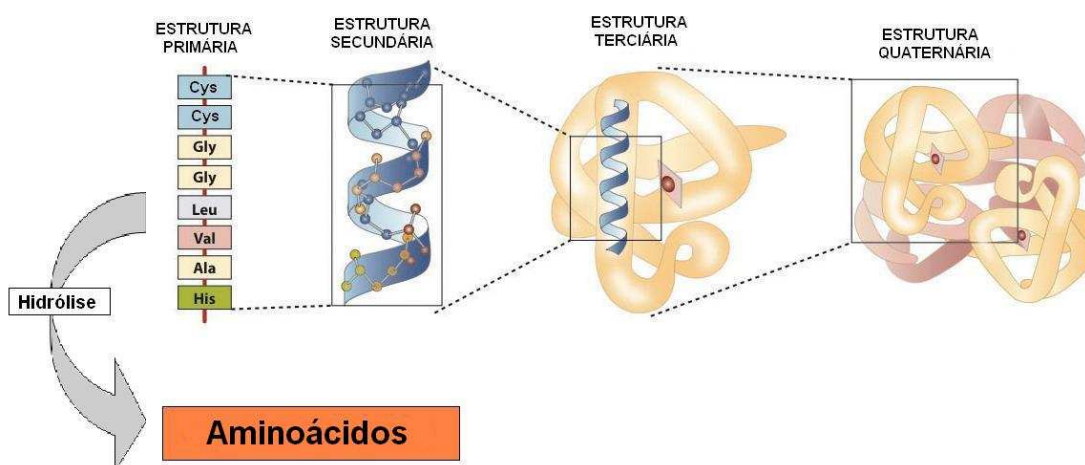


Figura 20. Estrutura de proteínas desnaturadas e hidrolisadas (adaptado de Hill *et al.*¹³⁹).

De acordo com os estudos de Mckee e Sams¹⁴⁰, em condições de pH ácido e aquecimento, a carne perde suas propriedades funcionais devido à desnaturação protéica. No entanto, neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas ($t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, $\alpha=0,05$) entre o uso e não uso de suco de limão (suco de pH ácido) nas amostras de peixes. Porém, todas as amostras apresentaram $\text{pH} < 6,5$. Sendo assim, se há uma influência da perda de Hg devido ao desnaturamento e/ou hidrólise de proteínas entre as amostras estudadas, o tratamento térmico do processo de cocção deve ser o fator responsável mais significativo. Apesar do Hg poder formar cloro-complexos estáveis, não foi observada nenhuma tendência entre os tratamentos culinários que utilizaram ou não o sal de cozinha (NaCl).

Todas as amostras apresentaram teores de CH_3Hg^+ maiores que 85% em relação ao Hg total. Segundo Ullrich *et al.*¹⁴¹, os principais fatores que afetam os níveis de CH_3Hg^+ em peixes são: dieta, nível trófico da espécie, idade do peixe, além de parâmetros de seu habitat, tais como: atividade microbiana, concentração de Hg na camada superior do sedimento local, conteúdo de carbono orgânico dissolvido, salinidade, pH e potencial redox. Portanto neste trabalho não é possível fazer uma boa analogia entre as amostras estudadas e os fatores que afetam a sorção de Hg em peixes, pois essas amostras são provenientes de ambientes aquáticos distintos entre si.

Em nenhum dos 12 tratamentos culinários avaliados neste trabalho foi observado mudanças significativas ($t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, $\alpha = 0,05$) entre a proporção das espécies de Hg. Ou seja, não foram constatadas conversões entre as espécies em função de pH (suco de limão) e aquecimento. Embora perdas de Hg total de até 33%

durante o processo de fritura tenham sido observadas, não foram notadas perdas de Hg maiores que 19% entre os demais tratamentos culinários (cru, cozido e assado).

4.8 Considerações finais – benefícios e riscos no consumo de peixes

Nos últimos 10 anos, pesquisadores têm abordado questões envolvendo os riscos e benefícios associados com o consumo de peixe.⁷⁻⁹ De fato, para muitas populações, o peixe é a principal fonte de proteína e outros nutrientes, dentre estes, o Se. Além disso, alguns peixes podem ser uma fonte importante de ácidos graxos poliinsaturados como os ômega-3 (ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico), que são considerados ácidos graxos essenciais, ou seja, eles não são sintetizados pelo organismo e devem ser ingeridos através da alimentação. A ingestão do ômega-3 auxilia na diminuição dos níveis de triglicerídeos e LDL (lipoproteína de baixa densidade, conhecido como o mau colesterol), conseqüentemente diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares.¹⁴² Ou seja, uma dieta bem balanceada que contenha peixes e frutos do mar contribui para a saúde do coração e para o crescimento e desenvolvimento adequado de crianças.¹¹

Em geral, os peixes ricos em gordura têm níveis mais elevados de ômega-3 que os peixes com baixo teor de gordura, e a maioria dos peixes de água doce tem níveis mais baixos de ômega-3 que peixes marinhos. Não há uma associação entre o teor de Hg e o nível de ômega-3 presentes nos peixes. No entanto, peixes com alto teor de ômega-3 são geralmente peixes de nível trófico baixo (como salmão e anchovas), e peixes com baixo teor deste ácido graxo, geralmente estão associados com o topo da cadeia trófica (como o tubarão e o peixe espada) que em geral são os que apresentam os teores de Hg relativamente maiores que os de nível trófico menores.¹⁴³

A FDA o EPA estão recomendando para as pessoas que consomem regularmente peixes, que evitem o consumo de peixes predadores (tubarão, peixe espada, cavala, entre outros), pois estes contêm altos níveis de Hg. A recomendação é o consumo de peixes de nível trófico baixo e ricos em ácidos graxos ômega-3 (salmão, pescada polaca, entre outros). Já para as mulheres gestantes a recomendação é ainda mais restrita, limitando o consumo destes peixes para cerca de 350 g por semana.¹¹

Portanto, de maneira análoga, é possível dizer que quem busca uma alimentação mais saudável, buscando peixes que apresentam uma fonte rica em compostos poliinsaturados e de nível trófico baixo, terá um menor risco de doenças cardiovasculares e menor risco de contaminação por Hg. Apesar de ter sido constatado neste trabalho perdas de Hg de até 33% durante o processo de fritura, não se recomenda este processo para quem está buscando os benefícios nutricionais proporcionados pelo ômega-3. O processo de fritura, além de aumentar o teor de gordura total do peixe, acaba saturando os compostos poliinsaturados (ex.: ômega-3) e/ou minimizando a absorção de ômega-3 no organismo através da competição com outros ácidos graxos (ômega-6) presentes no óleo de fritura.¹⁴²

Embora haja um grande número de publicações relacionadas com a toxicidade de Hg em peixes, pouco se sabe da real bioacessibilidade e biodisponibilidade deste metal após a ingestão através dos alimentos, principalmente em alimentos que sofreram algum tratamento térmico. Conforme já citado anteriormente (no item 2.6), um estudo que aborda este tema foi desenvolvido por Torres-Escribano *et al.*¹⁰⁴ Estes autores observaram que o peixe assado não apresentava diferença na concentração de Hg total após a cocção. Porém, eles constataram através de simulação gastrointestinal *in vitro*, que a bioacessibilidade do Hg diminui significativamente após a cocção. Eles atribuem essa perda devido à alteração da estrutura protéica produzida pela temperatura de cocção.

Além disso, algumas pesquisas demonstram que o teor de Se encontrado em peixes, geralmente na forma de selenoproteínas, tem um papel importante na minimização da toxicidade do Hg no organismo.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Dentre estes, possíveis mecanismos são sugeridos para a ação protetora do Se: (a) formação de complexos de Hg–Se inativos; (b) redistribuição do Hg no organismo; (c) desmetilação do CH_3Hg^+ ; e (d) por prevenção de danos causados por radicais livres gerados pelo Hg na membrana celular. Ou seja, a eliminação do Hg do organismo não é diminuída pela presença de Se, mas sim uma redistribuição do Hg para tecidos menos sensíveis, conferindo um certo grau de proteção.¹⁴⁷

Entre as amostras estudadas neste trabalho, a amostra de Pirarucu foi a que apresentou o menor teor de Se e o maior teor de Hg (Figura 21). Ou seja, de acordo com as pesquisas apontadas no parágrafo anterior, o Pirarucu, é relativamente o peixe que apresenta o maior risco a saúde dentre as demais espécies de peixes estudadas neste trabalho.

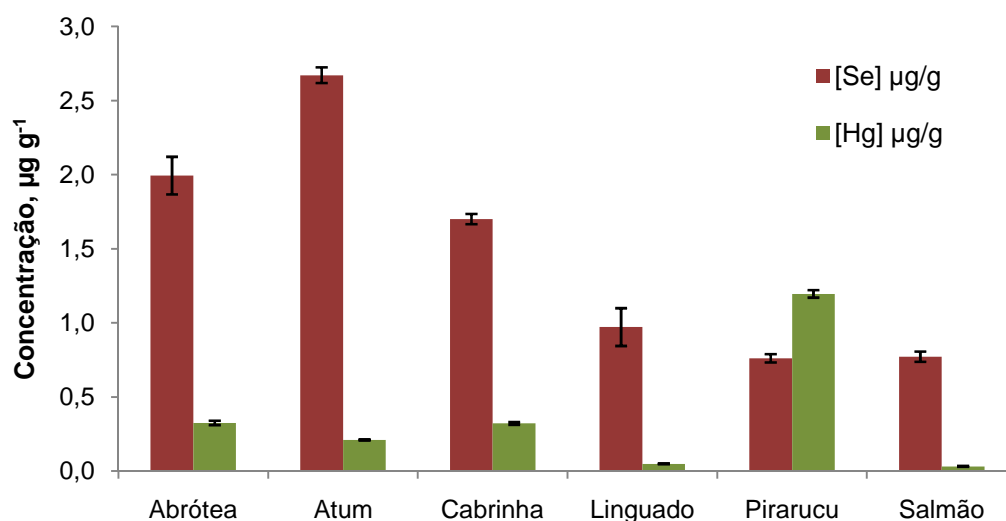


Figura 21. Relação da proporção dos teores de Se e Hg presentes nas amostras de peixes *in natura* (n = 3).

Visando a manutenção da máxima integridade nutricional e remoção de Hg em peixes, não foi evidenciado nenhum tratamento culinário que pudesse ser ideal para o consumo de peixes. No entanto, estes tratamentos podem modificar a bioacessibilidade do Hg no organismo e, quem sabe, exerçam uma influência pelos ingredientes usados nestes processos. Cabe ressaltar que estudos envolvendo este tema ainda estão em progresso e são uma tendência na química analítica voltada a elementos tóxicos.⁹⁹

5 CONCLUSÕES

Como pôde ser observado nos resultados apresentados ao longo deste trabalho, o método de especiação de Hg empregado neste estudo mostrou-se bastante robusto para amostras de músculos de peixes. As espécies de Hg puderam ser identificadas e quantificadas em diferentes espécies de peixes e com diferentes tratamentos culinários. Além disso, o procedimento de extração mostrou-se simples e rápido, envolvendo poucas etapas que, por sua vez, acabou minimizando as incertezas de medição do método analítico utilizado.

Uma possível solução referente ao risco associado às exposições a substâncias tóxicas (CH_3Hg^+) em peixes, é a de extrair estas substâncias ou, em outro caso, tentar substituir estas substâncias por outras de menor toxicidade (Hg^{2+}). Porém, isto nem sempre é possível. Algumas espécies químicas, como o CH_3Hg^+ possuem estabilidade relativamente alta, o que torna difícil a ruptura da ligação C—Hg, e energias suficientemente capazes de clivar essa ligação, como a radiação UV, acabariam oxidando também os nutrientes presentes no peixe.

Neste trabalho foram constatadas perdas de Hg de até 33%, o que pode ser considerado uma vantagem para determinado procedimento de cocção. No entanto, as amostras que apresentaram perda de Hg em maior quantidade (amostras fritas), foram as que possivelmente sofreram a maior perda nutricional. Além disso, não foram constatadas conversões significativas entre as espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . Porém, de acordo com os resultados já discutidos neste trabalho, sugere-se que a espécie íntegra do Hg possa ter sofrido transformações ao longo dos tratamentos culinários e ter mudado a sua bioacessibilidade no organismo.

Então, através deste estudo é possível notar que há uma deficiência em pesquisas relacionadas com estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade de contaminantes, em especial o Hg. Há uma grande quantidade de trabalhos voltados para este contaminante em alimentos, mas poucos relacionados com o que é realmente absorvido e metabolizado no organismo. Portanto, são necessárias mais investigações sobre este assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huber, K., Mercury Use: Industry, Wisconsin Mercury SourceBook: A guide to help yours community identify and reduce releases of elemental mercury, 1997, pp. 407 - 435.
2. Kuiken, T., Mercury products guide: The hidden dangers of mercury, National Wildlife Federation, Ann Arbor, Michigan, USA, 2002, pp. 17-34.
3. Lacerda, L. D., Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro, *Quim. Nova* 20 (1997) 196-199.
4. Bisinoti, M. C., Jardim, W. F., O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente, *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.
5. Hacon, S., Rochedo, E. R. R., Campos, R. R. R., Lacerda, L. D., Mercury exposure through fish consumption in the urban area of Alta Floresta in the Amazon Basin, *Journal of Geochemical Exploration* 58 (1997) 209-216.
6. Horvat, M., Gibičar, D., Speciation of Mercury: Environment, Food, Clinical, and Occupational Health, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, England, 2005, pp. 281-304.
7. Burger, J., Stern, A. H., Gochfeld, M., Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 266-271.
8. Dorea, J. G., Barbosa, A. C., Fish consumption and blood mercury: Proven health benefits or probable neurotoxic risk?, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42 (2005) 249-250.
9. Passos, C. J., Mergler, D., Gaspar, E., Morais, S., Lucotte, M., Larribe, F., Davidson, R., Grosbois, S. d., Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon, *Environ. Res.* 93 (2003) 123-130.
10. JECFA, Safety evaluation of certain food additives and contaminants., Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Geneva, 2004, pp. 132-139.
11. FDA/EPA, What you need to know about mercury in fish and shellfish. , U.S. Food and Drug Administration, U.S. Environmental Protection Agency, 2004.
12. Hintelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R. D., Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) in environmental samples using stable

- Hg²⁺ isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.
13. Schrier, R. W., Diseases of the kidney & urinary tract, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2006, pp. 1153-1159.
 14. Chen, D., Jing, M., Wang, X., Determination of methyl mercury in water and soil by HPLC-ICP-MS, application, *Application Note, Agilent Technologies* (2005) 8.
 15. Miranda, C., Yáñez, J., Contreras, D., Garcia, R., Jardim, W. F., Mansilla, H. D., Photocatalytic removal of methylmercury assisted by UV-A irradiation, *Applied Catalysis B: Environmental* 90 (2009) 115-119.
 16. Craig, P., Organometallic compounds in the environment, 2 ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England, 2003, pp. 434.
 17. Micaroni, R. C. d. C. M., Bueno, M. I. M. S., Jardim, W. d. F., Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte, *Quim. Nova* 23 (2000) 487-495.
 18. Hintelmann, H., Sample preparation for mercury speciation, M. Zoltan, S. Ralph (Eds.) Sample preparation for trace element analysis, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2003, pp. 1063-1080.
 19. WHO, Mercury in Health Care: Policy Paper, World Health Organization, 2005.
 20. EPA, Mercury update: impact on fish advisories, Environmental Protection Agency, 2001.
 21. Counter, S. A., Buchanan, L. H., Mercury exposure in children: a review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 209-230.
 22. Leong, C. C. W., Syed, N. I., Lorscheider, F. L., Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury, *Neuroreport* 12 (2001) 733-737.
 23. Bond, A. L., Diamond, A. W., Mercury concentrations in seabird tissues from Machias Seal Island, New Brunswick, Canada, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 4340-4347.
 24. WHO, Methylmercury in environmental health criteria 101, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1990, pp. 144.
 25. Harada, M., Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution, *Crit. Rev. Toxicol.* 25 (1995) 1-24.
 26. Miranda, M. R., Coelho-Souza, S. A., Guimarães, J. R. D., Correia, R. R. S., Oliveira, D., Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores ambientais que afetam a metilação, *Oecologia Brasiliensis* 11 (2007) 240-251.
 27. Holsbeek, L., Das, H. K., Joiris, C. R., Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish, *Sci. Total Environ.* 198 (1997) 201-210.

28. Molina, C. I., Gibon, F.-M., Duprey, J.-L., Dominguez, E., Guimarães, J.-R. D., Roulet, M., Transfer of mercury and methylmercury along macroinvertebrate food chains in a floodplain lake of the Beni River, Bolivian Amazonia, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3382-3391.
29. Domingo, J. L., Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity, *Reprod. Toxicol.* 9 (1995) 105-113.
30. Domingo, J. L., Developmental toxicity of metal chelating agents, *Reprod. Toxicol.* 12 (1998) 499-510.
31. Lapin, C. A., Carter, D. E., Early indices of methyl mercury toxicity and their use in treatment evaluation, *J. Toxicol. Environ. Health* 8 (1981) 767-776.
32. Berlin, M., Lewander, T., Increased brain uptake of mercury caused by 2,3-dimercaptopropanol (BAL) in mice given mercuric chloride, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. 22 (1965) 1-7.
33. Drawing chemical structures and graphical image, ACD/ChemSketch 8.0, 2005.
34. Choi, M. H., Cech, J. J., Unexpectedly high mercury level in pelleted commercial fish feed, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1979-1981.
35. Lindberg, A., Ask Björnberg, K., Vahter, M., Berglund, M., Exposure to methylmercury in non-fish-eating people in Sweden, *Environ. Res.* 96 (2004) 28-33.
36. Eisler, R., Mercury Hazards to Living Organisms, CRC Press, USA, 2006, pp. 312.
37. Barbosa, A. C., Souza, J. d., Dórea, J. G., Jardim, W. F., Fadini, P. S., Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (2003) 235-246.
38. Bastos, W. R., Rebelo, M. d. F., Fonseca, M. d. F., Almeida, R. d., Malm, O., A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil, *Acta Amazon.* 38 (2008) 431-438.
39. Dorea, J. G., Barbosa, A. C., Silva, G. S., Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142 (2006) 275-283.
40. Gonçalves, A., Gonçalves, N. N. d. S. e., Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica, *Rev. Panam. Salud Publica* 16 (2004) 415-419.
41. Mascarenhas, A. F. S., Brabo, E. S., Silva, A. P., Fayal, K. F., Jesus, I. M., Santos, E. C. O., Avaliação da concentração de mercúrio em sedimentos e material particulado no rio Acre, estado do Acre, Brasil, *Acta Amazon.* 34 (2004) 61-68.

42. Huguet, L., Castelle, S., Schäfer, J., Blanc, G., Maury-Brachet, R., Reynouard, C., Jorand, F., Mercury methylation rates of biofilm and plankton microorganisms from a hydroelectric reservoir in French Guiana, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1338-1348.
43. Achá, D., Hintelmann, H., Yee, J., Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region, *Chemosphere* 82 (2011) 911-916.
44. Celo, V., Lean, D. R. S., Scott, S. L., Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 126-137.
45. Duran, R., Ranchou-Peyruse, M., Menuet, V., Monperrus, M., Bareille, G., Goñi, M. S., Salvado, J. C., Amouroux, D., Guyoneaud, R., Donard, O. F. X., Caumette, P., Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France), *Environ. Pollut.* 156 (2008) 951-958.
46. Eckley, C. S., Hintelmann, H., Determination of mercury methylation potentials in the water column of lakes across Canada, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 111-125.
47. Krystek, P., Ritsema, R., Determination of Hg species in seafood, John Wiley & Sons, Inc., Rome, Italy, 2006, pp. 707-726.
48. Dórea, J. G., Cassava cyanogens and fish mercury are high but safely consumed in the diet of native Amazonians, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57 (2004) 248-256.
49. Tollefson, L., Cordle, F., Methylmercury in fish: a review of residue levels, fish consumption and regulatory action in the United States, *Environ. Health Perspect.* 68 (1986) 203-208.
50. Endo, T., Hotta, Y., Haraguchi, K., Sakata, M., Mercury contamination in the red meat of whales and dolphins marketed for human consumption in Japan, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2681-2685.
51. Harris, H. H., Pickering, I. J., George, G. N., The chemical form of mercury in fish, *Science* 301 (2003) 1203.
52. Brasil, Regulamento técnico de identidade e qualidade de conservas de peixes, Portaria Nº 67, de 13 de novembro de 2002, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.
53. Cabanero Ortiz, A. I., Madrid Albarrañ, Y., Camara Rica, C., Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.
54. Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K., Handbook of elemental speciation - techniques and methodology, John Wiley & Sons, 2003.
55. Chau, Y. K., Wong, P. T. S., Recent developments in speciation and determination of organometallic compounds in environmental samples, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 640-645.

56. Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., Chromium toxicity in plants, *Environ. Int.* 31 (2005) 739-753.
57. Sharma, V. K., Sohn, M., Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation, *Environ. Int.* 35 (2009) 743-759.
58. Sivakumar, S., Subbhuraam, C. V., Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm *Eisenia fetida*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62 (2005) 93-98.
59. Zayed, A., Lytle, C. M., Qian, J.-H., Terry, N., Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops, *Planta* 206 (1998) 293-299.
60. Oliveira, A. M., Silva, G. A., Poppi, R. J., Augusto, F., Isolation and quantification of dialkylmercury species by headspace solid phase microextraction and gas Chromatography with Atomic Emission detection, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19 (2008) 1041-1047.
61. Horvat, M., Mercury - do we know enough?, Trace Element Speciation for Environment, Food and Health, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 2001, pp. 127-141.
62. Parker, J. L., Bloom, N. S., Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation, *Sci. Total Environ.* 337 (2005) 253-263.
63. Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., Horvat, M., Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 383-393.
64. Flores, E. L. M., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Pozebon, D., Dressler, V. L., Mercury speciation in urban landfill leachate by cold vapor generation atomic absorption spectrometry using ion exchange and amalgamation, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (2009) 1659-1666.
65. Beceiro-González, E., Guimaraes, A., Alpendurada, M. F., Optimisation of a headspace-solid-phase micro-extraction method for simultaneous determination of organometallic compounds of mercury, lead and tin in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 1216 (2009) 5563-5569.
66. Duarte, F. A., Bizzi, C. A., Antes, F. G., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Organic, inorganic and total mercury determination in fish by chemical vapor generation with collection on a gold gauze and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 513-519.
67. Kaercher, L. E., Goldschmidt, F., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 60 (2005) 705-710.

68. Torres, D. P., Borges, D. L. G., Frescura, V. L. A., Curtius, A. J., A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1118-1122.
69. Nevado, J. J. B., Martín-Doimeadios, R. C. R., Bernardo, F. J. G., Moreno, M. J., Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr.* 1093 (2005) 21-28.
70. Chiou, C.-S., Jiang, S.-J., Kumar Danadurai, K. S., Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 1133-1142.
71. Lemes, M., Wang, F., Methylmercury speciation in fish muscle by HPLC-ICP-MS following enzymatic hydrolysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.
72. Abollino, O., Giacomino, A., Malandrino, M., Marro, S., Mentasti, E., Voltammetric determination of methylmercury and inorganic mercury with an home made gold nanoparticle electrode, *J. Appl. Electrochem.* 39 (2009) 2209-2216.
73. Korolczuk, M., Rutyna, I., New methodology for anodic stripping voltammetric determination of methylmercury, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1024-1026.
74. Mohammadi, H., Amine, A., Ouarzane, A., El Rhazi, M., Screening of fish tissue for methyl mercury using the enzyme invertase in a solvent interface, *Microchimica Acta* 149 (2005) 251-257.
75. Van Loon, J. C., Metal speciation by chromatography/atomic spectrometry, *Anal. Chem.* 51 (1979) 1139A-1150A.
76. Suzuki, K. T., Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: Metallothionein, *Anal. Biochem.* 102 (1980) 31-34.
77. Rosen, A. L., Hieftje, G. M., Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 59 (2004) 135-146.
78. Calixto de Campos, R., Araújo Gonçalves, R., Birman Tonietto, G., Marcus Godoy, J., Brandão, G. P., High performance liquid chromatography hydride generation in situ trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry: A new way of performing speciation analysis using GFAAS as detector, *Microchem. J.* 84 (2006) 26-30.
79. Łobiński, R., Schaumlöffel, D., Szpunar, J., Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 255-289.

80. PerkinElmer, The 30-Minute Guide to ICP-MS, *Technical Note* (2001).
81. Snook, R., Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry, *Chromatographia* 34 (1992) 546-546.
82. Chen, J., Determination of mercury in wastewater by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Application Note, PerkinElmer* (2009) 3.
83. Jian, L., Goessler, W., Irgolic, K. J., Mercury determination with ICP-MS: signal suppression by acids, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 48-53.
84. Harrington, C. F., Merson, S. A., D' Silva, T. M., Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 247-254.
85. Vallant, B., Kadnar, R., Goessler, W., Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 322-325.
86. Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., Room temperature sonolysis-based advanced oxidation process for degradation of organomercurials: Application to determination of inorganic and total mercury in waters by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984.
87. Takase, I., Pereira, H. B., Luna, A. S., Grinberg, P., Campos, R. C. d., A geração química de vapor em espectrometria atômica, *Quim. Nova* 25 (2002) 1132-1144.
88. D'Ulivo, A., Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 65 (2010) 360-375.
89. Foy, G. P., Pacey, G. E., Supercritical fluid extraction of mercury species, *Talanta* 61 (2003) 849-853.
90. Laird, B. D., Shade, C., Gantner, N., Chan, H. M., Siciliano, S. D., Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 6003-6008.
91. Pearson, R. G., Hard and Soft Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533-3539.
92. Westöö, G., Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination., *Acta Chem. Scand.* (1966) 2131-2137.
93. Qvarnstrom, J., Frech, W., Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491.

94. Krishna, M. V. B., Ranjit, M., Karunasagar, D., Arunachalam, J., A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS, *Talanta* 67 (2005) 70-80.
95. Pilz, C., Antes, F. G., Moreira, C. M., Mello, P. d. A., Duarte, F. A., Pozebon, D., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Determination of Hg species in edible mushrooms using reversed phase - liquid chromatography - chemical vapor generation - inductively coupled plasma mass spectrometry, *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* 0 (2010) 12-17.
96. Batista, B. L., Rodrigues, J. L., de Souza, S. S., Oliveira Souza, V. C., Barbosa Jr, F., Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples, *Food Chem.* 126 (2011) 2000-2004.
97. Hight, S. C., Cheng, J., Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.
98. Wang, Z.-h., Yin, Y.-g., He, B., Shi, J.-b., Liu, J.-f., Jiang, G.-b., L-cysteine-induced degradation of organic mercury as a novel interface in the HPLC-CV-AFS hyphenated system for speciation of mercury, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 810-814.
99. Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P., Prada-Rodríguez, D., In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 324-345.
100. FAO, Fisheries and aquaculture topics. Fish and seafood utilization. Topics fact sheets., FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2011.
101. Ersoy, B., Özeren, A., The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish, *Food Chem.* 115 (2009) 419-422.
102. Tornberg, E., Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products, *Meat Science* 70 (2005) 493-508.
103. Morgan, J. N., M.R., B., R.L., G., Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 7 (1997).

104. Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Vélez, D., Montoro, R., Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 981-986.
105. Farias, L. A., Fávaro, D. I., Santos, J. O., Vasconsellos, M. B., Pessôa, A., Aguiar, J. P. L., Yuyama, L., Influência do processo de cocção no teor de mercúrio em peixes, *Acta Amazon.* 40 (2010) 741-748.
106. Devesa, V., Martínez, A., Súnier, M. A., Vélez, D., Almela, C., Montoro, R., Effect of cooking temperatures on chemical changes in species of organic arsenic in seafood, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2272-2276.
107. Heath, J. C., Banna, K. M., Reed, M. N., Pesek, E. F., Cole, N., Li, J., Newland, M. C., Dietary selenium protects against selected signs of aging and methylmercury exposure, *Neurotoxicology* 31 (2010) 169-179.
108. Moreira, C. M., Determinação de espécies de antimônio em antimoniato de meglumina, PPGQ, UFSM, Santa Maria, 2008.
109. FishBase. World Fish Center. Disponível em: <http://www.fishbase.org/> Acessado em: 04 de março de 2011.
110. ANVISA, Regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação, RDC Nº 216, 2004.
111. Horwitz, W., Association of Official Analytical, C., Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Md., 2006.
112. Bligh, E. G., Dyer, W. J., A Rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (1959) 911-917.
113. Kollipara, U. K., Brittin, H. C., Increased iron content of some Indian foods due to cookware, *J. Am. Diet. Assoc.* 96 (1996) 508-510.
114. Kuligowski, J., Halperin, K. M., Stainless-steel cookware as a significant source of nickel, chromium, and iron, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (1992) 211-215.
115. Gouveia, S. T., Silva, F. V., Costa, L. M., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 269-275.
116. Waddell, R., Lewis, C., Hang, W., Hassell, C., Majidi, V., Inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental speciation: Applications in the new millennium, *Applied Spectroscopy Reviews* 40 (2005) 33 - 69.
117. Zoorob, G. K., McKiernan, J. W., Caruso, J. A., ICP-MS for elemental speciation studies, *Microchimica Acta* 128 (1998) 145-168.

118. Rosenberg, E., Ariese, F., Quality Control in Speciation Analysis, Trace element speciation for environment, food and health, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 2001, pp. 17-50.
119. Krug, F. J., Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1 ed., Piracicaba, 2010, pp. 340.
120. Blanco Gomis, D., Sánchez Núñez, N., Andrés García, E., Bayod Jasanada, M., Gutiérrez Alvarez, M. D., Fast high performance liquid chromatography method for in-process control of sulbactam, *Anal. Chim. Acta* 498 (2003) 1-8.
121. Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.
122. Ribani, M., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, *J. Chromatogr.* 1156 (2007) 201-205.
123. Miller, J. N., Miller, J. C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5 ed., Pearson, England, 2005, pp. 288.
124. Ferreira, M. W., Bressan, M. C., Souza, X. R. d., Vieira, J. O. e., Faria, P. B., Andrade, P. L., Efeito dos métodos de cocção sobre a composição química e perfil lipídico de filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757), *Ciência e Agrotecnologia* 31 (2007) 798-803.
125. Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Cengiz, E., Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Food Chem.* 84 (2004) 19-22.
126. Paschke, A., Consideration of the physicochemical properties of sample matrices - an important step in sampling and sample preparation, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 78-89.
127. ANVISA, Regulamento Técnico - Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos, Portaria Nº 685, 27 de agosto de 1998, 1998.
128. Limaverde Filho, A. M., Campos, R. C. d., Goes, V. d. A., Pinto, R. A. G., Avaliação da perda de mercúrio total em peixe antes e após os processos de fritura e cocção, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 19 (1999) 19-22.
129. Antes, F. G., Mesko, M. F., Barin, J. S., Moreira, C. M., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS, *Microchem. J.* 98 (2011) 144-149.

130. Machát, J., Kanický, V., Otruba, V., Determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with pneumatic nebulization, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 576-581.
131. Feijó, G. L. D., Conhecendo a carne que você consome, *Embrapa Gado de Corte* (1999) 25.
132. Leander, R. C., Hedrick, H. B., Brown, M. F., White, J. A., Comparison of structural changes in bovine long and semitendinosus muscles during cooking, *J. Food Sci.* 45 (1980) 1-6.
133. Li, L., Wang, F., Meng, B., Lemes, M., Feng, X., Jiang, G., Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3103-3107.
134. Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M., Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes, *Meat Science* 71 (2005) 194-204.
135. McKee, SR, Sams, A., Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale exudative turkey meat characteristics, *Poult. Sci.* 77 (1998) 169-174.
136. Murphy, R., Marks, B., Effect of meat temperature on proteins, texture, and cook loss for ground chicken breast patties, *Poult. Sci.* 79 (2000) 99-104.
137. Martins, V. G., Costa, J. A. V., Prentice-Hernández, C., Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*), *Quim. Nova* 32 (2009) 61-66.
138. Krupp, E., Milne, B., Mestrot, A., Meharg, A., Feldmann, J., Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1753-1764.
139. Hill, J. W., Ball, D. W., Scott, R. J., The basics of general, organic, and biological chemistry, Pearson Education Limited, 2011, pp. 704.
140. McKee, SR, Sams, A., The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat, *Poult. Sci.* 76 (1997) 1616-1620.
141. Ullrich, S. M., Tanton, T. W., Abdrashitova, S. A., Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31 (2001) 241-293.
142. Fagundes, D. L. A., Ômega-3 & Ômega-6 - o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças, 1 ed., AGE, 2002, pp. 112.
143. Mergler, D., Anderson, H. A., Chan, L. H. M., Mahaffey, K. R., Murray, M., Sakamoto, M., Stern, A. H., Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern, *Ambio* 36 (2007) 3-11.

-
144. Falnoga, I., Kobal, A., Stibilj, V., Horvat, M., Selenoprotein P in subjects exposed to mercury and other stress situations such as physical load or metal chelation treatment, *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 25-33.
 145. Park, K., Mozaffarian, D., Omega-3 fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases, *Current Atherosclerosis Reports* 12 (2010) 414-422.
 146. Mozaffarian, D., Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: Current evidence and unanswered questions, *Int. J. Env. Res. Public Health* 6 (2009) 1894-1916.
 147. Peakall, D., Burger, J., Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2003) 110-121.

ANEXO A

Neste anexo será apresentado um breve estudo sobre a influência de diferentes condições de secagem sobre a integridade de espécies de Hg em amostras de peixes. Os tratamentos de secagem utilizados neste estudo são os geralmente empregados no preparo de amostras biológicas para posterior análise de especiação de Hg, a liofilização e a secagem convencional usando estufa com circulação forçada de ar.

Avaliação de diferentes condições de secagem no comportamento de espécies de Hg em amostras de peixes

A1 Introdução

Um dos principais problemas associados com a análise de especiação química é garantir a integridade das espécies de interesse durante todo o procedimento analítico. Diversas etapas do procedimento analítico podem resultar em modificações destas espécies, o que pode acarretar em uma interpretação inexata dos resultados analíticos.¹⁻³

Em análise de especiação de Hg, a maioria das amostras, principalmente biológicas, necessita de uma etapa de secagem, pois assim, as amostras se tornam mais apropriadas para a homogeneização, conservação das espécies e extração. Dentre os processos de secagem geralmente utilizados no preparo de amostras, destacam-se a liofilização e a secagem em estufa com circulação forçada de ar.⁴

A secagem em estufa é o procedimento mais empregado em laboratórios de análise química, pois é considerado prático e relativamente mais barato que os demais procedimentos de secagem empregados, como a liofilização. Este processo de secagem geralmente se dá pela evaporação da água da amostra com a circulação forçada de ar, onde a água evaporada é dispensada para o ambiente externo, impedindo assim, o retorno da umidade para a amostra.⁵ Já a liofilização é um processo de secagem baseado no fenômeno de sublimação. Devido à ausência de água líquida e as baixas temperaturas requeridas para este processo, muitos métodos de análise de especiação utilizam este procedimento com o objetivo de manter a integridade dos analitos. As etapas fundamentais envolvidas neste processo são: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A amostra, previamente congelada, é desidratada por sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas.⁶

Atualmente existem muitos métodos analíticos referentes à especiação de Hg empregando estas técnicas de secagem em amostras biológicas. No entanto, pouco

se sabe sobre a influência das condições de secagem na conservação da integridade das espécies de Hg nestas amostras.

Portanto, neste trabalho em anexo, foi feita uma avaliação da influência da temperatura e do tipo de secagem sobre a estabilidade das espécies de Hg em amostras de peixe. A extração das espécies de Hg da matriz da amostra foi efetuada utilizando solução de L-cisteína 0,6% (m/v). Para a identificação e quantificação das espécies de Hg, foi utilizada a técnica de LC-CVG-ICP-MS.

A2 Materiais e métodos

A2.1 Instrumentos, materiais diversos e reagentes

A descrição de todos instrumentos, materiais diversos e reagentes utilizados neste estudo estão descritos nos itens 3.1, 3.2, e 3.3, respectivamente.

A2.2 Amostra

Sete espécies diferentes de peixes foram adquiridas no mercado local. Dentre estas: Abrotea (*Brotula barbata*), Atum (*Thunnus albacares*); Cabrinha (*Prionotus punctatus*), Corvina (*Micropogonias furnieri*), Pirarucu (*Arapaima gigas*), Salmão (*Salmo salar*) e Tainha (*Mugil brasiliensis*).

A2.3 Preparo de amostra

A2.3.1 Tratamento preliminar

Cerca de 2 kg de músculo de cada espécie de peixe foram homogeneizados com auxílio de um liquidificador. Cada amostra homogeneizada foi fracionada em quatro unidades com o objetivo de manter as mesmas condições de congelamentos e descongelamento para todos os testes. Para o acondicionamento das amostras, utilizaram-se embalagens de polietileno (PE) e ambiente com temperatura de -20 °C.

A2.3.2 Secagem

Para a avaliação do comportamento das espécies de Hg submetida a diferentes condições de secagem de amostra, foram utilizados 7 tipos de tratamentos de secagem. Os tratamentos avaliados foram:

- Secagem em forno estufa por circulação de ar, sob diferentes temperaturas (50, 75, 100, 125, 150 e 175 °C).
- Secagem em liofilizador (5 mmHg, -2 °C)

As amostras provenientes do tratamento do item A2.3.1, foram descongeladas ao abrigo da luz em refrigerador em torno de 4 °C sempre 24 horas antes do início das operações de secagem. Em seguida, cada amostra foi dividida em 7 porções contendo cerca de 15 g de amostra e acondicionadas em vidros relógios. Destas, 6 porções foram transferidas às 6 respectivas condições de secagem em estufa por um tempo de 24 h. A 7ª porção foi congelada novamente por 24 h a -20 °C, e desidratada por sublimação em um liofilizador durante 48 h. Após cada tratamento de secagem, as amostras foram pesadas e cominuídas em moinho criogênico para posterior extração das espécies de Hg.

Todas as amostras foram mantidas ao abrigo da luz e estocadas em refrigerador a 4 °C até a análise.

A2.3.3 Especificação de Hg nas amostras secas de peixes

O método de especificação aplicado neste estudo foi baseado nas condições otimizadas dos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3. As espécies de Hg foram extraídas com solução de L-cisteína [0,6% (m/v)] e determinadas pela técnica de LC-CVG-ICP-MS. Vale ressaltar que essas amostras foram, também, decompostas para a determinação de Hg total, conforme descrito no item 3.10. A determinação do teor de Hg total presente nas amostras após cada tratamento possui o objetivo de avaliar a eficiência do método de especificação para cada amostra.

Na Figura A1 está representado o fluxograma das principais etapas envolvidas neste trabalho.

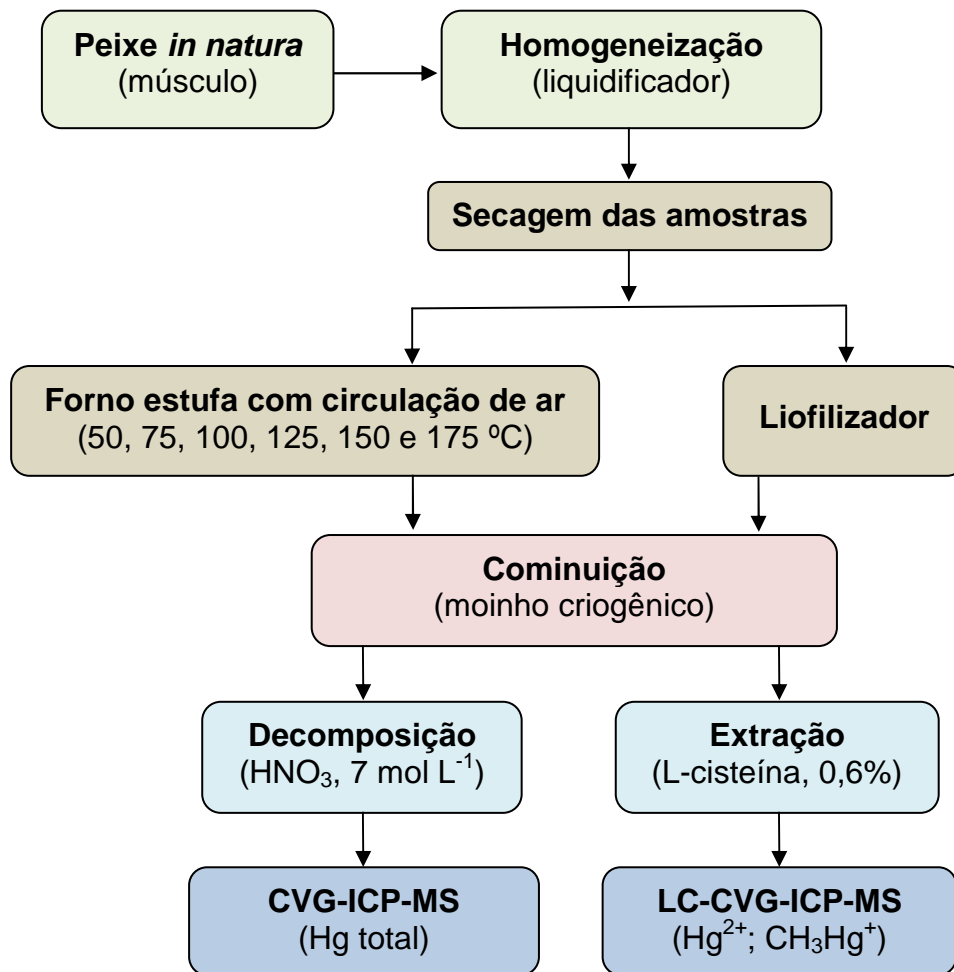


Figura A1. Fluxograma das etapas envolvidas na avaliação do efeito do processo da secagem na análise de especiação de Hg em peixes.

A3 Resultados e discussões

O método de especiação está discutido nos itens 4.1, 4.2 e 4.3. Portanto, o foco da discussão deste estudo em anexo será direcionado somente para a etapa de secagem no preparo de amostras.

A3.1 Avaliação da influência processo de secagem no comportamento de espécies de Hg em peixes

Os processos de secagem foram conduzidos até que as amostras atingissem massa constante, ou seja, os tempos de secagem de 24 e 48 h usados para a estufa

e liofilizador, respectivamente, foram suficientes para que todas as amostras atingissem massa constante. Apesar da maioria dos métodos desenvolvidos para a especiação de Hg utilizarem temperaturas inferiores a 100 °C, neste trabalho, avaliou-se temperaturas de secagem até 175 °C com o objetivo de observar um efeito mais pronunciado sobre a conservação das espécies de Hg.

Desta maneira, observou-se que o processo de secagem pode alterar as propriedades químicas e físicas da amostra (Figura A2). Conforme a temperatura de secagem aumenta, ocorre um escurecimento gradual da amostra, sendo mais pronunciado em temperaturas acima de 125 °C. Este escurecimento é provavelmente devido a reações de caramelização e/ou Maillard.^{5,7} Nas duas reações, os produtos (carboidratos) de degradação formam compostos de coloração escura.



Figura A2. Aspecto da amostra corvina moída após os diferentes tratamentos de secagem.

A avaliação do comportamento das espécies de Hg, após cada procedimento de secagem, foi verificada com base na relação da quantidade de Hg total presente na amostra *in natura* (amostra úmida) e a quantidade de Hg total presente na amostra seca, após cada tratamento. A quantidade de Hg total nas amostras secas foi obtida pelo somatório das concentrações das espécies de Hg após a análise de especiação. Para essa comparação, todos os resultados foram expressos em referência à massa seca de amostra. A influência destes tratamentos de secagem na análise de especiação de Hg nas diferentes amostras de peixes está apresentada na Figura A3.

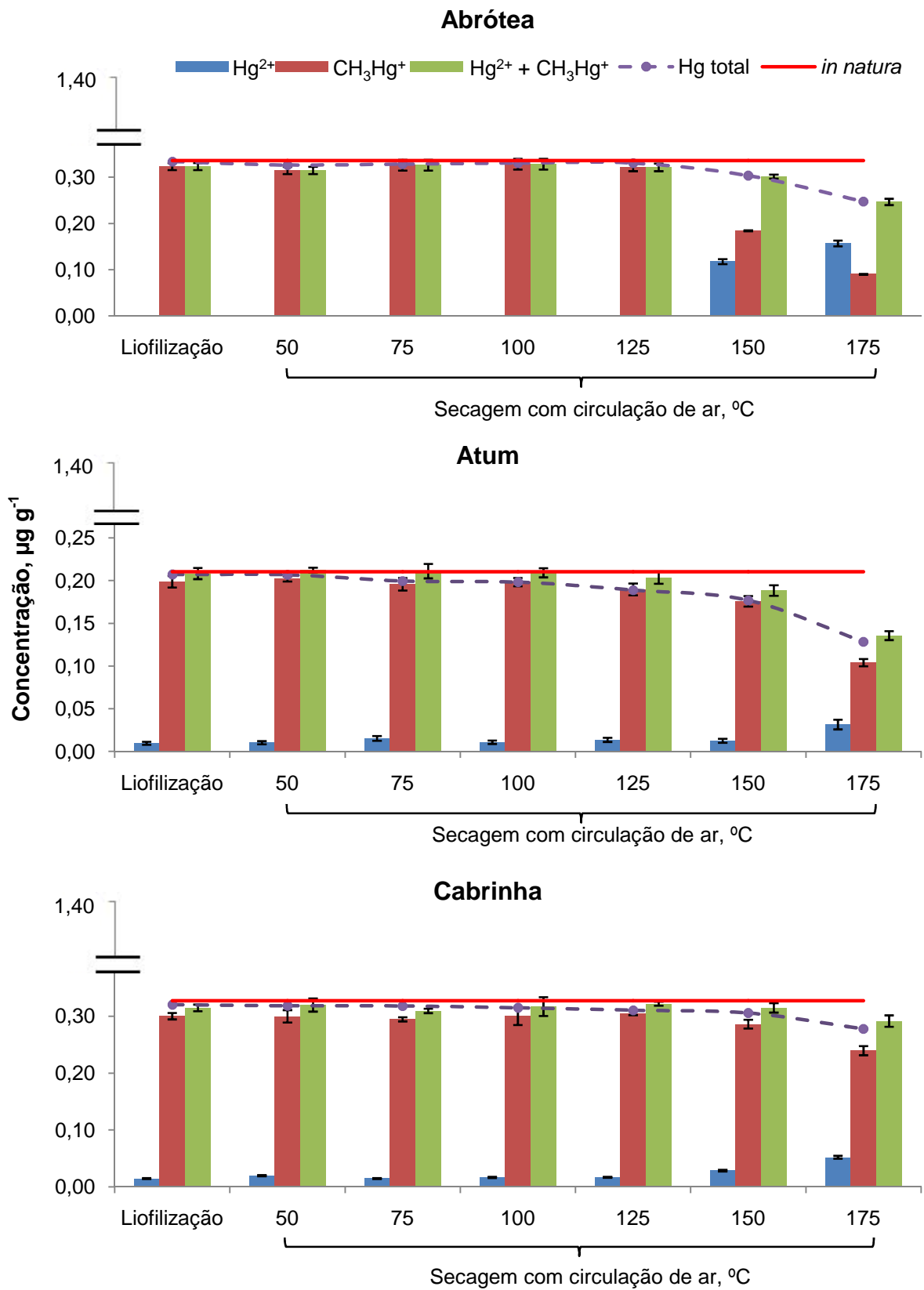


Figura A3. Influência dos diferentes tratamentos de secagem sobre a concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos de secagem.

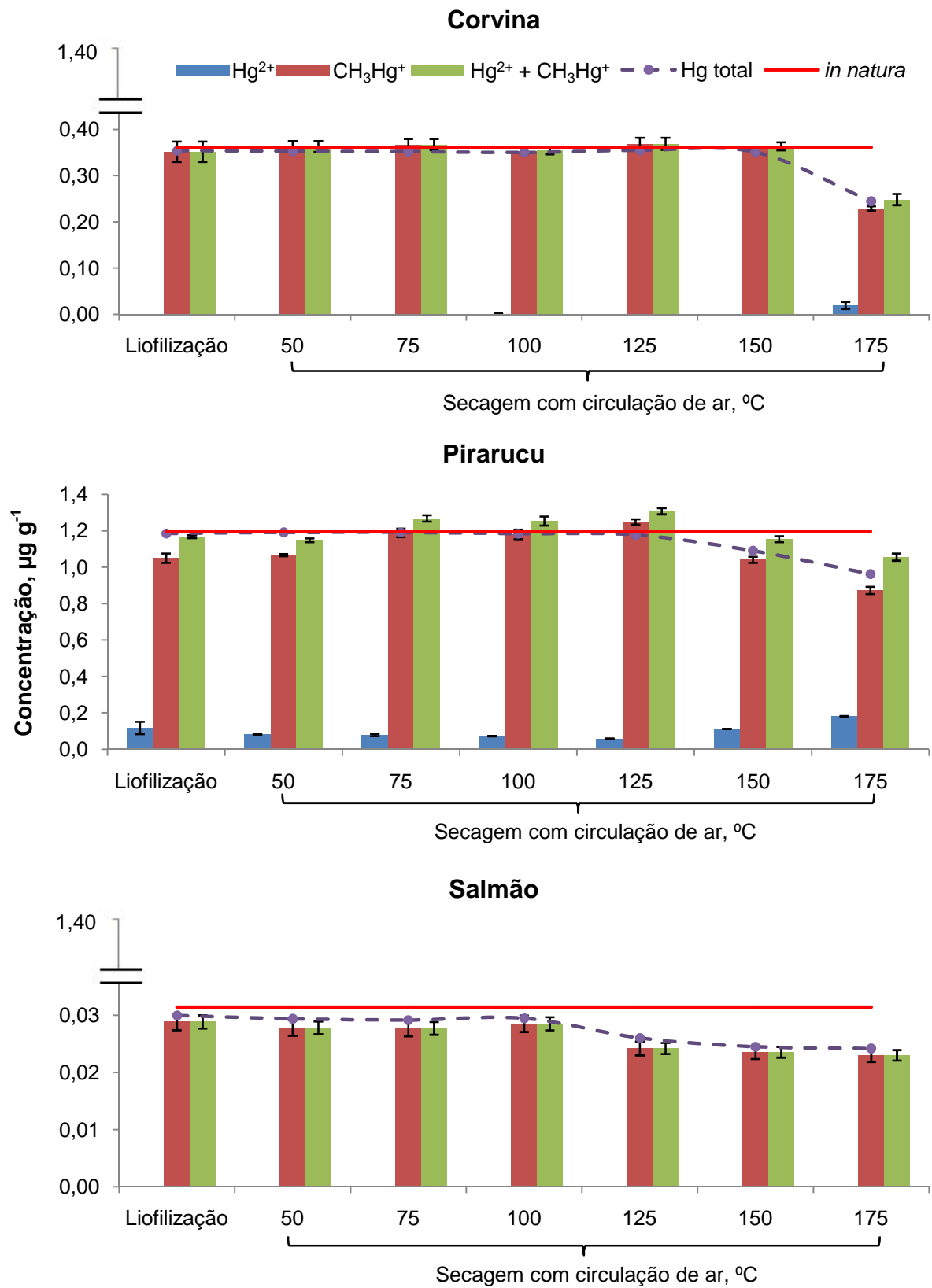


Figura A3 (Continuação). Influência dos diferentes tratamentos de secagem sobre a concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos de secagem.

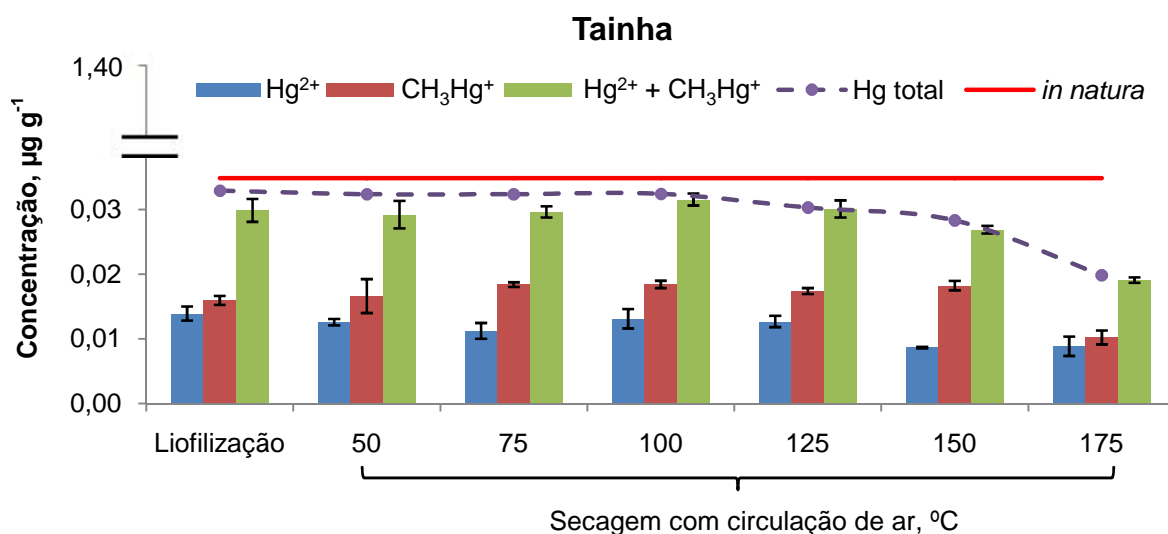


Figura A3 (Continuação). Influência dos diferentes tratamentos de secagem sobre a concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) das espécies de Hg nas amostras de peixes após os diferentes tratamentos de secagem.

Neste estudo, não foi possível efetuar a análise de especiação de Hg na amostra *in natura* (úmida), devido à dificuldade de dispersão da amostra na solução extratora. Este fato resultou em extrações não quantitativas. Um dos motivos que podem justificar esta baixa eficiência de extração estaria relacionado à etapa de moagem, que em geral, melhora a eficiência de extração por aumentar a interação da matriz com o extrator. No entanto, a amostra de peixe *in natura* não sofreu o processo de cominuição (moagem criogênica).

As recuperações de Hg total nas diferentes matrizes de peixes após a etapa de extração variaram de acordo com a matriz da amostra [abrótea (95-101%), atum (99-107%), cabrinha (96-107%), corvina (95-106%), pirarucu (96-112%), salmão (92-110%), e tainha (86-102%)]. Estes resultados foram considerados apropriados para a sequência, uma vez que métodos de análise de especiação a nível traço que forneçam recuperações de 70-120% são considerados apropriados.⁸ Desta forma, o método utilizado neste estudo mostrou-se adequado para o propósito deste trabalho.

Apesar de alguns estudos⁹⁻¹⁰ constatarem que o processo de liofilização pode ocasionar perdas e/ou conversões de espécies de Hg, neste trabalho não foram observadas diferenças significativas ($t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, $\alpha = 0,05$) entre processo de liofilização e a secagem convencional abaixo de 100 °C.

No entanto, um parâmetro importante que pode influenciar diretamente as características da amostra é a velocidade de congelamento do processo de

liofilização. Um congelamento rápido da amostra gera cristais pequenos, os quais formam maiores interfaces de gelo/água na amostra. Se a etapa de congelamento for lenta, ocorrerá a formação de cristais maiores, que podem romper a membrana celular.⁶ Com base nestes conceitos, deve-se enfatizar que a liofilização não pode ser considerada como uma operação de uma única variável. Se não há um total controle e conhecimento de todas as etapas envolvidas, a liofilização pode resultar em alterações indesejadas nas características das espécies químicas de interesse. Deste modo, a condição da taxa de congelamento empregada neste trabalho mostrou ser adequada para a conservação das espécies de Hg em amostras peixes. No entanto, para outros tipos de matrizes e/ou analitos, esta condição de congelamento pode não ser adequada.

De acordo com a Figura A3, é possível perceber que dentre as amostras de peixes estudadas neste trabalho, todas estão de acordo com as condições de secagem geralmente empregadas no preparo de amostras em análise de especiação de Hg. As condições geralmente empregadas utilizam o processo de liofilização¹¹⁻¹³, ou secagem em forno estufa em temperaturas abaixo de 100 °C.¹⁴⁻¹⁵ Neste trabalho, não foi observado riscos de perdas ou conversões de espécies de Hg nessas condições. Porém, em temperaturas acima de 125 °C foram observadas perdas e conversões de espécies de Hg em algumas amostras. Cabe lembrar que temperaturas de secagem de amostra acima de 100 °C não são comuns para a determinação de Hg; no entanto, neste trabalho, foram avaliadas temperaturas maiores justamente para aumentar a probabilidade de verificar algum efeito de perda e/ou conversão de espécies.

Na condição de secagem a 125 °C foi observado perdas significativas ($t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$, $\alpha = 0,05\%$) de Hg total para duas amostras (atum e salmão), porém não foi constatado conversões de espécies de Hg. Já em temperaturas de secagem de 150 e 175 °C foi possível observar perdas e até conversões de espécies de Hg para quase todas as amostras. Porém, dentre as 7 amostras avaliadas, a abrótea foi a que apresentou o maior efeito de conversão de espécies de CH_3Hg^+ a Hg^{2+} . Este efeito está apresentado na Figura A4.

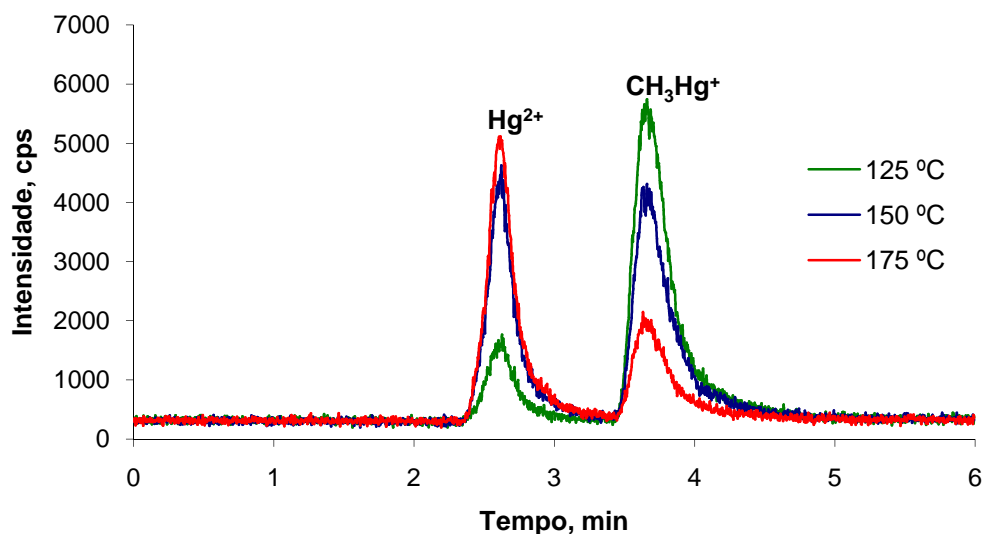


Figura A4. Perfil cromatográfico da influência do processo de secagem no comportamento de espécies de Hg na amostra de peixe abrótea.

O fato de uma espécie de peixe perder e/ou converter alguma espécie de Hg, é provavelmente devido ao tipo de interação das espécies de Hg com a matriz da amostra. O Hg possui uma alta afinidade com grupos funcionais ($-\text{SH}$ e $-\text{SeH}$) presentes nas proteínas do peixe. Deste modo, dependendo da espécie catiônica de Hg e do contra-íon ao qual esta (CH_3Hg^+) apresenta estar ligada, haverá uma energia de ligação distinta daquela espécie de Hg em questão. Portanto, as conversões de espécies de Hg observadas em algumas amostras de peixe (abrótea, atum, cabrinha e corvina), podem ser dependentes da natureza do ligante R (nucleófilo) do complexo $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{R}$ presente na matriz da amostra.

Em 2010, Zhang e Hsu-Kim;¹⁶ constataram que a fotodegradação do CH_3Hg^+ pode estar associada com o seu contra-íon. Os autores verificaram que grupos sulfidrila ($-\text{SH}$) alteram a energia de transição eletrônica do complexo $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{R}$. Ou seja, a degradação do CH_3Hg^+ por radiação UV foi observada para o complexo $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{GSH}$ (glutacionato de metilmercúrio). Porém, o mesmo comportamento não foi observado para as espécies CH_3HgCl , CH_3HgOH e $\text{CH}_3\text{HgHPO}_4^-$. Estes resultados mostraram que o complexante GSH altera a reatividade do CH_3Hg^+ , tornando-o mais suscetível à degradação. Em um estudo teórico, Ni *et al.*¹⁷ demonstraram que ligantes sulfidrila aumentam a eletronegatividade do grupo metila ($-\text{CH}_3$) do CH_3Hg^+ , e presumidamente aumenta a reatividade deste com compostos eletrófilos. Como consequência, este fato pode resultar em um aumento na possibilidade da clivagem da ligação C-Hg.

Desta forma, as perdas e conversões de espécies de Hg observadas nas amostras avaliadas neste trabalho podem ser decorrentes do efeito energético proporcionado pela temperatura de secagem, juntamente com a facilidade de clivagem da ligação C–Hg proporcionado pela diferença eletronegativa do grupo metila de espécies de CH_3Hg^+ ligadas a diferentes complexantes presentes na matriz da amostra.

Finalmente, dentre os diferentes tratamentos de secagem avaliados neste trabalho, constatou-se que tanto o processo de liofilização quanto o processo de secagem em estufa com temperaturas inferiores a 100 °C podem ser empregadas de maneira segura como etapa de tratamento preliminar no preparo de amostras para a análise de especificação de Hg.

A4 Conclusão

Através dos resultados apresentados e discutidos neste estudo, é possível concluir que a maioria dos métodos de secagem geralmente empregada como tratamento preliminar em preparo de amostras para análise de especificação de Hg (a liofilização e a secagem em estufa com circulação forçada de ar em temperaturas inferiores a 100 °C), está de acordo com o requisito que visa a manutenção das espécies químicas de interesse durante as etapas de preparo de amostras. No entanto, para outras amostras de peixes, talvez haja uma diferença mais significativa entre os diferentes tratamentos de secagem. Além disso, o método de especificação empregado neste estudo apresentou ser eficiente para o propósito do mesmo. Foi possível detectar e quantificar o Hg^{2+} e CH_3Hg^+ nas amostras de peixes, apresentando baixos limites de detecção, boa linearidade e satisfatórios índices de recuperações dos analitos.

A5 Referências Bibliográficas

1. Pedrero, Z., Mounicou, S., Monperrus, M., Amouroux, D., Investigation of Hg species binding biomolecules in dolphin liver combining GC and LC-ICP-MS with isotopic tracers, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 187-194.
2. Paschke, A., Consideration of the physicochemical properties of sample matrices - an important step in sampling and sample preparation, *Trac - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 78-89.
3. Hintelmann, H., Sample preparation for mercury speciation, M. Zoltan, S. Ralph (Eds.) Sample preparation for trace element analysis, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2003, pp. 1063-1080.
4. Ilnat, M., Sample preparation for food analysis, M. Zoltan, S. Ralph (Eds.) Sample preparation for trace element analysis, Elsevier, 2003, pp. 765-856.
5. Chen, X. D., Mujumdar, A. S., Drying Technologies in Food Processing, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, England, 2008, pp. 257.
6. Tattini Jr, V., Parra, D. F., Pitombo, R. N. d. M., Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42 (2006) 127-136.
7. Fernández-Artigas, P., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B., Browning Indicators in Model Systems and Baby Cereals, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2872-2878.
8. Rosenberg, E., Ariese, F., Quality Control in Speciation Analysis, Trace element speciation for environment, food and health, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, 2001, pp. 17-50.
9. Cabanero Ortiz, A. I., Madrid Albarran, Y., Camara Rica, C., Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.
10. Litman, R., Finston, H. L., Williams, E. T., Evaluation of sample pretreatments for mercury determination, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2364-2369.
11. Hardy, S., Jones, P., Capillary electrophoresis determination of methylmercury in fish and crab meat after extraction as the dithizone sulphonate complex, *J. Chromatogr.* 791 (1997) 333-338.
12. Sanz Landaluze, J., de Diego, A., Raposo, J. C., Madariaga, J. M., Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain), *Anal. Chim. Acta* 508 (2004) 107-117.

-
13. Nevado, J., Martín-Doimeadios, R., Bernardo, F., Moreno, M., Ropero, M., de Marcos Serrano, A., Mercury speciation in fish tissues from a Mediterranean river basin: the Tagus River (central Spain) as a case study, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (2011) 1-11.
 14. Ubillús, F., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M. J., Alegria, A., Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* 71 (2000) 529-533.
 15. Shao, L.-J., Gan, W.-E., Su, Q.-D., Determination of total and inorganic mercury in fish samples with on-line oxidation coupled to atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 128-133.
 16. Zhang, T., Hsu-Kim, H., Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands, *Nature Geosci* 3 (2010) 473-476.
 17. Ni, B., Kramer, J. R., Bell, R. A., Werstiuk, N. H., Protonolysis of the Hg-C bond of chloromethylmercury and dimethylmercury. A DFT and QTAIM study, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9451-9458.