

DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO E SELÊNIO EM MATERIAIS BIOLÓGICOS, PELO MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Marília G. M. Catharino*, Marina B. A. Vasconcellos*, Edson G. Moreira*, Roseli Cipriano, Mitiko Saiki*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Supervisão de Radioquímica
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil

RESUMO

O mercúrio apresenta um grande número de aplicações em diversos ramos, porém muitos compostos de mercúrio são altamente tóxicos e podem causar doenças ou mesmo a morte. Um outro elemento de interesse é o selênio, pois alguns estudos demonstraram que o selênio é capaz de reduzir os efeitos tóxicos do mercúrio, e outros elementos tóxicos, devido à capacidade que este possui de combinar-se com o referido elemento. Neste trabalho foram determinados os teores de mercúrio nos materiais de referência certificados "Spiked Human Hair"IAEA-085 e "Unspiked Human Hair"IAEA-086 e em amostras de cabelos de crianças que estão em tratamento dentário. A determinação de selênio foi feita através dos radioisótopos ^{77m}Se e ^{75}Se . Foram analisados os materiais de referência certificados (IAEA-085, IAEA-086, "Dogfish Liver" DOLT-1 e "Dogfish Muscle" DORM-1), suplemento vitamínico e amostras de unhas

I. INTRODUÇÃO

O mercúrio apresenta um grande número de aplicações em diversos ramos, como na agricultura, indústria, mineração e em produtos de uso bastante comum, como tinta e papel, porém muitos compostos de mercúrio são altamente tóxicos e podem causar doenças ou mesmo a morte. Devido ao grande número de aplicações desse metal, a presença deste tornou-se disseminada no meio ambiente, em grande parte devido ao fato de que o mercúrio reduz-se com facilidade a Hg^0 (metálico), que pode ser transportado por via atmosférica a longas distâncias.

Em meados da década de 50, descargas de mercúrio foram lançadas por uma indústria na Baía de Minamata no Japão, provocando grandes danos à saúde de pescadores residentes naquela região [1]. Na década de 70, no Iraque, camponeses sofreram grave contaminação mercurial ao consumir grãos contaminados por mercúrio.

A partir de ocorrências como estas iniciou-se a conscientização sobre a necessidade de reduzir as quantidades de mercúrio lançadas no meio ambiente, principalmente por indústrias.

Por outro lado, é importante ressaltar o crescimento do uso de mercúrio nas regiões de garimpo, no Brasil, notadamente na região Amazônica, onde o mercúrio é utilizado por garimpeiros para separar o ouro de outros metais. O uso indiscriminado de mercúrio não acaba afetando somente esses garimpeiros, pois estima-se que grandes quantidades de mercúrio são evaporadas ao ar após essa extração ou lançadas aos rios, afetando também a

qualidade das águas, causando sérios problemas de contaminação ambiental [2].

Neste trabalho os teores de mercúrio foram analisados em dois materiais de referência certificados "Spiked Human Hair" IAEA-085 e "Unspiked Human Hair" IAEA-086.

Um outro interesse quanto a análise de mercúrio é a determinação deste em amostras de cabelos de crianças que estão em tratamento dentário, para verificar a transferência do mercúrio do amálgama dentário.

No presente trabalho já foram analisadas 7 amostras de cabelos de crianças de 4 a 8 anos de idade, antes e após o tratamento.

Um outro elemento de interesse é o selênio, que foi determinado através do radioisótopo de meia-vida curta, ^{77m}Se .

O selênio é um elemento traço essencial na dieta humana. Sua ação está ligada à proteção contra substâncias cancerígenas; contra problemas do coração, melhoria da atividade sexual, hipertensão entre outros [1].

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o selênio é capaz de reduzir os efeitos tóxicos do mercúrio, e outros elementos tóxicos, devido à capacidade que o selênio possui de combinar-se com o referido elemento [3].

Todos os fatos mencionados demonstram a importância crescente que vem alcançando a determinação de selênio em diversos compartimentos do meio ambiente, como em solos, sedimentos, águas, assim como nos alimentos e dietas e também em monitores biológicos, como sangue, urina e cabelos.

A análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) é um dos métodos analíticos que tem sido bastante aplicados para as análises de selênio, ao lado de outros, como AAS, ICP-AES e ICP-MS.

O radionuclídeo mais utilizado para as análises de selênio é o ^{75}Se , que possui uma meia-vida longa, de 119,8 dias. O uso do radionuclídeo ^{75}Se permite boas determinações de selênio, mas requer irradiações longas, sob altos fluxos de nêutrons, assim como longos tempos de contagem e decaimento, o que pode levar a um tempo de análise total de duas a três semanas.

Uma outra alternativa para a determinação de selênio é a utilização do radioisótopo de meia-vida curta, $^{77\text{m}}\text{Se}$, com 17,45 segundos de meia-vida. Este isótopo pode ser produzido pela absorção de nêutrons térmicos pelo ^{76}Se .

O uso do $^{77\text{m}}\text{Se}$ em análise por ativação com nêutrons instrumental pode assim reduzir consideravelmente o custo e o tempo total da análise e tornar o método bastante competitivo em relação a outros métodos analíticos.

No presente trabalho, foram analisados os materiais de referência certificados para a certificação do método, através do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$. Os materiais de referência analisados foram: “Spiked Human Hair” IAEA-085, “Unspiked Human Hair” IAEA-086, “Dogfish Liver” DOLT-1 e “Dogfish Muscle” DORM-1. Foi utilizado também o radioisótopo de ^{75}Se afim de se comparar os teores de selênio obtidos através do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$ já que o método de análise, por irradiação longa, já foi estabelecido.

Foram analisados também um suplemento vitamínico, contendo selênio, e amostras de unhas.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Materiais de referência - Se e Hg. Na Tabela 1 estão apresentados os materiais de referência certificados utilizados neste trabalho.

Para os materiais de referência IAEA-085 e IAEA-086, as concentrações fornecidas para o teor de selênio não são certificadas, mas apenas de “informação”.

TABELA 1. Materiais de Referência Utilizados

Material de Referência	Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$)	Concentração de Hg ($\mu\text{g/g}$)
“Spiked Human Hair” IAEA-085	1,07 (0,96 - 1,17)	23,2 (22,4 - 24,0)
“Unspiked Human Hair” IAEA-086	1,0 (0,8 - 1,2)	0,573 (0,534 - 0,612)
“Dogfish Liver” DOLT-1	7,34 \pm 0,42	---
“Dogfish Muscle” DORM-1	1,62 \pm 0,12	---

Determinação de Se nos materiais de referência. Para as análises de selênio através do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$, primeiramente foram analisados os materiais de referência certificados afim de se obter a exatidão e precisão do procedimento analítico desenvolvido. Após a certificação destes foram analisadas as amostras.

As condições adotadas para a análise de selênio nos materiais de referência IAEA-085 e IAEA-086 foram as mesmas, onde para cada material de referência irradiou-se, no reator IEA - R1m, por seis vezes a mesma alíquota de cerca de 200 mg da amostra, por um período de 30 segundos e sob um fluxo de nêutrons térmicos de $0,5 \times 10^{12} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Já para a análise dos materiais de referência certificados DOLT-1 e DORM-1, o tempo de irradiação foi de 15 segundos. Essa variação do tempo de irradiação ocorre devido ao tipo de material de referência certificado que está sendo analisado. Além do ajuste do tempo de irradiação, uma outra modificação foi necessária para a análise de selênio no material de referência DOLT-1, foi necessário irradiar três alíquotas diferentes, devido ao fato do material conter outros elementos de fácil ativação, dificultando assim as medições, porém essa dificuldade foi eliminada fazendo-se apenas duas irradiações de cada alíquota.

Juntamente com cada um dos materiais de referência certificados foi irradiada uma alíquota de padrão sintético de selênio pipetado sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 40.

Imediatamente após a irradiação, padrão e material de referência foram medidos por 90 segundos cada, em um espectrômetro de raios gama, constituído de um detector de germânio hiperpuro CANBERRA modelo GX2020, acoplado a um sistema multicanal e eletrônica associada também da marca CANBERRA. A aquisição dos espectros gama foi feita utilizando - se o programa VERSÃO II, e a concentração de Se foi calculada através do programa PAKI. Para as irradiações longas cerca de 200 mg do material de referência e padrões sintéticos de selênio foram irradiados no reator IEA - R1m por um período de 8 horas, sob um fluxo de nêutrons térmicos de $10^{12} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Após um período de decaimento de 15 dias, materiais de referência certificados e padrões são medidos em um espectrômetro de raios gama, constituído de um detector de germânio hiperpuro CANBERRA modelo GX2020, acoplado a um sistema multicanal e eletrônica associada também da marca CANBERRA. A aquisição dos espectros gama foi feita utilizando-se o programa VERSÃO II, e a concentração de Se foi calculada através do programa ESPECTRO.

Até o presente momento foram analisados somente os materiais DOLT-1 e DORM-1.

Determinação de Se em suplemento vitamínico.

Primeiramente foram selecionados aleatoriamente dez comprimidos de um frasco de suplemento vitamínico contendo cem unidades da marca Vitamin World. Após essa seleção os comprimidos foram pesados um a um, já que o objetivo dessa análise é determinar a massa de selênio por comprimido.

Posteriormente os comprimidos foram triturados e homogeneizados um a um em almofariz de ágata, previamente limpo com ácido nítrico 10% e água destilada.

Por fim cada comprimido foi dividido em duas alíquotas de aproximadamente 200 mg, onde estas foram pesadas em envoltórios plásticos, previamente limpos com HNO_3 diluído, e selados.

Juntamente com uma alíquota do padrão sintético de selênio cada uma dessas alíquotas foram irradiadas, no reator IEA -

R1m, por um período de 20 segundos, sob um fluxo de nêutrons térmicos de $0,5 \times 10^{12} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cada alíquota foi irradiada apenas uma vez. As contagens foram procedidas da mesma forma que os materiais de referência, já citadas anteriormente. O radioisótopo utilizado nesta análise foi $^{77\text{m}}\text{Se}$.

Determinação de Se em amostras de unhas. As amostras de unhas foram coletadas de indivíduos saudáveis pertencentes a funcionários e estagiários da Supervisão de Radioquímica do IPEN, de dentistas, professores e outros.

A coleta das amostras de unhas foi feita de todos os dedos dos pés, utilizando - se cortador de unha ou tesouras de aço inox.

As amostras de unhas foram cortadas em segmentos menores e lavadas de acordo com o protocolo recomendado pela AIEA[4].

Cerca de 200 mg de cada amostra foi pesada em envoltórios plásticos, previamente limpos com HNO_3 diluído, e selados. Cada amostra de unha foi irradiada, no reator IEA - R1m, por duas vezes a mesma alíquota por um período de 20 segundos. As contagens foram procedidas da mesma forma que os materiais de referência, já citadas anteriormente. O radioisótopo utilizado nesta análise foi o de meia - vida curta $^{77\text{m}}\text{Se}$.

Determinação de Hg. As amostras de cabelos foram coletadas, de crianças de 4 a 8 anos de idade que estão em tratamento odontológico, em colaboração com a Faculdade de Odontologia da USP.

A coleta foi feita com tesoura de aço inox, limpa com álcool p.a., retirando - se o cabelo da área occipital, bem próximo ao escalpo, conforme o protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), já citado.

Após essas amostras de cabelos foram cortadas, com uma tesoura de aço inox limpa, em segmentos de cerca de 0,5 mm de comprimento e lavadas de acordo com o protocolo da AIEA.

Ao fim do processo de lavagem essas amostras foram secas à temperatura ambiente, por um período de 24 horas.

Cerca 100 mg de cada amostra foi pesada em envoltórios plásticos, previamente limpos com HNO_3 diluído, e selados. As amostras de cabelo foram irradiadas no reator nuclear IEA - R1m, sob um fluxo de nêutrons térmicos de cerca de $10^{12} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por um período de 60 minutos. Juntamente com as amostras, foram irradiados padrões sintético de mercúrio, pipetados sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 40 previamente impregnadas com solução de tioacetamida e cerca de 100 mg dos materiais de referência (IAEA-085 e IAEA-086). A tioacetamida é utilizada para evitar perdas do mercúrio durante a irradiação, conforme recomendado por Noguchi et al [5].

Após um período de decaimento de cerca de 48 horas, amostras e padrões foram medidos em um espectrômetro de raios gama, constituído de um detetor de germânio hiperpuro EURISYS modelo EGNC 25-190-R e eletrônica associada da mesma marca.

Para essa análise, mede - se a radioatividade gama do radioisótopo ^{197}Hg , com meia - vida de 64.1 horas e energias da radiação gama de 69 e 77 KeV.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados médios para os teores de selênio nos materiais de referência certificados, obtidos através dos radioisótopos $^{77\text{m}}\text{Se}$ e ^{75}Se .

TABELA 2. Resultados das Análises de Selênio nos Materiais de Referência IAEA-085, IAEA-086, DOLT-1 e DORM-1.

Material de Referência	Conc. média de Se ($\mu\text{g/g}$) ($^{77\text{m}}\text{Se}$)	Conc. média de Se ($\mu\text{g/g}$) (^{75}Se)
IAEA-085	$1,05 \pm 0,08$	---
IAEA-086	$1,04 \pm 0,16$	---
DOLT-1	$7,68 \pm 0,83$	$7,24 \pm 0,21$
DORM-1	$1,53 \pm 0,17$	$1,83 \pm 0,08$

Os resultados obtidos para a determinação de selênio, através do radioisótopo $^{77\text{m}}\text{Se}$ nos materiais de referência certificados IAEA-085, IAEA-086, DOLT-1 e DORM-1, conforme apresentado na tabela acima, foram satisfatórios tendo - se obtido erros relativos de 1,9; 4,0; 4,6 e 5,6% respectivamente. Os resultados obtidos por irradiações longas para os materiais DOLT-1 e DORM-1 também foram satisfatórios onde os erros relativos foram de 1,4 e 13% respectivamente.

Para melhor comparação dos valores obtidos com os valores certificados dos materiais de referência foram construídos gráficos de concentração normalizada apresentado nas Figuras 1 e 2.

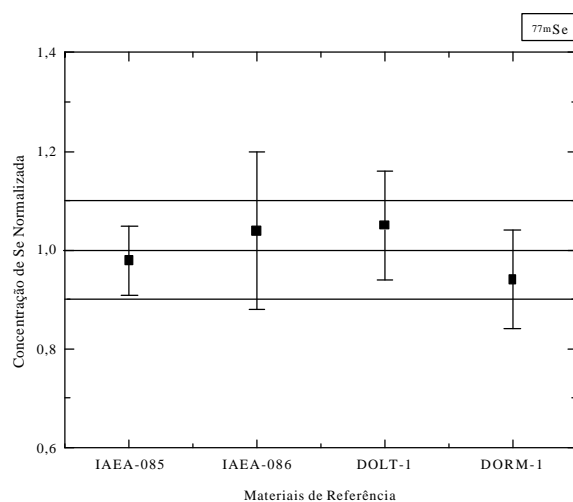


Figura 1. Gráfico de Concentração de Se Normalizada para os Materiais de Referência IAEA-085, IAEA-086, DOLT-1 e DORM-1 ($^{77\text{m}}\text{Se}$).

A exatidão dos resultados é medida pela distância do valor 1 apresentado no gráfico, e o desvio padrão é a dispersão do valor. Os valores de 0,9 e 1,1 apresentados pelas retas significam um desvio padrão de 10%.

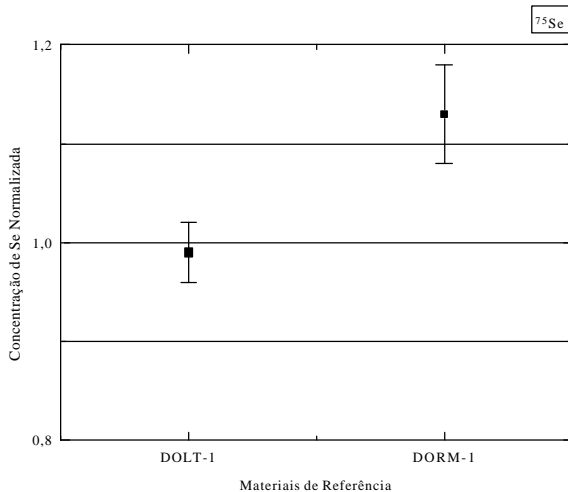


Figura 2. Gráfico de Concentração de Se Normalizada para os Materiais de Referência DOLT-1 e DORM-1 (^{75}Se).

Uma outra forma de compararmos melhor os resultados obtidos com os valores certificados é através do cálculo do z score,[6] que é calculado pela equação (1) apresentada a seguir.

$$z = \frac{C_o - C_m}{\sqrt{\sigma_o^2 + \sigma_m^2}} \quad (1)$$

onde:

C_o = Concentração do resultado obtido

C_m = Concentração do material certificado

σ_o = desvio padrão do resultado obtido

σ_m = desvio padrão do material certificado

A partir do cálculo do z score foram construídos gráficos que estão apresentados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Gráfico de z score para os Materiais de Referência IAEA-085, IAEA-086, DOLT-1 e DORM-1 (^{77m}Se).

Figura 4. Gráfico de z score para os Materiais de Referência DOLT-1 e DORM-1 (^{75}Se).

Para que os resultados obtidos possam ser considerados satisfatórios os valores de z devem estar compreendidos entre os valores 3 e -3.

Após essa etapa de otimização do método para os materiais de referência certificados foram analisadas amostras de um suplemento vitamínico e amostras de unhas quanto ao teor de selênio, através do radioisótopo ^{77m}Se . Esses resultados estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3. Resultados das Análises de Selênio em Suplemento Vitamínico de Selênio - Vitamin World

Código da Amostra	Massa média de Se/comprimido (μg)	Desvio Padrão Relativo (%)
C1	184,6 \pm 5,2	2,8
C2	198,6 \pm 6,4	3,2
C3	198,7 \pm 5,8	2,9
C4	205,1 \pm 6,4	3,1
C5	180,4 \pm 5,4	3,0
C6	197,6 \pm 6,5	3,3
C7	187,1 \pm 6,4	3,4
C8	182,2 \pm 5,5	3,0
C9	193,5 \pm 5,8	3,0
C10	176,5 \pm 5,5	3,1

Os resultados obtidos para o teor de selênio em suplemento vitamínico contendo selênio, Tabela 3, foram

satisfatórios onde obtivemos uma diferença percentual de 4,8.

Os valores médios obtidos estiveram um pouco abaixo do valor declarado pelo fabricante (200µg). A reprodutibilidade obtida, em torno de 3%, pode também ser considerada como satisfatória.

A tabela a seguir apresenta os resultados para o teor de selênio em amostras de unhas.

TABELA 4. Resultados das Análises de Selênio em Amostras de Unhas.

Código da amostra	Concentração de Se (ppm)	Desvio padrão relativo (%)
U8	0,59±0,05	8,5
U9	0,487±0,004	0,8
U10	0,403±0,001	0,2
U13	0,42±0,05	11,9
U14	0,45±0,02	4,4
U15	0,66±0,02	3,0

Os resultados obtidos para o teor de selênio nas amostras de unhas, através do método de AANI utilizando - se o radioisótopo de meia-vida curta é bastante aplicável nessa matriz, pois obteve - se desvios padrão de até 12%.

A Tabela 5 apresenta os resultados médios para os teores de mercúrio nos materiais de referência IAEA-085 e IAEA-086.

TABELA 5. Resultados das Análises de Mercúrio nos Materiais de Referência IAEA-085, IAEA-086.

Material de Referência	Concentração média de Hg (µg/g)
IAEA-085	24,70±1,17
IAEA-086	0,59±0,03

Os resultados obtidos para a determinação de mercúrio nos materiais de referência IAEA-085 e IAEA-086, foram satisfatórios, obtendo - se erros relativos de 6,5 e 3% respectivamente.

Para melhor comparação entre resultado obtido e valor certificado foram construídos gráficos de concentração normalizada e z score que estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

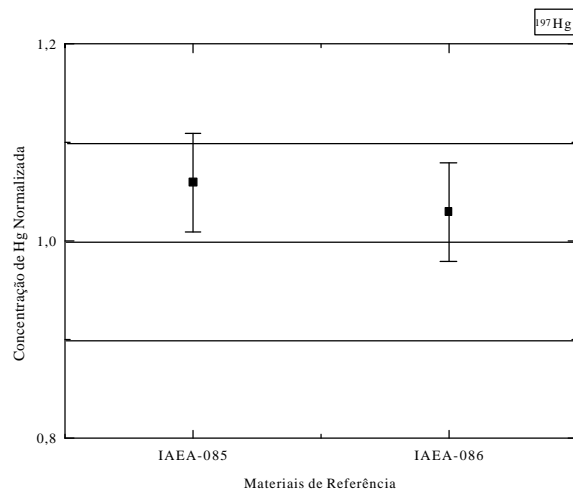


Figura 5. Gráfico de Concentração de Hg Normalizada para os Materiais de Referência IAEA-085, IAEA-086.

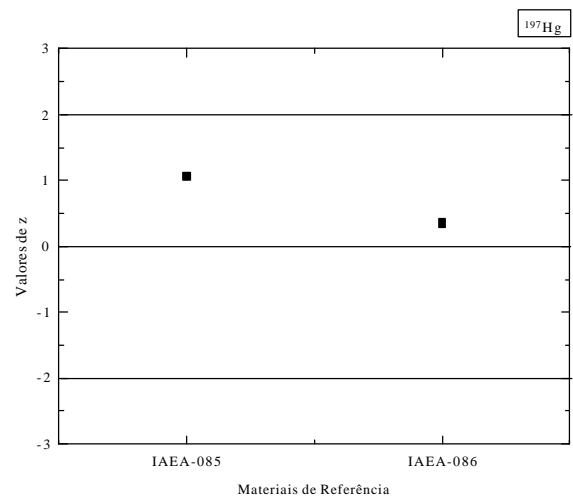


Figura 6. Gráfico de z score para os Materiais de Referência IAEA-085 e IAEA-086.

Foram analisados também o teor de mercúrio em amostras de cabelos coletadas de pacientes em tratamento odontológico. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Resultados das Análise do Teor de Mercúrio em Amostras de Cabelo de Crianças em Tratamento Odontológico.

Código da amostra	Conc. de Hg (ppm) antes do tratamento ^a	Conc. de Hg (ppm) após do tratamento ^a
A1	0,12±0,02 (16,6%)	0,38±0,03 (7,9%)
A3	0,21±0,03 (14,3%)	0,21±0,02 (9,5%)
A4	0,06±0,01 (16,6%)	0,06±0,01 (16,6%)
A5	0,26±0,03 (11,5%)	0,25±0,04 (16%)
A6	0,23±0,01 (4,3%)	0,27±0,04 (14,8%)
A7	0,12±0,01 (8,3%)	0,07±0,02 (28,6%)
A9	0,34±0,02 (5,9%)	0,22±0,02 (9,1%)
A10	0,28±0,01 (3,6%)	Problema com a coleta

a. valores entre paênteses: desvio padrão relativo

IV. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para o teor de selênio nos materiais de referência certificados podem ser considerados adequados demonstrando a aplicabilidade do método de análise por ativação com nêutrons instrumental para selênio, através do radioisótopo de meia - vida curta ^{77m}Se. Esses resultados puderam ser confirmados através das irradiações longas (⁷⁵Se), onde o método já está estabelecido.

Para os comprimidos contendo selênio e para as amostras de unhas o método estabelecido, através de irradiações curtas, demonstrou - se muito aplicável para esses tipos de matrizes.

Os resultados obtidos para o teor de mercúrio nos materiais de referência IAEA - 085 e IAEA - 086 também podem ser considerados adequado, pois nas condições adotadas obtivemos um erro relativo menor que 10%.

Para a análise de mercúrio em amostras de cabelos de crianças em tratamento odontológico não observou-se nenhum aumento significativo da concentração de mercúrio nos cabelos, após o tratamento, sendo esse estudo muito importante para a obtenção de dados de uma população controle de crianças.

V. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pelo suporte financeiro.

VI. REFERÊNCIAS

[1] Katz, S. A. e Chatt, A., **Hair Analysis - Application in the Biomedical and Environmental Sciences**, VCR Publishers Inc., Halifax, 1988.

[2] W.C. Pfeiffer, Proc. Int. Workshop on **Environmental Mercury Pollution and its health Effects in the Amazon River Basin (Rio de Janeiro, Brazil, November 30 - December 2, 1994)** p.1.

[3] Parizek, J., in: **Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences**, IAEA, Vienna, 177, 1972.

[4] Reference methods for Marine Pollution Studies, 46, October 1987.

[5] K. Noguchi, M. Shimizu, K. Mori Waki, **Radioisotopes**, 29, 221, 1980.

[6] Bode, P., **Instrumental and Organizational Aspects of a Neutron Activation Analysis Laboratory**, Ph. D. Thesis, Delft University of Technology, the Netherlands, 1996

VII. ABSTRACT

Mercury presents a great number of applications, however, many mercury compounds are highly toxic and may cause diseases or even death. Other element of interest is selenium, as some studies have shown that it may reduce the toxic effects of mercury and other toxic elements, due to its ability to bind to these elements. In this work the mercury concentration in the "Spiked Human Hair"IAEA-085 and "Unspiked Human Hair"IAEA-086 certified reference materials, in hair samples of children under dental treatment and in hair samples of an Amazon Region population, subject to mercurial contamination was determined. Selenium determination was done using ^{77m}Se and ⁷⁵Se radioisotopes. The selenium concentration was determined also in the (IAEA-085, IAEA-086, "Dogfish Liver"DOLT-1 and "Dogfish Muscle"DORM-1) certified reference materials, vitaminic supplement and nail clipping samples.