

Paula Alexandra Aguiéiras Triunfante Martins

**Doseamento do mercúrio total e de derivados orgânicos
de mercúrio em amostras de cadáveres
- Estudo de dois casos -**

Mestrado em Ciências Forenses

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Jun. 2007

Tese de Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Forenses

Orientadora:

Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

**Responsável pelo Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto**

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos pela orientação científica que me dispensou e pelo permanente incentivo e compreensão.

À Engenheira Elisa Soares por todo o seu apoio e colaboração prestada, constante encorajamento, compreensão e amizade.

A todos as pessoas do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia pela colaboração prestada e pela disponibilidade que sempre mostraram.

A todas as pessoas que me ajudaram com as suas palavras de estímulo.

À minha irmã Vera pela ajuda preciosa durante este percurso.

Ao meu pai pela forma de pensar que me transmitiu.

Dedico esta tese à minha mãe e irmãos.

RESUMO

No presente estudo, foi efectuada a determinação da concentração de mercúrio total em diferentes materiais humanos *post-mortem*, provenientes de dois cadáveres de indivíduos que presumivelmente faleceram por intoxicação por mercúrio inorgânico, por forma a estabelecer-se, inequivocamente, a sua causa de morte.

Considerando o elevado tempo de sobrevida dos casos em estudo, investigou-se ainda a possibilidade de biotransformação de mercúrio inorgânico em derivados orgânicos no organismo humano, à semelhança do que está devidamente estabelecido para o mercúrio em compartimentos ambientais.

Os cadáveres em estudo corresponderam a um indivíduo do sexo masculino e um indivíduo do sexo feminino, de 39 e 77 anos, respectivamente. No primeiro caso, a intoxicação ocorreu por ingestão de mercúrio inorgânico e no segundo caso por exposição dérmica a mercúrio inorgânico.

A quantificação do mercúrio total foi efectuada através de espectrometria de absorção atómica com vapor frio (CVAAS).

Para o doseamento do metilmercúrio foi desenvolvido um método de cromatografia líquida de alta resolução com detecção por ultra-violeta (HPLC-UV).

A validação dos métodos compreendeu os parâmetros analíticos: linearidade, precisão e exactidão. Para a técnica de CVAAS, o estudo da linearidade realizou-se utilizando o método da curva de calibração. A precisão do método foi avaliada em termos de coeficiente de variação. No estudo da exactidão do método, recorreu-se ao método da adição de padrões. Foi efectuada ainda o estudo da exactidão recorrendo a

material certificado, nomeadamente, padrão certificado Tuna Fish (CRM 463) e padrão certificado Pig Kidney (BCR 186).

Para a técnica de HPLC-UV, o estudo da linearidade realizou-se utilizando o método da curva de calibração. A precisão do método, em termos de coeficiente de variação, avaliou-se em digestos de fígado e de rim. A exactidão foi avaliada pelo método da adição de padrões. O estudo da exactidão em material certificado foi também efectuado utilizando padrão certificado Tuna Fish (CRM 463).

Os valores obtidos de mercúrio total para as amostras estudadas foram no primeiro caso, os seguintes: 49,9 µg/g fígado, 0,33 µg/g cérebro e 11,7 µg/g sangue e no segundo caso 77,7 µg/g rim, 46,6 µg/g fígado, 14,6 µg/g pulmão, 7,12 µg/g estômago, 6,40 µg/g baço, 2,95 µg/mL sangue, 2,34 µg/g coração, 1,40 µg/mL urina e 0,21 µg/g.encéfalo

Os valores obtidos de metilmercúrio para as amostras estudadas foram no primeiro caso 1,70 µg/g fígado e 0,15 µg/mL sangue. No pulmão e no cérebro os resultados foram inferiores ao limite de detecção do método. No segundo caso, todos os resultados foram inferiores ao limite de detecção do método.

Atendendo aos resultados obtidos, pode concluir-se que, nos dois casos em estudo, os valores de mercúrio total obtidos nas amostras *post-mortem* analisadas são consistentes com a morte por intoxicação por mercúrio.

Os resultados correspondentes ao doseamento do metilmercúrio apontam para a possibilidade de biotransformação, no organismo humano, de mercúrio inorgânico em metilmercúrio.

ABSTRACT

The research carried out in the present study aimed at determining the total mercury concentration in *post-mortem* human tissues in order to determine the death cause. The tissues were collected from two corpses of individuals that presumably died from inorganic mercury intoxication.

Given the time gap between the intoxication moment and death, further research was carried on the biotransformation of inorganic mercury into organomercurials in resemblance to the environmental behaviour.

The corpses in this study belonged to two individuals aged 39 and 77, respectively male and female. In the first individual, the intoxication was due to inorganic mercury ingestion and on the second due to dermal exposition to inorganic mercury.

Total mercury quantification was determined through Cold Vapour Generation Atomic Absorption Spectrometry (CVAAS).

A High Resolution Liquid Chromatographic method with UV detection (HPLC-UV) was developed for methylmercury dosing.

Method validation was performed taking into account analytical parameters such as linearity, precision and accuracy. For the CVAAS technique linearity was achieved through the calibration curve method. Precision was tested using a variation coefficient. Accuracy was tested using standards addition method. Accuracy was further tested using certified material, namely certified Tuna Fish standard (CRM 463) and certified Pig Kidney standard (BCR 186).

The linearization study for the HPLC-UV was performed using the calibration curve method. The precision of this method was evaluated in kidney and liver digests, regarding variation coefficient. Accuracy was evaluated using standards addition method. Accuracy was also studied using certified Tuna Fish standards (CRM 463).

In terms of total mercury, the results obtained for the first case samples were: liver 49,9 µg/g, brain 0,33 µg/g and blood 11,7 µg/g. For the second case samples the following results were achieved: kidney 77,7 µg/g, liver 46,6 µg/g, lungs 14,6 µg/g, stomach 7,12 µg/g, spleen 6,40 µg/g, blood 2,95 µg/mL, heart 2,34 µg/g, urine 1,40 µg/mL and encephalon 0,21 µg/g.

In the first case samples the values obtained for the methylmercury were: liver 1,70 µg/g, blood 0,15 µg/mL. In lungs and brain the results were less than the detection limit of the method. In the second case all the results were less than the detection limit of the method.

Given the obtained results it can be concluded that, for both cases, obtained total mercury values from post-mortem samples were consistent with mercury intoxication dead.

The results corresponding to methylmercury dosing suggest that biotransformation on the human body occurs from inorganic mercury into methylmercury.

ÍNDICE

1- Introdução	11
1.1 - Considerações gerais e objectivos do trabalho	11
1.2 - Características físico-químicas do mercúrio	13
1.3 – Intoxicações por mercúrio	16
1.4 – Ciclo do mercúrio	18
1.5 – Especiação e toxicocinética	21
1.5.5 – Mercúrio elementar	21
1.5.2 – Mercúrio inorgânico	24
1.5.3 – Mercúrio orgânico	27
1.6 – Toxicologia e tratamento	29
1.6.1 – Mercúrio elementar	30
1.6.2 – Mercúrio inorgânico	30
1.6.3 – Mercúrio orgânico	31
1.7 - Metodologias para a determinação do mercúrio	32
1.7.1 - Recolha das amostras	33
1.7.2 - Conservação e armazenamento	33
1.7.3 - Controlo da contaminação	34
1.7.4 - Pré-tratamento das amostras	35
1.7.5 - Doseamento do mercúrio total	35
1.7.6 - Doseamento do metilmercúrio	36

2. – Descrição dos casos em estudo	39
2.1 - Caso 1	39
2.1 - Caso 2	39
3 - Doseamento do mercúrio total e metilmercúrio em amostras biológicas	41
3.1 - Doseamento do mercúrio total	41
3.1.1 – Instrumentação	41
3.1.2 – Material	41
3.1.3 - Reagentes e padrões	41
3.1.4 - Amostras para análise	42
3.1.5 - Preparação das amostras	43
3.1.6 - Programação da Técnica de Vapor Frio para o doseamento do mercúrio total	44
3.2 - Validação do método para o doseamento do mercúrio total	45
3.2.1 - Estudo da linearidade, limite de detecção e quantificação	45
3.2.2 - Estudo da precisão	46
3.2.3 - Estudo da exactidão	47
3.3 - Doseamento do mercúrio orgânico	48
3.3.1 - Instrumentação e condições	48
3.3.2 – Material	49
3.3.3 - Reagentes e padrões	49
3.3.4 - Amostras para análise	50
3.3.5 - Processo extractivo	51
3.3.6 - Condições cromatográficas	51
3.4 - Validação do método de HPLC-UV	56

3.4.1 - Estudo da linearidade, limite de detecção e quantificação	56
3.4.2 - Estudo da precisão	56
3.4.3 - Estudo da exactidão	57
4 – Resultados	59
5 – Discussão	62
6 – Conclusão	76
7 – Bibliografia	78

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações gerais e objectivos do trabalho

No estabelecimento da causa da morte por envenenamento é determinante demonstrar que o agente em causa se encontra nas amostras humanas recolhidas no acto da autópsia em concentrações fatais, tendo em conta as circunstâncias da morte.

Nas intoxicações por metais, em particular, tem sido prática habitual a quantificação total do elemento nas amostras. No caso do mercúrio, considerado as diferentes toxicocinéticas e toxicodinâmicas das várias espécies químicas deste metal, torna-se interessante proceder, para além da determinação do mercúrio total, à respectiva análise de especiação. Esta abordagem analítica pode ter particular relevância quando há tempo de sobrevida apreciável, podendo admitir-se acontecer um processo de biotransformação com consequente distribuição dos novos compostos formados no organismo por diferentes órgãos alvo.

Constituiu, assim, objecto do presente trabalho o doseamento do mercúrio total em amostras de material biológico retiradas de dois cadáveres de indivíduos que presumivelmente faleceram por intoxicação por mercúrio inorgânico, por forma a estabelecer de forma inequívoca a sua causa de morte. Estudou-se também a distribuição do mercúrio nos diferentes órgãos e fluidos biológicos.

Foi, ainda, objecto deste trabalho a pesquisa da possibilidade de formação de metilmercúrio através da biotransformação de mercúrio inorgânico no organismo humano.

Para o efeito, foi implementada uma metodologia analítica para o doseamento de metilmercúrio nas amostras biológicas.

De seguida, descrevem-se os conceitos teóricos que se entenderam necessários à boa compreensão do trabalho efectuado.

1.2 - Características físico-químicas do mercúrio

O mercúrio pode apresentar-se no meio ambiente sob três estados básicos, mercúrio elementar ou metálico, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico (Klassen *et al*, 2001).

As diferentes formas existentes de mercúrio são conhecidas como espécies, definindo-se especiação como a distribuição de determinada quantidade de mercúrio entre as diversas espécies.

As propriedades e o comportamento químico das espécies de mercúrio dependem, em grande parte, do seu estado de oxidação, podendo distinguir-se: Hg^0 (metálico), o catião Hg_2^{2+} (mercuroso) e catião Hg^{2+} (mercurial) (EPA Volume III, 1997).

Os catiões Hg_2^{2+} e Hg^{2+} podem formar numerosos compostos químicos inorgânicos ou orgânicos. No entanto, o catião mercuroso é geralmente instável em condições ambientais normais, pelo que a maior parte do mercúrio encontrado no meio ambiente, excepto na atmosfera, onde predomina o mercúrio elementar, ocorre sob a forma de sais inorgânicos mercuriais e organomercuriais (EPA Volume V, 1997).

A forma pura de mercúrio é o mercúrio elementar ou metálico, representado como Hg^0 ou $\text{Hg}(0)$. Este elemento é um metal branco prateado brilhante que, ao contrário dos outros metais, encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente.

O mercúrio elementar é a forma mais volátil do mercúrio, vaporizando parcialmente à temperatura ambiente, formando vapores de mercúrio, que são incolores

e inodoros. O mercúrio elementar é relativamente insolúvel em água, mas solúvel em lípidos e ácido nítrico.

Os compostos inorgânicos formam-se por combinação do mercúrio elementar com elementos como o cloro, enxofre, fósforo ou outros (Risher *et al*, 2002). A toxicidade destes compostos depende da sua solubilidade, que é influenciada pelo estado de oxidação. Os compostos mais solúveis, formados pelo catião Hg^{2+} , apresentam uma maior toxicidade em comparação com os sais formados pelo catião Hg_2^{2+} (Calabuig, 2001).

Os compostos de mercúrio inorgânico mais utilizados ou usualmente tratados em toxicologia são os cloretos de mercúrio, HgCl_2 e Hg_2Cl_2 , o sulfureto de mercúrio (II) e o acetato de mercúrio (II) (WHO, 1989).

A maioria dos compostos inorgânicos de mercúrio são pós ou cristais brancos, com excepção do sulfureto de mercúrio, que é vermelho e adquire cor preta com a exposição à luz. Alguns compostos de mercúrio inorgânico, como o HgCl_2 , podem existir como gás atmosférico.

Nos compostos orgânicos de mercúrio (organomercuriais) o átomo de mercúrio forma uma ligação covalente com um átomo de carbono, sendo a toxicologia destes compostos determinada pela estabilidade desta ligação covalente (Dart *et al*, 2004).

As espécies formadas mais interessantes do ponto de vista prático são o metilmercúrio CH_3Hg^+ , o etilmercúrio $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ e o fenilmercúrio $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$. Do mesmo modo que os compostos inorgânicos, o metilmercúrio e o fenilmercúrio podem existir na forma de sais, como por exemplo o cloreto de metilmercúrio ou acetato de fenilmercúrio.

Os derivados de cadeia linear (metilmercúrio e etilmercúrio) são compostos mais estáveis e apresentam maior toxicidade. Estes compostos são lipossolúveis e facilmente absorvíveis no organismo humano, onde podem produzir alterações importantes. O metilmercúrio, em particular, é a espécie orgânica predominante no ambiente e é considerada a forma mais importante, em termos de toxicidade do mercúrio (Tchounwon *et al*, 2003). Este composto pode acumular-se em peixes de água doce e salgada comestíveis, assim como em mamíferos marinhos comestíveis, em concentrações muito superiores às das águas circundantes (PNUMA, 2002).

Algumas propriedades físico-químicas apresentadas pelo mercúrio como sejam a densidade elevada, o calor específico baixo, a tensão superficial muito elevada, a capacidade calorífica muito baixa e a sua capacidade de dissolver numerosos metais com formação de amálgamas, levaram à utilização deste elemento em inúmeros processos industriais e com fins terapêuticos.

Como exemplo, refere-se a utilização do mercúrio elementar na exploração das minas de ouro e prata, na produção de cloro alcalino, nos manómetros de medição e controlo, nos termómetros, nos interruptores eléctricos, nas lâmpadas fluorescentes e nas amálgamas dentárias.

O mercúrio inorgânico, é hoje em dia, principalmente, utilizado na produção de cloro e na electrónica. O sulfureto de mercúrio é utilizado como catalisador na produção de acetaldeído.

Os compostos orgânicos são utilizados como antisépticos (mercurocromo, borato de fenilmercúrio e mertiolato sódico) e fungicidas (cloreto de etilmercúrio e

fosfato de etilmercúrio). Estes compostos foram também utilizados como diuréticos, mas por serem extremamente nefrotóxicos, já não se utilizam na actualidade.

Os compostos de mercúrio são, ainda, utilizados na indústria do papel, em produtos farmacêuticos, tintas, reagentes de laboratório, etc.

1.3 - Intoxicações por mercúrio

O Homem pode estar exposto ao mercúrio através da inalação do ar ambiente, através do consumo de alimentos ou água contaminados, por contacto com água ou solo ou por contacto dérmico com substâncias contendo mercúrio. O risco para a saúde humana depende, consideravelmente, do tipo e extensão da exposição.

As intoxicações por mercúrio têm estado, usualmente, associadas à actividade humana, sendo, actualmente, as intoxicações por exposição ocupacional ou por contaminação ambiental as mais importantes (Goodman & Gilman, 1995).

As exposições ocupacionais estão relacionadas com a utilização do mercúrio em processos industriais e envolvem, na maioria dos casos, a inalação de vapores de mercúrio.

Nas intoxicações associadas a contaminações ambientais, assume especial importância o consumo de peixe contaminado com metilmercúrio.

Nos anos 50 ocorreu na baía de Minamata uma intoxicação massiva que afectou mais de 100 pessoas, devido ao consumo de peixe contaminado por metilmercúrio. A contaminação deveu-se à descarga nesta baía do efluente de uma indústria de cloro, que utilizava um sal de mercúrio como catalisador. Este episódio, levou ao esclarecimento

do ciclo do mercúrio e, nomeadamente, ao estudo da biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio, no ambiente.

Um incidente semelhante ocorreu em Niigata, no Japão em 1964-1965. Na Suécia e na América do Norte, foi interdito o consumo de peixe capturado em alguns rios e lagos ao serem detectadas elevadas concentrações de mercúrio nestes peixes.

Também se produziram intoxicações colectivas devido à utilização de compostos de mercúrio, como fungicidas, na agricultura. Em 1972, ocorreram intoxicações graves no Iraque e Paquistão devido ao consumo de sementes de trigo tratadas com fungicidas à base de mercúrio. Também na Guatemala se registaram intoxicações por este motivo.

A utilização do mercúrio, durante séculos, como ingrediente em diuréticos, antisépticos, antibactericidas e laxantes, também conduziu a muitos episódios de intoxicação. A sua utilização foi substituída por terapias mais específicas e seguras, pelo que, hoje em dia, estes casos são raros.

Na literatura, são também referidas intoxicações fatais por compostos inorgânicos, por via dérmica (WHO, 1989). Num dos casos, uma mulher de 27 anos faleceu 4 dias depois de inserir uma “tablet” de 8,75 g de cloreto de mercúrio na vagina. Num outro caso, um indivíduo do sexo masculino faleceu após aplicar diariamente, durante cerca de dois meses, um medicamento contendo cloreto de mercúrio. Neste caso, foi apontado como causa de morte falha renal. Foram observados efeitos clínicos como dores abdominais, náuseas e vômitos (WHO, 1989).

Um outro caso registado, refere o aparecimento de efeitos clínicos como tremores, ansiedade e depressão, numa mulher de 42 anos, após aplicação tópica,

durante 18 anos, de um creme despigmentante contendo 17.5% de um composto de mercúrio inorgânico (WHO, 1989).

1.4 - Ciclo do mercúrio

O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre, principalmente, na forma de sulfureto de mercúrio, HgS (mineral cinabrio), e em grandes bolsas de mercúrio metálico líquido. A incorporação deste mercúrio nas cadeias tróficas ocorre principalmente devido a actividade vulcânica e à sublimação do mercúrio metálico que se incorpora na atmosfera na forma de vapor.

Para além das fontes de contaminação naturais do mercúrio, este elemento pode ser distribuído no meio ambiente como resultado da actividade humana. As fontes antropogénicas de mercúrio podem ser variadas, assumindo maior importância as fontes de origem industrial. Alguns estudos existentes, assumem que 70 a 80% das emissões de mercúrio estão relacionadas com actividades antropogénicas (EPA Volume III, 1997).

No meio ambiente, as diversas formas de mercúrio podem ser transportadas através do ar, da água ou de organismos biológicos e sofrer transformações físicas, químicas ou biológicas. O ciclo do mercúrio e a sua distribuição no meio ambiente envolvem fenómenos complexos que dependem de numerosos parâmetros ambientais (EPA Volume III, 1997). Alguns destes fenómenos ainda não estão perfeitamente estabelecidos.

De, uma forma geral, indicam-se na figura 1.1 os principais mecanismos conhecidos do ciclo do mercúrio.

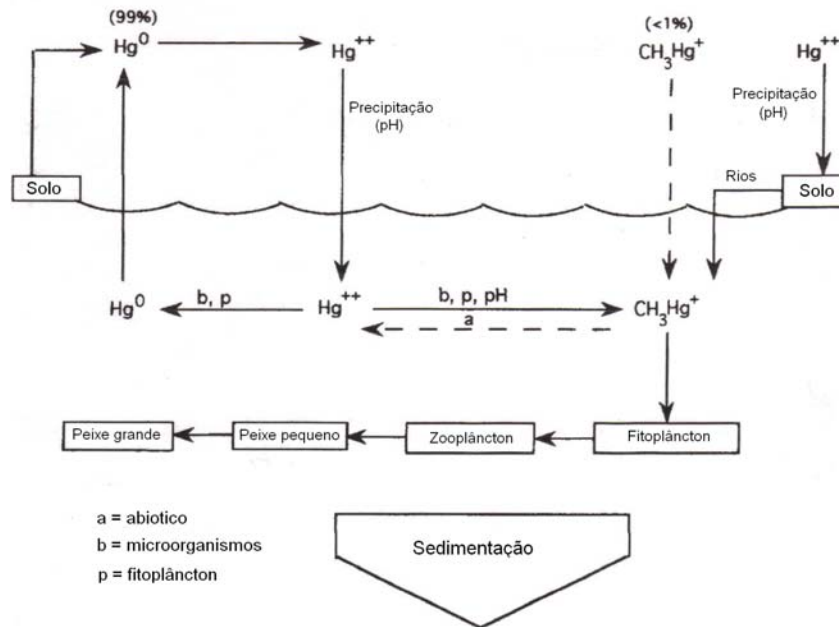


Figura 1.1 - Teoria actual sobre o ciclo do mercúrio (adaptada de Clarkson, 1998).

O mercúrio elementar na forma de vapor é a principal forma de mercúrio na atmosfera, sendo responsável por mais de 95% do mercúrio atmosférico (EPA Volume III, 1997). O tempo de residência deste elemento na atmosfera é apontado como sendo da ordem de um ano ou superior, devido à sua elevada pressão de vapor e baixa solubilidade em água. O tempo de residência de espécies divalentes de mercúrio existentes na atmosfera estima-se na ordem de poucos dias ou menos (EPA Volume III, 1997). Devido ao elevado tempo de residência do mercúrio elementar na atmosfera, este

elemento pode ser transportado a longas distância e ser depositado longe da sua fonte de emissão.

Na atmosfera, o mercúrio elementar pode ser oxidado a mercúrio divalente que, sendo solúvel, é depositado mais rapidamente. A deposição do mercúrio divalente ocorre, principalmente, através da precipitação.

Nas águas superficiais e nos sedimentos, o mercúrio divalente pode ser, reduzido a mercúrio elementar e reintroduzido na atmosfera, ou sofrer metilação a metilmercúrio por acção de microorganismos ou processos abióticos. No entanto, a sua formação na natureza deve-se, essencialmente, a processos bióticos. São exemplo de bactérias com capacidade de metilação as do género *Clostridium*, nomeadamente a methanobacter e a *Neurospora* (Magalhães, 1998). O metilmercúrio pode transformar-se em Hg_2^{2+} , que, por sua vez, pode ser reduzido a Hg^0 .

O metilmercúrio pode acumular-se nos peixes e nos mamíferos marinhos (bioacumulação), concentrando-se na cadeia alimentar (biomagnificação). A ingestão de peixe é, actualmente, a maior fonte de contaminação de metilmercúrio para o Homem, que por se encontrar no topo da cadeia alimentar fica potencialmente exposto a quantidades apreciáveis deste composto. A bioacumulação de mercúrio nos organismos aquáticos depende de factores como o pH da água, o comprimento da cadeia alimentar aquática, a temperatura e o material orgânico dissolvido.

O Hg^{2+} depositado no solo pode, também, ser reduzido a Hg^0 ou sofrer metilação a metilmercúrio, através da acção de microorganismos. O mercúrio pode permanecer no solo ou ser transportado para um curso de água por arrastamento dos terrenos pela água da chuva. No entanto, as espécies de Hg^{2+} , bem como o metilmercúrio, tendem a formar

complexos com a matéria orgânica do solo e colóides minerais, o que limita a sua mobilidade. É, assim, de esperar que o mercúrio acumulado nos solos seja fonte de contaminação das águas superficiais durante longos períodos de tempo (EPA Volume III, 1997).

1.5 - Especiação e toxicocinética

Todas as formas de mercúrio são tóxicas para o Homem, variando a sua toxicidade segundo a espécie química em que se apresenta, a via de exposição, a concentração atingida nos diferentes órgãos e a vulnerabilidade da pessoa exposta. A especiação, em particular, influencia a disponibilidade, o transporte dentro do organismo, a acumulação, a biomodificação, a destoxicação e a excreção (PNUMA, 2002).

A toxicidade dos diferentes compostos de mercúrio expressa-se no organismo em diferentes órgãos alvo, com toxicocinéticas distintas. Cada uma das formas tem o seu perfil toxicológico individual e o seu metabolismo.

De seguida, são referidos os principais efeitos das diferentes espécies de mercúrio no organismo humano.

1.5.1. Mercúrio elementar

A principal via de exposição a mercúrio elementar é por inalação dos seus

vapores. Cerca de 80% dos vapores inalados são absorvidos pelos tecidos pulmonares (PNUMA, 2002).

A absorção de vapor de mercúrio elementar através da pele julga-se em média de 0,024 ngHg/cm² por 1 mg/m³ no ar, sendo responsável por menos de 3% do vapor de mercúrio elementar absorvido durante a exposição (EPA Volume V, 1997).

Quando ingerido, o mercúrio elementar, tem uma absorção muito reduzida no tracto gastrointestinal sendo, em geral, pouco tóxico quando administrado por esta via (Dart *et al*, 2004). Estudos efectuados em ratos estimam uma absorção inferior a 0,01% (EPA Volume V, 1997).

A elevada lipossolubilidade do vapor de mercúrio elementar favorece a sua rápida difusão nos tecidos pulmonares e dissolução nos lípidos do sangue. Desta forma, os vapores de mercúrio inalado atravessam rapidamente a membrana alveolar e entram no sistema circulatório (Klaassen *et al*, 2001). Uma vez na circulação, este elemento é incorporado, preferencialmente, pelos glóbulos vermelhos, podendo ser oxidado a ião Hg²⁺ através do complexo catalase-peróxido de hidrogénio, existente na maioria dos tecidos. A taxa de oxidação pensa-se ser dependente da concentração de catalase no tecido, da produção endógena de peróxido de hidrogénio e da disponibilidade do vapor de mercúrio no local da oxidação (WHO, 1989). O complexo catalase-peróxido de hidrogénio pode sofrer saturação, a elevadas doses de vapor de mercúrio, sendo a produção de peróxido de hidrogénio o passo limitante (EPA Volume V, 1997).

A oxidação do mercúrio elementar pode ocorrer, igualmente, no cérebro, fígado, pulmões e, provavelmente, em outros tecidos. O ião Hg²⁺ obtido por oxidação do

mercúrio elementar não se distingue do ião Hg^{2+} de fontes de mercúrio inorgânico (EPA Volume V, 1997).

Os iões Hg^{2+} reagem com os grupos tiol das proteínas produzindo inibições não específicas nos sistemas enzimáticos e danificando as membranas celulares (Dart et al, 2004).

A reacção de oxidação de mercúrio elementar a ião Hg^{2+} é, em geral, suficientemente lenta para o mercúrio elementar se distribuir por todos os tecidos e órgãos (Dart et al, 2004; EPA Volume V, 1997).

O vapor de mercúrio, sendo lipossolúvel, pode atravessar a barreira hematoencefálica, assim como a placenta. O ião Hg^{2+} , pelo contrário, não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, pelo que, quando a oxidação do mercúrio elementar ocorre no cérebro, o mercúrio inorgânico acumula-se neste órgão. Estudos efectuados sugerem que a oxidação do mercúrio também ocorre na placenta e no feto. A extensão da oxidação é ainda desconhecida (WHO, 1989).

O sistema pulmonar e o sistema nervoso central são apontados como os primeiros órgãos alvo do mercúrio elementar (Goodman & Gilman, 1995). Este elemento fixa-se preferencialmente no sistema nervoso central e nos rins (Calabuig, 2001).

O mercúrio elementar é excretado sob a forma de ião mercúrio através da urina e fezes, podendo, também, ser excretado em pequenas quantidades no ar expirado, suor e saliva. A taxa de excreção depende da extensão em que ocorreu a oxidação a mercúrio inorgânico. À medida que ocorre a oxidação, a excreção torna-se similar com a excreção verificada para o mercúrio inorgânico (EPA Volume V, 1997).

1.5.2. Mercúrio inorgânico

A intoxicação por mercúrio inorgânico ocorre geralmente por ingestão, mas os sais de mercúrio podem também ser absorvidos pela pele ou pelas mucosas (Dart *et al*, 2004). A informação disponível sobre a absorção por via dérmica é muito limitada. Estudos efectuados em cobaias com cloreto de mercúrio (II) sugerem uma absorção de cerca de 2 a 3% da dose aplicada durante um período de 5 horas. (EPA Volume V, 1997). Em amostras de urina de mulheres jovens, que utilizavam um creme contendo 5-10% de mercurio inorgânico, foi obtida uma concentração de mercúrio média de 109 µg/litro. No caso de mulheres que descontinuavam o uso deste creme, a concentração de mercúrio media encontrada na urina foi de 6 µg/L. Em mulheres que nunca utilizaram o creme, a concentração de mercúrio medida na urina era em média de 2 µg/L (WHO, 1989).

Após ingestão, estima-se que só 7 a 15% do mercúrio divalente é absorvido, permanecendo uma grande quantidade no tracto gastrointestinal, onde é extremamente cáustico (Dart *et al*, 2004). A percentagem absorvida pelo tracto gastrointestinal depende, em geral, da solubilidade do sal envolvido, diminuindo com a diminuição da solubilidade (EPA Volume V, 1997). É provavelmente devido à solubilidade que a absorção de compostos mercuriosos é, em geral, menor que a absorção de compostos mercuriais (WHO, 1989). No entanto, compostos insolúveis podem ser absorvidos após oxidação por bactérias intestinais, a formas mais solúveis (Dart *et al*, 2004).

Após absorção, o sal ioniza e é inicialmente distribuído entre os glóbulos vermelhos e o plasma, onde se liga aos grupos tiol aí existentes (Dart *et al*, 2004). A

partir do sangue, o ião Hg^{2+} distribui-se inicialmente no fígado, mas acumula-se preferencialmente nos rins, onde se observam os maiores níveis de mercúrio e onde permanece mais tempo que no resto dos tecidos, causando necrose tubular aguda (EPA Volume V, 1997; Goodman & Gilman, 1995). Nos rins o ião Hg^{2+} deposita-se predominantemente nos lisosomas, mitocôndrias e membranas epiteliais (Calabuig *et al*, 2001).

Devido à baixa solubilidade em lípidos, o ião Hg^{2+} atravessa com dificuldade a barreira hematoencefálica e a placenta (Calabuig *et al*, 2001)

Os efeitos tóxicos dos compostos mercuriais dependem do grau de solubilidade e especificamente da capacidade de se ligar ao grupo tiol em enzimas importantes (Tchounwou *et al*, 2003). Estes compostos reagem com os grupos tiol das proteínas, produzindo inibições nas enzimas e danos nas membranas celulares (Dart *et al*, 2004). O mercúrio, tal como outros metais, cádmio e zinco, tem uma grande afinidade para as metalotioneínas (proteínas de baixo peso molecular que contêm cisteína) estabelecendo ligação com estas. A ligação do metal a estes ligandos intercelulares, favorece o fluxo de iões metálicos para o interior da célula e a sua acumulação em tecidos e órgãos (Goodman & Gilman, 1995).

Acredita-se que a presença de iões metálicos seja responsável pelo aumento da síntese de metalotioneínas, nomeadamente no rim, onde parece desempenhar uma função protectora uma vez que quando se ultrapassa a sua capacidade de se ligar ao ião Hg^{2+} aparece o dano renal (EPA Volume V, 1997; Calabuig *et al*, 2001).

São apontados como órgãos alvo destes compostos os rins e o tracto gastrointestinal (Klassen *et al*, 2001).

Alguns estudos apontam a possibilidade de biotransformação do mercúrio inorgânico no organismo humano, com formação de derivados orgânicos, à semelhança do que está devidamente estabelecido para o mercúrio em compartimentos ambientais.

Estudos efectuados por Abdulla *et al.* (1973) sugerem que pequenas quantidades de metilmercúrio se podem formar por intervenção da flora microbiana do intestino.

Também Ian R. Rowland *et al.* (1975, 1977) demonstraram que o conteúdo do ceco dos ratos e, em menor quantidade, o conteúdo do intestino delgado, sintetizam metilmercúrio a partir de cloreto de mercúrio(II). Estes autores, estimaram, ainda, que a quantidade total de metilmercúrio sintetizado a partir de mercúrio inorgânico ingerido, pelo homem é de, aproximadamente, 400ng/dia.

Alguns estudos efectuados em animais apontam, ainda, para a possibilidade do mercúrio inorgânico no organismo ser reduzido a mercúrio elementar pela observação de expiração de vapor de mercúrio elementar após ingestão de mercúrio inorgânico (Clarkson and Rothstein 1964; Dunn *et al.* 1981; Sugata and Clarkson, 1979; EPA Volume V, 1997).

Devido à limitada absorção do mercúrio inorgânico no trato gastrointestinal a maior parte do mercúrio ingerido (cerca de 85%) é eliminado nas fezes. O mercúrio inorgânico absorvido é eliminado principalmente, para além das fezes, na urina, podendo, também, ser eliminado em pequenas quantidades através do suor e saliva.

A vida média dos compostos inorgânicos no organismo humano é de 60 dias (Dart *et al.*, 2004).

1.5.3. Mercúrio orgânico

Os organomercuriais são absorvidos no trato gastrointestinal, em maior extensão que os sais inorgânicos de mercúrio por serem mais lipossolúveis e menos corrosivos para os intestinos (Goodman & Gilman, 1995).

Os derivados orgânicos de mercúrio, sobretudo os alquilmercuriais, devido à sua grande volatilidade, também são absorvidos por via respiratória, com uma taxa de absorção alveolar semelhante à dos vapores de Hg⁰ (cerca de 80%) (Dart *et al*, 2004).

Os antisépticos que contêm compostos orgânicos de mercúrio apresentam, em geral, uma baixa absorção por exposição dérmica (Dart *et al*, 2004).

O metilmercúrio, em particular, é absorvido no tracto gastrointestinal em mais de 90% (Klassen *et al*, 2001). No caso da ingestão de peixe contaminado com este composto, a absorção é de cerca de 95%. A intoxicação por metilmercúrio pode ocorrer também por via dérmica ou por inalação de vapores deste composto (EPA Volume V, 1997).

Os compostos organomercuriais distribuem-se no organismo de forma mais uniforme do que o mercúrio inorgânico (Klassen *et al*, 2001). Além disso, sendo lipossolúveis, podem atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta produzindo mais efeitos neurológicos que os sais de mercúrio inorgânico (Goodman & Gilman, 1995).

No sangue, os compostos orgânicos fixam-se, essencialmente, nos glóbulos vermelhos, principalmente nos grupos tiol da hemoglobina (Calabuig, 2001).

Os derivados alquilmercuriais acumulam-se no sistema nervoso central e em menor extensão no fígado e rins, originando fundamentalmente alterações neurológicas (Calabuig, 2001).

Após absorção, a ligação carbono-mercúrio de alguns organomercuriais é quebrada, ocorrendo a formação de compostos inorgânicos. Os alquilmercuriais de cadeia mais curta, como o metilmercúrio e o etilmercúrio, são mais estáveis no organismo humano que os de cadeia longa (EPA Volume V, 1997).

No metilmercúrio, essa ligação quebra muito lentamente e pensa-se o mercúrio inorgânico formado não intervêm, significativamente, na toxicidade do metilmercúrio (Goodman & Gilman, 1995).

O metilmercúrio distribui-se em vários tecidos, concentrando-se no fígado, rim, sangue, cérebro, cabelo e epiderme (Dart *et al*, 2004). Este composto atravessa a barreira hematoencefálica e o seu principal efeito envolve o sistema nervoso central. O metilmercúrio também pode atravessar a placenta e acumular-se no cérebro do feto (Dart *et al*, 2004). Concretamente, pode impedir o desenvolvimento embrionário e causar mal formações.

O metilmercúrio associa-se a moléculas solúveis em água (proteínas) ou aminoácidos contendo o grupo tiol devido à grande afinidade do catião metilmercúrio por este grupo. Foram identificados complexos de metilmercúrio com a cisteína no sangue, fígado e bile de ratos (EPA Volume V, 1997; Goodman & Gilman, 1995).

Estudos efectuados demonstram que após exposição aguda a metilmercúrio, a maior parte do mercúrio encontra-se no cérebro na forma orgânica, no entanto, em

exposições crónicas uma grande parte do mercúrio encontrado no cérebro encontra-se na forma inorgânica (EPA Volume V, 1997).

O metabolismo do metilmercúrio pode envolver também a circulação enterohepática. Mais de 70% é reabsorvido e volta ao fígado. Este facto conduz a uma elevada vida média deste composto no organismo humano (EPA Volume V, 1997; Clarkson *et al*, 1998). Este ciclo envolve a formação de um complexo entre o metilmercúrio e a glutathione (EPA Volume V, 1997).

O metilmercúrio é principalmente excretado pelas fezes. A excreção através da urina ocorre em menor quantidade, mas tende a aumentar com o tempo. O metilmercúrio é também excretado através do leite materno, podendo provocar anomalias no desenvolvimento dos tecidos com o aparecimento de mal formações em lactantes.

A vida média do metilmercúrio no organismo estima-se entre os 40 e 105 dias (Goodman & Gilman, 1995).

1.6 - Toxicologia e tratamento

Não existe ainda nenhum teste biológico válido para um diagnóstico precoce de intoxicação por mercúrio (Calabuig, 2001). No caso da intoxicação por mercúrio elementar ou mercúrio inorgânico, é recomendado o estudo da eliminação urinária do mercúrio. Em intoxicações por metilmercúrio são utilizados o sangue e o cabelo.

1.6.1. Mercúrio elementar

No caso de intoxicações agudas, os vapores de mercúrio produzem uma forte irritação pulmonar que leva a edema agudo do pulmão. Aparecem ainda sintomas como dor torácica, febre e insuficiência respiratória. Posteriormente, aparecem sintomas de eliminação como sejam sabor metálico, salivação, náuseas e vômitos.

No caso de intoxicações crónicas, os efeitos principais situam-se ao nível do sistema nervoso central. Aparecem, assim, sintomas neurasténicos e efeitos clínicos como tremores, aumento da tiróide, pulso fraco, taquicardia, dermografismo, gengivite, salivação, alterações hematológicas e um aumento da excreção de mercúrio na urina. Com o aumento da exposição, aparecem tremores não controláveis dos músculos que podem progredir para tremuras generalizadas por todo o corpo e violentos espasmos crónicos das extremidades e alterações de personalidade e comportamento, com perda de memória, excitabilidade aumentada, depressão, delírio e alucinação.

Podem também produzir-se lesões de eliminação como estomatites, colites hemorrágicas e afecções renais.

No caso da intoxicação por mercúrio metálico, o tratamento é efectuado com recurso a corticoides, oxigenoterapia e antídotos adequados.

1.6.2. Mercúrio inorgânico

As intoxicações agudas por mercúrio inorgânico apresentam um quadro característico. No caso de intoxicações por via digestiva, aparece gastroenterite aguda,

estomatite, colite e afecção renal, com anúria, que conduz à uremia. No caso da entrada do composto não se dar por via digestiva não se verifica o aparecimento de gastroenterite. Podem surgir, ainda, infecções secundárias.

As intoxicações crônicas por mercúrio inorgânico conduzem, essencialmente, a lesões de eliminação: nefrites, colites e estomatites. A longo prazo podem ocorrer, ainda, alterações neurológicas como: tremores e neurites sensoriais.

No caso do tratamento ser iniciado rapidamente, pode ser efectuado um tratamento evacuante, sendo aconselhável uma lavagem gástrica com neutralizantes. No tratamento com antídotos é usual recorrer ao BAL ou dimercaptopropanol. Posteriormente é utilizado outro quelante como o N-acetil-D-penicilamina. Deve ser efectuada hemodiálise quando a função renal do indivíduo intoxicado é afectada.

1.6.3. Mercúrio orgânico

O quadro clínico de intoxicações por compostos organomercuriais caracteriza-se por alterações neurológicas, transtornos psíquicos, transtornos sensoriais e afecção renal. Entre as alterações neurológicas pode ocorrer ataxia e parestesia à volta da boca, lábios e extremidades, em especial dedos das mãos e pés. Como transtornos psíquicos é usual a irritabilidade emocional, ansiedade e a instabilidade acompanhada de cefaleias. Em alguns casos surge demência.

Os transtornos sensoriais relacionados são a perda auditiva e óptica. As afecções renais devem-se à libertação de mercúrio inorgânico.

Em casos mais graves, pode ocorrer confusão mental, seguida de coma e morte.

Como tratamento, nas intoxicações por mercúrio orgânico é recomendado o uso do antídoto N-acetil-D-penicilamina. As lesões do sistema nervoso central são irreversíveis e é possível efectuar um tratamento sintomático. A hemodiálise convencional é de pouco valor no tratamento de intoxicações por metilmercúrio, uma vez que este composto se concentra, preferencialmente, nos eritrocitos (Goodman & Gilman, 1995).

1.7 - Metodologias analíticas para determinação de mercúrio

Uma adequada quantificação das concentrações de elementos em amostras depende das técnicas utilizadas para o seu doseamento, bem como dos métodos utilizados na recolha, manuseamento e conservação dessas amostras.

De facto, os metais não podem ser criados nem destruídos durante o processo de recolha e análise da amostra, no entanto, para que os resultados quantitativos sejam válidos, é essencial preservar a integridade da amostra, tendo em conta a massa (incluindo o conteúdo de água), a distribuição física do analito na amostra, o conteúdo do analito e a forma do analito (em caso de especiação) (Chang, 1996).

Numa investigação toxicológica, muitas vezes as dificuldades encontradas não se devem à falta de meios técnicos mas sim ao tipo, qualidade e estado de conservação da amostra a ser analisada.

No caso das técnicas a adoptar, a precisão, fiabilidade, controlo de qualidade, variabilidade e limites de detecção/quantificação dessas metodologias influem de forma determinante na validade dos resultados analíticos.

A escolha da técnica depende, ainda, de factores como a facilidade de execução e a possibilidade de interferência.

Neste capítulo são abordados, de forma sucinta, os cuidados a ter na recolha, manuseamento e conservação das amostras *post-mortem* e as principais técnicas para a determinação do mercúrio total e do metilmercúrio. No capítulo seguinte são descritas de forma exaustiva as metodologias adoptadas neste trabalho.

1.7.1. Recolha das amostras

A recolha de amostras constitui um elemento essencial na investigação toxicológica.

No caso de amostras do foro tanatológico, cabe ao tanatologista proceder a uma adequada colheita das amostras biológicas a analisar. Para isso, este deve ter noções básicas relativamente à qualidade, quantidade e local de colheita de amostras, de modo a evitar incorrer em erros que possam comprometer posteriores tratamentos analíticos.

As amostras a colher para exame toxicológico (órgãos e/ou líquidos orgânicos), mais adequadas à pesquisa, dependem, fundamentalmente, do tipo de exame toxicológico pretendido. No caso da pesquisa de intoxicação fatal por mercúrio entende-se de particular importância a recolha de sangue, rim, fígado e cérebro.

1.7.2. Conservação e armazenamento

As amostras destinadas a exame toxicológico, depois de colhidas e devidamente

identificadas, devem ser enviadas para análise logo que possível, devendo ser conservadas, em geral, a aproximadamente 4°C até ao seu envio.

Amostras de tecidos e fluidos corporais destinadas a análise com base em peso húmido devem ser armazenadas através de refrigeração ou congelamento, dependendo do tempo de armazenamento.

Às amostras não deve ser adicionado qualquer conservante e o analito em estudo não deve ser um dos componentes dos contentores de armazenamento. No caso do doseamento de metais, os contentores mais adequados são os de material plástico, nomeadamente, os de polietileno e os de fluorohidrocarboneto.

1.7.3. Controlo da contaminação

O controlo da contaminação é um dos aspectos a ter em conta para obter um resultado válido.

Uma limpeza cuidada do ambiente do laboratório assim como de todo o material utilizado é de extrema importância. Em geral, todo o material utilizado deve ser de material plástico, lavado cuidadosamente e seco em ambiente livre de contaminações. Na lavagem é usualmente utilizado um ácido e água bidesionizada.

É, ainda, importante a qualidade dos reagentes utilizados, devendo a sua pureza ser adequada à análise a efectuar. É desejável que todos os reagentes tenham um elevado grau de pureza.

1.7.4. Pré-tratamento das amostras

O pré-tratamento requerido da amostra depende, entre outros factores, do tecido a ser analisado, do metal a pesquisar e da técnica escolhida para a análise.

A preparação da amostra permite a concentração do tóxico, a eliminação de substâncias interferentes e a obtenção de uma matriz adequada à análise instrumental.

Numa fase inicial, a preparação das amostras para doseamento de metais, implica, em geral, processos de destruição de estruturas orgânicas, por forma a maximizar a extracção e isolamento dos metais a dosear.

Os elementos a analisar serão tanto mais fáceis de extrair quanto maior for a fluidez. As amostras podem considerar-se líquidas, como sejam o fluido cérebro-espinal, o suor, a saliva, a urina e a bÍlis, mistas, como o plasma, soro e sangue total, ou sólidas, como cérebro, coração, rim, fÍgado, pulmão e músculo.

Para aumentar a fluidez das amostras, é necessário submetê-las a diversos processos, a definir de acordo com a técnica analítica a realizar e as características do metal a dosear. Em geral, o meio aquoso é o mais utilizado para desenvolver estes processos.

1.7.5. Doseamento do Mercúrio Total

Para a determinação da quantidade de mercúrio total em amostras biológicas têm sido utilizados diversos métodos analíticos como sejam a Espectrometria de Absorção Atómica (AAS), Espectrometria de Fluorescência Atómica (AFS), Neutron Activation

Analysis (NAA), Espectrometria de Massa (MS) e Anodic Stripping Voltammetry (ASV) (WHO, 1989).

No entanto, a técnica geralmente adoptada, devido à sua sensibilidade e facilidade de execução, é baseada na geração de vapor frio com detecção por absorção atómica (CVAAS). A eleição desta técnica deve-se, principalmente, ao facto de o mercúrio apresentar uma pressão de vapor alta a temperaturas relativamente baixas, o que permite que possa ser introduzido no espectrómetro, como vapor, de forma quantitativa (Morita *et al*, 1998).

A metodologia a seguir envolve a redução do mercúrio iónico dissolvido, por SnCl_2 ou NaBH_4 , a mercúrio metálico, $\text{Hg}(0)$.

No pré-tratamento da amostra, têm sido utilizadas uma grande variedade de combinações de diferentes factores que influenciam a sua preparação, como sejam: ácidos fortes (HCl , H_2SO_4 , HNO_3), oxidantes (H_2O_2 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), temperatura, radiação UV (ultra-violeta) e utilização de microondas.

Neste trabalho utilizou-se a técnica de Espectrometria de Absorção Atómica com vapor frio (CVAAS) com detector de ultravioleta. A metodologia utilizada é detalhada no capítulo seguinte.

1.7.6. Doseamento do metilmercúrio

A partir do momento que se tornou evidente a importância da forma química do mercúrio na sua toxicidade, foram desenvolvidos vários métodos analíticos para a sua especiação, aplicados a diferentes matrizes.

Estes métodos envolvem, geralmente, a separação cromatográfica das espécies seguida da sua detecção com um detector específico.

Na determinação de compostos organomercuriais em amostras biológicas, o método mais utilizado tem sido a cromatografia gasosa (GC) com detector de captura de electrões (Harrington *et al*, 1997). Este método tem um baixo limite de detecção, na ordem das nanograma. No entanto, este método é, em geral, aplicado após a derivatização das diferentes espécies de mercúrio (Shi *et al*, 2005).

Os métodos que aplicam a separação por Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) têm a vantagem de não precisarem de derivatização para uma separação eficiente. Além disso, reduzem a possibilidade de perdas antes da análise, o tempo de preparação da amostra e o potencial de contaminação (Shi *et al*, 2005). O limite de detecção deste método é mais elevado, que nos métodos que aplicam Cromatografia gasosa, não atingindo a ordem das nanograma. Estes métodos já foram utilizados em amostras de água, animais marinhos, peixes, produtos farmacêuticos, fluidos corporais, solução de lentes de contacto, solo e sedimentos.

Ao nível do pré-tratamento da amostra, o primeiro método para a extracção centrado na especiação de mercúrio foi desenvolvido por Westöö em 1966. O método envolvia, inicialmente, a extracção do cloreto do metal com benzeno e a passagem das espécies de mercúrio para a fase aquosa por conversão em hidróxido, com hidróxido de amónio saturado com sulfato de sódio.

Por razões técnicas, de saúde e de segurança, a utilização do benzeno foi substituída por tolueno. Na transferência dos compostos de mercúrio para a fase aquosa,

são, actualmente mais utilizados a cisteína, o tiosulfato ou outro reagente contendo o grupo tiol.

Agências reguladoras de todo o mundo recomendam a utilização deste método e, actualmente, a maioria dos procedimentos utilizados para a extracção de metilmercúrio são baseados no método Westöo ou modificações deste (Morita et al, 1998).

2- DESCRIÇÃO DOS CASOS EM ESTUDO

Como já foi referido, a toxicidade do mercúrio em seres humanos varia segundo a via de exposição, a espécie química em que se apresenta, a concentração atingida nos diferentes órgãos e a vulnerabilidade da pessoa exposta.

É, assim, desejável, para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, conhecer o maior número possível de factores relacionados com os casos em estudo.

A informação obtida relativa aos casos em estudo no presente trabalho é descrita de seguida.

2.1. Caso 1

Indivíduo do sexo masculino, de 39 anos, com suspeita de tentativa de suicídio por ingestão de uma grande quantidade de mercúrio inorgânico. Teve um período de internamento hospitalar de 49 dias. No período de internamento foi submetido a terapia com agentes quelantes e hemodiálise, na tentativa de remover o metal do organismo. No acto da autópsia foram recolhidas para análise amostras de fígado, pulmão, cérebro e sangue.

2.2. Caso 2

Indivíduo do sexo feminino, de 77 anos. Suspeita de intoxicação por mercúrio inorgânico resultante de aplicação tópica na pele. O brometo de mercúrio terá sido

introduzido na preparação de uma pomada. Teve um período de internamento hospitalar de 8 dias. Durante esse tempo foi submetida a terapia com agentes quelantes e hemodiálise, na tentativa de remover o metal do organismo. No acto da autópsia foram recolhidas para análise amostras de rim, fígado, pulmão, estômago, baço, coração, encéfalo, sangue e urina.

3- DOSEAMENTO DE MERCÚRIO TOTAL E METILMERCÚRIO EM AMOSTRAS *POST-MORTEM*

3.1. Doseamento de Mercúrio Total

3.1.1. Instrumentação

Para o doseamento do mercúrio total foi utilizado um Espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin-Elmer®, modelo 3110 com geração de Vapor Frio por Sistema de Injecção de Análises em Fluxo (FIAS 100). A lâmpada de mercúrio de cátodo oco operou a 253.7 nm em aparelho equipado com um pipetador automático de amostras AS-90 e um integrador Epson Ex-800.

3.1.2. Material

Com o fim de evitar contaminações, foi utilizado material de laboratório de politetrafluoretileno (PTFE). Todo o material de ensaio usado foi previamente lavado por imersão durante 24h em solução diluída de ácido nítrico (HNO₃, 15%), sendo depois lavado com água bidesionizada e seco em ambiente livre de contaminações.

3.1.3. Reagentes e Padrões

Na preparação dos padrões e na digestão das amostras utilizou-se ácido nítrico

(HNO₃) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) de grau de pureza p.a., Merck®.

Foram usados permanganato de potássio cryst. extra puro e cloreto de hidroxilamina p.a., Merck®, para a preparação de soluções de permanganato de potássio 15% e cloreto de hidroxilamina 5%, respectivamente.

A água utilizada foi bidesionizada e obtida com desionizador SERADEST LFM 20.

A solução de NaBH₄ 0,1% em NaOH 0,025% foi preparada a partir de borohidreto de sódio p.a. Merck® e hidróxido de sódio p.a. Merck®.

Os padrões de mercúrio foram preparados por diluição de uma solução padrão 1000±5 mg/L, BDH Spectrosol® , em HNO₃+H₂SO₄ 2%. As soluções padrão de trabalho foram preparadas diariamente.

O material de referência utilizado foi Tuna Fish CRM 463 (Community Bureau of Reference-BCR) com o valor de mercúrio total de 2,85±0.16 µg/g e Pig Kidney BCR 186 (Community Bureau of Reference-BCR) com o valor de mercúrio total de 1970±40 µg/kg.

3.1.4. Amostras para Análise

As amostras utilizadas para o doseamento do mercúrio total e metilmercúrio foram recolhidas dos dois cadáveres em estudo, no acto da autópsia. As amostras analisadas (baço, coração, encéfalo, estômago, fígado, pulmão, rim, sangue e urina) foram enviadas pelo Serviço de Toxicologia do Instituto Nacional de Medicina Legal do Porto e de Coimbra, referentes aos casos 1 e 2, respectivamente, e analisadas no

Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Porto, no âmbito de um Protocolo celebrado entre as duas Instituições. Foi assegurada toda a cadeia de custódia e a confidencialidade exigida.

A fragmentação dos órgãos a analisar (baço, coração, encéfalo, estômago, fígado, pulmão e rim) foi efectuada sem recurso a utensílios metálicos.

Todas as amostras foram conservadas em frigorífico até serem processadas.

3.1.5. Preparação das Amostras para análise de Hg total

Uma porção representativa de cada um dos órgãos para análise foi reduzida a pequenos fragmentos e levada a secar em estufa a 30 °C durante vários dias. Após a etapa de secagem, procedeu-se à trituração das amostras em almofariz de ágata até se obter um pó fino.

A digestão das amostras foi efectuada através da adição, a uma toma de aproximadamente 0,1g de amostra sólida ou 1 ml de amostra líquida, de 0,25 mL de H_2O_2 e 2 mL de HNO_3 . A digestão foi efectuada em recipientes de teflon, colocados em estufa a 85 ± 5 °C durante 8 horas.

Os digestos obtidos foram transferidos para tubos PTFE e adicionou-se água bidesionizada até perfazer o volume de 10 mL. Em seguida, adicionou-se solução de permanganato de potássio a 10%, gota a gota, até se obter uma cor arroxeada persistente, para garantir a oxidação completa do mercúrio. O permanganato de potássio em excesso foi depois reduzido pela adição de uma solução de cloreto de hidroxilamina 5%.

Finalmente, o mercúrio foi reduzido a mercúrio elementar por adição de uma solução de borohidreto de sódio 0,1%.

3.1.6. Programação da Técnica de Vapor Frio para o doseamento do mercúrio total.

Da amostra aspirada foram introduzidos 500 μL na corrente do reagente transportador (solução de HCl 3%).

O reagente redutor (NaBH_4 0,1%) foi depois transportado para a câmara de reacção onde foi misturado com a amostra e a solução de HCl. Na câmara de reacção ocorreu então uma reacção espontânea, que reduziu o analito a mercúrio metálico.

A mistura reduzida passou depois através de um separador gás-líquido. O líquido foi separado e rejeitado e o vapor de mercúrio arrastado para a célula de quartzo, por acção de uma corrente adicional de árgon e hidrogénio libertado durante a reacção.

A absorção dos átomos de mercúrio foi medida a um comprimento de onda de 253.7 nm.

As condições instrumentais do método CVAAS, assim como os parâmetros de operação do FIAS, são apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente.

Tabela 3.1- Condições instrumentais do CVAAS.

CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS	
Comprimento de onda (nm)	253.7
Sinal	Altura de pico
Volume injectado (µL)	500

Tabela 3.2 - Parâmetros de operação do FIAS.

PROGRAMAÇÃO DO SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO				
Passo	Tempo (seg)	Bomba (rpm)	Válvula	Leitura
Pré-enchimento	10	120	enchimento	
1	15	120	enchimento	
2	20	120	injecção	x

3.2. Validação do método para o doseamento do mercúrio total

3.2.1. Estudo da linearidade, limite de detecção e quantificação

O estudo da linearidade da metodologia analítica adoptada foi realizado através do método da curva de calibração. Utilizaram-se soluções padrão de mercúrio com as concentrações de 1,0 µg/L, 2,5 µg/L, 5,0 µg/L e 10,0 µg/L. Os resultados indicaram uma relação de linearidade de resposta entre 0,28 e 10,0 µg/L.

O limite de detecção foi determinado considerando três vezes o valor do desvio-padrão da média das leituras de vinte “brancos” e do declive da recta de calibração. O valor obtido foi 0,28 µg/L. O limite de quantificação foi determinado considerando 10 vezes o valor do desvio padrão, sendo o valor obtido de 0,92 µg/L. Considerando uma toma de 0,05 g de amostra sólida ou 1 ml de amostra líquida para um volume final de 10 mL, o limite de quantificação obtido foi de 0,184 µg/g e 9,2 µg/L, respectivamente.

3.2.2. Estudo da precisão

Para avaliar a precisão do método, foi realizado o estudo da repetibilidade do procedimento instrumental, mediante vinte leituras sobre o mesmo digesto de fígado tendo-se obtido um coeficiente de variação de 6,4%.

O estudo da repetibilidade do procedimento experimental global foi efectuado a partir da leitura de vinte tomas distintas de digestos de fígado, preparadas nas mesmas condições laboratoriais e pelo mesmo operador. Os resultados apresentaram um coeficiente de variação de 9,9%. A tabela 3.3 apresenta os valores assumidos para os parâmetros referidos.

Tabela 3.3 - Estudo da precisão do método para o doseamento de mercúrio total em amostra de fígado.

Amostra	Repetibilidade do procedimento instrumental (c.v. %) (n=20)	Repetibilidade do procedimento experimental global (c.v. %) (n=20)
Fígado	6,4	9,9

3.2.3. Estudo da exactidão

3.2.3.1. Método da adição de padrões

A exactidão do método foi avaliada pelo método da adição de padrões e determinação das respectivas recuperações obtidas. A várias tomas de uma mesma amostra de fígado foram adicionadas diferentes quantidades de padrão de mercúrio (1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µg/L). As tomas preparadas foram submetidas ao procedimento experimental global descrito e nos digestos obtidos foi feito o doseamento do mercúrio total. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Estudo da exactidão pelo método da adição de padrões para o doseamento de mercúrio total em amostra de fígado.

Parâmetros	Amostras de fígado			
Concentração (µg/L) *	1,0	2,5	5,0	10,0
Número de ensaios	7	7	7	7
Recuperação±sd (%)	96±2	96±1	98±1	97±2

* Concentração de padrão de mercúrio adicionado às tomas de fígado e submetidas ao procedimento experimental global.

3.2.3.2. Estudo da exactidão com Material de Referência Certificado

Para verificar a exactidão do método, o procedimento experimental global foi aplicado a várias tomas de material de referência certificado. Foram utilizadas para este

estudo 7 amostras de padrão certificado de Tuna Fish (CRM 463) e 11 amostras de padrão certificado de Pig Kidney (BCR 186). As amostras foram submetidas ao procedimento experimental global descrito, e nas soluções obtidas procedeu-se ao doseamento do mercúrio total. Os resultados destas determinações encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Estudo da exactidão do método para doseamento de mercúrio total em Material de Referência Certificado.

	Tuna Fish (CRM 463) (µg/g)	Pig Kidney (BCR 186) (µg/kg)
Valor certificado	2,85±0,16	1970±40
Valor encontrado	2,85±0,07 (n=7)	1985±56 (n=11)

3.3. Doseamento de mercúrio orgânico

3.3.1. Instrumentação e condições

Para o doseamento de metilmercúrio nas amostras em estudo utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Pressão, Hewlett Packard HP 1100, equipado com um detector de Ultravioleta de comprimento de onda variável. Usou-se uma coluna RP-18, Spherisorb, com 25 cm de comprimento, 4,5 mm de diâmetro interno e 10 µm de tamanho de partícula, adaptada a uma pré-coluna C18 Altech, 30-40 µm.

O eluente era constituído por uma mistura de acetonitrilo e tampão acetato de amónio 0,05 M, pH=4,5, adicionado de 2-mercapto-etanol a 0,01% (30:70), programado com um gradiente de fluxo como se indica na tabela 3.6. A detecção foi efectuada para um comprimento de onda de 230 nm e o volume de amostra injectada foi de 50 µL.

Tabela 3.6 - Gradiente de fluxo da fase móvel ao longo da análise cromatográfica.

Tempo (min)	0 -10	10 -11	11 -15	15 -16
Fluxo (mL/min)	0,65	0,9	0,9	0,65

3.3.2. Material

Para evitar contaminações, todo o material utilizado foi previamente lavado e imerso, durante 24 horas, em solução diluída de ácido nítrico (HNO₃ 15%). Em seguida foi lavado com água bidesionizada e seco em ambiente livre de contaminações.

3.3.3. Reagentes e padrões

O acetonitrilo utilizado na fase móvel foi Lichrosolv Merk®. A solução tampão de acetato de amónio 0,05 M, pH=4,5, foi preparada a partir de acetato de amónio p.a., Merck®. Ao tampão filtrado e desgaseificado em aparelho de ultra-sons, foram adicionados imediatamente antes da sua utilização 100 µL de 2-mercapto-etanol, Sigma®.

Para as extracções dos compostos organomercuriais utilizou-se HCl concentrado, Merck, solução de glutatona 1%, Sigma, n-hexano Lichrosolv Merk®, tolueno Lichrosolv Merk®, álcool isoamílico p.a., Merck®, e uma solução de tiosulfato de sódio 0.01M, preparada com tiosulfato de sódio p.a., Merck®.

O material de referência certificado utilizado foi Tuna Fish, CRM 463 (Community Bureau of Reference-BCR) com o valor de metilmercúrio de $3,04 \pm 0,16$ µg/g.

O padrão de metilmercúrio utilizado foi cloreto de metilmercúrio, Riedel-deHaën Pestanal®. O padrão de metilmercúrio foi pesado rigorosamente e preparado por dissolução em água nas concentrações de 100 µg/mL e 10 µg/mL. As soluções de trabalho, contendo 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 µg/mL, foram preparadas utilizando o procedimento de extracção semelhante ao das amostras. Estas soluções foram conservadas em frigorífico e retiradas apenas no momento da injeccção. As soluções padrão de trabalho foram renovadas todos os dias.

3.3.4. Amostras para análise

As amostras utilizadas para a pesquisa e doseamento de metilmercúrio foram amostras *post-mortem* provenientes dos casos em estudo, descritos no ponto 4, com suspeita de intoxicação fatal por mercúrio.

3.3.5. Processo extractivo

Para a extracção de metilmercúrio foram utilizadas as amostras secas e reduzidas a pó, previamente preparadas para o doseamento de mercúrio total. A tomas de aproximadamente 0,1 g de amostra seca ou 1 ml de amostra líquida adicionou-se 1 ml de ácido clorídrico concentrado e 2 mL de glutathione 1%. Após agitação em vortex, as amostras foram sujeitas a uma extracção lipídica com 5 mL de n-hexano. Rejeitada a fase orgânica, continuou-se a extracção do metilmercúrio com 2x5 ml de uma mistura de tolueno: álcool isoamílico (99:1). Depois de agitar vigorosamente e centrifugar, separaram-se e juntaram-se as fases orgânicas. À fase orgânica reunida, adicionaram-se 2 ml de tiosulfato de sódio 0,01 M para extrair o metilmercúrio. Em seguida, acidificou-se com 1ml de ácido clorídrico concentrado, agitou-se e procedeu-se a uma purificação, fazendo passar a fase aquosa obtida, através de uma coluna Extrelut. Após eluição com 15 mL de tolueno, extraiu-se o metilmercúrio com 1 mL de tiosulfato de sódio 0,01 M. Depois de uma eficiente centrifugação, procedeu-se à análise cromatográfica de 50 µL do extracto obtido.

O esquema do procedimento de extracção encontra-se descrito na figura 3.1.

3.3.6. Condições cromatográficas

O estudo das melhores condições para separação cromatográfica do metilmercúrio teve como base um estudo anteriormente realizado e validado em amostras biológicas.

As condições cromatográficas, nomeadamente do eluente e do fluxo, foram optimizadas utilizando soluções padrão de metilmercúrio, de modo a conseguir uma boa resolução no menor tempo possível. Verificou-se que, nas condições de análise optimizadas, as impurezas e os compostos em estudo eram individualizados. A melhor resolução e eficiência foi conseguida com a mistura acetonitrilo: tampão acetato de amónio (30:70, v/v).

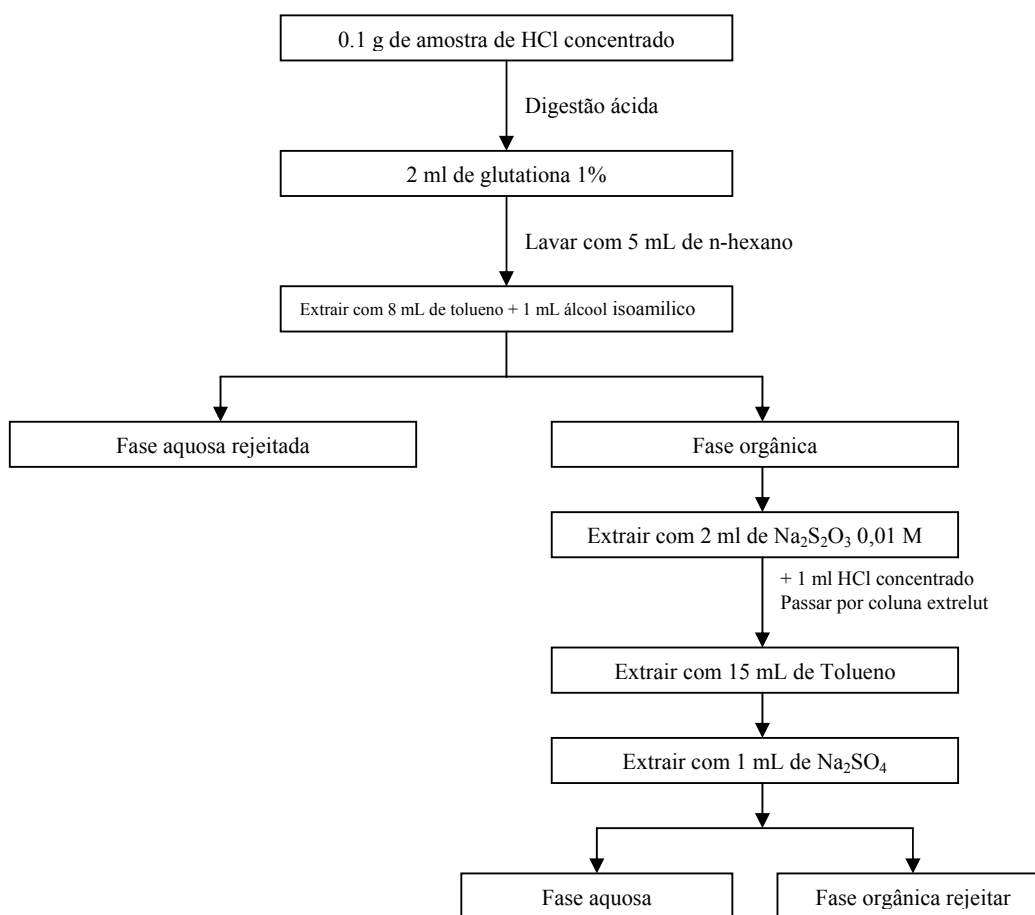


Figura 3.1 – Esquema do procedimento efectuado de extracção do metilmercúrio.

As figuras 3.2 a 3.6 mostram os cromatogramas obtidos na análise por HPLC da solução aquosa padrão de metilmercúrio e de extracto de fígado de rato analisado antes e após fortificação com a solução padrão de metilmercúrio.

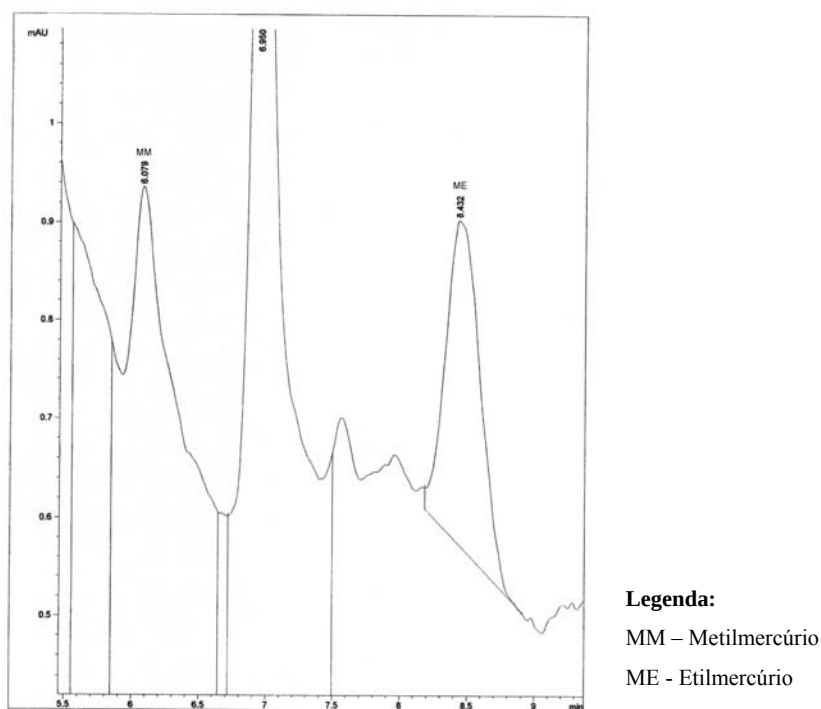


Figura 3.2 – Cromatograma de uma solução padrão de metilmercúrio.

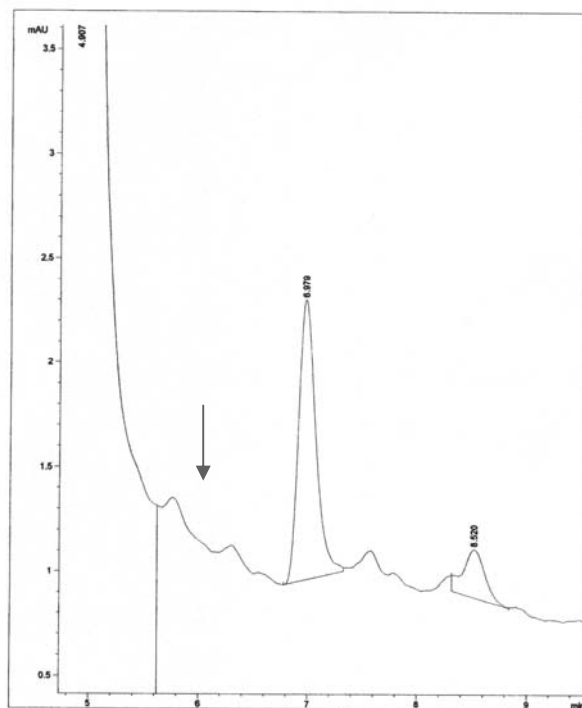


Figura 3.3 – Cromatograma de um extrato de fígado sem adição de metilmercúrio.

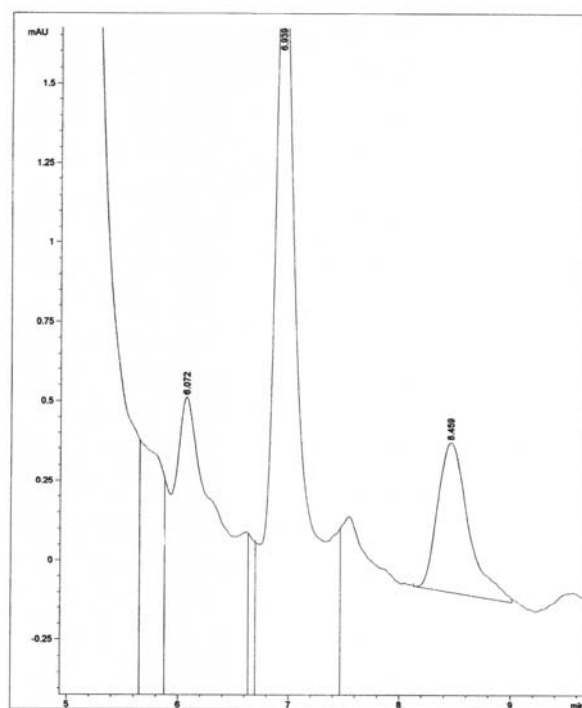


Figura 3.4 – Cromatograma de um extrato de fígado com adição de padrão de metilmercúrio.

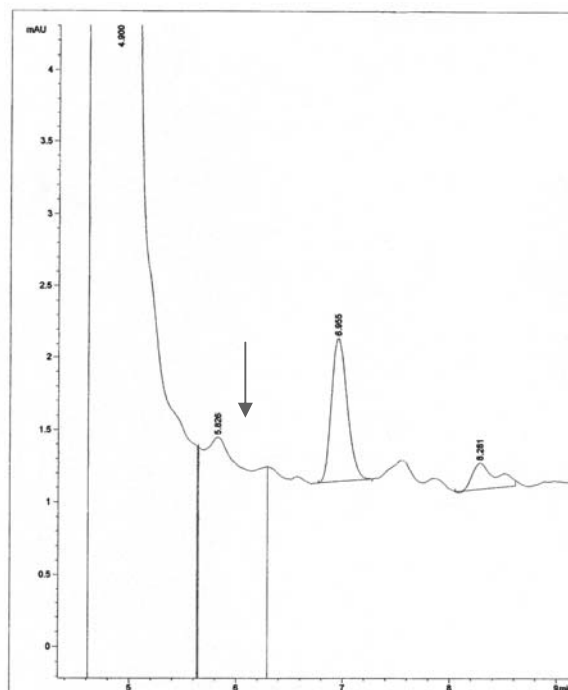


Figura 3.5 – Cromatograma de um extrato de rim sem adição de padrão de metilmercúrio.

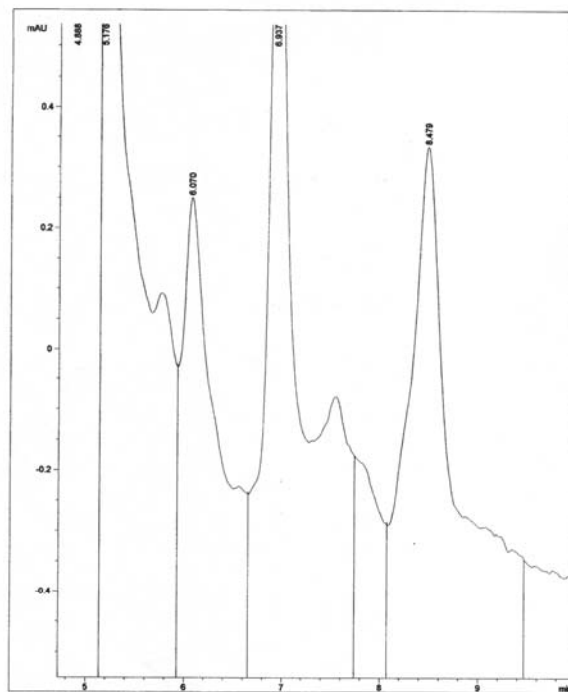


Figura 3.6 – Cromatograma de um extrato de rim com adição de padrão de metilmercúrio.

3.4. Validação do método de HPLC-UV

3.4.1. Estudo da linearidade, limite de detecção e quantificação

O estudo da linearidade da metodologia analítica adoptada realizou-se utilizando o método da curva de calibração. Utilizaram-se soluções padrão de mercúrio com concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 µg/mL. Os resultados obtidos indicaram uma linearidade de resposta entre 0,043 e 5,0 µg/mL.

O limite de detecção determinou-se considerando três vezes o valor do desvio padrão da média das leituras de vinte “brancos” e do declive da recta de calibração. O valor obtido foi de 0,043 µg/mL.

O limite de quantificação foi determinado considerando 10 vezes o valor do desvio padrão, sendo o valor obtido de 0.130 µg/mL. Considerando uma toma de 0.1 g de amostra sólida ou de 1 ml amostra líquida para um volume final de 1ml, o limite de quantificação obtido foi de 1.30 µg/g e 0.13 µg/mL, respectivamente.

3.4.2. Estudo da precisão

Para avaliar a precisão foi realizado o estudo da repetibilidade do método instrumental, mediante vinte leituras sobre o mesmo digesto de fígado e sobre o mesmo digesto de rim, tendo-se obtido um coeficiente de variação de 3,0% e 3,7%, respectivamente.

A repetibilidade do procedimento experimental global foi efectuada a partir da leitura de vinte tomas distintas de digestos de fígado e vinte tomas distintas de digestos de rim preparadas nas mesmas condições laboratoriais e pelo mesmo operador. Os resultados apresentaram um coeficiente de variação de 5,4% e 10,4%. A tabela 3.7 apresenta os valores assumidos para os parâmetros referidos.

Tabela 3.7 - Estudo da precisão do método para o doseamento de metilmercúrio.

Amostra	Repetibilidade do procedimento instrumental (c.v. %) (n=20)	Repetibilidade do procedimento experimental global (c.v. %) (n=20)
Fígado	3,0	5,4
Rim	3,7	10,4

3.4.3. Estudo da exactidão

3.4.3.1. Método da adição de padrões

A exactidão do método foi avaliada pelo método da adição de padrões e avaliação das respectivas recuperações obtidas. O estudo foi realizado recorrendo a aliquotas de uma mesma amostra de fígado, às quais foram adicionadas soluções de metilmercúrio nas concentrações 0,25, 0,5, 1,0 e 2,5µg/mL.

As amostras foram submetidas ao procedimento experimental global e posteriormente foi efectuada o doseamento do metilmercúrio. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.8.

3.4.3.2. Estudo da exactidão com material certificado

Para avaliar a exactidão do método, o procedimento experimental global foi aplicado a várias tomas de material certificado. Foram utilizadas para este estudo 8 amostras de padrão certificado de Tuna Fish (CRM 463). As amostras foram submetidas ao procedimento experimental descrito anteriormente para extracção do metilmercúrio e procedeu-se ao seu doseamento nas condições cromatográficas optimizadas. Os resultados destas determinações encontram-se na tabela 3.9.

Tabela 3.8 - Estudo da exactidão pelo método da adição de padrões para o doseamento de Metilmercúrio.

Parâmetros	Amostras de fígado			
Concentração (µg/ml) *	0,25	0,5	1,0	2,5
Número de ensaios	6	6	6	6
Recuperação±sd (%)	96±3	95±1	95±2	95±2

* Concentrações das soluções de padrão de metilmercúrio adicionadas às amostras de fígado e submetidas ao procedimento experimental.

Tabela 3.9 - Estudo da exactidão do método para o doseamento de metilmercúrio em material certificado Tuna Fish (CRM 463) por HPLC-UV.

	Tuna Fish (CRM 463) (µg/g)
Valor certificado	3,04±0,16
Valor encontrado (n=8)	2,79±0,29

4- RESULTADOS

Caso 1

Para o caso 1 foi determinada a quantidade de mercúrio total nas amostras dos diferentes órgãos disponíveis e em amostra de sangue, utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica (CVAAS). Na tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 4.1 - Quantidade de mercúrio total obtida nos diferentes órgãos analisados, em µg/g peso húmido e no sangue, em µg/mL.

Órgão	Mercúrio Total
Fígado	49,9µg/g peso húmido
Pulmão	3,27µg/g peso húmido
Cérebro	0,33 µg/g peso húmido
Sangue	11,7µg/mL

A quantidade de metilmercúrio para os diferentes órgãos disponíveis, determinada por HPLC, encontra-se na tabela seguinte.

Tabela 4.2 - Quantidade de metilmercúrio obtida nos diferentes órgãos analisados, em µg/g peso húmido, e no sangue, em µg/L.

Órgão	Metilmercúrio
Fígado	1,70 µg/g peso húmido
Pulmão	< LQ
Cérebro	< LQ
Sangue	0,15 µg/mL

Caso 2

Para o caso 2 foi determinada a quantidade de mercúrio total nas amostras *post-mortem* disponíveis, utilizando a técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica (CVAAS). Os resultados obtidos nos diferentes órgãos analisados apresentam-se na tabela 4.3. Os resultados obtidos no sangue e urina apresentam-se na tabela 4.4.

A quantidade de metilmercúrio foi determinada por HPLC nos diferentes órgãos disponíveis do caso 2. Em todas as amostras analisadas, o resultado foi inferior ao limite de detecção do método.

Tabela 4.3 - Quantidades de mercúrio total obtidas para os diferentes órgãos analisados, em $\mu\text{g/g}$ peso húmido e para as amostras de sangue e urina ($\mu\text{g/mL}$)..

Órgão	Mercúrio Total ($\mu\text{g/g}$ peso húmido)
Rim	77,7 $\mu\text{g/g}$
Fígado	46,6 $\mu\text{g/g}$
Pulmão	14,6 $\mu\text{g/g}$
Estômago	7,12 $\mu\text{g/g}$
Baço	6,40 $\mu\text{g/g}$
Coração	2,34 $\mu\text{g/g}$
Encéfalo	0,21 $\mu\text{g/g}$
Sangue	2,95 $\mu\text{g/mL}$
Urina	1,40 $\mu\text{g/mL}$

5- DISCUSSÃO

Doseamento de mercúrio total

Para o doseamento do mercúrio total foi utilizada a técnica de CVAAS. Esta técnica é recomendada pela Comunidade Europeia para doseamento de mercúrio, segundo decisão da Comissão de 26 de Setembro de 1990 (90/515/CEE), que adopta os métodos de referência para a pesquisa de resíduos de metais pesados e arsénio.

A digestão húmida da amostra foi realizada em sistema fechado, tal como referido pela mesma decisão comunitária, o que reduz o tempo requerido para o processo e minimiza os riscos de contaminação e perdas do mercúrio por volatilização. Durante a mesma, foram garantidas as condições de oxidação, evitando a carbonização e consequente perda de mercúrio.

A digestão da amostra foi efectuada através da adição de uma mistura ácida ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$).

A eficácia do procedimento verificou-se aplicando-o a amostras de material certificado, padrão certificado Tuna Fish (CRM 463) e padrão certificado Pig Kidney (BCR 186).

Para a validação do método de doseamento de mercúrio total foram medidos vários parâmetros, nomeadamente a linearidade, a precisão e a exactidão.

O estudo da linearidade realizou-se utilizando o método da curva de calibração. Os resultados obtidos indicaram uma zona de linearidade de resposta entre 0,28 e 10,0 $\mu\text{g/L}$. O Limite de detecção estabelecido foi de 0,28 $\mu\text{g/L}$ e o de quantificação de 0,184

$\mu\text{g/g}$ e $9,2 \mu\text{g/L}$, considerando, respectivamente, $0,05 \text{ g}$ de amostra sólida ou 1 mL de amostra líquida para 10 mL de volume final.

A precisão do método foi avaliada em termos de coeficiente de variação, tendo-se obtido $6,4\%$ e $9,9\%$ para a repetibilidade da técnica analítica e repetibilidade do procedimento experimental global, respectivamente. Os valores de coeficiente de variação obtidos são inferiores a 10% , estando de acordo com os valores referidos na decisão da Comissão da Comunidade Europeia de 12 de Agosto de 2002.

No estudo da exactidão do método recorrendo ao método da adição de padrões, os resultados obtidos foram superiores a 96% .

Foi efectuado, ainda, o estudo da exactidão recorrendo a material certificado. Para o efeito, utilizou-se padrão certificado Tuna Fish (CRM 463) e padrão certificado Pig Kidney (BCR 186), com valores de mercúrio total de $2,85 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ e $1970 \pm 40 \mu\text{g/kg}$, respectivamente. Os valores encontrados, após análise dos materiais certificados pelo nosso método, foram para Tuna Fish $2,85 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$ e para Pig Kidney $1985 \pm 56 \mu\text{g/kg}$, o que demonstra a excelente exactidão do método.

Considerando o descrito, pode concluir-se que o procedimento adoptado neste trabalho, e que é recomendado pela decisão da comissão de 26 de Setembro de 1990 (90/515/CEE), se revelou adequado para as amostras em estudo. De facto, o método apresenta elevada sensibilidade, com uma zona de linearidade de resposta que permite a quantificação do mercúrio em amostras *post-mortem* obtidas de cadáveres em que recai a suspeita de intoxicação, sendo também um método preciso e exacto, como devidamente averiguado.

Doseamento de metilmercúrio

Para o doseamento do metilmercúrio foi também validado um método, tendo neste caso havido a preocupação de aplicar um procedimento analítico que não provocasse alteração da espécie de mercúrio.

Tratando-se de uma espécie lipofílica, tentou-se uma técnica de extracção com base em elementos bibliográficos disponíveis para extracção e concentração de derivados orgânicos de mercúrio em amostras biológicas, para posterior análise por HPLC. Uma revisão sobre a especiação do mercúrio utilizando HPLC refere que a maioria dos procedimentos de extracção do metilmercúrio são baseados no método Westöo ou modificações deste (Harrington *et al*, 2000). Um programa europeu para a certificação da determinação de mercúrio total e metilmercúrio em Tuna Fish refere, igualmente, métodos de extracção baseados no método Westöo ou modificações deste.

Deste modo, no presente trabalho, a técnica de extracção utilizada baseou-se no método Westöo (1966) aplicado a amostras de Tuna Fish. O método inicialmente descrito consiste na digestão da amostra com HCl concentrado, seguindo-se uma extracção do cloreto do metal com benzeno. O metilmercúrio passa, então, para a fase aquosa usando hidróxido de amónio saturado com sulfato de sódio. Actualmente, para a mudança de fase, são mais utilizados reagentes como a cisteína ou o tiosulfato. A purificação com estes compostos justifica-se pela afinidade dos compostos mercúriaes para o enxofre. O benzeno foi substituído por tolueno, por razões de segurança.

Assim, procedeu-se à digestão ácida da amostra com HCl concentrado e juntou-se solução aquosa de glutathione a 1%. A adição de glutathione favorece a extracção

devido à afinidade dos mercuriais para os grupos SH. Os compostos orgânicos de mercúrio foram extraídos com tolueno e posteriormente extraídos com uma solução diluída de tiosulfato de sódio. A concentração do tiosulfato de sódio utilizada foi inferior à reportada em outros trabalhos, devido ao facto de se ter verificado que a utilização de concentrações de ordem de grandeza mais elevada conduzia a interferências no registo cromatográfico, que mascaravam os picos relativos ao metilmercúrio. Contudo, este procedimento revelou-se ineficaz para eliminar todas as interferências, devido à complexidade das amostras *post-mortem* em estudo.

Procedeu-se, então, à tentativa de eliminar o maior número de interferências possível, por forma a que o composto a analisar pudesse ser identificado e quantificado de modo inequívoco.

Vários solventes foram testados na tentativa de encontrar o que permitisse uma elevada recuperação do composto a analisar e ausência de compostos interferentes.

Foram efectuadas tentativas de purificação da amostra com os seguintes solventes: éter de petróleo, n-hexano, acetato de etilo e isopropanol. Aquele que se mostrou adequado face aos objectivos foi o n-hexano.

Finalmente, conseguiu-se uma eficaz preparação da amostra procedendo a purificações ao longo do processo de extracção, primeiro com uma lavagem com n-hexano, antes da extracção do composto com tolueno, e depois com uma passagem por uma coluna extrelut, após a extracção com tiosulfato de sódio. A verificação da eficácia do procedimento foi feita através da análise de amostras fortificadas com metilmercúrio, após aplicação do procedimento global.

A determinação de metilmercúrio foi, então, efectuada por HPLC com detecção por UV, método já realizado e validado para a determinação de metilmercúrio em Tuna Fish (Magalhães, 1998).

Como já foi referido, muitos dos métodos utilizados para a especiação do mercúrio aplicam a separação por cromatografia gasosa, no entanto, os métodos que aplicam a separação por HPLC têm vantagens relativamente aos métodos de GC, pois as espécies não precisam de derivatização para uma separação eficiente.

As condições cromatográficas foram estudadas, nomeadamente as relativas à constituição eluente e ao fluxo. Depois de experimentar várias condições, a melhor resolução e eficiência conseguiu-se com a mistura acetonitrilo e tampão de acetato de amónio pH=4,5. A proporção utilizada foi de 30:70 v/v com gradiente de fluxo.

A validação do método implementado compreendeu os parâmetros analíticos: linearidade, precisão e exactidão.

O estudo da linearidade realizou-se utilizando o método da curva de calibração, obtendo-se uma linearidade de resposta entre 0,043 e 5,0 µg/mL. O limite de detecção obtido foi de 0,043 µg/mL e o limite de quantificação foi de 1,30 µg/g e 0,13 µg/mL, para, respectivamente, 0,1 g de amostra sólida ou 1 mL de amostra líquida para um volume final de 1 mL.

A precisão do método, em termos de coeficiente de variação, avaliou-se em amostras de fígado e de rim. Relativamente à repetibilidade da técnica analítica obteve-se 3.0% e 3.7% em fígado e rim, respectivamente. Para a repetibilidade do procedimento experimental global, obteve-se 5,4% e 10,4% em fígado e rim, respectivamente.

Na exactidão, avaliada pelo método da adição de padrões, obteve-se uma recuperação superior a 95%.

O estudo da exactidão em material certificado foi também efectuado. Utilizou-se padrão certificado Tuna Fish (CRM 463) com um valor certificado de $3,04 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$. O valor encontrado foi de $2,79 \pm 0,29 \mu\text{g/g}$.

A concentração encontrada está em concordância com o valor certificado. A recuperação foi muito boa, 95%. Estes resultados indicam que o método proposto é fiável para a determinação de metilmercúrio em amostras biológicas.

Mercúrio total em amostras *post-mortem*

O estabelecimento de uma intoxicação como causa de morte baseia-se, usualmente, em demonstrar que o agente causal se encontra na amostra em concentrações fatais, tendo em conta as circunstâncias da morte.

Assim, para uma interpretação correcta dos dados obtidos é útil a sua comparação com valores não tóxicos, isto é, valores obtidos em indivíduos não expostos, e com valores publicados na literatura reportados em intoxicações fatais com a substância em causa.

No caso do mercúrio, é usual analisar-se os resultados por recurso aos valores de mercúrio total, registando-se, mesmo assim, escassez de dados disponíveis na literatura.

Os níveis de mercúrio total reportados na literatura em indivíduos não expostos encontram-se transcritos na tabela 5.1. e foram retirados de Randall, 2002.

Tabela 5.1 - Concentrações de mercúrio total, em indivíduos não expostos, em sangue (mg/L) e órgãos (mg/kg).

Órgão	Sangue	Cérebro	Pulmão	Fígado	Rim
Concentração	0,06	0,10	0,08	0,47	1,1

Adaptado de. Randall, 2002

Os valores relativos a casos de intoxicação fatal por mercúrio foram obtidos numa revisão realizada em 2004 por Musshoff *et al.* sendo, no entanto, as informações disponibilizadas em cada caso e o número de amostras analisadas bastante reduzido. Os dados encontram-se na tabela 5.2. Nesta revisão encontram-se reportados 5 casos, nos quais só em um deles é conhecida a idade, sexo e tempo de sobrevida do indivíduo em causa. Também as amostras biológicas analisadas não são idênticas em todos os casos. Só o sangue, fígado e rim são analisados em praticamente todos os casos referidos. Em todos os casos a concentração encontrada no rim é superior à determinada nas restantes amostras, com excepção de um dos casos descritos de intoxicação por via dérmica. Neste caso, a maior concentração de metal foi encontrada no fígado.

Tabela 5.2 - Concentrações de mercúrio em tecidos e fluidos biológicos humanos e técnica utilizada, idade, sexo, via de exposição e tempo de sobrevida, em casos de intoxicação fatal por mercúrio.

Idade	Sexo	Tempo de sobrevida	Via	Sangue (mg/L)	Urina (mg/L)	Fígado (mg/kg)	Rim (mg/kg)	Cérebro (mg/kg)	Método analítico
			Subcutânea		2,1	86	337		AAS
48	Mulher	8 dias	Oral	0,8		33,2	46,7	1,1	?
			Dérmica	1,7	5,9				AAS
			Dérmica	2,1	0,7	75,1	19,1	0,7	AAS
			Oral	22		56	136	3	AAS

Mercúrio total

Análise do caso 1

No caso 1 em estudo, um indivíduo do sexo masculino com 39 anos de idade teve um período de internamento hospitalar de 49 dias com suspeita de ingestão de uma grande quantidade de mercúrio inorgânico. Após confirmação de ingestão de mercúrio inorgânico, foi submetido, durante aquele período, a hemodiálise e a tratamento por quelantes.

Apesar dos esforços de tratamento, o indivíduo acabou por sucumbir. No acto da autópsia, foram recolhidas várias amostras para análise, nomeadamente, fígado, pulmão, cérebro e sangue.

Devido ao longo período de sobrevida do intoxicado, considerou-se relevante o doseamento do mercúrio total nas amostras *post-mortem*, bem como a tentativa de caracterização de derivados orgânicos de mercúrio. De facto, é extensamente conhecido que alguns seres vivos têm a capacidade de biotransformar o mercúrio inorgânico por conjugação sobretudo com grupos metilo e etilo, originando derivados orgânicos com características toxicocinéticas e toxicodinâmicas diferentes do mercúrio inorgânico. Esta situação, tanto quanto pudemos averiguar, não está esclarecida no ser humano.

Os valores obtidos de mercúrio total para as amostras disponibilizadas, fígado 49,9 µg/g, pulmão 3,27 µg/g, cérebro 0,33 µg/g e sangue 11,7 µg/mL, estão de acordo com os valores publicados na literatura e que se apresentam na tabela 5.2 (Musschof *et al*, 2004). Os valores obtidos são também francamente superiores aos valores considerados normais para população não exposta a mercúrio (tabela 5.1) (Randall, 2002).

Infelizmente, não foi, neste caso, disponibilizada amostra de rim para análise, o que é duplamente lamentável, na medida em que o mercúrio inorgânico, espécie ingerida, é eliminado essencialmente pelo rim, tendo também este órgão como principal alvo da sua toxicidade.

O fígado foi o órgão onde se encontrou uma concentração mais elevada de mercúrio. Quantidades inferiores deste metal foram encontradas nas amostras de sangue, pulmão e cérebro, sendo a concentração mais elevada encontrada na amostra de

sangue, seguindo-se a amostra de pulmão e, por fim, a amostra de cérebro. Nos casos descritos na literatura que envolvem intoxicações por mercúrio inorgânico por via oral, a quantidade no fígado é sempre superior à quantidade presente no sangue e no cérebro. Não foi possível detectar o mercúrio nas amostras de pulmão, assumindo-se por isso que os seus níveis eram inferiores ao limite de detecção do método, isto é 0,28 µg/L.

Do exposto, pode concluir-se que os valores de mercúrio total obtidos nas amostras *post-mortem* analisadas neste caso são consistentes com morte por intoxicação por mercúrio.

Para uma análise mais exaustiva dos resultados, nomeadamente a avaliação dos factores que podem ter influenciado os valores obtidos, seria necessário dispor de mais informação relativamente ao caso em estudo e, principalmente, aos casos descritos na literatura. Seria desejável que todos os casos reportados incluíssem informações como idade, sexo, circunstâncias da intoxicação, tempo de sobrevivência ou tratamento efectuado e espécie de mercúrio envolvida.

Análise do caso 2

No caso 2 em estudo, uma quantidade indeterminada de mercúrio terá sido colocada numa pomada e absorvido por via dérmica. O indivíduo era do sexo feminino, com 77 anos de idade. Teve um período de internamento de 8 dias, ao fim do qual pereceu.

Neste caso, as concentrações de mercúrio total presentes nas amostras *post-mortem*, foram de 77,7 µg/g, 46,6 µg/g, 14,6 µg/g, 7,12 µg/g, 6,40 µg/g, 2,95 µg/mL,

2,34 µg/g, 1,40 µg/mL e 0,21 µg/g, correspondendo, por ordem crescente de concentrações, ao rim, fígado, pulmão, estômago, baço, sangue, coração, urina e encéfalo. O facto de a maior quantidade de mercúrio ter sido encontrada no rim é consistente com a informação disponível na literatura e com o facto de este elemento ser essencialmente eliminado através do rim quando na forma inorgânica. Quanto à comparação dos níveis presentes nas restantes amostras analisadas, os dados disponíveis na literatura apenas se referem a amostras de sangue, urina, fígado, rim e cérebro (ver tabela 5.2). Comparando os valores obtidos com a informação disponível, verifica-se que a ordem de grandeza relativa é consistente com os dados existentes para uma intoxicação por via dérmica.

Os valores de mercúrio total nas amostras *post-mortem* analisadas são, também, neste caso, francamente superiores aos valores considerados normais para população não exposta a mercúrio.

Pode assim concluir-se que os valores obtidos são, igualmente, consistentes com morte por intoxicação por mercúrio.

Também neste caso seria necessário dispor-se de mais informação para se proceder a uma análise mais detalhada dos resultados. Concretamente, a constituição rigorosa da pomada, número de aplicações feitas, dias de aplicação, zona da pele e extensão da mesma, pele íntegra ou ulcerada, sintomas de intoxicação, etc.

Metilmercúrio

Para o caso 1 obteve-se um valor de metilmercúrio de 1,70 µg/g em fígado e 0,15 µg/mL em sangue. Nas amostras de pulmão e cérebro o resultado foi negativo, isto é, foram obtidos valores inferiores ao limite de quantificação, 1,30 µg/g e 0,13 µg/mL.

Para o caso 2, foram obtidos resultados negativos em todas as amostras analisadas (inferiores ao limite de detecção).

Estudos realizados avançam a possibilidade de transformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio através do conteúdo do ceco e do intestino delgado. Abdulle *et al.* (1973) sugerem que pequenas quantidades de metilmercúrio se podem formar por intervenção da flora microbiana do intestino. Rowland *et al* (1975, 1977) demonstraram que o conteúdo do ceco dos ratos e, em menor quantidade, o conteúdo do intestino delgado, sintetizam metilmercúrio a partir de cloreto de mercúrio (II). Estes autores sugerem ainda que a quantidade total de metilmercúrio sintetizado a partir de mercúrio inorgânico ingerido pelo homem é de aproximadamente 400 ng/dia.

Pode, assim, concluir-se que os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os publicados na literatura, embora em modelos experimentais. De facto, só no caso 1, em que o mercúrio inorgânico foi ingerido, os resultados de metilmercúrio obtidos apontam para a possibilidade de biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio no homem. A quantidade de metilmercúrio encontrada no fígado e no sangue do caso 1 são prova dessa transformação. Surpreendentemente, não foi possível detectar metilmercúrio no cérebro. Sendo uma espécie de mercúrio muito lipossolúvel e atravessando a barreira hemato-encefálica, tendo o cérebro como órgão

alvo da sua toxicidade, seria expectável a sua presença neste órgão. Embora no campo especulativo, poder-se-á admitir que o metilmercúrio formado no fígado era lançado no intestino através da bile, absorvido e, na corrente circulatória, sequestrado e/ou forçadamente eliminado do organismo em consequência das medidas de tratamento intensivas a que o indivíduo intoxicado esteve sujeito durante longo período de tempo.

Trabalhos futuros

Os casos de intoxicação fatal por mercúrio são raros, hoje em dia, pelo que os dados *post-mortem* são escassos. Deste modo, o presente trabalho constituiu uma oportunidade interessante para o estudo do comportamento do mercúrio no organismo humano, nomeadamente, no estabelecimento da toxicocinética do mercúrio inorgânico no corpo humano, bem como a distribuição do mercúrio nos diferentes órgãos e fluidos biológicos.

Teria sido importante, no presente trabalho, poder dispor, para o caso 1 em estudo, de amostra de rim. Este facto teria permitido confirmar a maior acumulação do mercúrio neste órgão, tal como avançam estudos já efectuados que estabelecem o mercúrio inorgânico como um nefrotóxico. Por outro lado, teria permitido também verificar se neste órgão se encontra metilmercúrio tal como se verificou no caso do fígado e sangue. Isto poderá ser investigado em futuros trabalhos.

Uma vez que os resultados obtidos apontam para a possibilidade de biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio no organismo humano, seria desejável prosseguir estes estudos pois o metilmercúrio tem uma alta toxicidade e

uma importante acção neurotóxica. Seria importante investigar qual o mecanismo e em que condições o mercúrio inorgânico é transformado em metilmercúrio.

Aconselha-se, também, em trabalhos futuros o doseamento de um maior número de espécies de mercúrio, no sentido de obter maior informação relativamente à biotransformação do mercúrio. Também seria importante alargar a pesquisa ao maior número de material biológico possível.

6- CONCLUSÃO

Aplicou-se o método CVAAS, recomendado em Directiva da Comunidade Europeia, ao doseamento de mercúrio total em amostras biológicas, sendo os valores encontrados consistentes com intoxicação fatal por mercúrio, para os dois casos estudados.

Implementou-se um método de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção por Ultra-Violeta, para o doseamento do metilmercúrio, que foi devidamente validado.

Estabeleceu-se um método de extracção de metilmercúrio em amostras biológicas de elevada complexidade.

Os métodos utilizados revelaram-se adequados às determinações efectuadas, obtendo-se bons resultados nos parâmetros utilizados para a sua validação.

Os resultados permitiram estabelecer a distribuição do mercúrio nos diferentes órgãos e fluidos biológicos.

Através das concentrações de metilmercúrio obtidas, pode concluir-se que existe a possibilidade de transformação de mercúrio inorgânico em metilmercúrio no organismo humano.

O processo de metilação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio no organismo humano, deveria ser um factor a ter em conta quando se avalia o risco associado a intoxicações devidas a mercúrio inorgânico.

7 - BIBLIOGRAFIA

Andres S., Laporte J. M., Mason R. P. Mercury accumulation and flux across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes Sapidus*). **Aquatic Toxicology** **56** 303-320 (2001)

Baselt, Randall C.; **Disposition of toxic drugs in man**. 6th edition, Biomedical publications California (2002)

Bergdhal I. A.; Schutz A., Hansson G. Automated determination of inorganic mercury in blood after sulfuric acid treatment using Cold Vapour Atomic Absorption Chromatography and an Inductively Heated Gold Trap. **Analyst** **120** 1205-1209 (1995)

Calabuig, J. A. Gisbert; **Medicina Legal y toxicología**. 5ª edición, Masson Barcelona (2001)

Carrier G., Bouchard M., Brunet R. C., Caza M. A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology** **171** 50-60 (2001).

Chang, Louis W.; **Toxicology of metals**. Lewis Publishers USA (1996)

Clarkson T. W. Human toxicology of mercury. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine** **11** 303-317 (1998).

Cole D. C., Kearney J., Sanin L., Leblanc A., Weber J. Blood mercury levels among Ontario and sport-fish eaters. **Environmental Research** **95** 305-314 (2004).

Cominos X., Athanaselis S., Dona A., Koutselinis A. Analysis of total mercury in human tissues prepared by microwave decomposition using a hydride generator system coupled to an atomic absorption spectrometer. **Forensic Science International** **118** 43-47 (2001).

Dart R C., Sullivan J. B. Mercury **Medical Toxicology** 3th edition Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. (2004)

Decisão da Comissão Europeia nº 90/515 Métodos de referência para a pesquisa de resíduos de metais pesados e de arsénio. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L286/33 Bruxelas (1990)

Decisão da Comissão Europeia nº 2002/657. Desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L221/8 (2002)

Dopp, E. Hartmann L. M., Florea A. M., Rettenmeier A. W., Himer A. V. Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(loid) compounds. **Critical Reviews in toxicology** **34** 301-333 (2004).

Endo T., Nakaia S., Kimura R., Murata T. Gastrointestinal absorption of inorganic mercuric compounds in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacology** **83** 187-196 (1986).

Goodman & Gilman; **Pharmacological basis of therapeutics**. 9th edition. Pergamon Press, New York USA (1995)

Harrington C. F. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry** **19** 167-179 (2000)

Harrington C. F., Catterick T. Problems encountered during the development of a method for the speciation of mercury and methylmercury by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** **12** 1053-1056 (1997).

Karimi A., Moniri F., Nasihatkon A., Zarepoor M. J., Alborzi A. Mercury exposure among residents of a building block in Shiraz, Iran. **Environmental Research Section** **88** 41-43 (2002).

Klaassen C. D., Watkins III J. B. **Toxicologia A Ciência básica dos tóxicos de Casarett & Doulls**. McGraw-Hill de Portugal, Lda.; 5ª Edição Portugal (2001)

Labat V., Dumestre-Toulet, Goullé J.P., Lhermitte M. A fatal case of mercuric cyanide poisoning. **Forensic Science International** **143**, Issues 2-3, 215-217 (2004).

Landi S., Fagioli F., Locatelli C. Determination of total mercury in seafood and other protein-rich products. **Journal of AOAC International** **75** 1023-1028 (1992)

Ludwicki J. K. Studies on the role of gastrointestinal tract contents in the methylation of inorganic mercury compounds. **Bull. Environ. Contam. Toxicology** **42** 283-288 (1989).

Magalhães Paula **Implementação de técnicas de HPLC e de absorção atômica para caracterização de compostos orgânicos de mercúrio em bivalves e doseamento de mercúrio total em água, sedimento e bivalves** Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (1998).

Mercury study report to congress Volume III: Fate and transport of mercury in the environment. EPA Office of air quality planning & standards and office of research and development USA (1997).

Mercury study report to congress Volume IV: An assessment of exposure to mercury in the United States. EPA Office of air quality planning & standards and office of research and development USA (1997).

Mercury study report to congress Volume V: An evaluation of mercury control technologies and costs. EPA Office of air quality planning & standards and office of research and development USA (1997)

Morita M., Yoshinaga J., Edmonds J. S. The determination of mercury species in environmental and biological samples. **Pure & Appl Chem.** **70** 1585-1615 (1998).

Musshoff F., Padosch S., Steinborn S., Madea B. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. **Forensic Science International** **142** 161-210 (2004).

Navarro-Alarcón M., López-Martinez M. C., Sánchez-Vinas M. Determination of mercury in crops by cold vapour atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. **J. Agric. Food Chem.** **39** 2223-2225 (1991).

Nielsen J. B. Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health** **37** 85-122 (1992).

Nielsen J. B., Hultman P. Strain dependence of steady-state retention and elimination of mercury in mice after prolonged exposure to mercury(II) chloride. **Analyst** **123** 87-90 (1998).

Norserth T., Clarkson T. W. Studies on the biotransformation of ²⁰³Hg-labeled methyl mercury chloride in rats. **Arch Environ Health** **21** (1970)

Patrick, Lyn; Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the tretment of mercury toxicity. **Alternative Medicine Review** **7** 456-471 (2002)

Programa de las naciones unidas para el medio ambiente – Produtos Quimicos, Evaluación mundial sobre el mercurio, Extractos del informe completo, **PNUMA Productos Químicos**, Ginebra, Suiza, (2002).

Qvarnstrom J., Tu Q., Frech W., Ludke C. Flow injection-Liquid Chromatography-Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry for rapid determination of methyl and inorganic mercury. **The Royal Society of Chemistry** **125** 1193-1197 (2000).

Risher J. F., Murray E. H., Prince G. R. Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. **Toxicology and Industrial Health** **18** 109-160 (2002)

Rowland I. R., Davies M. J., Grasso P. Biosynthesis of methylmercury compounds by the intestinal flora of the rat. **Archives of Environmental Health** 32 24-28 (1977)

Rowland I. R., Davies M. J., Grasso P. The methylation of mercury by the gastrointestinal contents of the rat. **Archives of Environmental Health** 31 1064-1065 (1975)

Sen J., Das Chaudhuri A. B. Brief Communication: Choice of washing method of hair samples for trace element analysis in environmental studies. **American Journal of physical anthropology** 115 289-291 (2001).

Shi J.-B.; Liang L., Jiang G. Simultaneous determination of methylmercury and ethylmercury in rice by capillary gas chromatography coupled on-line with atomic fluorescence spectrometry. **Journal of AOAC International** 88 (2005)

Soares M.E., Carneiro C., Bastos M.L. Implementation of AAS methods for the quantification of Hg and hexavalent Cr in recycled paper used for packaging. **Atomic Spectroscopy** 23 148-153 (2002).

Sullivan Jr J. B., Krieger G. R. **Hazardous materials toxicology clinical principles of environmental health**. Williams &Wilkins USA (1992)

Taylor A., Branch S., Halls D., Patriarca M. White, Mark; Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. **The Royal Society of Chemistry** 17 414-455 (2002).

Tchounwou P. B., Ayensu W. K., Ninashvili N., Sutton D. Review Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications to public health. **Environmental Toxicology** 18 149-175 (2003)

Tao G., Willie S. N., Sturgeon R. E. Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion. **Analyst** 123 1215-1218 (1998).

Vargas M. C., Romero R. A. Mercury determination by cold vapour absorption spectrometry in several biological indicators from Lake Maracaibo, Venezuela. **Analyst** 117 (1992)

WHO, 1989. Environmental Health Criteria 86. Mercury-Environmental Aspects. World Health Organisation, Geneva (1989)

Winstanley R., Patel I., Fisher E. The determination of toxic metals in simulated stomach contents by energy dispersive x-ray fluorescence analysis and a fatal case of mercury poisoning. **Forensic Science International** 35 181-187 (1987).