

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CHUMBO EM EMBRIÕES DE GALINHA PELO MÉTODO DA DITIZONA.

Mateus SUGIZAKI*
Celso Augusto Fessel GRANER**

RESUMO: Os autores relatam o procedimento analítico montado para a determinação espectrofotométrica do chumbo em embriões de galinha, pelo método da ditizona. As amostras são mineralizadas por via úmida com ácidos nítrico, sulfúrico e perclórico, e as interferências de cálcio e fósforo controladas por hexametáfosfato de sódio.

UNITERMOS: Chumbo em embriões de galinha; método da ditizona; determinação de chumbo.

INTRODUÇÃO

Pesquisa sobre morte/sobrevivência e anomalias em embriões de galinha provocadas pelo tratamento com quantidades variáveis de chumbo (II), assim como sobre o efeito protetor do EDTA contra a ação tóxica do íon metálico¹, envolveu a necessidade de elaborar um procedimento analítico adequado à dosagem do cátion naquele material. Optando-se pela espectrofotometria do ditizonato de chumbo (II) extraído de uma fase aquosa amoniacal redutora para o clorofórmio², a precipitação dos autores concentrou-se no estudo dos eventuais problemas inerentes à mineralização das amostras^{5,6,7} à riqueza dos fosfatos de cálcio, magnésio³, bem como à influência do EDTA utilizado para o tratamento.

O presente trabalho descreve o procedimento montado, assim como os resultados experimentais das dosagens de chumbo (II), efetuadas no material e nas condições descritas.

PARTE EXPERIMENTAL

As medidas colorimétricas foram efetuadas num espectrofotômetro ZEISS modelo PMQ II, provido de cubetas de 10 mm de caminho óptico. Das soluções utilizadas, merecem destaque:

Solução contendo 1,00 mg de Pb (II)/ml: dissolver 1,8308 g de acetato de chumbo (II) triidratado e 8,5 g de cloreto de sódio com água deionizada, acidulada com algumas gotas de ácido acético, e diluir a 1 litro, com água deionizada num balão volumétrico. Para a obtenção de soluções menos concentradas, proceder a diluições convenientes com "solução salina".

Solução de ditizona: dissolver 30,0 mg de ditizona com clorofórmio e diluir para 1 litro, com o mesmo solvente, num balão volumétrico. Conservar em frasco de vidro âmbar, envolvido em folha de alumínio e em refrigerador.

Solução tampão de citrato, redutora e complexante auxiliar: dissolver 5,0 g de

* Departamento de Biofísica — Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola - UNESP - 18.600 - Botucatu - SP.
** Departamento de Química Analítica — Instituto de Química - UNESP - 14.800 - Araraquara - SP.

citrato monoácido de amônio, 2,5 g de sulfato de sódio e 2,0 g de cianeto de potássio em cerca de 300 ml de água deionizada, transferir a solução para um funil de separação do tipo pêra, de 1 litro, e acrescentar 75 ml de solução concentrada de amônia; adicionar 5 ml de solução de ditizona e agitar vigorosamente o sistema do funil por 1 minuto, desprezando a fase orgânica após a separação das fases; repetir esse tratamento com novas porções da solução de ditizona, até que a fase orgânica se mostre limpa, incolor ou levemente esverdeada. Transferir a fase aquosa do funil de separação para um balão volumétrico de 1 litro, juntar mais 50 ml de solução concentrada de amônia e completar e homogeneizar o volume com água deionizada.

Solução de hexametáfosfato de sódio: dissolver 100 g de hexametáfosfato de sódio em cerca de 800 ml de água deionizada e ajustar a 9,0 o pH da solução com solução diluída de amônia; transferir para funil de separação do tipo pêra, tratá-la com porções de 5 ml de solução de ditizona, até que a fase orgânica se mostre limpa ou só levemente esverdeada. Transferir a fase aquosa para um balão volumétrico de 1 (um) litro e diluir até a marca com água deionizada.

Solução de EDTA: dissolver 5,0 g de sal cálcico dissódico hexaidratado de EDTA e 8,5 g de cloreto de sódio em água deionizada e diluir a 1 litro com água deionizada num balão volumétrico.

Solução salina: dissolver 8,5 g de cloreto de sódio em água deionizada suficiente para 1 litro de solução.

Amostras de embriões de galinha: obtidas de ovos embrionados, de galinha da raça Leghorn, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu, divididos em quatro tipos de tratamento recebidos no 4.º dia de desenvolvimento, injetando-se 0,1 ml das seguintes soluções: a) salina; b) salina e EDTA; c) Pb (II) 1,00 mg/ml; d) Pb (II) 1,00 mg/ml e

EDTA. Os ovos foram abertos e os embriões retirados no 18.º dia de desenvolvimento.

Mineralização das amostras 4,5,8: lavar os embriões de galinha com água deionizada, transferir para béquer de 50 ml, acrescentar 25 ml de ácido nítrico, cobrir com um vidro de relógio e deixar em repouso para que o ataque se processe a frio por cerca de 24 horas. Mantendo o béquer coberto com o vidro de relógio, digerir sobre uma chapa aquecedora até completa desgregação e suspensão do material para então acrescentar 3 ml de ácido sulfúrico e 0,5 ml de ácido perclórico; prosseguir a digestão e, ocorrendo enegrecimento, introduzir porções adicionais de 5 ml de ácido nítrico e gotas de ácido perclórico, até ocorrer intensa evolução de fumos brancos e o meio tornar-se limpo e praticamente incolor. Deixar esfriar e transferir quantitativamente o material para balão volumétrico de 50 ml, através de sucessivas lavagens do béquer com pequenas porções de água deionizada; diluir até a marca com água deionizada e homogeneizar a solução obtida. Provas em branco devem ser conduzidas simultaneamente.

Curva Padrão: para uma série de seis funis de separação tipo pera, de 60 ml, transferir 0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 e 4,0 ml de solução contendo 4,00 µg de Pb (II)/ml, igualar os volumes a 10 ml com água deionizada, acrescentar 10 ml de solução de hexametáfosfato e uma gota de solução indicadora de vermelho de fenol, e alcalinizar o meio, se necessário, com solução diluída de amônia. Acrescentar 10 ml da solução tampão de citrato e exatamente 5 ml da solução de ditizona, após o que agitar os funis por 1 minuto. Aguardar a separação das fases, retirar e desprezar a superior, fase aquosa, sifonando-a com o auxílio de uma bomba de vácuo. Acrescentar mais 10 ml de solução tampão de citrato, repetir e aguardar nova separação das fases. Enxugar a haste do funil com um pequeno cartucho de papel de filtro de boa qualidade, introduzir na

mesma uma pequena porção de algodão hidrófilo e drenar a fase orgânica contendo o ditizonato de chumbo (II) para cubetas de 10 mm de caminho óptico. Ler a 510 nm, contra a prova em branco. Com os dados de absorbância correspondentes aos valores de 0 - 2 - 4 - 8 - 12 - 16 µg de chumbo (II), existentes nas alíquotas da solução padrão utilizadas, obter os coeficientes angular e linear da reta, para relacionar matematicamente a quantidade de chumbo em µg e a absorbância.

Teste sobre o uso de hexametáfosfato: do extrato proveniente da mineralização do material, transferir alíquotas de 5 ml para funis de separação, acrescentar ou não 10 ml da solução de hexametáfosfato, igualar os volumes a 20 ml com água deionizada, adicionar uma gota de solução indicadora de fenol e, daqui por diante, prosseguir como já descrito para a obtenção da curva padrão.

Teste de recuperação: do extrato proveniente da mineralização do material, transferir alíquotas de 5 ml para funis de separação, acrescentar ou não alíquotas de 1 ml de solução padrão contendo 4,00 µg de Pb (II)/ml, mais 10 ml de solução de hexametáfosfato e, daqui por diante,

TABELA 1 - Influência do hexametáfosfato na determinação do chumbo em embrião de galinha pela ditizona.

Amostra n.º	Teor de chumbo (µg/g)	
	sem hexametáfosfato	com hexametáfosfato
1	1,69	4,57
2	4,57	18,4

Evitando a precipitação dos fosfatos de cálcio e de magnésio do meio alcalino, exigido pelo método da ditizona, o hexametáfosfato evita também, adequada-

TABELA 2 - Resultados da determinação e do teste de recuperação de chumbo pelo método da ditizona.

Amostra n.º	Original	Teor de chumbo (µg/g) recuperado		Recuperação %
		adicionado	recuperado	
3	2,33	4,00	6,19	96,5
4	5,00	4,00	8,71	92,8
5	5,00	4,00	8,71	92,8
6	6,08	4,00	10,40	108,0

prosseguir como já descrito no teste sobre o uso de hexametáfosfato.

Determinação do chumbo nas amostras: proceder como descrito no teste de recuperação, porém sem acrescentar solução padrão de chumbo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de absorbância (A), obtidos quando da confecção da curva padrão, permite-nos exprimir a massa de chumbo em µg, contida como ditizonato de chumbo nos 5 ml da fase clorofórmica, pela equação da reta

$$\mu\text{g de Pb (II)} = (A + 0,010) \cdot 18,0$$

com coeficiente de correlação linear igual a 0,99959. Considerando-se como m gramas a massa de embrião transformada em 50 ml de extrato, o procedimento analítico descrito permite-nos então exprimir o teor de chumbo no material em µg/g, pela expressão:

$$\mu\text{g de Pb (II)/g de embrião} = (A + 0,010) \cdot 18,0/m$$

É indispensável o uso de hexametáfosfato na dosagem em questão, como mostram os dados da Tabela 1.

Tais dados revelam uma recuperação média de $(97,5 \pm 6,2) \%$, com um desvio-padrão relativo de 7,38%, perfeitamente compatível para uma determinação ao nível de traços e no material em questão. Verifica-se também a não-interferência do EDTA como complexante do chumbo, que foi destruído no processo de digestão nítrica-sulfúrica-perclórica.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da determinação do chumbo em apreço.

TABELA 3 - Resultados da determinação do chumbo pelo método da ditizona, conforme proposto, em amostras de embriões de galinha submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamento	Teor de chumbo, em $\mu\text{g/g}$ de embriões
Salina	$0,18 \pm 0,06$
EDTA	$0,22 \pm 0,00$
Chumbo	$1,38 \pm 0,04$
Chumbo e EDTA	$1,12 \pm 0,34$

SUGIZAKI, M. & GRANER, C.A.F. — Spectrophotometric determination of lead in chick embryos by dithizone method. *Ecl. Quim.*, São Paulo, 7: 55-58, 1982.

ABSTRACT: The authors relate the analytical procedure provided to spectrophotometric determination of lead in chick embryos, by the dithizone method. The samples are mineralized by wet via with nitric, sulphuric and perchloric acid, and the calcium and phosphates interferences are controlled by sodium hexametaphosphate.

KEY-WORDS: Lead in chick embryo; dithizone method; lead determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SUGIZAKI, M. — *Incorporação do Chumbo pelo Embrião de Galinha*. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Botucatu, 1973, 73 p.
2. SANDELL, E.B. — *Colorimetric Determination of Traces of Metals*. 3 ed. New York, Interscience, 1959, p. 555-83.
3. JOHNSON, E.I.; POLHILL, R.D.A. — *Analyst*, 1955, 80: 364.
4. BESSMAN, S.P.; LAYNE, E.C. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 45: 159.
5. MIDDLETON, G.; STUCKEY, R.G. — *Analyst*, 1954, 79: 138.
6. ABSON, D.; LIPSCOMB, A.G. — *Analyst*, 1957, 82: 152.
7. HANSON, N.W., ed. — *Official, Standardized and Recommended Methods of analysis*. 2. ed., London, Society for Analytical Chemistry, 1973, p. 40-4.
8. GORSUCH, T.T. — *Analyst*, 1962, 87: 112.
9. ECKSCHALAGER, K. — *Errors Measurement & Results in Chemical Analysis*. London, Van Nostrand Reinhold, 1969, p. 137-48.