

UM NOVO MÉTODO PARA QUANTIFICAR MERCÚRIO ORGÂNICO ($Hg_{orgânico}$) EMPREGANDO A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA ATÔMICA DO VAPOR FRIO

Márcia Cristina Bisinoti*

Instituto de Biologia, Letras e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristovão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto - SP, Brasil

Wilson F. Jardim

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

José Lailson Brito Júnior, Olaf Malm e Jean Remy Guimarães

Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco G, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 13/4/05; aceito em 10/2/06; publicado na web em 14/6/06

A NOVEL APPROACH TO QUANTIFY ORGANIC MERCURY (ORGANIC Hg) BY COLD VAPOUR ATOMIC FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (CVAFS). In this work a simple and sensitive procedure to extract organic mercury from water and sediment samples, using methylene chloride in acidic media followed by CVAFS quantification has been developed. The method was evaluated for possible interferents, using different inorganic mercury species and humic acid, no effects being observed. The detection limit for organic mercury was 160 pg and 396 pg for water and sediment samples respectively. The accuracy of the method was evaluated using a certified reference material of methylmercury (BCR-580, estuarine sediment). Recovery tests using methylmercury as surrogate spiked with 1.0 up to 30.0 ng L⁻¹ ranged from 90 up to 109% for water samples, whereas for sediments, recoveries ranged from 57 up to 97%.

Keywords: methylmercury; bromine chloride; environmental samples.

INTRODUÇÃO

Aspectos relacionados à toxicidade do mercúrio têm despertado a atenção da comunidade científica nestas últimas décadas devido, principalmente, ao potencial tóxico do mesmo para a biota e os seres humanos, bem como para melhor entender seu ciclo biogeoquímico, que envolve distribuição, bioacumulação, transformação e transporte no ambiente¹⁻⁴.

A quantificação de mercúrio total (Hg_{total}) é muito importante, porém, não é suficiente para o entendimento da ecotoxicologia deste metal no meio aquático. De todas as espécies de mercúrio, o metilmercúrio (metilHg) é a mais tóxica, sendo considerada uma neurotoxina⁵, a qual possui elevada afinidade por lipídios e membranas celulares, o que favorece sua bioacumulação e biomagnificação no ambiente^{6,7}.

O desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de metilmercúrio (CH_3Hg^+) em água ou em sedimento não é trivial, devido aos problemas relacionados à extração do analito da amostra e ao método de quantificação final empregado. De acordo com Tseng⁸, o procedimento mais usado para extração e separação de CH_3Hg^+ em amostras ambientais é a técnica clássica desenvolvida por Westö^{9,10}. Muitos outros procedimentos foram usados para separar CH_3Hg^+ do mercúrio inorgânico, incluindo acidificação, digestão alcalina ou destilação seguida de uma ou mais etapas de separação, como extração líquido-líquido com solvente e derivatização em meio básico (geração de hidretos), entre outras. A quantificação pode ser realizada empregando-se Cromatógrafo a Gás com detector de Captura de Elétrons (GC-ECD), Fluorescência, Emissão ou Absorção Atômica^{8,11}.

A técnica cromatográfica é a mais indicada para a especiação de compostos orgânicos e inorgânicos em comparação às não-cromatográficas, apesar dos procedimentos serem geralmente longos e tediosos. Não obstante, alguns métodos empregando técnicas

não-cromatográficas, como Espectrometria de Absorção Atômica do Vapor Frio (CVAAS), têm sido desenvolvidos e empregados na separação e quantificação de $Hg_{inorgânico}$ e $Hg_{orgânico}$. Nestes, o emprego da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) tem sido uma boa associação para quantificação destas espécies. Entretanto, o emprego do CVAAS resulta em limites de detecção na ordem de $\mu g L^{-1}$, o que é importante para a quantificação de $Hg_{orgânico}$ em solos e sedimentos, mas para amostras de água este limite está bastante distante das concentrações comumente encontradas (sub ng L⁻¹)^{8,12-16}. Desta maneira, o desenvolvimento de um método empregando CVAFS tornaria possível a quantificação de $Hg_{orgânico}$ em águas naturais.

Dentre a variedade de métodos¹⁷⁻²⁰ empregando técnicas não-cromatográficas para determinação de $Hg_{orgânico}$, Jian e McLeod¹⁸ realizaram a determinação em extratos de tolueno pela técnica de CVAFS acoplado a um sistema FIA. Os experimentos possibilitaram a determinação de $Hg_{orgânico}$ com limite de detecção de 100 ng L⁻¹. Neste sentido, o trabalho de Jian e McLeod se destaca pela sensibilidade obtida, porém não atinge o exigido para quantificação de $Hg_{orgânico}$ em amostras de águas naturais provenientes de locais pouco impactados. Dentro deste panorama, o desenvolvimento de um método analítico que possibilite a especiação do mercúrio ($Hg_{orgânico}$ e $Hg_{inorgânico}$) em amostras de água e sedimento com baixo limite de detecção, empregando técnicas não-cromatográficas e específicas para determinação de mercúrio, pode ser útil para a realização de um diagnóstico da contaminação, bem como para o entendimento da dinâmica desse composto no ambiente.

Neste trabalho é proposto um procedimento simples, rápido e com baixo limite de detecção para quantificação do $Hg_{orgânico}$ em amostras de água e sedimento e que se destaca pelo protocolo de coleta, o qual garante a integridade do analito até o momento da quantificação. Este método é baseado na extração do $Hg_{orgânico}$ de amostras de água e sedimento em meio ácido com diclorometano, seguida da oxidação com cloreto de bromo e redução com cloreto estano, para posterior quantificação por CVAFS.

*e-mail: mbisinoti@hotmail.com

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

Ácido clorídrico, cloreto de metileno, cloridrato de hidroxilamina e etanol foram de elevada pureza (Mallinckrodt Baker Inc., Kentucky, USA). Cloreto de potássio, cloreto de mercúrio, mercúrio metálico, ácido húmico, tolueno, ditizona, sulfeto de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, acetato de sódio, ácido etileno diamino tetraacético, sulfato de sódio, florissil e cloreto de sódio foram de grau analítico.

A água utilizada no preparo de todas as soluções de trabalho, bem como na limpeza da vidraria foi de grau MilliQ® (Millipore, Molsheim, France), produzida a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. O ácido clorídrico foi destilado por sub-ebulição anterior ao seu uso. As soluções padrão de metilHg foram preparadas a partir da diluição apropriada do padrão estoque de referência certificado de 1 g L^{-1} (pureza > 99%, da Spectra Pure) em água MilliQ®.

Para pré-concentração e amalgamação do Hg^0 e posterior quantificação no CVAFS foram utilizadas colunas de areia de ouro, que consistem em colunas de vidro contendo em seu interior 33 mg de areia de quartzo recoberta por ouro (AFS-24, Brooks Rand®).

Equipamento

A quantificação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ foi realizada através do emprego de um CVAFS, marca Brooks Rand®, modelo 2, usando argônio como gás de arraste. O ultra-som empregado era da marca Bransonic, modelo 2210 e o Agitador Orbital, da Cientec.

A quantificação de metilHg em sedimento foi realizada empregando-se um GC-ECD, marca Shimadzu modelo 14B. Foi utilizada uma coluna empacotada (Gl Sciences Japan), cuja fase líquida é Hg-20 A e o suporte é uma Chromosorb Uniport HP – 60/80 Mesh (com 0,75 m de comprimento e d. i. de 3 mm). As temperaturas do forno, injetor e coluna foram de 240, 180 e $155 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente²¹.

Limpeza da vidraria

Toda a vidraria, incluindo os frascos de Teflon, foi lavada exaustivamente com detergente neutro, seguida de água de torneira e, por último, água deionizada, tendo permanecido em banho de ácido clorídrico 4 mol L^{-1} a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por no mínimo 48 h. Após este período, a vidraria foi lavada com água deionizada e preenchida, quando possível, com ácido clorídrico destilado sub-ebulição contendo 5 mL L^{-1} de cloreto de bromo $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, preparado de acordo com as recomendações de Szakacs e colaboradores²². Após 48 h, os frascos foram enxaguados com água MilliQ várias vezes e colocados para secar em sala limpa classe 100. Após seca, a vidraria foi mantida em HCl 20% (v/v) até o momento do uso. Detalhes do cuidado requerido para se trabalhar com níveis muito baixos de mercúrio foram descritos por Fadini e Jardim²³. As garrafas de Teflon empregadas na extração de metilHg foram preenchidas com água MilliQ e colocadas em ultra-som para que o excesso de HCl fosse eliminado. Este processo foi realizado até que o pH da água contido dentro das garrafas fosse similar ao pH da água deionizada empregada.

Procedimento analítico para determinação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ em amostras ambientais

Água

O procedimento para quantificação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ de amostra de água foi adaptado de Bloom²⁴ e de Horvat e colaboradores²⁵. Em um frasco de Teflon foram adicionados 300 mL de amostra de água,

seguido da adição de 15 mL de uma solução de HCl 10% (v/v) saturada com KCl (pH<2) e 40 mL de cloreto de metileno. As garrafas de Teflon foram acondicionadas em sacos plásticos para evitar problemas de contaminação através da deposição de poeira e, em seguida, foram colocadas em mesa agitadora, onde foram mantidas a 150 rpm por 12 h. A fase aquosa foi decantada e a fase orgânica que contém o $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ foi transferida para outro frasco de Teflon contendo 100,0 mL de água MilliQ, através de um funil de separação. A amostra foi, então, purgada com N_2 (purificado através de sua passagem por uma coluna de areia de ouro) para remover o cloreto de metileno, à temperatura ambiente. O $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ permanece na fase aquosa durante a remoção da fase orgânica (cloreto de metileno).

A destruição do $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ é realizada através da adição de 1,0 mL de cloreto de bromo $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Após 30 min, o excesso de cloreto de bromo foi reduzido por adição de 400 μL de cloridrato de hidroxilamina 30% (m/v). Após 5 min, a amostra foi transferida para um frasco extrator, com adição de 2,0 mL de cloreto estano e borbuhlada por 15 min, sendo os vapores de mercúrio (Hg^0) capturados por uma coluna de areia de ouro e, em seguida, quantificados por CVAFS.

Sedimento

O método para quantificação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ de amostras de sedimento foi adaptado de Hintelmann²⁶ e consistiu na adição de 5,0 mL de uma solução de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ em uma garrafa de Teflon, contendo 0,5–2,0 g de sedimento úmido. A mistura foi mantida por 15 min em ultra-som. Em seguida, foram adicionados 10,0 mL de CH_2Cl_2 e agitou-se em agitador orbital por 12 h a 150 rpm. A fase aquosa foi decantada e a fase orgânica contendo o cloreto de metileno foi transferida para outro frasco de Teflon contendo 100 mL de água milliQ, através de um funil de separação. A amostra foi aquecida à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e o excesso de cloreto de metileno foi removido por passagem de N_2 durante 5 min. Logo em seguida, o $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ extraído da amostra presente na água milliQ (após remoção do cloreto de metileno) é oxidado com BrCl e reduzido com SnCl_2 , conforme descrito para quantificação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ em amostra de água, seguido da quantificação por CVAFS.

É importante mencionar que o procedimento para quantificação de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ em amostra de água e sedimento não é específico para determinação de metilmercúrio, uma vez que a especificação das formas orgânicas de mercúrio, como metilmercúrio e dimetilmercúrio, não possível por este método. Por esta razão, o termo $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$, e não metilmercúrio, será usado neste trabalho. Todos os testes de recuperação foram feitos usando o metilmercúrio como composto modelo das espécies orgânicas.

Curva analítica

A curva analítica de metilmercúrio para a faixa de trabalho de $1,0$ a $30,0 \text{ ng L}^{-1}$ foi preparada a partir de uma solução padrão de $1,00 \text{ g L}^{-1}$. É importante mencionar que para o manuseio do padrão de metilHg é imprescindível o emprego de luvas de nitrila (inertes a esta substância), bem como trabalhar em capela e utilizar os equipamentos de proteção individual, além de muito cuidado. O metilmercúrio é uma substância extremamente tóxica e, seu manuseio exige atenção e cuidados especiais⁷.

Avaliação de interferentes na extração de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$

Mercúrio inorgânico

Para avaliar se o $\text{Hg}_{\text{inorgânico}}$ (Hg^{2+}) poderia causar falso positivo durante a extração de $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ de amostras ambientais, uma vez que está presente em amostras naturais e poderia ser transferido da fase aquosa para a orgânica durante o processo de extração, volumes de 100 mL de água milliQ foram contaminados com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 ng de Hg^{2+} seguidos da extração do $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ empregando o método

Tabela 1. Concentrações de Hg_{total} , relação C/N e comparação entre as concentrações de $Hg_{orgânico}$ obtidas por CVAFS e metilmercúrio obtidas por GC-ECD em amostras de sedimento

Amostras	Hg_{total} ($\mu g\ kg^{-1}$)	C/N	$Hg_{orgânico}$ ($\mu g\ kg^{-1}$)	Metilmercúrio ($\mu g\ kg^{-1}$)	Erro absoluto (%)
Lago Fernandola	51,8 \pm 2,7	7,3	0,44 \pm 0,09	0,40 \pm 0,10	4,0
Lago Nazaré	97,8 \pm 3,9	11,8	2,03 \pm 0,25	2,08 \pm 0,29	5,0
Lago Iara (draga)	150,2 \pm 8,3	11,1	2,70 \pm 0,10	2,69 \pm 0,04	1,0
Lago Iara (0-4 cm)	113,6 \pm 2,2	13,2	2,39 \pm 0,05	2,35 \pm 0,06	4,0
Lago Iara (4-8 cm)	98,7 \pm 6,9	12,9	2,01 \pm 0,12	2,04 \pm 0,10	3,0
Lago Iara (8-12 cm)	99,4 \pm 6,7	6,7	1,88 \pm 0,01	1,86 \pm 0,01	2,0
Lago Iara (12-16 cm)	77,2 \pm 3,5	5,4	1,59 \pm 0,02	1,54 \pm 0,01	5,0
Lago Iara (16-23 cm)	70,7 \pm 3,0	4,7	1,51 \pm 0,05	1,46 \pm 0,02	5,0
Lago Iara (23-30 cm)	76,6 \pm 2,7	5,8	0,98 \pm 0,03	0,95 \pm 0,01	3,0
Rio Unini	194,4 \pm 19,7	3,1	1,14 \pm 0,15	1,12 \pm 0,17	2,0

descrito anteriormente. Durante o procedimento de extração, realizou-se a quantificação do $Hg_{orgânico}$ que foi extraído da fase orgânica e de Hg_{total} da fase aquosa.

Mercúrio metálico

Foi realizado um teste utilizando água milliQ contendo 700 ng L^{-1} de Hg^0 . Em seguida, esta amostra foi submetida a determinação do $Hg_{orgânico}$, para se avaliar o efeito do Hg^0 no procedimento de determinação de $Hg_{orgânico}$ proposto neste trabalho. Assim como descrito no experimento para avaliação da possível interferência do $Hg_{inorgânico}$, após a extração do $Hg_{orgânico}$ realizou-se a determinação de Hg_{total} na fase aquosa.

Ácido húmico e mercúrio inorgânico

O procedimento para avaliação do efeito de Hg^{2+} e ácido húmico na extração de $Hg_{orgânico}$ de amostras de água consistiu na realização de 8 ensaios. Os dois primeiros ensaios consistiram de dois brancos nas concentrações de 10,0 e 30,0 mg L^{-1} de ácido húmico; em outros dois ensaios foram empregadas concentrações finais de 10,0 e 30,0 ng L^{-1} de Hg^{2+} . No quinto, foram preparadas soluções com concentrações de 10,0 mg L^{-1} de ácido húmico e 10,0 ng L^{-1} Hg^{2+} . No sexto, foram empregadas soluções contendo 30,0 mg L^{-1} de ácido húmico e 30,0 ng L^{-1} de Hg^{2+} . No sétimo, 10,0 mg L^{-1} de ácido húmico e 30,0 ng L^{-1} de Hg^{2+} e, no oitavo, 30,0 mg L^{-1} de ácido húmico e 10,0 ng L^{-1} de Hg^{2+} . Estas concentrações foram preparadas a partir da retirada de alíquotas de solução padrão de ácido húmico 100 mg L^{-1} e de solução padrão de Hg^{2+} na concentração de 1000,0 ng L^{-1} . As amostras foram deixadas em repouso por 12 h para que houvesse equilíbrio entre o Hg^{2+} e o ácido húmico e, em seguida, a concentração de $Hg_{orgânico}$ foi avaliada de acordo com o método proposto.

Consistência do método

Para avaliar a consistência do método empregou-se o material de referência certificado (BCR-580) para metilmercúrio e mercúrio total em sedimento estuarino (proveniente de uma lagoa que recebe resíduo de indústrias petrolíferas), sendo que a concentração de $Hg_{orgânico}$ foi quantificada seguindo o método aqui proposto para quantificação de $Hg_{orgânico}$ em sedimento.

Um segundo teste para avaliar a consistência do método baseou-se na quantificação de $Hg_{orgânico}$ por CVAFS (método proposto neste artigo) e metilHg empregando um método referência por GC-ECD²¹ em 10 amostras de sedimento contendo diferentes concentrações de $Hg_{orgânico}$ e matéria orgânica (Tabela 1). O método referência para quantificação de metilHg consiste em digestão alcalina da amostra de sedimento com NaOH, seguida de extração com solução de ditizona-tolueno e limpeza dos extratos, para posterior quantificação por GC-ECD²¹.

Coleta da amostra e preservação

Foram propostos dois protocolos de coleta de amostra de água neste trabalho. Para avaliar o primeiro protocolo, quantidades conhecidas de metilHg foram adicionadas em frascos de vidro contendo diclorometano em concentrações de 2,0 e 3,5 ng L^{-1} . Estes frascos foram mantidos em geladeira por 32 dias; em intervalos de tempo definidos retiravam-se 6 frascos e a concentração de $Hg_{orgânico}$ era quantificada. Um segundo protocolo previa a coleta das amostras de águas brancas e pretas da Bacia do Rio Negro, Amazônia (Rio Branco e Lago Iara), em campo e extração do $Hg_{orgânico}$ no laboratório. Para isto, amostras de água foram coletadas e contaminadas com metilHg (2,0 ng L^{-1}) e, em seguida, as garrafas contendo as amostras foram envoltas com papel alumínio e congeladas. A concentração de $Hg_{orgânico}$ foi quantificada seguindo o procedimento de extração e quantificação proposto neste artigo, em intervalos de tempo definidos até 12 dias. Na Tabela 2 estão listadas as principais características físico-químicas das amostras de água empregadas neste trabalho.

Tabela 2. Características físicas e químicas das amostras de água coletadas na Bacia do Rio Negro

Características	unidade	Rio Branco (águas brancas)	Lago Iara (águas pretas)
pH	-	7,2	4,6
COD	mg L^{-1}	5,3	15,3
Temperatura	°C	30,5	30,9
Oxigênio Dissolvido	mg L^{-1}	5,3	4,2
Condutividade	$\mu S\ cm^{-1}$	28,0	10,0
Mercúrio total	ng L^{-1}	4,6 \pm 0,1	14,6 \pm 0,1
NO_3^-	$\mu g\ L^{-1}$	< 25,0	35,0
NO_2^-	$\mu g\ L^{-1}$	< 25,0	< 25,0
NH_3	$\mu g\ L^{-1}$	< 5,0	6,6
SO_4^{2-}	mg L^{-1}	27,7	11,5
E_H	mV	290,0	316,0

As amostras de sedimento foram coletadas no Lago Iara (perfil profundidade), no Lago Fernandola, no Lago Nazaré e no Rio Unini, sendo todas de águas pretas da Bacia do Rio Negro, e, posteriormente, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas no congelador a $\sim 4\ ^\circ C$ até o momento da análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CVAFS, como citado anteriormente, quantifica apenas a espécie Hg^0 . Muitos artigos trazem a quantificação de $Hg_{orgânico}$ utilizando a

cromatografia como método de separação para quantificação final usando um detector de captura de elétrons. A utilização de um oxidante forte para destruição do metilmercúrio e posterior redução deste para Hg^0 , com cloreto estano, tornaria possível a quantificação do $Hg_{orgânico}$ por CVAFS. Segundo Baeyens e colaboradores²⁷, o Cl_2 é capaz de oxidar metilmercúrio, e o cloreto de bromo (BrCl, que é uma mistura de $KBr/KBrO_3$ em HCl concentrado) produz Cl_2 . Desta maneira, neste trabalho empregou-se o cloreto de bromo como agente oxidante e o cloreto estano como agente redutor.

A Figura 1 ($R^2 = 0,9978$) ilustra que a melhor quantidade de cloreto de bromo para destruição do metilmercúrio, na faixa de concentração de 0,0 a 30,0 ng L^{-1} , é de 1,0 ou 1,5 mL. A utilização de 1,0 mL de BrCl foi escolhida, pois o mesmo pode provocar uma interferência negativa da fluorescência (efeito “quenching”), devido à ocorrência do cruzamento intersistema para um estado excitado tripleto. Deste modo, a destruição de qualquer excesso de BrCl é fundamental para a obtenção de resultados fidedignos, e esta destruição é obtida usando-se cloridrato de hidroxilamina.

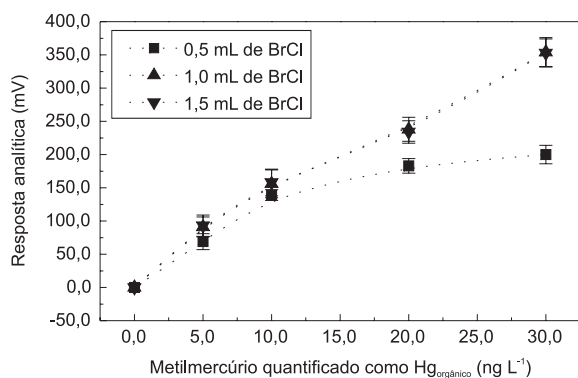


Figura 1. Resposta analítica obtida para a adição de 0,5; 1,0 e 1,5 mL de cloreto de bromo 0,02 mol L^{-1} em 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 ng de metilmercúrio em 100 mL de amostra

Determinação de $Hg_{orgânico}$ em água usando o metilmercúrio como modelo

O método desenvolvido neste trabalho provou ser eficiente para quantificação de $Hg_{orgânico}$ em amostras de água não-filtradas proveniente da Bacia do Rio Negro, Amazônia. Os resultados da Figura 2 ilustram que houve uma boa recuperação ($R^2 = 0,9900$) do metilHg adicionado em amostras de águas naturais, o que foi quantificado como $Hg_{orgânico}$ ²⁸.

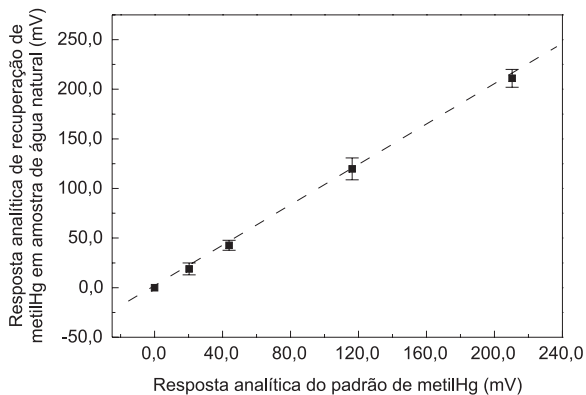


Figura 2. Recuperação do $Hg_{orgânico}$ em amostra de água natural adicionado como metilmercúrio para as concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 ng L^{-1}

Como citado anteriormente, as amostras naturais geralmente apresentam ambas espécies $Hg_{inorgânico}$ e $Hg_{orgânico}$. Desta maneira, a realização de um teste para avaliar o efeito do $Hg_{inorgânico}$ na determinação de $Hg_{orgânico}$ se faz necessária. Observou-se que a leitura de $Hg_{orgânico}$ na fase orgânica (Figura 3a) foi praticamente constante para as adições de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 ng de Hg^{2+} para cada 100 mL de amostra, indicando que o Hg^{2+} não interfere na extração de $Hg_{orgânico}$ e permanece na fase aquosa. Escolheu-se esta faixa de concentração de Hg^{2+} , pois se sabe que a concentração de Hg_{total} encontrada em águas naturais raramente excede 10,0 ng L^{-1} .

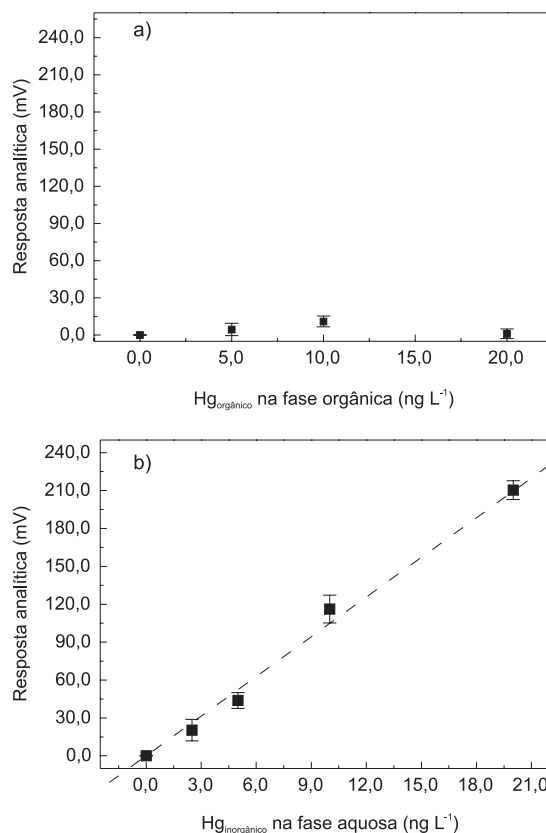


Figura 3. Estudo do efeito da presença de Hg^{2+} durante a extração do $Hg_{orgânico}$ com cloreto de metileno em amostra de água que recebeu adição de 0,0; 5,0; 10,0 e 20,0 ng L^{-1} de Hg^{2+} : a) resposta analítica de Hg^{2+} extraído na fase orgânica; b) resposta analítica de Hg^{2+} que ficou na fase aquosa após a extração

Os resultados apresentados na Figura 3b ($R^2 = 0,9983$) comprovam que o Hg^{2+} permaneceu na fase aquosa. Pode-se concluir, com base nas Figuras 3a e 3b, que o Hg^{2+} não causa falso positivo na extração de $Hg_{orgânico}$ de uma amostra de água natural nas concentrações trabalhadas.

Após a realização dos testes para avaliação do efeito da formação de complexos de ácido húmico com mercúrio inorgânico, ficou claro que não ocorrem problemas de interferentes na extração de $Hg_{orgânico}$ (Figura 4), indicando, como já testado anteriormente, que o Hg^{2+} não é transferido para a fase orgânica. Para as concentrações de 10 e 30 mg L^{-1} de ácido húmico em presença de Hg^{2+} não há formação de complexo que seja transferido para a fase orgânica durante a extração e que possa ser quantificado como $Hg_{orgânico}$.

Limite de detecção

O limite de detecção²⁸ para quantificação de $Hg_{orgânico}$ em água, utilizando o metilmercúrio como modelo, foi calculado de acordo

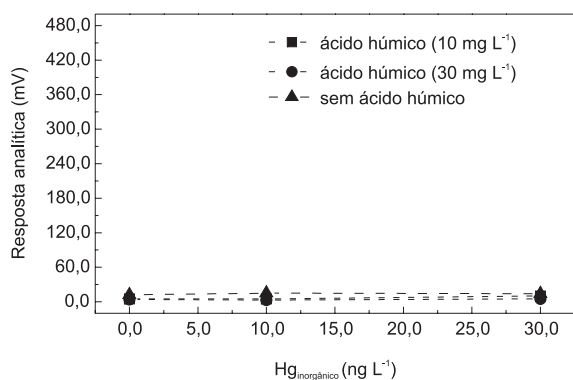


Figura 4. Recuperação de Hg^{2+} na fase orgânica após extração de $Hg_{orgânico}$ de uma amostra que recebeu adição de ácido húmico e Hg^{2+}

com a equação abaixo, sendo o valor médio do branco (M_{Branco}) de 22,09 mV e o desvio padrão das medidas do branco (σ_{branco}) de 2,11 mV, o que corresponde a 160 pg.

$$M_{Branco} + 3 \sigma_{branco} = 13,88114 + 7,09291 x$$

A reprodutibilidade e a repetibilidade foram avaliadas por meio de uma série de seis quantificações do sedimento (BCR-580) realizadas no mesmo dia, como em datas diferentes²⁸, e os resultados encontram-se ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de variação para a determinação de $Hg_{orgânico}$ por CVAFS

Composto	LD (pg)	LQ (pg)	Repetibilidade RSD (%; n=6)	Reprodutibilidade RSD (%; n=6)
$Hg_{orgânico}$	90,0	160,0	5,3	6,4

* Dados adicionais: 100,0 mL de amostra

Protocolos de coleta de $Hg_{orgânico}$ em amostra de água

O estudo da estabilidade do metilHg em diclorometano demonstrou que não ocorrem diferenças significativas na concentração de metilHg quantificado como $Hg_{orgânico}$ para as concentrações de 2,0 e 3,5 $ng L^{-1}$, armazenadas no congelador durante 31 dias (Figura 5a). A grande vantagem da extração do metilHg em campo e armazenamento deste em diclorometano deve-se ao método empregado para quantificação de $Hg_{orgânico}$ proposto neste trabalho, no qual ocorre a quantificação de Hg^0 a partir da redução do Hg^{2+} . Desta maneira, se o metilHg for convertido em Hg^{2+} durante o transporte dos extratos para o laboratório, a concentração de $Hg_{orgânico}$ não será alterada. Outra vantagem de realizar a extração do $Hg_{orgânico}$ da amostra em campo é a redução da quantidade de amostra a ser transportada para o laboratório.

O segundo protocolo de coleta consistiu na coleta das amostras e transporte para o laboratório em garrafas de politereftalato de etileno (PET) originalmente empregadas para comercialização de água mineral, envoltas com papel alumínio e mantidas a 4 °C. Os resultados demonstraram que o $Hg_{orgânico}$ precisa ser extraído em diclorometano dentro de no máximo 6 dias, pois após este tempo pode haver perda do metilHg ou sua degradação para Hg^{2+} (Figura 5b).

Determinação de $Hg_{orgânico}$ em sedimentos empregando-se metilmercúrio como composto modelo

Os melhores resultados para recuperação de $Hg_{orgânico}$ de amostras de sedimentos empregando-se metilmercúrio como composto modelo

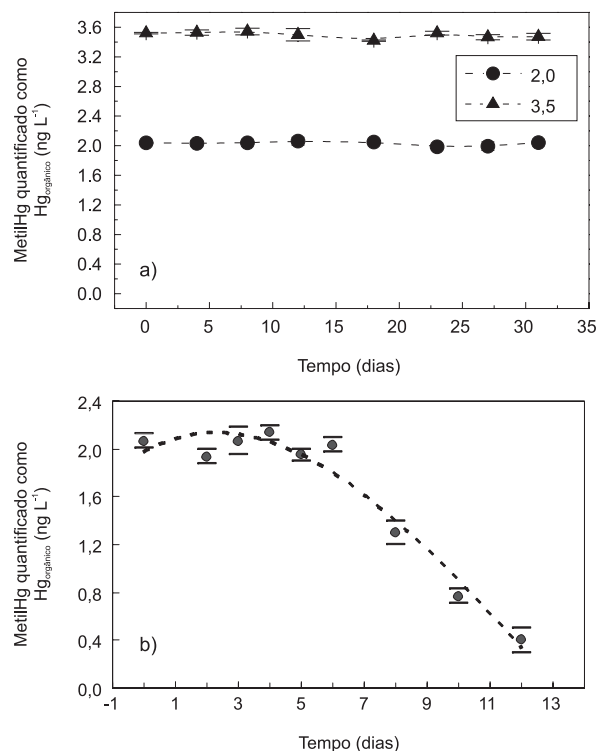


Figura 5. a) Avaliação da estabilidade do padrão de metilHg em diclorometano em função do tempo, b) avaliação da estabilidade do metilHg em amostras naturais acondicionadas em garrafas PET empregadas no armazenamento de água mineral. Amostras congeladas

foram obtidos após sonicação por 15 min, seguida de agitação mecânica em mesa agitadora, por 12 h a 150 rpm. Neste experimento foram realizados testes de recuperação sobre as amostras de sedimento para concentrações variando de 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 $ng metilHg g^{-1}$ de sedimento. Os resultados apresentados na Figura 6a demonstram que o método apresentou boa recuperação do metilmercúrio adicionado e quantificado como $Hg_{orgânico}$ ($R^2 = 0,9937$).

Os resultados mostrados na Figura 6b indicam que ocorreu uma boa recuperação do metilmercúrio adicionado na amostra de sedimento ($R^2=0,9921$). O $Hg_{orgânico}$ foi quantificado em várias amostras de sedimento e para cada análise foi realizado um teste de recuperação para a adição de 10,0 ng de metilHg g^{-1} de sedimento. Os valores de recuperação de metilHg (valores não apresentados) variaram de 57 a 97%, dependendo do conteúdo de carbono orgânico presente nos sedimentos.

Consistência do método

A exatidão do método proposto neste trabalho não pôde ser plenamente avaliada, devido à dificuldade de se encontrar um material certificado que apresentasse o estoque desagregado das formas orgânicas de mercúrio. Uma possível inconsistência na exatidão do método proposto para determinação de $Hg_{orgânico}$ foi testada pela análise do material referência certificado (BCR-580). Os resultados ilustrados na Tabela 4 mostram que o valor de $Hg_{orgânico}$ é maior que o valor certificado para metilmercúrio. Esta diferença já era esperada e pode ser justificada pela provável presença de outros compostos organomercuriais no BCR-580, como dimetilHg. Em trabalho realizado por Wasserman e colaboradores²⁹ com sedimentos da Baía de Sepitiba (RJ), região costeira, foi demonstrado que nas 28 estações amostradas a concentração de dimetilmercúrio foi maior que a de metilmercúrio, o que fortalece a idéia de que o sedimento BCR-580 pode apresentar outros compostos organomercuriais.

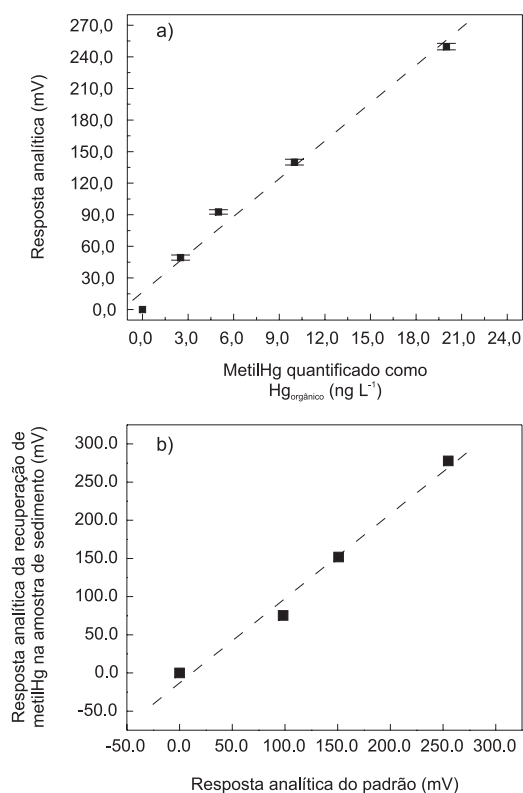


Figura 6. a) Curva analítica de metilmercúrio para a faixa de 0,0 a 20,0 ng L⁻¹, sendo a) metilmercúrio e b) recuperação de Hg_{orgânico} de amostras de sedimento que receberam adição de metilHg

Tabela 4. Valores observados e certificados no sedimento BCR-580, apresentado como média ± SD

BCR-580	Hg _{total} (mg kg ⁻¹)	Hg _{orgânico} (µg kg ⁻¹)
Valor certificado	132 ± 3	75,5 ± 3,7 (*)
Valor observado	-	91,6 ± 4,6
Erro absoluto (%) (n=6)	-	16,1

(*) Valor certificado referência para metilHg

Quando os valores de Hg_{orgânico} (CVAFS) foram comparados com os valores de metilHg (GC-ECD) em sedimentos da Bacia do Rio Negro (Tabela 1) não foram observadas diferenças significativas nas concentrações encontradas pelos dois métodos, uma vez que o valor de t tabelado (2,23, P=0,05) foi maior que o valor de t calculado (0,91) (teste t pareado). Desta maneira, acredita-se que para as amostras de sedimento coletadas na Bacia do Rio Negro em Janeiro/2004, o conteúdo de Hg_{orgânico} pode ser considerado majoritariamente como sendo metilHg.

CONCLUSÕES

Este trabalho propõe um novo método para quantificação de Hg_{orgânico} em amostras ambientais, baseado na extração seguida de oxidação do Hg_{orgânico} e subsequente redução deste para Hg⁰ e sua quantificação final por CVAFS.

O método adaptado para quantificação de Hg_{orgânico} em amostra de água e sedimento apresentou eficiência com níveis de recuperação variando de 90-110% para amostra de água e 57-110% para amostra de sedimento. O método não apresentou problemas de interferência quando na presença de Hg²⁺ na ordem de 1,0-30,0 ng L⁻¹, e

a presença de Hg⁰ em concentração de 700 ng L⁻¹ e ácido húmico em concentrações de 10,0 a 30,0 mg L⁻¹ não formou complexos de Hg-ácido húmico que fossem passíveis de extração como Hg_{orgânico}, gerando artefatos positivos.

Para amostras de sedimento da Bacia do Rio Negro os valores de metilmercúrio (GC-ECD) e Hg_{orgânico} (CVAFS) não apresentaram diferenças significativas (teste t pareado), o que indica que estas amostras de sedimento devem conter apenas metilmercúrio como composto organomercurial.

Este método apresenta a vantagem de ser relativamente rápido e de baixo custo, além do metilmercúrio ser destruído antes da quantificação, diminuindo os problemas relacionados ao manuseio deste composto, que apresenta elevada toxicidade. Uma outra vantagem deste método é proporcionar um protocolo de coleta no qual o metilHg, uma vez extraído da amostra, poderá ser convertido para Hg²⁺ sem comprometer o resultado final. Desta maneira, este método apresenta um diferencial frente aos outros métodos de especiação de mercúrio em amostras ambientais, destacando-se pela simplicidade e sensibilidade.

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi financiado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projetos (00/02321-2, 00/13517-1 e 02/03395-1).

REFERÊNCIAS

- Kanno, A.; Akagi, H.; Takabakate, E.; *Eisei Kagaku-Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* **1985**, *31*, 260.
- Marins, R. V.; Filho, F. J. De P.; Maia, S. R. R.; Lacerda, L. D.; Marques, W. S.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 763.
- Miretzky, P.; Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F.; Rocha, J. C.; *Quím. Nova* **2005**, *28*, 438.
- Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 244.
- Halbach, S. Em *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids - Bioinorganic Medicine*; Berthon, G. ed., Marcel Dekker: Basel, 1995.
- Ulrich, S. M.; Tanton, T. W.; Abdrashitova, S. A.; *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2001**, *31*, 241.
- Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 593.
- Tseng, C. M.; Diego, A. D.; Martin, F. M.; Donard, O. F. X.; *J. Anal. Spectrom.* **1997**, *12*, 629.
- Westöö, G.; *Acta. Chem. Scand.* **1967**, *20*, 1790.
- Westöö, G.; *Acta. Chem. Scand.* **1968**, *22*, 2277.
- Marins, R. V.; Paraquetti, H. H. M.; Ayres, G. A.; *Quím. Nova* **2002**, *25*, 372.
- Resende, M. D. R.; Campos, R. C.; Curtius, A. J.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1993**, *8*, 247.
- Cossa, D.; Sanjuan, J.; Cloud, J.; Stockwell, P. B.; Torns, W. T.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1995**, *10*, 287.
- Suda, I.; Suda, M.; Hirayama, K.; *Arch. Toxicol.* **1993**, *67*, 365.
- Limaverde Filho, A. M.; Campos, R. C.; *Quím. Nova* **1999**, *22*, 477.
- Micaroni, R. C. D. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F.; *Quím. Nova* **2000**, *23*, 487.
- Atallah, R. H.; Kalman, D.; *J. Anal. Toxicol.* **1993**, *17*, 87.
- Jian, W.; Mcleod, C. W.; *Talanta* **1992**, *39*, 1537.
- Bisogni, J. J.; Lawrence, A. W.; *Environ. Sci. Technol.* **1974**, *18*, 850.
- Lee, Y. H.; Mowrer, J.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *221*, 259.
- Akagi, H.; Nishimura, H. Em *Advances in mercury toxicology*; Suzuki, T.; Nobumasa, I.; Clarkson, T. W., eds.; Plenum Press: New York, 1991.
- Szakacs, O.; Lasztity, A.; Horvath, Z.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *121*, 219.
- Fadini, P. S.; Jardim, W. F.; *Analyst* **2000**, *125*, 549.
- Bloom, N. S.; *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* **1989**, *46*, 1120.
- Horvat, M.; Laing, L.; Bloom, N. S.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *281*, 135.
- Hintelmann, H.; Falter, R.; Ilgen, G.; Evans, R. D.; *J. Anal. Chem.* **1997**, *358*, 363.
- Baeyens, W.; Ebinghaus, R. E.; Vasiliev, O.; *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1996.
- Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood PTR Prentice Hall: New York, 1993.
- Wasserman, J. C.; Amouroux, D.; Wasserman, M. A. V.; Donard, O. F. X.; *Environ. Technol.* **2002**, *23*, 899.