



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro



MAKENLY TAFURT CARDONA

DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE METILMERCÚRIO E MERCÚRIO (II)
EM SISTEMAS AQUÁTICOS NAS PROXIMIDADES DE REFINARIAS
DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DIFUSÃO EM FILMES
FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT).

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Geociências e Ciências
Exatas do Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Geociência e Meio Ambiente.*

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Rio Claro - SP

2015



Ministério
da Ciência e
Tecnologia



628.1 Cardona, Makenly Tafurt
C268d Determinação in situ de metilmercúrio e mercúrio (II) em sistemas aquáticos nas proximidades de refinarias de petróleo, utilizando a técnica difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) / Makenly Tafurt Cardona. - Rio Claro, 2015
77 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Amauri Antonio Menegário

1. Abastecimento de água. 2. Recurso hídrico. 3. S.cerevisiae. I. Título.

DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE METILMERCÚRIO E MERCÚRIO (II)
EM SISTEMAS AQUÁTICOS NAS PROXIMIDADES DE REFINARIAS
DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DIFUSÃO EM FILMES
FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT).

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Geociências e Ciências
Exatas do Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Geociência e Meio Ambiente.*

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário
Orientador – CEA/UNESP - Rio Claro/SP

Prof. Dr. Carlos Alfredo Suarez
CEA/UNESP - Rio Claro/SP

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
UFPR-Curitiba/PR

Conceito: Aprovada

Rio Claro,- SP 10 de abril de 2015

*Dedico este trabalho aos meus amados pais,
Meus irmãos e meus três preciosos sobrinhos,
por serem sempre meu melhor presente e motivo de orgulho.*

A persistência é o caminho do êxito. *Charles Chaplin*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Amauri pelo conhecimento compartilhado, todo tempo e paciência dispendidos a este trabalho, bem como a estrutura disponibilizada;

Ao Prof. Alfredo pelo acompanhamento no trabalho e dedicada atenção em todo o processo de construção do conhecimento aqui obtido.

Ao Prof. Marco Tadeu Grassi e ao Prof. Marcelo de Oliveira pelo aceite do convite para participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para melhorar este trabalho.

Ao Grupo GEMB pela amizade, suporte e troca de ideias que me foi permitida ao longo desses anos.

Aos funcionários do CEA pelo apoio administrativo essencial para cumprimento em cada etapa deste processo.

A minha família, em especial minha irmã Yali, por ter tornado possível hoje eu estar aqui. Ao Welinton pela compreensão, apoio e carinho.

Aos meus amigos hoje aqui presentes e aos que não puderam estar por tornar esses dois anos muito mais prazerosos e confortáveis.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás, ao PRH/ANP – FINEP/MCT e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE METILMERCÚRIO E MERCÚRIO (II) EM SISTEMAS AQUÁTICOS NAS PROXIMIDADES DE REFINARIAS DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um método para determinação seletiva e *in situ* do metilmercúrio (MeHg) com o uso técnica da técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT- diffusive gradients in thin films) e, também usando a DGT, avaliou-se um método já desenvolvido (baseado no uso da membrana P81) para a determinação de mercúrio (II). Para amostragem da espécie MeHg foi usado um disco ligante baseado no uso da *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) - 20% (m/v) - imobilizada em agarose 3%, o gel de poliacrilamida como meio difusivo (S + P) e o acetato de celulose como membrana filtrante. A membrana de troca catiônica P81 e o gel difusivo de agarose (P81 + A) foram usados na determinação de mercúrio (II).

Os dispositivos DGT montados com as três camadas foram imersos em soluções preparadas no laboratório com concentrações conhecidas de MeHg (e/ou Hg (II)). Determinou-se o coeficiente de difusão médio do MeHg ($7,03 \pm 0,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 23 °C) na poliacrilamida. Posteriormente foram avaliados os principais parâmetros que afetam o desempenho da técnica: na faixa de pH 3,5 e 8,5 e força iônica (I), entre, $0,0005 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. As recuperações obtidas de (84 - 98 %) e (84 - 105 %) do analito, no intervalo de pH e I estudadas, indicaram que o método pode ser utilizado em sistemas aquáticos que satisfaçam estas condições. Foram avaliadas também interferências devido à presença de alguns íons concomitantes. Os íons Mn, Cu, Zn, Fe(II) não afetaram a retenção do MeHg pelo ligante, com recuperações de (70 - 87 %). A retenção do ligante *S. cerevisiae* foi menos tolerável à presença de Pb e Cd com recuperações de ($62 \pm 5 \%$) e ($54 \pm 6 \%$). O método desenvolvido foi aplicado *in situ* no Rio Negro (Manaus-AM) no entorno da refinaria de petróleo Isaac Sabbá (Reman). Determinou-se as concentrações medias de MeHg e Hg (II) no local pela técnica DGT. Os resultados obtidos com a DGT foram ($< 0,025 \mu\text{g L}^{-1}$) e ($< 0,085 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

Palavras chaves: Metilmercúrio. *S. cerevisiae*. DGT.

Abstract

An *in situ* method for selective determination of methylmercury (MeHg) was developed in this work by using the diffusive gradients in thin films (DGT) technique. This method was used together with an already evaluated DGT method, based on the use of P81 cationic membrane as binder for determination of mercury (II). To determine MeHg species, it was used a binder disk of *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) - 20% (w / v) - immobilized on agarose 3%, polyacrylamide diffusive layers (S + P) and acetate of cellulose as a filter membrane. The P81 cationic membrane and the diffusion agarose gel (P81 + A) were used for the determination of mercury (II).

The DGT devices assembled with the previously described layers were deployed in solutions prepared in laboratory, with known concentrations of MeHg (and / or Hg^{2+}). The average MeHg diffusion coefficient obtained for polyacrylamide equals to $7.03 \pm 0.77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 23 °C. It was evaluated the main parameters that affect the technical performance: pH (3.5 - 8, 5) and ionic strength (I) ($0.0005 \text{ mol L}^{-1}$ to 0.1 mol L^{-1} NaCl). The analyte recoveries obtained for the pH range studied (84 - 98%) and I (84 - 105%) indicated that the method can be used in aquatic systems which meet these conditions. The effect of interference due to simultaneous presence of ions was also evaluated. Mn, Cu, Zn, Fe (II) did not affect the retention of MeHg by the binder (70 - 87% recoveries). However, the binder layer was less tolerable to presence of Pb and Cd, noticeable by lower recoveries of $62 \pm 5\%$ and $54 \pm 6\%$, respectively.

The developed method was applied *in situ* in Rio Negro (Manaus-AM), nearby the oil refinery Isaac Sabbá (Reman). The average concentrations of MeHg and Hg (II) were determined and the results obtained by DGT on site were ($< 0,025 \mu\text{gL}^{-1}$) and ($< 0,085 \mu\text{gL}^{-1}$), respectively.

Keywords: Methylmercury. *S. cerevisiae*. DGT.

Lista de Figuras

Figura 01. Ciclo biogeoquímico de mercúrio.	19
Figura 02. Principais reações químicas do ciclo do Hg.	20
Figura 03. Fundamento teórico.	25
Figura 04. Esquema de um dispositivo DGT	27
Figura 05. Diagrama esquemático do sistema AFS para análise de mercúrio.	33
Figura 06. Mapa de localização do Rio Negro na Bacia do Rio Amazonas.....	34
Figura 07. Preparo do agente ligante <i>S.Cerevisiae</i>	41
Figura 08. Disposição dos discos utilizados na montagem do DGT.....	42
Figura 09. a) solução em estabilização; b) Dispositivos DGTs a serem utilizados para imersão;	44
Figura 10. Soluções sintéticas de Hg(II) e MeHg para a análise de especiação.	47
Figura 11. Pontos de coleta.....	48
Figura 12. Ilustra os pontos de amostragem no Rio Negro	48
Figura 13. a) Montagem dos dispositivos DGT; b) Dispositivos DGT mais pesos; c) Imersão no Rio Negro-AM.....	49
Figura 14. Procedimento adotado para coleta de amostras - a) Teor dissolvido; b) Teor total.	50
Figura 15. Procedimento de coleta.....	50
Figura 16. Massa acumulada em relação à concentração da solução de imersão versus o tempo. Soluções contendo 100 mg L^{-1} MeHg em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl (pH 5-6). Temperatura 23° C . Imersões até 48 horas.....	55
Figura 17. Massa acumulada em relação a concentração da solução de imersão versus o tempo. Soluções contendo 100 mg L^{-1} MeHg em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl (pH 5-6). Temperatura 23° C . Imersões até 6 horas.....	55
Figura 18. Efeito das diferentes forças iônicas testadas na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i>	58
Figura 19. Efeito dos diferentes pH testados na capacidade de ligação da <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	59
Figura 20. Efeito da interferência de metais na retenção de MeHg pelo ligante <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	60

Lista de Tabelas

Tabela 01. Propriedades físico- químicas do mercúrio.....	14
Tabela 02. Classificação de compostos mercuriais.	15
Tabela 03. Compostos de mercúrio encontrados nos hidrocarbonetos e carvão energético	18
Tabela 04. Parâmetros instrumentais para determinação de Hg.....	51
Tabela 05. Resultados do teste de extração em fase sólida com o emprego da membrana P81 na retenção do MeHg.	53
Tabela 06. Resultados do teste de extração em fase sólida com o emprego dos discos de <i>S. cerevisiae</i> imobilizada em agarose na retenção do MeHg	54
Tabela 07. Coeficientes de Difusão (D) determinados nos diferentes experimentos realizados no laboratório.....	57
Tabela 08 Recuperação ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos analitos a partir de amostras sintéticas obtidos com o método proposto. S + P = Agente ligante <i>S. cerevisiae</i> + gel difusivo poliacrilamida; S + A = Agente ligante <i>S. cerevisiae</i> + gel difusivo agarose.....	62
Tabela 09. Resultado de análise de especiação de Hg (II) e MeHg em solução com concentrações conhecidas.....	63
Tabela 10. Parâmetros monitorados nos pontos de coleta e imersão dos dispositivos DGT.....	64
Tabela 11. Concentração <i>In situ</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) de MeHg e Hg (II) (determinação por técnica DGT), e concentração de mercúrio total y dissolvida em amostras provenientes do Rio Negro-AM.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Mercúrio	13
3.1.1	Fontes	16
3.1.2	Ciclo biogeoquímico do mercúrio	18
3.1.3	Metilmercúrio.....	21
3.1.4	Bioacumulação e Biomagnificação.....	22
3.1.5	Toxicidade do Metilmercúrio	23
3.2	Técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT).24	
3.2.1	Especiação de mercúrio (II) e metilmercúrio pela DGT	27
3.3	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).....	31
3.4	Caracterização da área de estudo	34
3.4.1	Rio Negro-Bacia do Rio Negro, AM.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS EMPREGADOS	36
4.1	Material	36
4.1.1	Soluções.....	37
4.2	Métodos	38
4.2.1	Princípios da Técnica DGT.....	38
4.2.2	Membrana filtrante	39
4.2.3	Géis difusivos	39
4.2.4	Agentes ligantes	40
4.2.5	Montagem dos dispositivos DGT	41

4.2.6	Retenção de MeHg pela <i>S.Cerevisiae</i>	42
4.2.7	Processo de eluição	43
4.2.8	Coeficiente de difusão	44
4.2.9	Efeito da força iônica na retenção de MeHg.....	45
4.2.10	Efeito do pH na retenção de MeHg	45
4.2.11	Interferência de metais na determinação de MeHg	45
4.2.12	Seletividade do ligante <i>S. cerevisiae</i> para MeHg e Hg (II).....	46
4.2.13	Análise de especiação de MeHg e Hg (II)	46
4.3.1	Locais de Coleta.....	47
4.3.2	Imersão	48
4.4	Preparo das soluções e amostras para determinação por CV- AFS	50
4.5	Determinação de mercúrio e metilmercúrio empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).....	51
4.5.1	Condições de operação do CV-AFS.....	51
5	RESULTADOS E DICUSSÃO	52
5.1	Retenção MeHg – testes preliminares	52
5.2	Curvas de imersão e Coeficiente de difusão.....	54
5.3	Efeito da força iônica na retenção de MeHg	57
5.4	Efeito do pH na retenção na retenção de MeHg	58
5.5	Efeito da interferência de metais	59
5.6	Seletividade do ligante <i>S. cerevisiae</i> para MeHg e Hg (II).....	60
5.7	Análise de especiação de MeHg e Hg (II) em amostras sintéticas.	62
5.8	Imersão <i>in situ</i> Rio Negro, sub-bacia do Rio Negro , AM.	63
6	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
7	BIBLIOGRAFIA.....	67

1 INTRODUÇÃO

O Hg é um dos metais presentes no solo e na água, como um componente natural dos mesmos ou como resultado das atividades humanas, que podem causar graves impactos ambientais (GUTIERREZ; BUSCIO 2010). Assim, traços e ultra traços deste elemento podem ser encontrados em águas residuais provenientes de refinarias de petróleo, sendo também susceptíveis de serem fiscalizadas pelos órgãos reguladores para as emissões de mercúrio na atmosfera e em resíduos sólidos ou líquidos, como é feito com as usinas a carvão (WILHEM M., 2000). Outra fonte associada à produção comercial de mercúrio está intimamente ligada à indústria da mineração, que é a fonte primária de obtenção deste metal e representa cerca de 60 % do fornecimento (IGME, 2003).

A toxicidade do mercúrio depende de suas diferentes espécies químicas, como o metilmercúrio (a forma orgânica) que é extremamente tóxico, quando comparada com o Hg^{2+} (forma inorgânica mais comum no ambiente). Devido ao radical orgânico, o metilmercúrio (MeHg) pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis ao sistema nervoso central. Se for acumulado no corpo humano, pode não só afetar o sistema nervoso, como também o sistema cardiovascular, trato digestivo e renal, especialmente em crianças (MORRISON, 2007). Além disso, estudos anteriores indicam a existência de mercúrio bioacumulado (especialmente na sua forma MeHg) nos organismos vivos e os efeitos adversos na trajetória do elemento na cadeia alimentar, chegando ao ser humano através da flora e fauna aquáticas, causando problemas na saúde das pessoas que vivem na região exposta (WEINBERG, 2010).

A análise de especiação de mercúrio em um ecossistema aquático torna-se um problema, devido aos níveis muito baixos, o que requer o uso de técnicas altamente sensíveis. Além disso, a determinação é dificultada por aspectos como a preservação e estabilidade das várias espécies durante a amostragem, armazenamento e análise (YU L. P. et al., 2003). Neste sentido, são necessárias técnicas analíticas para a determinação das formas específicas de Hg. O emprego da técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT), que tem sido utilizada para determinar metais e suas espécies lábeis em águas naturais, é uma das alternativas para conduzir a especiação de mercúrio *in situ*, evitando assim

problemas de preservação e estabilidade das suas várias espécies (DAHLQVIST et al., 2010; GILLAN et al., 2012; WEIJIA et al., 2007).

A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (Diffusive Gradients in thin Films - DGT) desenvolvida recentemente, em comparação com outras técnicas analíticas, apresenta uma série de vantagens, como: sua simplicidade; capacidade de amostragem *in situ*; pré-concentração das espécies de interesse; amostragem multielementar; e sua capacidade de fornecer concentrações médias no tempo, quando utilizado por longos períodos (dias e semanas) em amostras de concentração variável, além da independência das medidas realizadas com as variações do fluxo hídrico do sistema estudado, o qual permite seu emprego em qualquer sistema aquático, seja em rios, mares ou lagoas sem a necessidade de medidas adicionais (ZHANG, H. & DAVISON W., 1995; Manual Técnico de Informações DGT Research).

O petróleo bruto ou natural tem uma ampla matriz de compostos, entre eles hidrocarbonetos saturados e aromáticos. A concentração total de metais em óleos raramente excede 0,02-0,03% em peso. Cerca de 60 microelementos podem ser encontrados nesta matriz, dentre eles o mercúrio (Hg) (SOIN et al., 2010). O mercúrio e os compostos de mercúrio são componentes comuns do petróleo e produtos dele derivados. As concentrações de Hg no petróleo cru e gás natural variam entre 0,01 ng g⁻¹ e 10 µg g⁻¹, as quais são altamente dependentes da localização geológica (WILHEM M., 2000). Deste modo, as águas residuais de refinarias de petróleo podem conter uma vasta gama de poluentes orgânicos e metálicos, tais como óleo, graxas, fenóis, sulfetos, amoníaco, sólidos em suspensão, compostos de nitrogênio, metais pesados e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (BROWN; DONELLY, 1984).

Considerando o exposto nos parágrafos anteriores, a aplicação da técnica DGT torna-se uma ferramenta útil e eficaz para determinar o grau de poluição efetivo das fontes de água próximas às refinarias de petróleo, servindo como base para a tomada de decisão das instituições governamentais e outras organizações para garantir boa qualidade dos recursos hídricos, uma adequada qualidade de vida das comunidades vizinhas, com foco no desenvolvimento sustentável.

Neste projeto visou-se o desenvolvimento de um método empregando a técnica DGT para medida *in situ* das espécies de mercúrio (Hg^{2+} inorgânico e MeHg orgânico). Para aplicação do método, foram selecionados três pontos nas proximidades da refinaria de petróleo Isaac Sabbá (Reman) no percurso do Rio Negro na cidade de Manaus, no Estado do Amazonas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver um método para determinar *in situ* seletivamente as espécies de mercúrio orgânico (MeHg) e inorgânico (Hg (II)) em sistemas aquáticos usando a técnica DGT. Avaliar o desempenho do sistema DGT contendo o agente ligante *S. cerevisiae* e poliacrilamida (como agente difusivo) para retenção de MeHg. Também, avaliar o desempenho do método desenvolvido para especiação de mercúrio no entorno de refinarias de petróleo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercúrio

O mercúrio é considerado um dos elementos mais tóxicos presentes no ambiente em nível mundial (UNEP, 2013). Encontra-se de forma natural, em baixas concentrações e com variadas propriedades químicas e físicas distribuído por toda a crosta terrestre. Presente em pelo menos 25 minerais, mas a única forma economicamente explorada é o Cinábrio (HgS - sulfeto de mercúrio (II)), que ocorre em depósitos em áreas com atividade vulcânica recente, em veios e fraturas minerais, e próximo a fontes de águas termais (AZEVEDO, 2003). O mercúrio está presente na forma inorgânica em águas superficiais e subterrâneas em

concentrações inferiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (OMS,1993). Na Tabela 01 são apresentadas algumas de suas propriedades físicas e químicas.

Tabela 01. Propriedades físico- químicas do mercúrio.

Propriedade	
Cor/ forma	Branca prata; líquido a temperatura ambiente e a 0°C
Odor	Inodoro
Densidade	$13\,579 \text{ g/cm}^3$ (25°C)
Ponto de fusão	$-38,87^\circ\text{C}$ (234 K)
Ponto de ebulição	$356,72^\circ\text{C}$ (630 K)
Pressão de vapor (25°C)	$2 \times 10^{-3} \text{ mmHg}$
Solubilidade em água	Insolúvel em água e em HCl diluído., HBr, HI, H_2SO_4 diluído., solúvel em HNO_3
Solubilidade em solventes orgânicos	Solúvel em H_2SO_4 ; lipídicos.

Fonte: Agency (1999); Fabre e Truhaut (1971); Galvao e Corey (1987); Halbach (1987); Stokinger (1965), apud Azevedo (2003).

O mercúrio pode existir em três estados de oxidação: O mercúrio metálico ou elementar (Hg^0) possui baixa solubilidade em água, altamente volátil a temperatura ambiente e, sendo uma das espécies predominantes na atmosfera devido sua estabilidade, pode ser transportado por longas distâncias. As duas formas oxidadas, o íon mercurioso ($\text{Hg}(\text{I})$), o qual consiste no cátion divalente (Hg_2^{2+}), é instável nos diferentes ambientes e oxida rapidamente ao íon mercúrio (Hg^{2+}). O íon mercúrio ($\text{Hg}(\text{II})$ ou Hg^{2+}), por sua alta solubilidade em água, possui a maior atividade química e biológica. Devido a sua habilidade para atrair e reter elétrons doadores, o $\text{Hg}(\text{II})$ forma uma variedade de complexos muito estáveis, além de compostos orgânicos de ligações covalentes com enxofre (S), nitrogênio (N), fósforo (P) e principalmente o

carbono (C). Desta forma, constitui o precursor ambiental das espécies de mercúrio que apresenta maior toxicidade: as organometálicas (JACKSON, 1998; AZEVEDO, 2003).

Fatores como o pH, força iônica, potencial redox, concentrações de matéria orgânica dissolvida, oxigênio dissolvido, sulfatos e sólidos suspensos, são importantes que controlam a especiação do mercúrio em solução e contribuem para diferenciar ou tipificar o mercúrio no ambiente (GABRIEL e WILLIAMSON, 2004).

Em 2000, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry- IUPAC), recomendou a seguinte definição: “Especiação é o termo geralmente utilizado para representar a distribuição de um elemento entre as espécies químicas definidas num sistema” (TEMPLETON et al., 2000). As diferentes formas de um elemento químico e suas combinações são conhecidas como "espécies". As principais espécies de mercúrio são o mercúrio elementar (Hg^0), e as formas inorgânicas (Hg^{2+}) e orgânicas (MeHg) (AZEVEDO, 2003).

A Tabela 02 apresenta uma classificação dos compostos mercuriais, proposta por Lindqvist e colaboradores (1984).

Tabela 02. Classificação de compostos mercuriais.

Classificação	Composto
Voláteis	(Hg^0); (CH_3) ₂ Hg
Espécies reativas particuladas solúveis em água	Hg^{2+} , HgX_3^- , HgX_4^{2-} (em que X=OH ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻), HgO em partículas aerossóis e complexos de Hg^{2+} com ácidos orgânicos
Espécies não reativas	MeHg, CH_3HgCl , CH_3HgOH e outros organomercuriais, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HS e Hg^{2+} ligado ao enxofre em fragmentos de matéria húmica.

Fonte: Lindqvist et al. (1984), apud Azevedo (2003).

3.1.1 Fontes

O mercúrio é gerado no ambiente por processos naturais e antrópicos. As emissões naturais na atualidade são menores em comparação com as emissões antrópicas; em todo o mundo estima-se que durante o último século as emissões antrópicas triplicaram as concentrações de Hg na atmosfera e na superfície do oceano (MANSON et al., 1994).

As fontes naturais incluem atividade geotérmica, a evaporação das superfícies de terra e água, degradação de minerais, intemperismo natural de rochas, erupções vulcânicas e incêndios florestais, sendo responsáveis por cerca de 10 % da estimativa de 5.500-8.900 toneladas de mercúrio atualmente a ser emitidos e re-emitidos para a atmosfera a partir de todas as fontes. (UNEP, 2013).

O mercúrio pode ser encontrado em concentrações variáveis, em quase todos os ambientes geológicos. É encontrado em vários tipos de rochas, com mais frequência em calcário, arenito, serpentina, andesita, basalto, riolita, feldspato alcalino e quartzo e principalmente associado ao cinábrio como sulfeto de mercúrio. As regiões de alta concentração de mercúrio nas rochas superficiais são caracterizadas pela emissão de grandes quantidades de mercúrio para a atmosfera. Devido às elevadas temperaturas do manto da Terra, o mercúrio, em especial o elementar, é extremamente móvel e continuamente se difunde para a superfície por sua volatilidade. Em zonas de fratura geológicas profundas, estes processos são mais intensos. Existem os chamados cinturões geoquímicos de mercúrio, os quais na sua capa superior as concentrações de mercúrio excedem significativamente os valores médios. Em algumas partes dos cinturões, a acumulação de grandes quantidades de mercúrio levou à formação de depósitos exploráveis (Jonasson e Boyle, 1971; Bailey et al., 1973; Clayton, 1982 apud UNEP, 2002).

No inventário de emissões globais antrópicas de mercúrio, realizado pela UNEP (2013), estima-se que em 2010, aproximadamente 1.960 toneladas das emissões, foram geradas pelas atividades humanas, representando cerca de 30% da quantidade total de mercúrio na atmosfera anualmente. Baseando-se nas avaliações de emissões globais, as emissões para águas e solos no Brasil são

estimadas em cerca de 50% das emissões atmosféricas. Calcula-se também que o total de Hg emitido para o meio ambiente atinja cerca de 100 toneladas anuais, tendo diminuído significativamente nas últimas duas décadas (MMA, 2011).

As principais fontes de emissão ocorrem a través da queima de carvão, mineração, fundição e produção de ferro e metais não ferrosos, produção de cimento, mineração artesanal de pequena escala de ouro, resíduos de produtos de consumo em geral (baterias, tintas, interruptores elétricos e dispositivos eletrônicos, termômetros, medidores de pressão arterial, lâmpadas fluorescentes, pesticidas, fungicidas, medicamentos, cosméticos, amálgama dentária), na indústria do cloro e álcalis, onde a tecnologia de células de mercúrio pode ser utilizada na produção de cloro e de soda cáustica, também é usado como um catalisador na produção de cloreto de vinil monômero (VCM) a partir de acetileno, sobretudo na China. Novas fontes não incluídas nos inventários passados são as emissões provenientes da produção e emissão de alumínio primário, queima de gás natural e refino de petróleo (UNEP, 2013).

A concentração de Hg no petróleo é extremamente variável dependendo da origem, arcabouço geológico do depósito, idade do depósito, entre outros fatores. Várias espécies de mercúrio já foram identificadas no petróleo. A Tabela 03 apresenta a predominância relativa entre as espécies de mercúrio encontradas em combustíveis fósseis comparando os valores registrados para carvão energético, petróleo e gás natural. A espécie dominante de Hg no petróleo é mercúrio elementar, conseqüentemente, será concentrado nas frações mais leves, como a nafta. Essa informação é importante para prever a distribuição do mercúrio nas diversas etapas da cadeia de produção de combustíveis (MMA, 2013).

Em geral os combustíveis fósseis, principalmente o petróleo, tendem a ser uma das causas mais significativas da contaminação ambiental, com maior frequência no ar, o que, posteriormente, leva à contaminação de outros meios, como solo e água (Saha, 1972, apud Quiroz, 1995, apud Azevedo 2003).

Tabela 03. Compostos de mercúrio encontrados nos hidrocarbonetos e carvão energético

Espécies	Carvão	Petróleo	Gás natural
Hg ⁰	Traços	>90 % do total	>90% do total
(CH ₃) ₂ Hg	Traços	Traços	Traços
HgCl ₂	10-50 % do total	Traços	Traços
HgS	>50 % do total	Raro	Em suspensão
HgO	Traços	Raro	Raro
CH ₃ HgCl	-	Raro	Raro

Fonte: EPA (1998); Wilhelm (2000); Bloom (2002) apud MMA (2011).

3.1.2 Ciclo biogeoquímico do mercúrio

O ciclo biogeoquímico de mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este composto pode seguir no ambiente. De modo geral destaca-se sua liberação do solo e da água para atmosfera, seu transporte está seguido da deposição atmosférica na água e no solo. Quando em contato com o solo ou sedimento, pode ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação, reiteração deste na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática (BISINOTI et al.,2004).

Como mencionado anteriormente o mercúrio participa de uma série de processos complexos em diferentes compartimentos ambientais (água, ar, solo e biota). Dependendo dos componentes do ambiente, o mercúrio desenvolve uma série de transformações químicas, existindo assim, diferentes espécies químicas com diferentes propriedades (STEFFEN et al.,2008). A Figura 01 ilustra os diferentes ambientes onde ocorre o ciclo biogeoquímico do mercúrio.

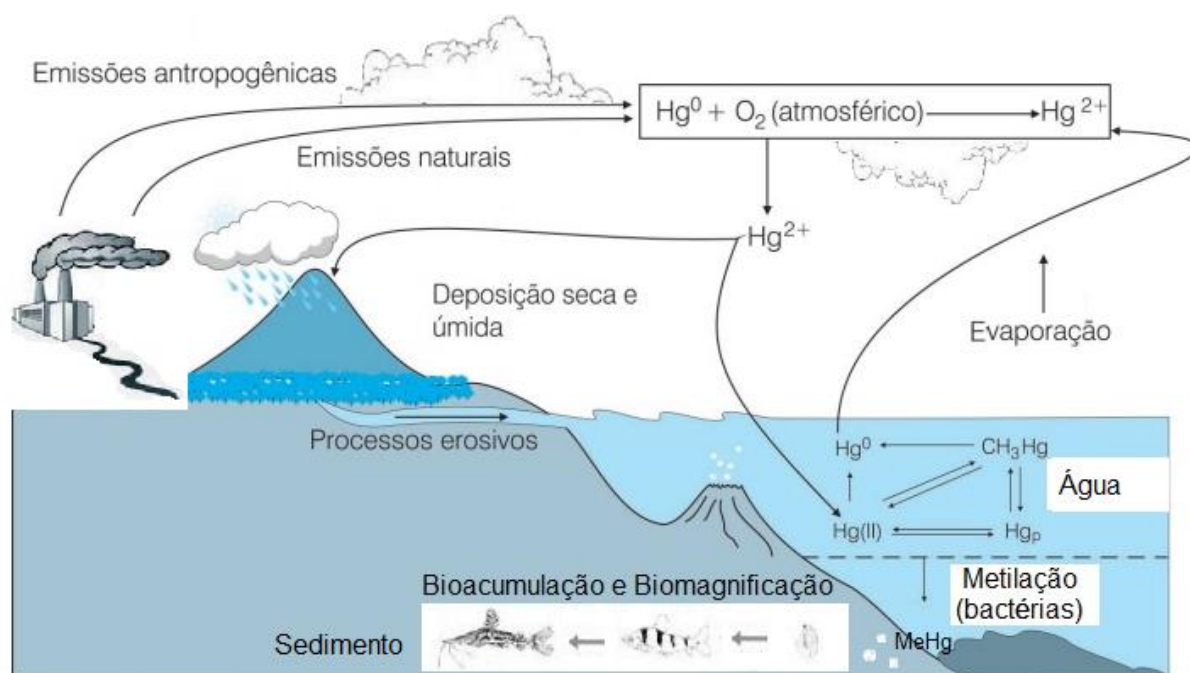


Figura 01. Ciclo biogeoquímico de mercúrio. Fonte: Modificado a partir de Souza (2000).

Segundo Mason et. al., (1994) e Morel et. al., (1998), o mercúrio emitido naturalmente para a atmosfera se apresenta, principalmente, na forma de vapor de Hg^0 insolúvel em Água e com baixa reatividade, o qual é retido na atmosfera e transportado através de grandes distâncias. Na presença de ozônio é oxidado e precipitado em uma fração significativa de mercúrio reativo (Hg^{2+}), sendo mais solúvel em água, podendo ser reemitido para a atmosfera como Hg^0 . O oceano recebe cerca de 90 % de Hg através da deposição atmosférica úmida e seca. Quando oxidado, cerca de 60 % do mercúrio total é depositado na Terra e 40 % na água. Uma vez na água, o mercúrio reativo pode formar grande quantidade de complexos e de quelatos com material orgânico, partículas em suspensão, carbono orgânico dissolvido e também, pode ter ligações covalentes com o carbono e formar compostos chamados organomercuriais (em especial as formas MeHg e dimetilmercúrio), além de apresentar uma forte sorção pelo material húmico (Tena, 1981; Mucci et al., 1995; apud Azevedo 2003). Estudos realizados por Gabriel e Williamson (2004) mostraram que a adsorção do mercúrio pela matéria húmica aumenta com o pH baixo e que a razão para isso poderia ser devido a uma grande concorrência de outros elementos competindo com o Hg, o que influenciaria nessa adsorção. Segundo Bisinoti, (2004), a quantidade de Hg^{2+} diminui quando é fixado à matéria orgânica, sobretudo ao material húmico. No fundo dos oceanos é depositado

na forma insolúvel sulfeto de mercúrio (HgS), o que dificulta o processo de metilação com períodos de retenção mais longos (UNEP, 2005). Desta forma a liberação gradual do mercúrio pode-se estender por períodos mais longos com possíveis lançamentos para a superfície das águas.

Dependendo das condições ambientais como pH e salinidade, (aumentando a solubilidade, mobilidade e disponibilidade do mercúrio) e a presença do complexo íon mercúrio (II)- ácido húmico ($\text{Hg}^{2+}\text{-AH}$) no solo, aumenta ou diminui a metilação do mercúrio (WASSERMAN., 2002 apud BISINOTI et al., 2004). Por outro lado, o mercúrio oxidado (Hg^{2+}) pode complexar também com outros íons presentes, como o cloreto, e formar cloreto de mercúrio (II) (HgCl_2), que depositará na água e no solo, podendo formar MeHg , ou se volatilizará e retornará para a atmosfera, na forma de mercúrio metálico, MeHg ou dimetilmercurio. Mais do que 85% do estoque total de mercúrio na biota de águas doces está na forma de MeHg , no entanto, nas águas este valor raramente ultrapassa 10% e, em sedimentos, varia de 0,1 a 1,5% do estoque total, (BISINOTI et al, 2004). Devido à sua baixa concentração no ambiente, o estudo deste composto é de grande importância pelos efeitos adversos que causa à saúde do homem. A Figura 02 ilustra as principais reações que podem ocorrer no ciclo do Hg no sedimento, água e atmosfera, com grande influência da ação de bactérias e da luz solar.

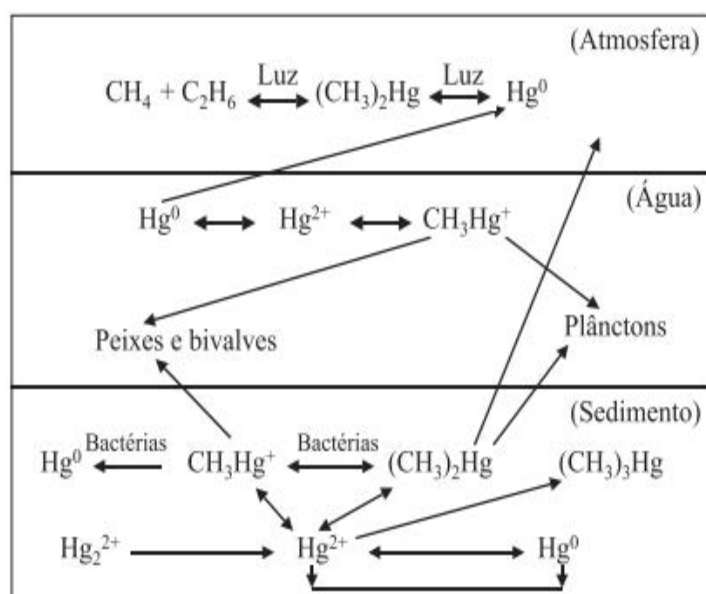


Figura 02. Principais reações químicas do ciclo do Hg. Fonte: Modificado a partir de Bisinotti.,2004.

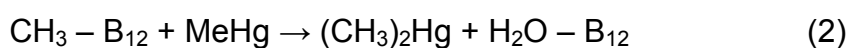
3.1.3 Metilmercúrio

O mercúrio inorgânico pode ser metilado, principalmente, por dois mecanismos:

- Biótico, por microrganismos e fungos em condições aeróbias ou anaeróbias.
- Químico ou abiótico.

Nos dois mecanismos, tem relevância, parâmetros como pH, potencial redox, temperatura, concentração de matéria orgânica, substância húmica e presença de íons (cloreto, nitrato, nitrito, sulfato, sulfeto) (AZEVEDO, 2003;. BISINOTI, 2004).

A formação do MeHg em condições bióticas ocorre por ação da coenzima metilcobalamina (conhecida como vitamina B₁₂) sobre o Hg (II). Produzida por bactérias metanogênicas, tanto aeróbias quanto anaeróbias, em ambientes moderadamente redutores, sendo capaz de transferir o grupo metila para o íon Hg²⁺ como um íon carbânio e um radical metila para produzir MeHg estável em condições neutras e ácidas e o dimetilmercúrio ((CH₃)₂Hg) em condições básicas, (Balde, 1997; D'itri, 1990; Manahan, 1975 apud Azevedo, 2003). (Equações 1 e 2).



As condições anaeróbias facilitam a formação de sulfeto e sulfitos, em elevadas quantidades de sulfeto torna-se Hg (II) solúvel, devido à formação de complexos solúveis de sulfeto no sedimento, favorecendo a produção de MeHg por ação das bactérias sulfato redutoras, as quais são implicadas como sintetizadoras primárias. Já em água salgada, como o íon cloreto (Cl⁻) ocorre formação de cloro complexos HgCl₃⁻/ HgCl₄⁻² e, em água doce, complexos com hidroxila (FITZGERALD et al., 2014). O que sugere que a disponibilidade de Hg (II) para metilação deve ser reduzida em ambientes marinhos e estuários, quando comparado aos sistemas de água doce (BISINOTI, 2004).

A taxa de síntese biológica do MeHg é determinada, principalmente pela concentração e forma química do Hg disponível no sistema aquático, ocorrendo especialmente na coluna de água nos oceanos, a pouca profundidade e em locais associados com partículas e sedimentos como lagoas, estuários, pântanos e brejos (FITZGERALD et al., 2014). Normalmente mediada por bactérias em ambientes parcialmente ácidos, com baixos valores de potencial redox e com alta concentração de material orgânico dissolvido (COD), predominando a metilação abiótica.

A metilação abiótica do mercúrio pode ser realizada de várias maneiras: por aumento de temperatura e presença de ácidos húmicos e fúlvicos doadores do grupo metila para o Hg (II), e, portanto, são uma fonte adicional na formação de MeHg. Por reação com a metilcobalamina não enzimática, em extratos livres de célula de bactéria anaeróbia, foi observada transferência não enzimática dos grupos metila da metilcobalamina para o Hg (II) e por reações de transmetilação por meio da radiação ultravioleta, envolvendo derivados metílicos de estanho, chumbo e compostos etílicos ((CH₃)₄ Pb) lançados no mesmo corpo de água. Em geral mecanismos abióticos em sedimentos formam uma quantidade menor de MeHg comparada com a metilação bioquímica sob condições similares (Queiroz, 1995 apud Azevedo, 2004).

3.1.4 Bioacumulação e Biomagnificação

Uma vez metilado, o Hg orgânico é rapidamente incorporado pela biota. Por apresentar um longo tempo de residência em organismos, aumenta sua concentração ao longo do tempo de exposição (bioacumulação) e, conseqüentemente, se incorpora na cadeia trófica. Cerca de 90 % do Hg presente nos organismos de nível trófico elevado encontra-se sob forma de MeHg.

O MeHg é quase totalmente absorvido pelo trato digestivo em todos os níveis tróficos, além, apresenta um tempo de meia-vida longo de 44 a 80 dias, sofrendo o processo de biomagnificação (Bisinoti e Jardim, 2004; Lacerda e Malm, 2008). Por ser lipossolúvel, e por tanto bioacumulável, é a forma mais tóxica do mercúrio, o que lhe confere uma alta biodisponibilidade no ambiente, sendo armazenado e reciclado

por longos períodos antes de ser removidos por processos naturais, tornando-se um risco à saúde dos seres vivos (UNEP, 2013).

Aparentemente, quase o 100% do mercúrio é bioacumulado em peixes predadores na forma de MeHg, a maior parte deste se encontra nos tecidos dos peixes formando ligações covalentes com os grupos sulfidrilos das proteínas, resultando em uma vida média de eliminação longa (cerca de dois anos) (Wiener and Spry, 1996; apud Unep, 2005). Desta maneira, se gera um enriquecimento seletivo de MeHg, quando se passa de um nível trófico inferior a um superior.

Segundo Almeida et al., (2009) com base em dados da literatura sobre a distribuição de Hg em solos, águas, sedimentos, biota e os seres humanos que vivem na Bacia Amazônica, mostrou evidências de que a exposição humana à contaminação por mercúrio não está diretamente relacionada com a emissão de Hg para uma área específica, mas sim com os processos biogeoquímicos complexos ao nível do ecossistema controlando a mobilidade Hg e biodisponibilidade.

3.1.5 Toxicidade do Metilmercúrio

O ciclo biogeoquímico do mercúrio teve grande importância nas últimas décadas após surgirem vários acidentes com diferentes espécies químicas do mercúrio nos distintos ambientes. Estas espécies diferem grandemente nas suas propriedades bio-físico-químicas tais como toxicidade, solubilidade, e taxa de bioacumulação pelos organismos. O principal caminho para a exposição humana é o consumo de peixe contaminado e outros frutos do mar, onde o mercúrio orgânico na sua forma MeHg, é acumulado na biota aquática e biomagnificado na cadeia alimentar (UNEP, 2013). Devido à sua afinidade com aminoácidos, nos mamíferos, o MeHg acumula-se preferencialmente no sistema nervoso central e sua alta toxicidade em humanos, leva à disfunção neural, distúrbios visuais como escotomas (visão turva) e redução do campo visual, ataxia (baixa coordenação para andar), parestesia (insensibilidade na pele), neurestenia (dor nos nervos), perda da audição, disartria (dificuldade na articulação das palavras), deterioração mental, tremor muscular, distúrbio da motilidade e, nos casos de exposição grave, paralisia e morte.

Verificou-se que certas regiões do cérebro são particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos do MeHg, a saber, o córtex cerebral (especialmente o córtex visual) e a camada granulosa do cerebelo, causando mais danos ao desenvolvimento de embriões, os quais são cinco a dez vezes mais sensíveis que os adultos. (Goodman, L 1991; EPA, 1997 apud Bisinotti, 2004).

Quando assimilado, 95% da dose oral é absorvido pelo intestino para a corrente sanguínea, necessitando cerca de 70 dias para que 50% da dose ingerida seja excretada. Desta forma, ocorre uma acumulação de MeHg, no organismo ao longo do tempo, mesmo com frequências relativamente baixas de exposição (MMA., 2012).

O Código Internacional de Doenças (CID) reconhece a ação tóxica do mercúrio. No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº1399/GM, de 18 de novembro de 1999, reconhece que o metal é prejudicial à saúde dos trabalhadores. O limite de tolerância, no Brasil, para exposição ocupacional (exceto as formas orgânicas) foi estabelecido no Anexo 11 da Norma Regulamentadora 15 (NR 15) da Portaria 3214, de 1978 de Ministério do Trabalho e Emprego (MTE): LT = 0,04 mg m⁻³ para jornadas de 48 horas semanais.

Segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA resolução 357 de 2004 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, nível máximo de mercúrio total 2 µg L⁻¹ para rios pertencentes a classe 3 (Decreto Estadual nº 10755/77), porém, ainda não existe uma regulamentação para os compostos organomercuriais devido a dificuldade na sua determinação.

3.2 Técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT).

A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração desenvolvida por Davison e Zhang em 1995 (ZHANG, H.; DAVISON.W.,1995), está fundamentada na 1ª. Lei de Fick, na qual um fluxo F de íons metálicos da solução ou

da amostra se difunde através do gel de agarose ou poliacrilamida em direção ao material ligante, formando um gradiente de concentração. Na Figura 03 se ilustra graficamente a difusão molecular do analito.

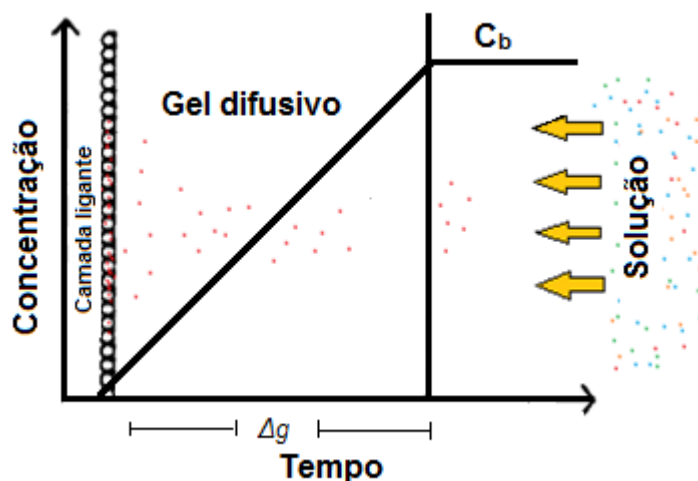


Figura 03. Fundamento teórico. Fonte: Adaptado de ZHANG; DAVISON, 1995

O fluxo de íons metálicos (F) através do gel pode ser determinado de acordo com a equação 1.

$$F = D(C_b - C') / \Delta g \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

D = coeficiente de difusão do íon no interior do gel difusivo

C_b = concentração da solução

C' = concentração do analito livre na interface com o material ligante

Δg = espessura do gel por onde há difusão do íon.

Se considerarmos que o equilíbrio entre os íons da solução/amostra e o material ligante é alcançado rapidamente e, se a ligação entre eles for intensa não ocorrendo saturação da fase ligante, a concentração C' tenderá a zero e a Equação 1 poderá ser escrita da seguinte forma:

$$F = DC_b / \Delta g \quad (\text{Equação 2})$$

O fluxo dos analitos pode ser calculado também por equação de fluxo $F=M(At)^{-1}$, onde M é a massa do analito, A é a área da janela do dispositivo e t o tempo de imersão dos dispositivos, podemos combinar esta fórmula com a (Equação 2, expressando-se assim a massa M do analito em estudo como,

$$M = DC_b tA / \Delta g \quad (\text{Equação 3})$$

A determinação da massa M é possível depois do processo de eluição, seguido do análise para determinar a concentração C_e do íon na solução eluída. Considerando o volumem do ácido usado na eluição V_e , o volumem do disco V_r e o fator de eluição f_e . A massa M do analito retida no dispositivo DGT é obtida conforme expressão 4 (ZHANG; DAVISON, 1995):

$$M = C_e (V_e + V_r) \cdot f_e^{-1} \quad (\text{Equação 4})$$

Determinada a massa M num tempo de imersão determinado (t), podemos calcular a concentração C_b do analito na solução/amostra através da Equação 5.

$$C_b = M \Delta g / DtA \quad (\text{Equação 5})$$

O dispositivo DGT convencional consiste basicamente de duas camadas, um ligante, a resina Chelex-100 imobilizada em um gel de acrilamida-agarose e, sobre esta, uma camada permeável ou difusível, com porosidade controlada, um gel de acrilamida-agarose e, por cima deste, um filtrante de nitrato ou acetato de celulose para proteger o gel de material particulado. As duas camadas são fixadas a um pistão de polipropileno com um anel contendo uma abertura central de 20 mm de diâmetro, onde ocorre à difusão dos analitos da solução para a camada mais interna, o agente ligante. (ZHANG, H.; DAVISON.W.,1995). A Figura 04 ilustra a disposição das camadas que conformam o dispositivo DGT.

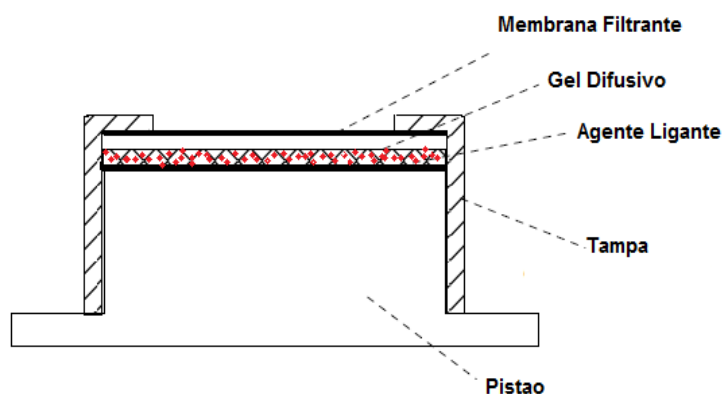


Figura 04. Esquema de um dispositivo DGT. Fonte: Adaptado de ZHANG; DAVISON, 1995

3.2.1 Especificação de mercúrio (II) e metilmercúrio pela DGT

A técnica DGT foi utilizada com sucesso para a determinação de MeHg em águas utilizando a 3-mercaptopropil-sílica gel como agente ligante e gel de poliacrilamida como agente difusivo. A quantificação foi feita por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) depois da derivatização de MeHg com borato de tetraetila e pré-concentração no adsorvente Tenax, seguido por separação cromatográfica. Os resultados demonstraram uma acumulação eficiente (>75%) em pH 3-9 ($[NaCl]$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e um forte efeito de matriz causado pela presença de tiouréia (CLARISSE, O. et al., 2006; CLARISSE, O. et al., 2009). Este agente ligante foi usado também para especificação de Hg em soluções preparadas no laboratório, usando cromatografia iônica (IC) (SHADE C. W.; HUDSON R. J., 2005). Segundo estudos anteriores, o gel de poliacrilamida não tem afinidade por MeHg e, conseqüentemente, pode ser utilizado como uma camada difusiva na técnica DGT (CLARISSE, O. et al., 2006). Por outro lado, segundo Docekalová, e Divis (2005), os íons de mercúrio inorgânico se unem covalentemente aos grupos amida do gel de poliacrilamida, impossibilitando seu uso como gel difusivo na determinação de Hg (II) pela DGT. Deste modo, os autores estabelecem o gel de agarose como gel difusivo para a determinação de Hg (II). No mesmo estudo, realizado no rio Svitava (República Checa), foi empregada a resina Chelex-100 com grupos iminodiacéticos e a resina Spheron-Thiol com grupos tióis como agentes ligantes, mostrando maiores valores de concentração de mercúrio quando foi utilizada a resina Spheron-Thiol

($0,0116 \pm 0,0009 \mu\text{g L}^{-1}$) em comparação a Chelex-100 ($0,0042 \pm 0,0005 \mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados obtidos por duas resinas ficaram muito abaixo dos valores medidos diretamente no rio ($0,088 \pm 0,012 \mu\text{g L}^{-1}$). Essa diferença indica a seletividade dos dispositivos utilizados para íons inorgânicos e espécies lábeis, não sendo capaz de amostrar espécies orgânicas inertes e coloides (DOCEKALOVÁ E DIVIS, 2005). Resultados similares foram obtidos por Cattani e colaboradores (2008) na caracterização das espécies de mercúrio em solos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (HPLC-ICP-MS), utilizando agarose como gel difusivo e testando as resinas Chelex-100 e Spheron-Thiol como possíveis ligantes. Os estudos demonstraram recuperações melhores para a Spheron-Thiol (83-97%) em relação a Chelex-100 (50-58%). A utilização da técnica de HPLC-ICP-MS demonstrou boa separação e sensibilidade para as espécies investigadas (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$).

Estudos posteriores mostraram o emprego da técnica DGT para quantificação simultânea de MeHg e Hg (II) utilizando também agarose como camada difusiva e a resina 3-mercaptopropil-sílica gel como agente ligante (3MFSG, Sigma Aldrich). As espécies de Hg foram extraídas com solução ácida de tiourea para formar complexos estáveis de Hg, posteriormente separados e detectados por cromatografia iônica e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (IC-ICP-MS), respectivamente (HONG, Y. S. et al., 2011).

Recentemente, Gao, Y e colaboradores (2014) testaram o agente ligante 3-mercaptopropil-sílica gel juntamente com dois meios difusivos (gel de agarose, e gel de poliacrilamida) para determinação de MeHg pelo DGT em água, obtendo resultados contrários aos relatados anteriormente por outros autores (CLARISSE et al., 2006 e DOCEKALOVA et al., 2005). Relatou-se que o gel de poliacrilamida tem uma forte afinidade pelo íon MeHg dificultando sua retenção na resina, da mesma maneira estudos anteriores de Gao, Y. et al., (2011) mostraram que o gel de poliacrilamida adsorve mais do 20 % de Hg (II), diferentemente do gel de agarose que apresentou baixa afinidade por ambos íons, em contraste com estudos anteriores por Docekalova e Divis (2005), Fernandez-Gomez et al. (2011) demonstraram a possibilidade de utilização da poliacrilamida como agente difusivo para íons de Hg^{2+} , afirmando que as interações do gel não afetam as interações do

Hg (II) com o gel ligante (3-mercaptopropil-sílica gel), já que não foi observada competição da poliacrilamida com a acumulação de Hg (II) pela resina, uma vez que a massa de Hg (II) medida depois de uma implantação de 32 horas foi de 0,07 ng correspondendo a 540 ng L^{-1} no disco, inferior à concentração presente na solução. Assim, confirmou-se que o gel difusivo de poliacrilamida, além de não ter afinidade por MeHg demonstrado por Clarisse et al., (2006), não tem afinidade específica por Hg inorgânico. Por conseguinte, este gel é considerado adequado para ser usado como uma camada difusiva na técnica DGT para medir ambas as espécies de Hg orgânicos e inorgânicos.

Para avaliar a labilidade de MeHg em presença e ausência de matéria orgânica dissolvida (MOD), foram utilizados os dispositivos DGT com o agente ligante (3-mercaptopropil-sílica gel), gel de agarose (A-DGT, 0,5 mm de espessura) e de poliacrilamida (P-DGT, 0,4 mm de espessura) como géis difusivos. Os resultados mostraram que a poliacrilamida em águas com e sem MOD, foi mais apropriada para a medida de MeHg, já que o complexo MeHg-MOD torna-se mais lábil sendo dissociado com maior facilidade em águas eutrofizadas, ao monitorar concentrações muito baixas (FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2014).

Pelcova et al. (2014) testaram as resinas de troca iônica Ambersep GT74 e Duolite GT73, como agentes ligantes junto ao gel difusivo agarose para a determinação de quatro espécies de mercúrio (Hg^{2+} , MeHg, $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$). A acumulação das espécies de mercúrio era independente na faixa de pH 4-8 para ambos géis. Em condições fortemente ácidas, foi observado maior capacidade de acumulação para a resina Ambersep; em condições fortemente alcalinas, a resina Duolite tinha maior capacidade de retenção. No entanto, agentes com grupos tiol, como Spheron-tiol e Duolite GT73, capazes de amostrar mercúrio total dissolvido, já não se encontram disponíveis comercialmente (PELCOVA P. et al., 2014).

A aplicação *in situ* para a determinação de MeHg por DGT utilizando (3-mercaptopropil-sílica gel) como ligante e a poliacrilamida como gel difusivo, mostrou resultados positivos no monitoramento do MeHg dissolvido em três estudos, ao ser separados por Cromatografia gasosa e quantificados por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (GC-ICP-MS) (CLARISSE, O et al

2009; CLARISSE, O. et al. 2011; CLARISSE, O. et al. 2012) . No primeiro estudo, a técnica DGT foi usada com sucesso para monitorar o MeHg na fase dissolvida do lago 658 boreal estratificado, na Área experimental de lagos (ELA) em Ontário, Canadá. Os resultados mostraram que no epilímnio, o MeHg foi quase totalmente ligado a DOM. Na parte superior do hipolímnio foi identificada uma fracção lábil, e na parte inferior do lago uma fracção significativa de MeHg foi potencialmente associada ao material coloidal (CLARISSE, O et al 2009). Outro estudo foi realizado para medir a fracção lábil de MeHg dissolvida na água intersticial em sedimentos na Baía de São Francisco. Os resultados foram positivos mostrando que a metilação de mercúrio, um processo biogeoquímico, afetou fortemente a quantidade de MeHg acumulado pelo dispositivo DGT no sedimento o que sugere que, as medições feitas por DGT têm o potencial para prever as taxas de metilação nestes sedimentos (CLARISSE, O. et al 2011). Também foram realizados estudos para testar o potencial do DGT na substituição do mexilhão *Macoma balthica* como bioindicador da bioacumulação de MeHg em ambientes marinhos. Usando isótopos enriquecidos MeHg como traçadores, a biodisponibilidade foi determinada pela comparação da taxa de absorção de MeHg por os dispositivos DGT e os organismo sentinelas ao longo do tempo. Os resultados demonstraram bons resultados demonstrando que o DGT é capaz de prever razoavelmente a absorção de MeHg pelo molusco, evidenciando a possibilidade da utilização do dispositivo como substituto para organismos sentinela (CLARISSE, O. et al 2012).

A maior parte dos trabalhos de análise de especiação de mercúrio é feita no laboratório após a amostragem *in situ*, usando outras técnicas analíticas como cromatografia líquida ou gasosa acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (AFS). A cromatografia líquida possui limites de detecção mais altos se comparada com a gasosa, necessitando de métodos de pré-concentração para atingir baixos limites de detecção, por exemplo, extração em ponto nuvem (YU, L, 2005; LI, Y, 2005; LENG. G, 2012; STOICHEV, T, 2004). Ainda, os métodos propostos apresentem bons limites de detecção (na faixa de ng L^{-1}), é importante o emprego da técnica DGT para fazer amostragem *in situ*.

Existem no mercado alternativas a serem utilizadas como, por exemplo, a membrana de troca iônica P81 (Whatman-GE Healthcare) que é uma membrana de

celulose tratada com fosfato, potencialmente útil por ser um bom trocador catiônico (OLIVEIRA, W. et al., 2005; Li W. et al., 2002). Esta membrana, já foi utilizada com sucesso como agente ligante para a técnica DGT para determinação de Cu, Cd, Mn, Co, Ni, Zn e Pb (LARNER, B. L. et al., 2005). A P81 também foi empregada como agente ligante na técnica DGT para análise dos elementos nela retidos, por fluorescência de raios X (EDXRF) após uma simples secagem (ALMEIDA, E. et al., 2012). Esta membrana junto ao gel de agarose 1,5 % (m/v) foram usados com sucesso por Colaço e colaboradores (2014) na determinação de Hg (II) lábil em águas de rio, obtendo resultados positivos na recuperação do analito pela membrana com (97 %) de retenção, em comparação à tradicional resina Chelex 100 com (80 %) de retenção.

A levedura (*S. cerevisiae*) é um material de baixo custo, encontrado facilmente e em grandes quantidades na sua forma desidratada (MENEGÁRIO, A. et al., 2010). Seu uso já foi testado com sucesso anteriormente para a determinação seletiva de espécies de MeHg na presença Hg(II) (MADRID, Y. et al., 1995), assim como para separação e pré-concentração de vários metais (MAQUIEIRA, A. et al., 1994; BAG, H. et al., 2000; BISCARO, P. A. et al., 2007; MENEGÁRIO, A. et al., 2010). Estudos preliminares realizados nos laboratórios do Centro de Estudos Ambientais da UNESP - Rio Claro/SP utilizando *S. cerevisiae* imobilizada em agarose mostraram a potencialidade de sua utilização como agente ligante na técnica DGT para a determinação de Cd(II) e Pb(II) (MENEGÁRIO, A. et al., 2010; PESCIM, G. F. et al., 2012). Considerando a capacidade da *S. cerevisiae* para reter as espécies químicas descritas acima, pode-se considerar que o uso da *S. cerevisiae* imobilizada em agarose pode ser estendido para a determinação de outros metais, particularmente, para especiação do MeHg.

3.3 Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).

O espectrômetro de fluorescência atômica com vapor frio, por apresentar baixa interferência de matriz, baixos custos de operação, além de oferecer recursos analíticos interessantes, tais como limites de detecção baixos (abaixo de $\mu\text{g L}^{-1}$) e

ampla faixa de calibração linear (de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1}), é considerado um dos detectores mais sensíveis para a determinação de mercúrio no ambiente, comparável à detecção com o ICP-MS, (BLOOM N., 1989; SANCHEZ R., 2010).

Para garantir que o mercúrio esteja em seu estado elementar é empregada a técnica analítica de geração química de vapor (ANDRADE, R., 2010), que consiste na transformação por meio de uma reação química da espécie de interesse em um composto volátil sem necessidade de uma chama, para seu posterior transporte para a célula de atomização (TAKASE, I. et al., 2002).

A geração química de vapor pode ocorrer através de duas técnicas: A técnica de geração de hidreto (HG), para determinação de elementos como As, Bi, Pb, Sb, Se, e Te, que usa comumente tetraborohidrato para reação, que é rápida, porém, alguns estudos indicam que traria problemas inevitáveis, por exemplo, reagentes relativamente dispendiosos e instáveis, interferências de elementos de transição, contaminação e grande consumo de reagentes (GAO, Y. et al., 2010). Há também as técnicas de vapor frio (CV), para determinação de Hg e Cd, etilação, para determinação de Pb e Hg, e geração de carbonil, para determinação de Ni (TORRES, D. et al., 2009). Na CV, o íon mercúrico contido numa solução da amostra é reduzido a mercúrio elementar a partir de um agente redutor adequado (borohidreto de sódio ou cloreto de estanho (II)) em meio ácido, assim, é posteriormente carregado por uma corrente de gás (ar, N_2 ou Ar), borbulhada através da solução, para a célula de absorção; ou seja, o vapor formado pela reação já é o próprio vapor atômico, que é introduzido no feixe óptico, onde os átomos de mercúrio podem ser excitados por uma fonte apropriada, por exemplo, uma lâmpada de descarga de mercúrio (SANCHEZ R et al., 2010). Para o Hg e o Cd é formado diretamente o vapor atômico, de maneira que não há necessidade de um atomizador, simplificando a instrumentação (Y. CAI., 2000). O uso do borohidreto como redutor traz interferências na determinação, devido à formação de espuma no separador gás/líquido (O, HAASE, et al., 1998). A Figura 05 apresenta o arranjo óptico esquemático para a medida de mercúrio.

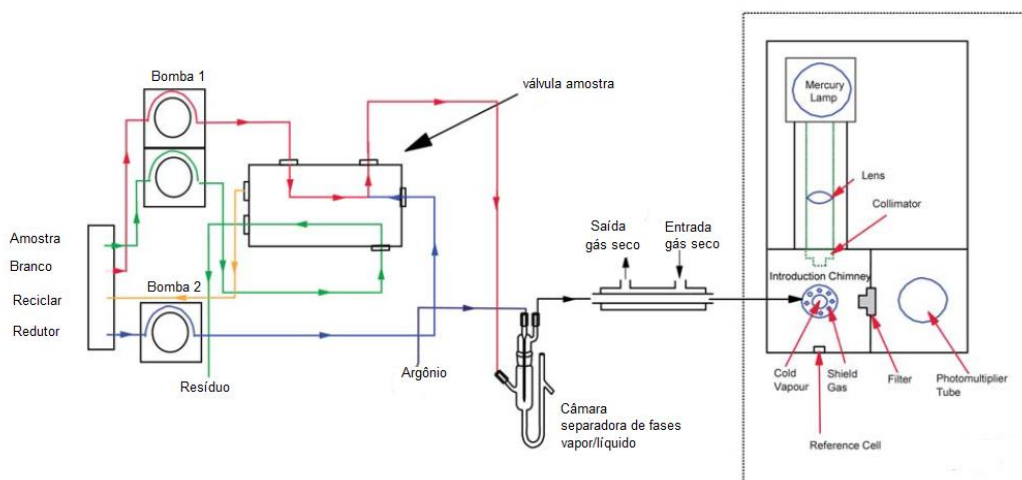


Figura 05. Diagrama esquemático do sistema AFS para análise de mercúrio. (Fonte: Adaptado SANCHEZ R., 2010).

A técnica de fluorescência atômica oferece grandes vantagens em termos de linearidade e níveis de detecção, o que tem melhorado em função da qualidade das lâmpadas empregadas como fontes da excitação (TAKASE, I. et al., 2002). A geração química de vapor, além da separação do analito da matriz, eficiência de introdução da amostra, aumento da seletividade pela redução de interferentes, obtenção de baixos limites de detecção, pode ser acoplada a diferentes técnicas, sendo elas: a espectrometria de absorção atômica (AAS), ICP OES, ICP-MS, (XP YAN.,1994).

Vários estudos de especiação de mercúrio pela AFS envolvem o acoplamento de cromatografia líquida ou gasosa (STOICHEV, T. et al., 2004 e TSENG, C. et al., 2004) sendo mais dispendioso, por precisar de métodos de pré-concentração para atingir baixos limites de detecção (YU, L, et al., 2005; LI, Y. et al., 2005; LENG, G. et al., 2012).

A técnica AFS apresenta também limitações, como espalhamento, supressão da fluorescência e emissão de fundo, que dependem dos níveis de impurezas das amostras (TAKASE, I. et al., 2002). Além disto, grandes volumes de solução, o estado de oxidação do analito, a forma do composto assim como o pH da solução e a concentração dos reagentes podem ser críticos (XP YAN.,1994). A cinética da reação e liberação dos vapores pode ser afetada por fatores físicos da solução,

particularmente o mercúrio que é sensível a reações de troca, que pode causar perdas e contaminação (TORRES, D. et al., 2009).

3.4 Caracterização da área de estudo

3.4.1 Rio Negro-Bacia do Rio Negro, AM.

A Bacia do Rio Negro é constituída por diferentes tipos de rios, sendo classificados como rios de águas brancas, rios de águas claras e rios de águas pretas. A Figura 06 ilustra a localização do Rio Negro na bacia Amazônica.

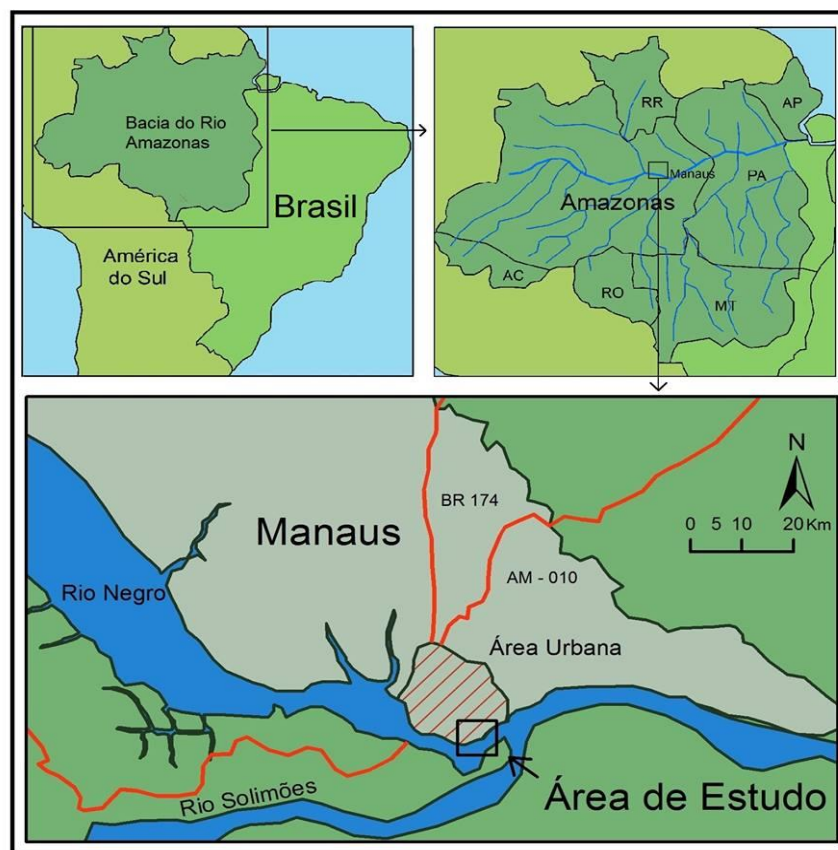


Figura 06. Mapa de localização do Rio Negro na Bacia do Rio Amazonas.

O principal tributário da Bacia é o Rio Negro que apresenta uma extensão de 1.700 km e drena uma área de aproximadamente 700.000 km², nasce na Serra do Junaí, na Colômbia penetrando no Brasil pelo estado do Amazonas, até encontrar o Rio Solimões para formar o Rio Amazonas, pouco abaixo da cidade de Manaus. É um rio de águas escuras, devido às chuvas constantes removem as partículas

minerais mais finas (argilas) juntamente com o material orgânico e formam solos arenosos (podzóis). Esse processo, chamado podzolização do solo, junto à drenagem dos solos ricos em solutos húmicos, provenientes da matéria orgânica em decomposição da floresta, favorecem a formação de águas pretas e o processo de liberação do mercúrio para os corpos hídrico. Além da cor, apresenta características físicas e químicas peculiares, entre elas, baixa condutividade (entre 6 e 12 $\mu\text{S cm}^{-1}$), águas ácidas com pH (entre 4,0 e 5,5), baixos teores de sais minerais, entre eles potássio, sódio, cálcio e magnésio, e alta concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD) entre 600 – 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (LEENHEER e SANTOS, 1980; FADINI e JARDIM, 2001). Os solos amazônicos também têm sido sugeridos como reservatórios importantes de Hg (OLIVEIRA et al., 2001). A bacia do Rio Negro apresenta altos níveis de mercúrio no solo ($170 \mu\text{g kg}^{-1}$) em comparação com o valor para regiões livres de anomalias $45 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$, há indicações que a ocorrência de mercúrio nesta zona possui origem natural e têm sido creditados à mobilização do metal acumulado durante milhares de anos nos solos argilosos, antigos e profundos que predominam na região, através dos complexos orgânicos que são liberados pela lixiviação no solo. A mobilização do Hg se dá em suas diferentes formas, sendo que o processo de metilação do metal, mediado por bactérias, é amplamente favorecido nos diferentes compartimentos ambientais de floresta tropical úmida (GILMAR S. et al., 2009).

Bisinoti (2005) afirmou que a bacia do Rio Negro oferece ambientes ideais para a metilação e bioacumulação de mercúrio. Segundo a autora, as extensas áreas de solos hidromórficos na parte ocidental da bacia amazônica são habitats ricos em material orgânico, frequentemente anaeróbios e os prováveis locais de metilação.

Vários estudos indicam que a principal rota de contaminação do homem por MeHg se dá através da ingestão de peixes contaminados por ser esta espécie extremamente tóxica. No Brasil principalmente na região Amazônica é a área mais estudada por apresentar altos valores de Hg total, e em alguns casos, foram superiores aos permitidos pela legislação (Bisinoti, 2007). Assim torna-se importante a realização de estudos virados à especificação de mercúrio nesta área, dadas suas

diferentes toxicidades no ciclo biogeoquímico e os processos envolvidos de bioacumulação e biomagnificação do MeHg.

4 MATERIAL E MÉTODOS EMPREGADOS

4.1 Material

Foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Espectrômetro de fluorescência atômica- AFS (PS Analytical modelo Millenium Merlin);
- Espectrômetro de emissão óptica com fonte plasma acoplado indutivamente (ICP OES);
- Vidrarias e acessórios de laboratório;
- Equipamentos de uso rotineiro em laboratórios de química analítica, como medidores de pH, termômetro, agitadores e balanças analíticas.
- Sistema de purificação de água Milli-Q resistividade 18,2 MΩ cm-1 (Millipore).
- Agitador magnético (Fisatom, modelo 752- Brasil).
- Agitador orbital (Hoeter Pharmacia Biotech, modelo PR70 - Brasil).
- Balança analítica (Gehaka-Brasil).
- Chapa de aquecimento (Tecnal, Te-018).
- Pipetas automáticas (Gilson-Francia).
- Dispositivos DGT em polipropileno (pistão e anel), DGT (Research Lda - Lancaster, Reino Unido).
- Câmara de difusão construída em acrílico, similar à proposta por Zhang e Davison (1999), construída no CEA.

Foram empregados os seguintes reagentes e produtos químicos.

- Ácido clorídrico HCl (J.T. Baker - México);
- Acido nítrico HNO₃ (J. T. Baker - México);

- Álcool metílico (Quimex - Brasil);
- Bromato de potássio KBrO_3 (Merck – Darmstadt, Germany);
- Brometo de potássio KBr (Merk - Darmstadt, Germany);
- Cloridrato de Hidroxilamina $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (Mallinckrodt – Paris, Kentucky);
- Cloreto de sódio NaCl (Synth - Brasil);
- Cloreto Estanoso SnCl_2 (Caledon – Georgetown, Canadá);
- Cloreto de Metilmercurio CH_3HgCl (Aldrich);
- Hidróxido de sódio NaOH (Merck - Darmstadt, Germany);
- Membrana filtrante acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech Ltda);
- Géis de agarose (Amresco, Agarose RA -Biotechnology Grade) e, agarose poli(acrilamida) (DGT Research Ltd.);
- Agentes e membranas trocadoras de cátions P81(Whatman, GE Lifescience);
- *Saccharomyces cerevisiae* obtida no comércio local (Brasil).

Materiais como vidrarias de laboratório, presilhas e dispositivos DGT em polipropileno (pistão e anel), previamente ao seu uso, passaram por um processo de descontaminação que consistiu em deixá-los imersos em uma solução de HNO_3 20% (v/v) por um período de 4 horas. Após este tempo, os materiais foram lavados com água deionizada e logo com água purificada em sistema Mill-Q (Millipore) que confere alta resistividade, 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. Os ácidos empregados neste trabalho foram destilados abaixo do ponto de ebulição para maior pureza (Distillacid, Berghof).

4.1.1 Soluções

A solução estoque de MeHg 100 mg L^{-1} foi preparada por dissolução de 0,0138g do sal cloreto de MeHg em 100 mL de metanol 100%. Esta solução foi preservada em frasco de vidro com tampas de teflon, mantida ao abrigo da luz para evitar a fotodegradação (PARKER, JL; BLOOM. NS. 2005). Ressalta-se a importância do uso de luvas de nitrila (inertes a esta substância), para o manuseio de todas as soluções com o padrão de MeHg , além de trabalhar dentro da capela laminar, considerando o grau de toxicidade deste composto.

Os padrões de metilmercúrio (na faixa de 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 5,0 - 10,0 mol L⁻¹), utilizados nas curvas analíticas foram preparados conforme procedimento descrito no manual PS Analytical (2002).

Soluções padrão certificadas: Mercúrio - Hg, manganês - Mn, cobre - Cu, Zinco-Zn, Ferro - Fe, Chumbo - Pb, Cadmio - Cd (Specsol, Brasil).

Para o preparo das soluções a serem analisadas no espectrômetro de fluorescência de atômica com geração de vapor frio CV- AFS. Adotou-se o procedimento descrito no manual do instrumento PS-Analytical (2009): HCl 33% (v/v), SnCl 2% (m/v), KBrO₃ 2N, KBr 2N, NH₂OH-HCl 12% (m/v).

4.2 Métodos

4.2.1 Princípios da Técnica DGT

A técnica DGT consiste na imersão, no sistema aquático a ser monitorado, dos dispositivos DGT por um período de tempo (horas a semanas). Estes dispositivos contêm o agente ligante para a acumulação dos metais, um gel difusivo (poliacrilamida ou gel de agarose) que permite a difusão controlada do analito através de um gradiente de concentração e, uma membrana filtrante. Após este tempo, os dispositivos são recolhidos, desmontados e os íons acumulados no agente ligante são recuperados por eluição com um solvente adequado. Os íons eluídos são posteriormente analisados empregando-se uma técnica analítica apropriada para determinar a massa dos elementos de interesse. Esta massa é então utilizada para calcular a concentração das espécies lábeis no sistema, utilizando-se a fórmula 4. As técnicas analíticas usualmente empregadas são as que fornecem altos níveis de sensibilidade da leitura dos eluídos, como a AFS, ICP OES e ICP-MS, que fazem da DGT uma técnica de particular interesse na análise de elementos a níveis de traços e ultra-traços em monitoramento ambiental.

4.2.2 Membrana filtrante

Como membrana filtrante, nos dispositivos DGT, foram utilizados discos de acetato de celulose, 2,5 cm de diâmetro com uma porosidade de 0,45 μm e espessura entre 115-145 μm (Sartorius Stedim Biotech Ltda.). Estes discos foram imersos em solução ácida HNO_3 1 mol L^{-1} por 24 horas para sua descontaminação, após este tempo foram lavados com água deionizada até atingir o pH entre 5,0-7,0. Posteriormente, foram armazenados em solução em NaCl 0,05 mol L^{-1} , em recipiente fechado dentro da geladeira.

4.2.3 Géis difusivos

Agarose

Os géis de agarose (AMRESCO Agarose RA - Biotechnology Grade -) foram preparados com composição de 1,5 % (m/v) mediante dissolução de 0,6 g de agarose em 40 mL de água ultrapura em ebulição. A agarose foi adicionada à água em ebulição em pequenas quantidades para obter uma solução mais uniforme sob agitação constante. Posteriormente, a mistura foi vertida entre duas placas de vidro pré-aquecidas com espaçador de plástico de 0,8 mm e deixada em repouso por uma 1 hora até a gelificação completa. Após este tempo, o gel de agarose foi cortado em discos de 2,5 cm de diâmetro e, armazenados em solução com força iônica 0,05 mol L^{-1} NaNO_3 por 24 horas antes da imersão.

Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida, utilizado neste trabalho, encontra-se disponível comercialmente (15% v/v de acrilamida e 0,3% v/v de reticulante -um produto a base de agarose, patenteado pela DGT Research Ltd.), apresentado em laminas de 13x13 cm e espessura de 0,78 mm cortadas em discos de 2,5 cm de diâmetro e posteriormente imersos em solução de força iônica NaCl 0,05 mol L^{-1} por 24 horas.

4.2.4 Agentes ligantes

Membrana P81

As membranas de troca iônica P81 comercialmente são disponíveis em forma de discos de 2,5 cm de diâmetro, espessura 0,23 mm e capacidade de troca iônica $18 \mu\text{eq cm}^{-2}$. Foram deixadas em imersão em solução de HNO_3 1 mol L^{-1} por 24 horas para sua descontaminação, posteriormente lavadas para atingir pH entre 5,5 e 7,0 e preservadas em água ultrapura.

Preparação do gel ligante de *S. cerevisiae* imobilizada em agarose

Os discos de gel de agarose com a *S. cerevisiae* imobilizada, foram preparados segundo estudos anteriores (MENEGARIO, A. et al., 2010; PESCIM, G. et al., 2012). Estes discos contêm 20 % (m/v) de *S. cerevisiae* e 3,0 % (m/v) de agarose. O procedimento consistiu na dissolução de 0,9 g de agarose em 30 mL de água ultrapura em ebulição. Posteriormente foram adicionados 6 g de *S. Cerevisiae* desidratada a uma temperatura menor de 80°C sob agitação constante. Em seguida, a suspensão foi vertida entre duas placas pré-aquecidas com espaçador de 0,6 mm entre elas e, deixada em repouso por 1 hora. A lâmina formada foi então cortada em discos de 2,5 cm de diâmetro e sua espessura ($0,6 \pm 0,01$ mm) verificou-se com paquímetro Digimess, logo os discos foram preservados em água ultrapura dentro da geladeira. A vida útil dos discos é aproximadamente de duas semanas; para garantir sua preservação foi trocada a água de imersão uma vez por dia, com o objetivo de prevenir a proliferação de fungos. A Figura 07 mostra de modo geral as etapas do preparo dos discos.

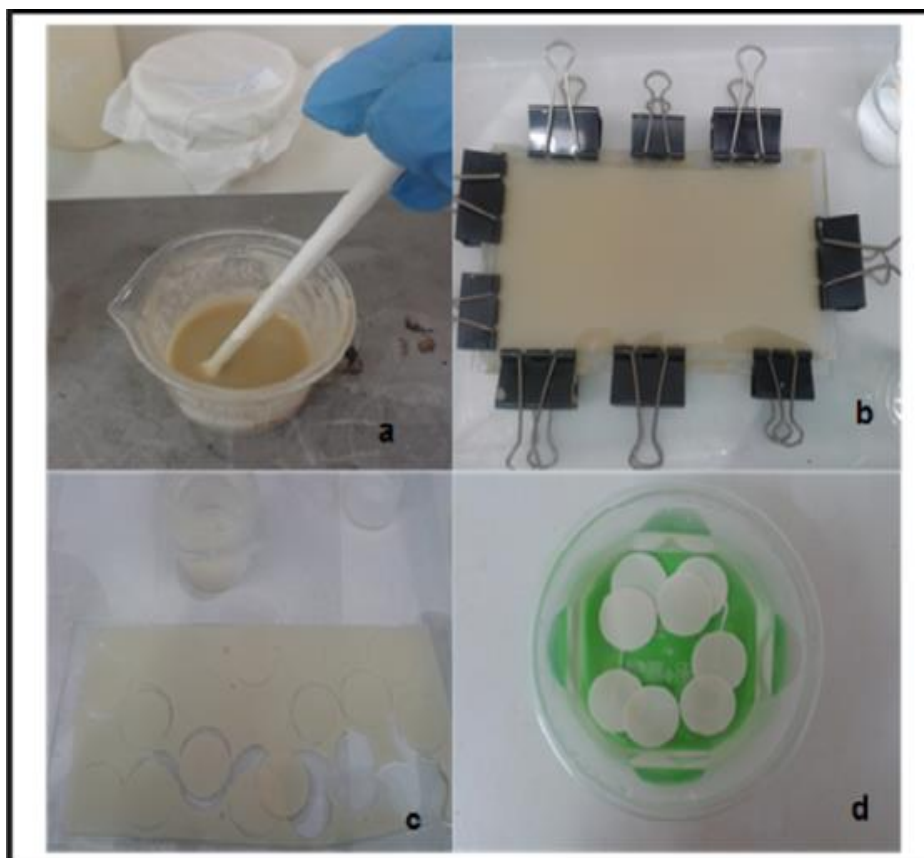


Figura 07. Preparo do agente ligante *S.Cerevisiae* - a) dissolução; b) placa de vidro contendo *S.Cerevisiae* imobilizada em agarose; c) corte dos discos; d) preservação água Milli-Q.

4.2.5 Montagem dos dispositivos DGT

A Figura 08 mostra a sequência de montagem dos dispositivos DGT. Sobre o pistão de polipropileno foram colocados: o agente ligante (discos de agarose com a *S. cerevisiae* imobilizada), o gel difusivo (poliacrilamida) e a membrana filtrante (acetato de celulose), fixados com uma capa de polipropileno contendo uma janela de 20 mm de diâmetro.

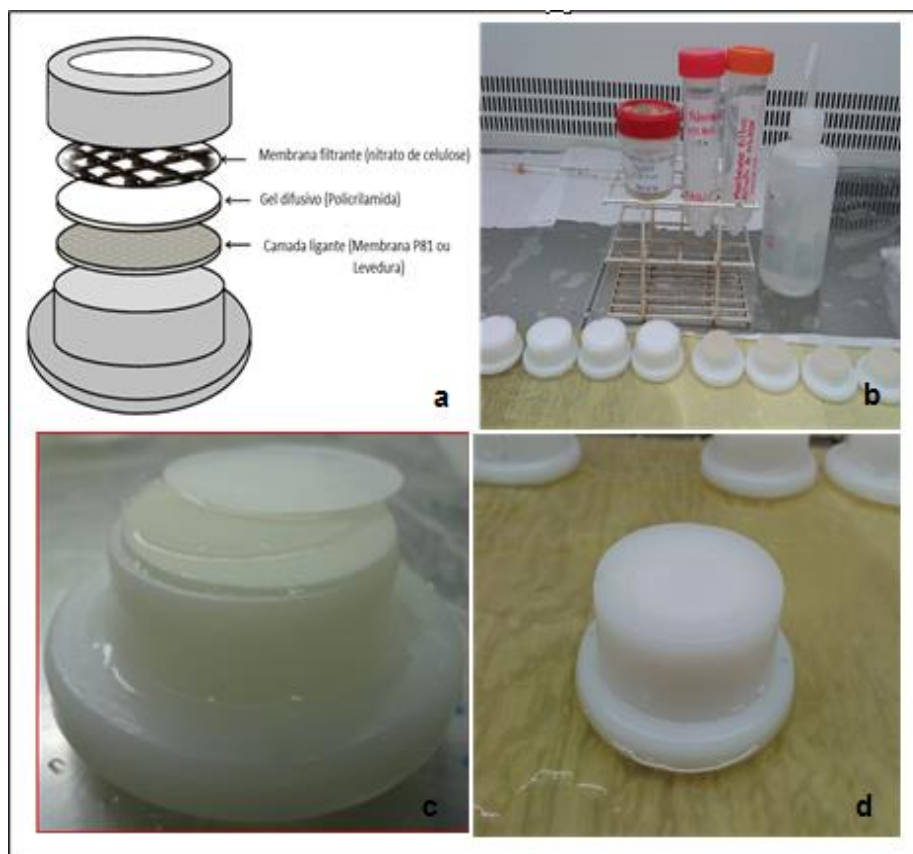


Figura 08. a); c) disposição dos discos utilizados na montagem do DGT, *S.Cerevisiae*, Poliacrilamida, membrana filtrante.; b) materiais empregados; d) DGT montado.

4.2.6 Retenção de MeHg pela *S.Cerevisiae*.

Para determinar massa retida do analito nos agentes ligantes testados, foram preparados 200 mL de solução de MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em água ultrapura com força iônica $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi distribuída em quatro tubos tipo falcon de 50 mL, sendo que de cada tubo retirou-se uma alíquota inicial (C_i) e uma alíquota final (C_f), com o objetivo de verificar a perda do analito na solução. Em sequência, os tubos contendo o agente ligante foram mantidos sob agitação constante por 2 horas. Após este tempo, os discos ligantes foram retirados e submetidos ao processo de eluição do analito.

4.2.7 Processo de eluição

Uma vez retirados os discos ligantes, foram dispostos em tubos de polipropileno de 15 mL, contendo 5 mL de HCl 1 mol L⁻¹ e deixados sob agitação constante por 24 horas, ocorrendo assim a eluição dos íons retidos. Após este tempo, os discos de *S. cerevisiae* foram retirados da solução e os eluatos centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Finalmente e posterior pre-tratamento acima descrito para determinação por CV-AFS, foi retirado 1 mL de cada tubo e transferido a tubos tipo falcon de 50 mL. Este procedimento foi também empregado para a recuperação dos íons retidos na membrana P81.

Uma vez obtidas às concentrações dos eluídos e conhecendo-se os volumes de eluente utilizados, pode-se calcular a massa eluída segundo a equação 6.

$$Me = (Ce). V \quad \text{(Equação 6)}$$

Me = Massa dos eluídos.

Ce = Concentração do eluído.

V = Volume da solução de eluição.

Por outro lado, a massa de analito retida em cada um dos agentes testados pode ser calculada mediante o uso da equação 7.

$$Mr = (Ci - Cf). V \quad \text{(Equação 7)}$$

Mr = Massa retida

Ci = Concentração inicial da solução de imersão

Cf = Concentração final da solução de imersão

V = Volume da solução de imersão

Segundo Zhang e Davison (1995), com os valores das massas retida (equação 7) e massa eluída (equação 6) é possível calcular o fator de eluição (*fe*), mediante a equação 8:

$$fe = Me Mr^{-1} \quad \text{(Equação 8)}$$

4.2.8 Coeficiente de difusão

Uma vez estudadas as capacidade de retenção de MeHg, dos ligantes P81 e *S. cerevisiae*, prosseguiu-se ao teste para determinar o coeficiente de difusão do analito. Para tal, foram preparados quatro litros de solução de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg, força iônica $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl e pH 5,5 ajustado com HCl 2 % (v/v) e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi deixada dentro de uma incubadora a $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h sob agitação constante, para garantir a estabilização do analito, uma vez que se observo uma perda constante nos testes contendo a solução de Hg (II), optou-se por estudar a perda o MeHg, observou-se perdas insignificativas com relação ao Hg (II).

Posteriormente, foram imersos na solução oito dispositivos DGT montados segundo item 4.2.5. e, dois dispositivos retirados após 4, 12, 24 e 48 horas respectivamente. Em sequência, os dispositivos foram desmontados e os discos de agente ligante submetidos ao processo de eluição descrito anteriormente. Do mesmo jeito, foram retiradas alíquotas da solução antes da imersão e para cada tempo de retirada dos dispositivos. Na Figura 09 apresentam-se de modo geral as etapas do processo de imersão.



Figura 09. a) solução em estabilização; b) Dispositivos DGTs a serem utilizados para imersão; c) imersão dos DGTs.

4.2.9 Efeito da força iônica na retenção de MeHg

Com o objeto de analisar o efeito da força iônica na retenção da *S. cerevisiae* quatro soluções de 1,5 L de MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas, cada recipiente com força iônica 0,0005 - 0,005 - 0,05 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl e, pH 5,0 - 6,0 ajustado com soluções de HCl 2% (v/v) e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após a estabilização das soluções, foram imersos três dispositivos DGT em cada solução. Decorridas 6 horas, os dispositivos foram retirados, desmontados e os agentes ligantes submetidos ao processo de eluição, descrito no item 4.2.7.

4.2.10 Efeito do pH na retenção de MeHg

Para analisar o efeito do pH na retenção da *S. cerevisiae*, foram preparadas quatro soluções de 1,5 L de MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$, pH 3,5 - 5,0 - 6,5 e 8,5, respectivamente, ajustados com soluções de HCl 2 % (v/v) e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, força iônica $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl 2 mol L^{-1} . Após a estabilização das soluções, foram imersos três dispositivos DGT em cada solução. Após 6 horas, os DGTs foram retirados, desmontados e os agentes ligantes submetidos ao processo de eluição.

4.2.11 Interferência de metais na determinação de MeHg

Foram avaliadas separadamente as potenciais interferências na retenção de MeHg conduzindo imersões do dispositivo desenvolvido (ligante *S.cerevisiae*, difusivo-poliacrilamida, e filtro-acetato de celulose) durante seis horas, em diferentes soluções preparadas no laboratório, contendo os seguintes metais: Manganês (Mn), Cobre (Cu), Zinco (Zn) e Ferro (Fe), Chumbo (Pb), e Cadmio (Cd).

Foram preparadas seis soluções de 1L contendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg, com força iônica de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 e pH entre (4 - 5,5) e relação de concentração de 1:100 para (Mn, Cu, Zn, Fe) e de 1:10 para (Pb, Cd). Após o tempo de imersão os

ligantes continuaram o processo de eluição para posterior determinação no ICP OES. A determinação de MeHg foi feita por CV-AFS.

4.2.12 Seletividade do ligante *S. cerevisiae* para MeHg e Hg (II)

Foi realizado um teste para avaliar a seletividade do ligante *S. cerevisiae* pelo Hg (II) e MeHg, em presença de agarose e poliacrilamida como géis difusivos, com o objetivo de observar a retenção do ligante por cada analito.

Foram preparadas três soluções de 3 L cada: Hg (II) ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (II)), MeHg ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg) e Mistura ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (II) + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg). As soluções foram mantidas em incubadora a $23 \text{ }^\circ\text{C}$. O pH (5,5) e a força iônica ($0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_3$). As soluções ficaram estabilizando dentro da incubadora por 24 h, após este período, foram imersos três dispositivos DGT montados com *S. cerevisiae* + poliacrilamida (S + P) e três com P81 + agarose (P81 + A) em cada uma das soluções. Para as duas montagens foram usados os discos de acetato de celulose como membrana filtrante. Os dispositivos ficaram imersos por um período de 6 horas. Após este período os dispositivos foram retirados, desmontados e os ligantes seguiram para o procedimento de eluição, descrito no item 4.2.7.

4.2.13 Análise de especiação de MeHg e Hg (II)

Para a análise de especiação de mercúrio inorgânico e MeHg pela DGT foram preparadas três soluções sintéticas de 3L com força iônica $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_3$, pH (4 - 5,5) e temperatura controlada $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução 1 com concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (II), a solução 2 com $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg, e a solução 3 contendo $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uma delas. As três soluções ficaram 24h dentro da incubadora para a estabilização do analito. Em cada recipiente de plástico foram imersos 6 dispositivos DGT, 3 com a membrana de troca catiônica P81, gel difusivo de agarose e membrana filtro de acetato de celulose, os 3 restantes com os discos de *S. cerevisiae*, agente difusivo poliacrilamida e membrana filtro de acetato de celulose. Após 6h de imersão, foram retirados os dispositivos, lavados com água milli-Q e

descartados o gel e membrana filtro; os agentes ligantes foram submetidos ao processo de eluição e posteriormente estas soluções foram centrifugadas, para posterior tratamento e leitura por CV-AFS. Para determinar a concentração da solução de imersão, retiraram-se alíquotas antes e depois da imersão dos dispositivos. A Figura 10 ilustra as soluções sintéticas de imersão dentro da incubadora para controle da temperatura.



Figura 10. Soluções sintéticas de Hg (II) e MeHg para a análise de especiação.

4.3 Procedimento de imersão *in situ* Rio Negro, sub-bacia do Rio Negro, AM.

4.3.1 Locais de Coleta

Foram selecionados três pontos de coleta no percurso do Rio Negro, nas imediações da refinaria de petróleo de Manaus (Figura 11), durante o mês de Agosto de 2014. O ponto 1 (Figura 12a) localiza-se à montante na latitude $3^{\circ} 9'22.55''S$ e longitude $59^{\circ}58'5.04''O$, o ponto 2 (Figura 12b) localiza-se perto do efluente da Refinaria de Petróleo na latitude $3^{\circ}8'58.61''S$ e longitude $59^{\circ}57'26.80''O$ e o ponto 3 (Figura 12c) a jusante $3^{\circ} 8'38.66''S$ e longitude $59^{\circ}56'49.66''O$.



Figura 11. Pontos de coleta- a) Ponto 1-montante; b) Ponto 2-efluente; c) Ponto 3-jusante.



Figura 12. Ilustra os pontos de amostragem no Rio Negro. (Fonte: Google Earth, data da imagem 6/23/2014).

4.3.2 Imersão

Para a análise de especiação *In situ* e determinação da fração lábil das espécies de Hg (II) e MeHg, foram imersos a um metro de profundidade e por um

período de 24h seis dispositivos DGT em cada ponto (Figura 13). Três contendo a membrana P81, gel de agarose 1,5 % e filtro, os três restantes com os discos de *S. cerevisiae*, agente difusivo poliacrilamida e membrana filtro de acetato de celulose. A condutividade elétrica, o pH e a temperatura foram medidos no momento da imersão e retirada dos dispositivos.

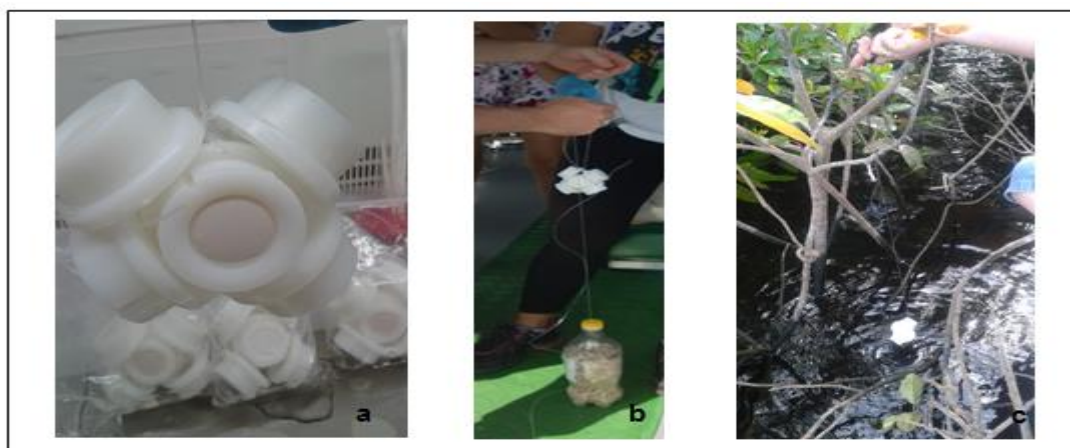


Figura 13. a) Montagem dos dispositivos DGT; b) Dispositivos DGT mais pesos; c) Imersão no Rio Negro-AM.

Em cada ponto foram coletados 50 mL de água para determinação de teor total e 50 mL para determinação do teor de sólidos dissolvidos de mercúrio. Para coletar as amostras de teor dissolvido usou-se seringa e filtros de acetato de celulose (Millipore, porosidade 0,45 μ m), previamente descontaminados. Cada amostra foi preservada em HCl 2 %. Na Figura 14 se ilustra o procedimento adotado para a coleta das amostras do teor dissolvido (Figura 14a), e teor total (Figura 14b). Também em cada ponto de amostragem, foi coletada água do rio usando garrafas de água mineral de politereftalato de etileno (PET) de 2 L, previamente esvaziadas e lavadas com água ultrapura no laboratório. No lugar da coleta, foram lavadas com água do rio, (Figura 15).

As amostras coletadas em campo, para a determinação de teor total e dissolvido de mercúrio, foram preservadas em HCl 2 mol L⁻¹ a uma temperatura de 4 ° C dentro da geladeira e os eluatos dos DGT levados para campo foram tratados segundo item 4.2.6 (Eluição). Todas as amostras foram pré-tratadas para posterior determinação por CV-AFS.



Figura 14. Procedimento adotado para coleta de amostras - a) Teor dissolvido; b) Teor total.



Figura 15. Procedimento de coleta

4.4 Preparo das soluções e amostras para determinação por CV- AFS

Todas as alíquotas, eluídos e padrões de curva analítica, foram tratados conforme o procedimento descrito no manual da PS Analytical (2002), para posterior determinação no CV- AFS. O procedimento consistiu, basicamente, em transferir 1 mL da amostra com o conteúdo de MeHg ou Hg (II), em tubos de polietileno de 50 mL, adicionar 7,5 ml de HCl 33% (v/v), 1 mL de 0,1 mol L⁻¹ da mistura das soluções KBrO₃/ KBr, e depois de 30 minutos adicionar 30µL de Cloridrato de Hidroxilamina NH₂OH-HCl, para remover o excesso da KBrO₃/KBr, e diluiu-se a solução para 50

mL com água milli-Q. O objetivo deste procedimento é usar a mistura $\text{KBrO}_3 / \text{KBr}$ como pré-tratamento para transformar o MeHg em Hg (II) e na presença do redutor SnCl_2 2% (m/v) a Hg^0 , a forma do Mercúrio determinada pela CV-AFS. As amostras coletadas em campo passaram pelo mesmo procedimento, a diferença que a diluição foi feita com a mesma amostra.

4.5 Determinação de mercúrio e metilmercúrio empregando espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS).

4.5.1 Condições de operação do CV-AFS

As concentrações de Hg (II) foram determinadas quantitativamente usando a CV-AFS. Como gás de arraste foi utilizado argônio. Todos os resultados obtidos foram baseados na altura de pico. Como redutor foi empregado SnCl_2 2 % (m/v) e como carregador a solução branco contendo os reagentes descritos na Tabela 04. Na tabela 04 também são mostradas as condições operacionais do espectrômetro de fluorescência atômica.

Tabela 04. Parâmetros instrumentais para determinação de Hg.

Parâmetro	Valor
	Vazão do agente redutor 3,5
SnCl_2 2% (m/v) em HCl 33% (v/v)	mL min^{-1}
Branco: HCl 33%; KBrO_3/KBr 0,1 N ;	
$\text{NH}_2\text{OH-HCl}$ 12% (m/v)	Vazão do branco 7,0 mL min^{-1}
Gás de arraste-Argônio	Vazão 250 mL min^{-1}
Ganho	10
Delay time	15 s
Analysis time	30 s
Memory time	20 s

Fonte: Manual do espectrômetro de fluorescência atômica Millennium Merlin (2009).

5 RESULTADOS E DICUSSÃO

A utilização da fluorescência atômica com geração de vapor frio, para detecção de Hg (II), permite a análise de baixas concentrações de Hg (II) (da ordem de ng L^{-1} a ng mL^{-1}) com segurança, boa sensibilidade e baixo limite de detecção. Mediante a curva analítica no CV- AFS se obteve uma boa correlação concentrações/sinal do equipamento ($R^2= 0,999$), com uma alta sensibilidade ($9,85 \text{ uF/ng}$). Desta maneira, se obtiveram limites de detecção de $0,0044 \text{ ng mL}^{-1}$, demonstrando alta sensibilidade da técnica.

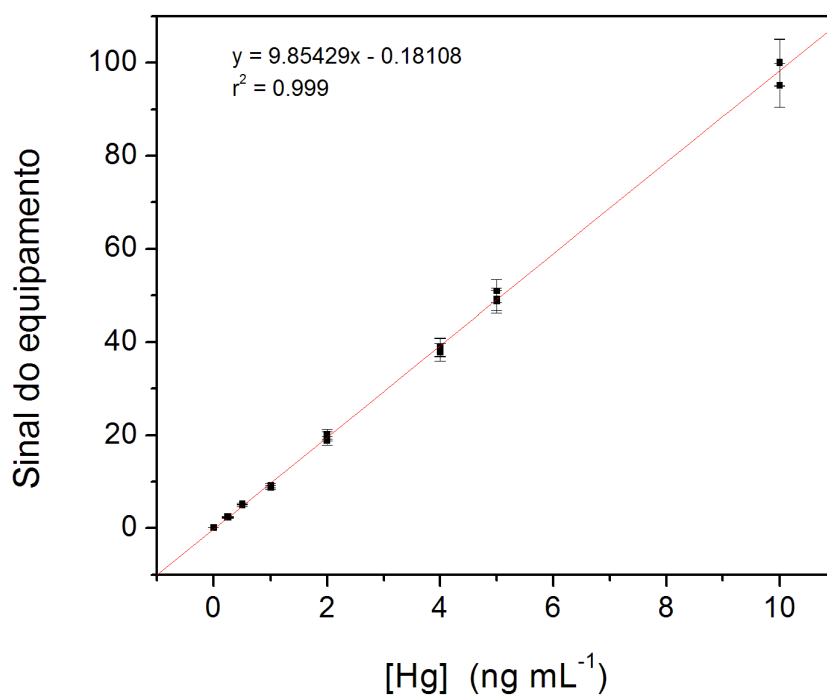


Figura 16. Curva de calibração na CV-AFS.

5.1 Retenção MeHg – testes preliminares

A membrana de fosfato de celulose P 81, por ser uma membrana de troca catiônica, foi utilizada com sucesso em trabalhos anteriores para determinação de Hg^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} dentre outros cátions (COLAÇO et al., (2012); LI et al., (2002)), mostrando maior afinidade por metais de transição do que metais alcalinos terrosos

(Li et al., (2002)). Diante do exposto e, considerado que o MeHg é um cátion em solução, foi realizado um teste para avaliar a retenção de MeHg pela membrana P81. Os resultados obtidos neste experimento, expostos na Tabela 05, indicaram uma baixa retenção (média de 6,75%) e baixo fator de eluição (média de 0,21) do analito, indicando que a membrana P81 não possui as características apropriadas para a retenção do MeHg.

Tabela 05. Resultados do teste de extração em fase sólida com o emprego da membrana P81 na retenção do MeHg.

Amostra	C _i (ng/mL)	C _f (ng/mL)	M _r (ng)	% retido	C _e (ng/mL)	M _e (ng)	F _e
1	69,91	67,01	145	4,15	2,48	49,7	0,34
2	70,98	68,78	110	3,12	1,88	37,7	0,34
3	82,86	78,04	241	5,82	1,12	22,4	0,09
4	84,85	73,02	592	13,9	1,46	29,2	0,05
Média			271,88	6,75			0,21
SD			220,16	4,92			0,16

C_i=Concentração inicial; C_f=Concentração final; C_e=Concentração do eluído; M_r=Massa retida; M_e=Massa do eluído; F_e=Fator de eluição

Na Tabela 06 se apresentam os resultados obtidos no experimento de extração em fase sólida (SPE) para avaliar a retenção do MeHg nos discos de *S.cerevisiae* imobilizada em agarose. Estes resultados mostraram que efetivamente houve retenção quantitativa de MeHg, com média de (91 ± 3,2) % de retenção. O procedimento de eluição adotado também se mostrou efetivo para a remoção do analito dos discos de levedura (fator de eluição de 0,972). Estes resultados corroboram o estudo de Madrid et al.(1995), que demonstrou a afinidade da *S. cerevisiae* pelo MeHg. Geralmente, o mecanismo de ligação da levedura pode ser explicado por sua constituição biomolecular, que tem numerosos grupos funcionais (por exemplo, sulfato de hidroxilo, grupos carbóxilo e amino) que podem ligar metais. Assim, os grupos funcionais que compõem a levedura podem remover e selecionar espécies de metais pesados presentes em solução (MADRID et al.,1995). Particularmente, Naganuma et al., (2000) sugeriram que o MeHg é ligado pela cisteína (Cys-2), aminoácido terminal que possui o grupo sulfidril e encontra-se na

estrutura terciária de L-glutamina: D-frutose-6- fosfato amidotransferase (GFAT) presente na *S. cerevisiae*, inibindo sua atividade enzimática, com o qual se explicaria a afinidade da levedura pelo MeHg e não pelo Hg(II).

Tabela 06. Resultados do teste de extração em fase sólida com o emprego dos discos de *S. cerevisiae* imobilizada em agarose na retenção do MeHg

Amostra	C _i (ng/mL)	C _f (ng/mL)	M _r (ng)	% retido	C _e (ng/mL)	M _e (ng)	F _e
1	73,98	9,004	3248,8	87,83	153,7	3842,5	1,183
2	87,84	7,265	4028,8	91,73	150,9	3772,5	0,936
3	96,09	5,578	4525,6	94,20	144,5	3612,5	0,798
Média			3934,4	91,25			0,927
SD			643,61	3,210			0,195

C_i=Concentração inicial; C_f=Concentração final; C_e=Concentração do eluído; M_r=Massa retida; M_e=Massa do eluído; F_e=Fator de eluição

5.2 Curvas de imersão e Coeficiente de difusão

Nas Figuras 17 e 18 apresentam-se os resultados obtidos no experimento para avaliar a retenção do MeHg em função do tempo de imersão, utilizando dispositivos DGT contendo a *S. cerevisiae* imobilizada em agarose e poliacrilamida como meio difusivo, considerando-se curtos (até 6 horas – Figura 18) e longos períodos de imersão (até 48 horas – Figura 17).

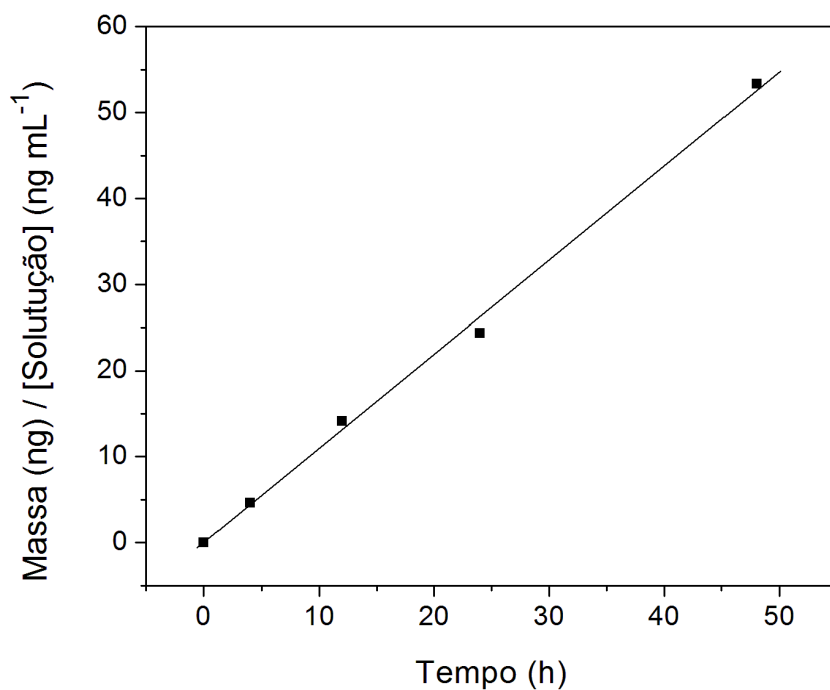


Figura 17. Massa acumulada em relação à concentração da solução de imersão versus o tempo. Soluções contendo 100 mg L^{-1} MeHg em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl (pH 5-6). Temperatura 23° C . Imersões até 48 horas.

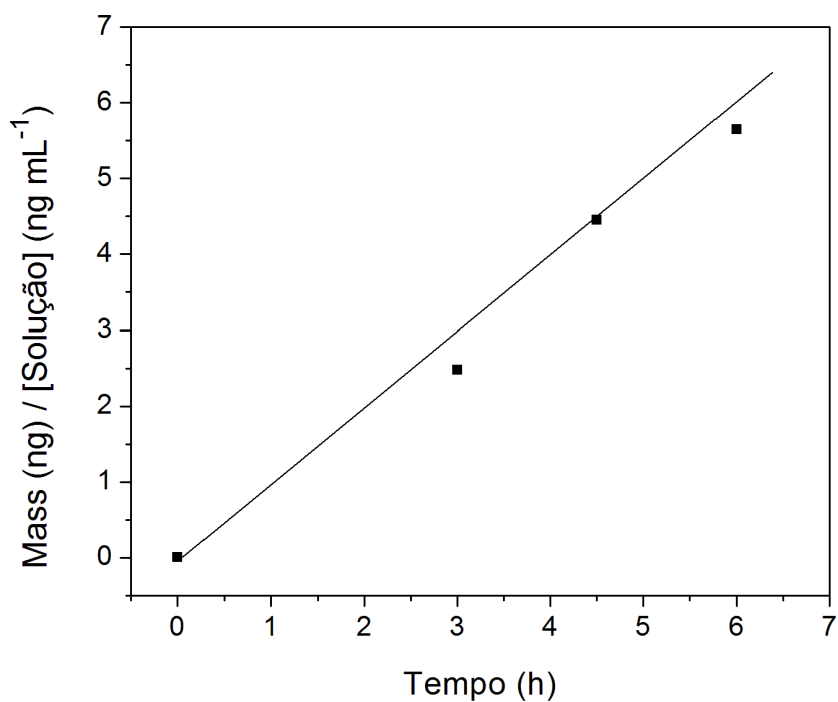


Figura 18. Massa acumulada de MeHg em relação a concentração da solução de imersão versus o tempo. Soluções contendo $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ MeHg em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl (pH 5-6). Temperatura 23° C . Imersões até 6 horas.

Como pode se observar nas figuras 17 e 18, foram retidas pelo ligante avaliado, quantidades significativas de MeHg tanto em períodos de 48 como de 6 horas de imersão. Na técnica DGT os dados são expressos normalmente como massa acumulada em função do tempo de imersão. No entanto, uma vez que se observou uma pequena variação na concentração do analito na solução de imersão ao longo dos experimentos, os dados das ordenadas (Y) foram normalizados dividindo a quantidade de massa retida pela concentração da solução no momento de retirar cada dispositivo DGT, como relatado anteriormente (GAO Y et al., 2014). A relação linear entre a razão (massas/concentração da solução) versus o tempo de imersão foi bastante satisfatória ($R^2 = 0,9954$ para 48h e $R^2 = 0,9917$ para 6h).

Foram obtidos coeficientes de difusão de $(8,08 \pm 0,32) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para períodos de 48h e $(7,91 \pm 0,5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para 6h ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$). Estes valores encontram-se em concordância com valores relatados anteriores (CLARISSE, O. et al., 2006; PELCOVA P. et al., 2014). Assim, sugere-se que o MeHg foi quantitativamente retido pelos discos *S. cerevisiae* imobilizados em agarose e que, o material proposto pode ser utilizado como um excelente agente ligante para amostragem deste analito pela técnica DGT. Por outro lado, os valores de coeficiente de difusão obtidos foram superiores em relação a outros estudos com MeHg e DGT realizados anteriormente (CLARISSE, O. et al., 2006; HONG, Y. 2011; PELCOVA P. et al., 2014). Os experimentos subsequentes mostraram uma variação no cálculo do coeficiente de difusão, por tanto, foi estabelecido um valor médio, levando em conta a variação dos mesmos nos experimentos das curvas de imersão, efeitos do pH e força iônica e estudos de especiação. O valor médio do coeficiente de difusão obtido foi de $7,03 \pm 0,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$. A Tabela 07 exhibe os valores do coeficiente de difusão obtidos em cada experimento, com tempos curtos de imersão (6 horas).

As determinações usando CV-AFS foram caracterizadas por um limite de detecção instrumental de $4,4 \text{ ng L}^{-1}$ definido como três vezes a estimativa do desvio padrão do branco ($LD = 3 \times SD_{branco}$). O fator de pré-concentração foi obtido pela relação entre a concentração do metal eluído e a concentração do metal na solução ($F_{pc} = C_e - C_b^{-1}$), considerando um $F_{pc} = 11$ em imersões de 48 horas, pode-se estimar um limite de detecção para a associação da DGT com CV-AFS de $0,4 \text{ ng L}^{-1}$. Estes

valores evidenciam a possibilidade de aplicação da técnica para a determinação e quantificação do analito em concentrações muito baixas.

Tabela 07. Coeficientes de Difusão (D) determinados nos diferentes experimentos realizados no laboratório.

Experimento	D 23°C (cm ² s ⁻¹)
1	8,08 x 10 ⁻⁶
2	7,91 x 10 ⁻⁶
3	6,24 x 10 ⁻⁶
4	6,62 x 10 ⁻⁶
5	6,64 x 10 ⁻⁶
6	6,69 x 10 ⁻⁶
Média	7,03 x 10 ⁻⁶
SD	0,77 x 10 ⁻⁶

5.3 Efeito da força iônica na retenção de MeHg

A Figura 19 apresenta a relação da concentração determinada através da imersão do dispositivo DGT desenvolvido e a concentração real da solução de imersão. A faixa de força iônica testada (0,0005 a 0,1 mol L⁻¹ com NaCl) revelou baixa interferência na retenção do MeHg, com recuperações de 84 a 105%. Embora esta interferência tenha sido insignificante (< 6%), a retenção de MeHg tende a diminuir à medida que aumenta a concentração de NaCl. Este comportamento foi similar ao reportado anteriormente por Hong Y. et al., (2011) utilizando a resina 3-mercaptopropil-sílica gel como agente ligante e o gel de agarose como camada difusiva. Estes autores sugerem que esta diminuição na recuperação de MeHg (em presença de NaCl) é consequência da complexação de Hg com Cloreto. Outros estudos (GAO Y. et al., 2011; CLARISSE O et al., 2006), utilizando também a resina 3-mercaptopropil-sílica gel e os geis de agarose e poliacrilamida como difusivos,

reportaram recuperações de MeHg (> 80%) na faixa de força iônica de 100 nmol L^{-1} a 1 mol L^{-1} com NaNO_3 .

Ressalta-se que o intervalo de força iônica testado abrange os valores encontrados na maioria dos sistemas fluviais

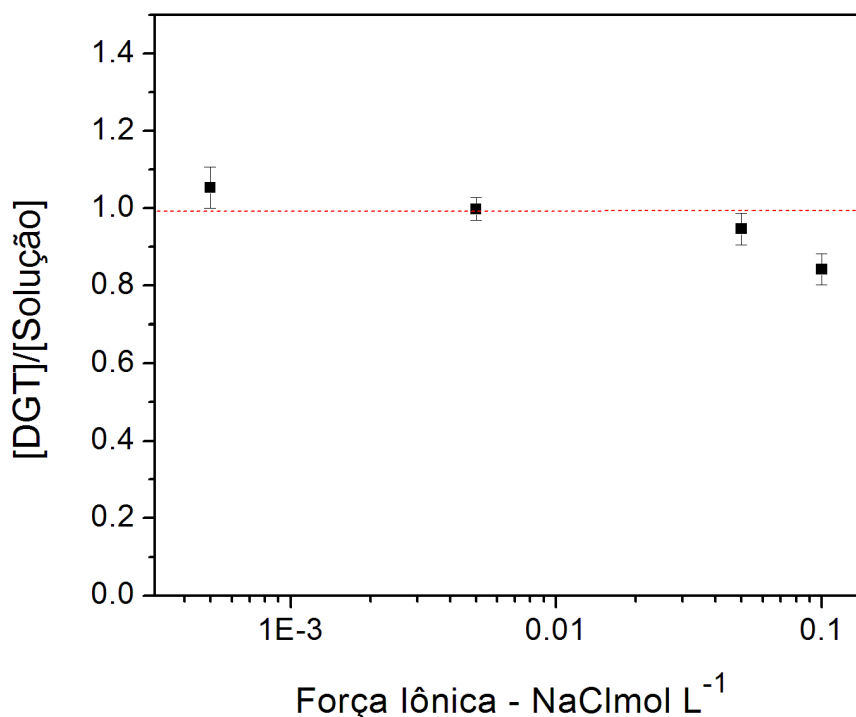


Figura 19. Efeito das diferentes forças iônicas testadas na capacidade retenção de MeHg pela *S. cerevisiae* (MeHg = $100 \mu\text{g L}^{-1}$. pH = 5,0)

5.4 Efeito do pH na retenção na retenção de MeHg

A Figura 20 apresenta a relação da concentração determinada através da imersão de dispositivos contendo o material desenvolvido e a concentração real da solução de imersão. Recuperações de 84 a 98% na faixa de pH testados (3,5 – 8,5) sugerem baixa interferência na retenção de MeHg pelo ligante proposto. Clarisse O. et., al (2006) relataram recuperações maiores a 75% para o intervalo de pH de 3 a 9, quando utilizado como agente ligante 3-mercpto-propil-sílica gel. Da mesma maneira, Gao et al. 2011, relataram recuperações entre 70 a 80% dentro de um

intervalo de pH de 3 a 8, utilizando o mesmo ligante. Ressalta-se que este intervalo de pH testado inclui os valores encontrados na maioria dos sistemas aquáticos fluviais comumente encontrados na bacia Amazônica.

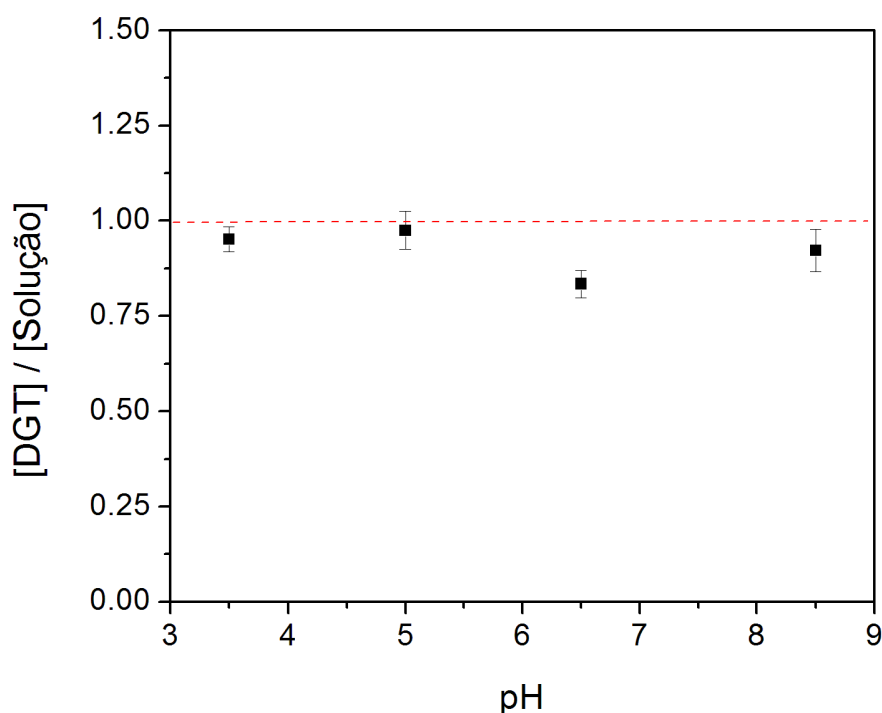


Figura 20. Efeito dos diferentes pH testados na capacidade de retenção de MeHg pela *S. cerevisiae*. (MeHg = 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; força iônica = 0,05 mol L^{-1} NaCl).

5.5 Efeito da interferência de metais

Os resultados obtidos no teste para avaliação das interferências de Manganês, Cobre, Zinco, Ferro, Chumbo, e Cadmio, na retenção de MeHg pelo ligante *S. cerevisiae* são apresentados na Figura 21. Quando comparadas as concentrações de MeHg determinadas pela DGT com a concentração da solução de imersão, as recuperações obtidas (70 – 87)% de MeHg sugerem que, mesmo em concentração 100 vezes maior, os íons Mn, Cu, Zn e Fe não apresentaram interferências significativas na retenção do analito pelo dispositivo desenvolvido. Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Pelcová e colaboradores (2014), que estudaram o efeito de Ag, Cu, Pb, Cd, Ni, Co e Fe na absorção de espécies de Hg lábil utilizando as resinas Duolite e Ambersep como ligantes. Contudo, observou-se

uma diminuição na porcentagem de recuperação de MeHg na presença de Pb ($62 \pm 5 \%$) e Cd ($54 \pm 6 \%$). É provável que estes elementos, estejam competindo fortemente pelos sítios de ligação na levedura, uma vez que o ligante já foi utilizado com sucesso para a determinação destes elementos (PESCIM, G. F. et al., 2012; MENEGÁRIO, A. et al., 2010).

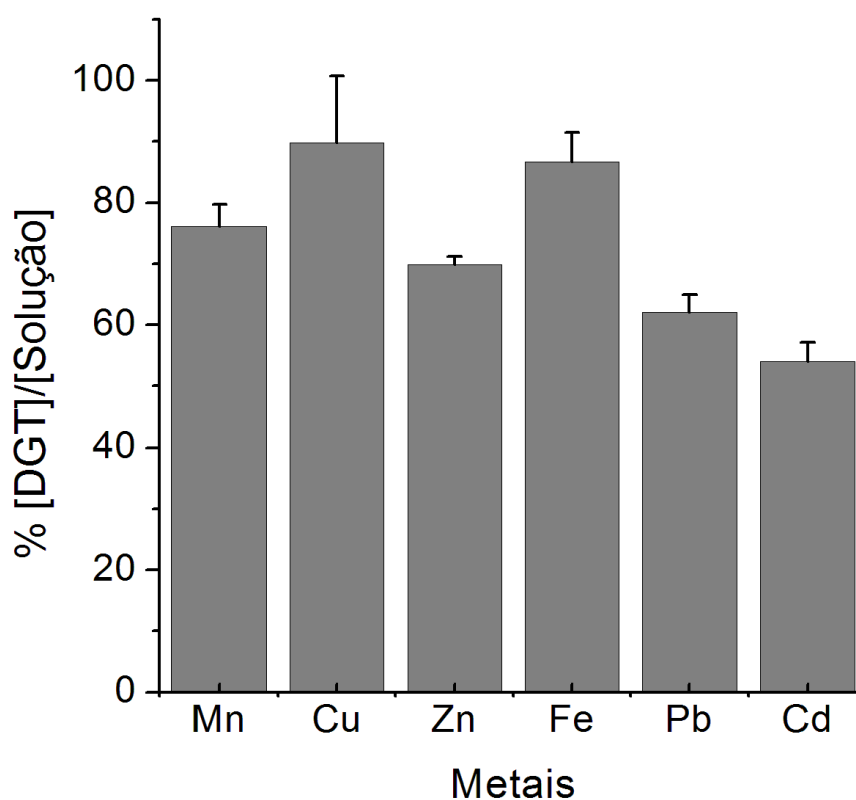


Figura 21. Efeito da interferência de metais na retenção de MeHg pelo ligante *S. cerevisiae*.

5.6 Seletividade do ligante *S. cerevisiae* para MeHg e Hg (II).

O teste para avaliar a seletividade do agente ligante *S. cerevisiae* pelo MeHg foi levado a cabo usando NaNO_3 para ajustar a força iônica. Com a utilização de NaNO_3 em vez de NaCl , visa-se evitar a formação de cloro complexos de Hg (II), os quais poderiam interferir tanto na migração dos ions através do agente difusivo como na retenção dos mesmos pelo agente ligante, assim comprovar a seletividade do ligante proposto pelo MeHg, uma vez que ambas espécies se encontram livres na

mesma solução (BOSZKE L et al., 2002; DOCEKALOVA E DIVIS., 2005; HONG Y et al., 2011).

Resultados satisfatórios já foram obtidos em estudos anteriores na determinação Hg (II) empregando o gel de agarose como agente difusivo, a diferença da poliacrilamida que foi reportada inadequada como meio difusivo para íons de Hg (II) (devido à formação de ligações covalentes com o grupo amida da poliacrilamida) (DOCEKALOVÁ e DIVIS 2005). Assim, para confirmar a seletividade da *S. cerevisiae* pelo MeHg na presença de Hg (II), foi realizado o teste utilizando dispositivos DGT montados com os géis difusivos de agarose e poliacrilamida separadamente, a fim de excluir eventuais interpretações incorretas devido á ligação poliacrilamida-Hg.

Os resultados apresentados na Tabela 08 mostram as recuperações de Hg (II) e MeHg a partir do uso de dispositivos (S + A) e (S + P) com imersões por períodos de 6h. No teste da solução A contendo só Hg (II), observa-se que tanto dispositivos montados com poliacrilamida como com agarose não foram satisfatórios para a retenção de Hg (II), com recuperações médias < 11,3 %, esta porcentagem é esperada, uma vez que uma pequena quantidade de Hg (II) fica adsorvida nos interstícios do agente ligante. Deve-se salientar que este erro pode ser facilmente superado em um período longo de imersão.

Por outro lado, o sistema foi bastante efetivo, mostrando recuperações médias de 115% e 102 % para os dispositivos S+A e S+P respectivamente na retenção de MeHg a partir da solução B contendo somente este analito, corroborando os resultados relatados por Madrid Y. et al., (1995). Estes resultados indicaram que a seletividade do sistema desenvolvido dá-se pelo ligante. Um comportamento semelhante foi observado para a solução contendo os dois analitos (solução C), ainda que, para o dispositivo S + A, a recuperação de MeHg na presença de Hg (II) foi superior a 100% (107%), o dispositivo de S+ P mostrou resultados com recuperações de MeHg na presença de Hg (II) inferior a 100% (63,4%), sugerindo que, apesar da boa seletividade do agente ligante MeHg-levedura, a utilização do gel de poliacrilamida pode melhorar a seletividade do dispositivo proposto.

Estes valores obtidos evidenciam o potencial de utilização de dispositivos DGT com (S + P) para a determinação seletiva de MeHg *in situ*.

Tabela 08 Recuperação ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos analitos a partir de amostras sintéticas obtidos com o método proposto. S + P = Agente ligante *S. cerevisiae* + gel difusivo poliacrilamida; S + A = Agente ligante *S. cerevisiae* + gel difusivo agarose.

	Solução A		Solução B		Solução C	
	[Solução] Hg (II)	[DGT] Hg (II)	[Solução] MeHg	[DGT] MeHg	[Solução] Hg(II) + MeHg	[DGT] Hg(II) + MeHg
S + P	11,5 ± 0,9	1,3 ± 0,5	29,7 ± 0,9	30 ± 9	41 ± 3	26 ± 1
S + A	11,5 ± 0,9	1,2 ± 0,2	29,7 ± 0,9	34 ± 10	41 ± 3	44 ± 11

5.7 Análise de especiação de mercúrio e metilmercúrio em amostras sintéticas.

Os resultados apresentados na Tabela 09, obtidos a partir do teste de especiação de Hg (II) e MeHg pela DGT, demonstram que o agente ligante *S. cerevisiae* retém quantitativa e seletivamente (80 - 98 %) o MeHg. Também, apresentou uma retenção significativamente baixa do Hg (II) (4 - 12 %), este comportamento pode ser explicado, (como foi mencionado anteriormente), uma vez que uma pequena quantidade de Hg (II) aderida na superfície de contato da *S. cerevisiae* pode ser quantificada. Os valores obtidos com a membrana P81 (presumivelmente, Hg (II)) foram superestimados, apresentando valores não esperados, considerando trabalhos anteriores Colaço. C (2012). O erro pode ter acontecido à dificuldade de trabalhar com Hg (II) devido a sua alta volatilidade apresentando uma perda constante na solução antes, durante e ao final da imersão. Este erro tentou-se corrigir, deixando imersos os dispositivos DGT e suportes para lograr a adsorção do elemento, mas a variabilidade da concentração do elemento foi maior, a diferença do MeHg, que manteve uma concentração estável ao longo dos testes. A membrana P81 reteve parcialmente também o MeHg (16 - 21 %), impedindo a amostragem seletiva de Hg (II), e seu uso para determinação das

concentrações do analito. Segundo Li et al., (2005), a concentração da fração lábil medida por diferentes ligantes, pode apresentar diferenças significativas, o que sugere que a medida da fração lábil do metal depende da força de ligação do agente utilizado. Neste contexto presume-se que a membrana P81 esta amostrando as duas espécies de mercúrio, representada nas medidas da fração lábil de mercúrio orgânico e inorgânico, em quanto que com o uso de *S. cerevisiae* como agente ligante, mede-se seletivamente a concentração MeHg.

A soma dos valores obtidos pela membrana P81 e *S. cerevisiae* representam relativamente bem à concentração total de mercúrio (118 %). Um acréscimo de cerca de 20 % refere-se à inclusão da fração lábil de MeHg.

Tabela 09. Resultado de análise de especiação de Hg (II) e MeHg em solução com concentrações conhecidas.

Solução	Hg (II)		MeHg		Hg (II) + MeHg	
	[Solução]	[DGT]	[Solução]	[DGT]	[Solução]	[DGT]
P 81	8,6±0,4	16±2	53±2	10±1	60±2	18±1
<i>S. cerevisiae</i>	8,6±0,4	0,7±0,3	53±2	47±3	60±2	53±4

5.8 Imersão *in situ* Rio Negro, sub-bacia do Rio Negro , AM.

Durante o período de imersão foram monitorados os seguintes parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), temperatura (T) e, condutividade elétrica (CE), a força iônica foi determinada de acordo com a formula de Griffin e Jurinak (1973). Em virtude de a força iônica ser muito baixa no sistema aquático avaliado, para medidas com técnica DGT, foram determinados os coeficientes de difusão aparentes, segundo o procedimento previamente descrito por Yabuki, L. et al., (2014). Os valores dos parâmetros monitorados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros monitorados nos pontos de coleta e imersão dos dispositivos DGT.

Ponto Imersão	CE μS/cm	Ph	FI mmol/L	T °C
P1	9	4,85	0,114	29,3
P2	10,5	5,05	0,133	29,9
P3	8,8	4,94	0,111	29

A amostragem *in situ* no rio Negro foi realizada na estação chuvosa, quando as concentrações de Hg são relativamente mais baixas. Na Tabela 10, se observam diferenças entre os valores de concentração de mercúrio total e dissolvido com concentrações menores a ($\leq 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras colhidas durante a implantação dos DGTs.

Uma concentração média de $0,0045 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Hg total (não filtrada) foi anteriormente estimada no período de 1995 a 1998 para o Rio Negro, considerando a análise em 17 afluentes diferentes (FADINI, P. S.; JARDIM, W. F., 2001). Bisinoti et al.,(2007) relataram uma concentração máxima de $0,029 \mu\text{g L}^{-1}$ para Hg total em água da Bacia do Rio Negro durante o período de (2002-2004). Neste trabalho as concentrações de Hg total foram similares ao valor máximo relatado por Bisinoti et al.,(2007), a exceção do local de amostragem (P2), sítio mais próximo à refinaria de petróleo, onde foram encontradas concentrações de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para mercúrio total e dissolvido, respectivamente. A concentração de mercúrio total encontra-se abaixo do limite estabelecido para Hg pela resolução CONAMA n° 357 que é de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para rios pertencentes à classe II (conforme Decreto Estadual n° 10755/77). Contudo, estes valores de concentração resultaram muito próximos do limite máximo permitido, podendo ser motivo de futura preocupação ambiental. Por outro lado, as concentrações de MeHg obtidas com o método desenvolvido empregando a *S. cerevisiae* como agente ligante na técnica DTG, foram inferiores a $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$, evidenciando que mesmo que exista uma concentração relativamente alta de mercúrio no ponto 2, a fração mais tóxica (MeHg), é muito baixa com grande potencial biodisponível. Comparando os resultados obtidos com a membrana P81 e com *S. cerevisiae*, pode-se presumir que a membrana P81 esta amostrando as duas espécies de mercúrio, uma vez que os valores obtidos ($< 0,085 \mu\text{g L}^{-1}$), foram superiores aos valores de MeHg e similares a fração dissolvida.

Considerando que a membrana P81 não foi seletiva para Hg (II), pode-se inferir que a melhor estratégia para especiação de mercúrio é obter a concentração de metilmercúrio (C_{MeHg}) através do DGT e a concentração de Hg (II) subtraindo a concentração do MeHg (C_{MeHg}) da concentração de mercúrio dissolvido ($C_{Hg\text{diss}}$). Uma das vantagens desta estratégia é que não se faz necessário conhecer os diferentes coeficientes de difusão de mercúrio (complexado e não complexado com substâncias húmicas). Por outro lado, esta estratégia traz como desvantagem a medida pontual do mercúrio dissolvido, diferentemente à DGT que proporciona medidas em função do tempo. Assim, se pôde estimar no local uma concentração de Hg (II) com valores médios de $(0,02 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1})$ referente aos pontos P1, P2, P3 antes e depois da coleta. Além disso, neste trabalho, as comparações entre as medições mostraram que MeHg representa 33 – 53 % do Hg dissolvido e 24 – 69 % das concentrações de Hg total (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração *In situ* ($\mu\text{g L}^{-1}$) de MeHg e Hg (II) (determinação por técnica DGT), e concentração de mercúrio total y dissolvida em amostras provenientes do Rio Negro-AM.

Pontos	[Total]		[Dissolvida]		[MeHg]	[Hg (II)]
	Antes ^a	Depois ^b	Antes ^a	Depois ^b	<i>S.cerevisiae</i>	P81
P1	0.04±0.004	0.03±0.001	0.06±0.005	0.03±0.001	0.024±0.011	0.04±0.010
P2	0.11±0.002	0.02±0.001	0.03±0.001	0.04±0.001	0.016±0.004	0.07±0.015
P3	0.03±0.001	0.03±0.007	0.05±0.001	0.01±0.001	0.010±0.002	0.05±0.027

a. Antes da imersão dos DGT

b. Depois da imersão dos DGT

Ainda que, a fração medida pelo DGT seja ligeiramente maior que a concentração dissolvida, esta aparente incoerência é devido às diferenças entre os sistemas de determinação. A técnica DGT mede a concentração média em um tempo determinado, enquanto a determinação da concentração nas amostras tanto para teor total como de sólidos dissolvidos, é uma medida pontual, além disso, não é possível controlar diferentes fatores como sazonalidade e descargas eventuais no ambiente. Atualmente não há legislações referentes aos valores de concentração Hg lábil e MeHg.

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia proposta, conclui-se que o MeHg é quantitativa e seletivamente retido pelos discos de *S.cerevisiae* imobilizada em agarose.

A associação da técnica DGT à detecção de Hg por CV-AFS resultou em uma excelente abordagem para determinação de MeHg *in situ* em amostras ambientais, considerando os baixos limites de detecção obtidos, 0,0044 ng mL⁻¹.

O coeficiente de difusão médio ($7,03 \pm 0,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) na poliacrilamida a 23 °C, ficou próximo aos valores obtidos em trabalhos anteriores para determinação de MeHg pelo DGT.

Os dispositivos DGT desenvolvidos (*S.cerevisiae* + poliacrilamida) demonstraram baixa influência do pH e Força Iônica sobre a capacidade de retenção da *S. cerevisiae* para o MeHg, permitindo a aplicação do método em sistemas aquáticos com uma longa faixa de pH de 3,5 a 8,5 e de Força Iônica de 0,0005 a 0,1 mol L⁻¹. Além disso, mostrou-se pouco interferido pelos íons avaliados Mn, Cu, Zn, Fe(II).

Os resultados indicaram que o sistema (P81+ A) não foi seletivo para Hg (II), impossibilitando a realização da especiação de mercúrio. A especiação poderá ser realizada considerando a concentração de MeHg (C_{MeHg}) obtida com a *S.cerevisiae* e o teor dissolvido de mercúrio (C_{Hgdiss}).

Finamente os resultados obtidos a partir dos diferentes testes abrangem as condições encontradas na maioria dos sistemas aquáticos fluviais, desta maneira, o método desenvolvido utilizando a técnica DGT permitiu a avaliação *in situ* da concentração de MeHg lábil no Rio Negro (AM) nas proximidades da refinaria do petróleo.

7 BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, R. M. **Determinação de mercúrio em materiais de referência certificados de amostras biológicas por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio após tratamento com hidróxido de tetrametilamônio.** 2010. Estágio Supervisionado II (QMC 5512) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ALMEIDA, D. M. et al. **Mercury degassing from forested and open field soils in Rondônia, Western Amazon, Brazil.** Chemosphere, Londres, p. 77, 60–66, 2009.

ALMEIDA, E.; FILHO, V. F. N.; MENEGÁRIO, A. A. **Paper-based diffusive gradients in thin films technique coupled to energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of labile Mn, Co, Ni, Cu, Zn and Pb in river water.** Spectrochimica Acta Part B, Amsterdã, 70-74, 2012.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio.** São Carlos: RIMA, 2003.

BAG, H. et al. **Separation and speciation of Cd (III) and Cr (VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS.** Talanta, Londres, 51, p. 895-902, 2000.

BISCARO, P. A. et al. **Pré-concentração de cádmio com *Saccharomyces cerevisiae* e determinação em águas fluviais usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.** Química Nova, São Paulo, 30, n. 2, p. 323-326, 2007.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. **O comportamento do metilmercúrio (MeHg) no ambiente.** Química Nova, São Paulo, 27, n.4, p. 593-600, 2004.

BISINOTI, M. C. **Biogeoquímica Aquática do Mercúrio Orgânico na Bacia do Rio Negro, Amazônia.** 2005. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2005.

BLOOM, N. **Determination of picogram levels of mercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapor atomic fluorescence**

detection. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Montreal, 46, p. 1131- 1140, 1989.

BROWN, K.W., DONELLY, KC. **Mutagenic activity of runoff and leachate water from hazardous waste and land treatment.** Environmental Pollution, Kidlington, 35, p. 229–246, 1984.

CAI, Y. **Atomic Fluorescence in Environmental Analysis.** In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. West Sussex: John Wiley & Sons, p. 2270–2292, 2000.

COLAÇO, C. D. **Determinação da fração lábil de mercúrio em águas fluviais.** 2012. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, UNESP, Rio Claro, 2012.

COLAÇO, C. D et al. **Determination of mercury in river water by diffusive gradients in thin films using P81 membrane as binding layer.** Talanta, Londres, 129, p. 486-490, 2014.

CLARISSE, O.; HINTELMANN, H. **Measurements of dissolved methylmercury in natural waters using diffusive gradients in thin film (DGT).** Journal of Environmental Monitoring, Cambridge, 8, p. 1242-1247, 2006.

CLARISSE, O.; FUCHER, D.; HINTELMANN, H. **Methylmercury speciation in the dissolved phase of a stratified lake using the diffusive gradient in thin film technique.** Environmental Pollution, Kidlington, 157, p. 987-993, 2009.

CLARISSE, O. et al. **Predicting net mercury methylation in sediments using diffusive gradient in thin films measurements.** Environmental Science and Technology, 45, 1506-1512, 2011

CLARISSE, O. et al. **Biomonitoring and assessment of monomethylmercury exposure in aqueous systems using the DGT technique.** Science of the Total Environment, 416, 449-454, 2012

DAHLQVIST, R. et al. **Performance of the diffusive gradients in thin films technique for measuring Ca and Mg in freshwater.** Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 460: p. 247-256. 2002.

DOCEKALOVÁ, H.; DIVIS, P. **Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems.** Talanta, Londres, 65, p. 1174-1178, 2005. .

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F **Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury?** .Science of Total Environment, Amsterdã, 275, p. 71-82, 2001.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, C. et al. **Development of the DGT technique for Hg measurement in water: Comparison of three different types of samplers in laboratory assays.** Chemosphere,Londres, 85, p. 1452-1457, 2011.

FERNÁNDEZ-GÓMEZ, C. et al. **Comparison of different types of diffusive gradient in thin film samplers for measurement of dissolved methylmercury in freshwaters.** Talanta, Londres, 129, p. 486-490, 2014.

FITZGERALD, W. F.; LAMBORG, C. H. **Geochemistry of Mercury in the Environment: Module in Earth Systems and Environmental Sciences.** In:_____Treatise on Geochemistry. 2nd edition. Oxford:;,Elsevier, p. 91-129, 2014.

GABRIEL M.; AND WILLIAMSON D. **Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment.** Environmental Geochemistry and Health, Dordrecht, 26, p. 421–434, 2004.

GAO, Y. et al. **Synthesized mercaptopropyl nanoporous resins in DGT probes for determining dissolved mercury concentrations.** Talanta, Londres, 87, p. 262-267, 2011.

GAO, Y.; DE CRAEMER, S.; BAEYENS, W. **A novel method for the determination of dissolved methylmercury concentrations using diffusive gradients in thin films technique.** Talanta, Londres, 120, p. 470-474, 2014.

GILMAR S. S. et al. **Major Aspects of the Mercury Cycle in the Negro River Basin, Amazon.** Journal of Brazilian Chemical. Society, São Paulo, 20, 6, p. 1127-1134, 2009.

GILLAN, D.C. et al. **Links between bacterial communities in marine sediments and trace metal geochemistry as measured by in situ DET/DGT approaches.** Marine Pollution Bulletin, Londres, 64, p. 353–362, 2012.

GUTIERREZ, R. M.; BUSCIO, O. **Organização Pan-Americana da Saúde. Biblioteca Virtual de Desenvolvimento Sustentável e Saúde Ambiental**, 12: p.200-209. 2010.

HAASE, O. et al. **Evaluation of the determination of mercury at the trace and ultra-trace levels in the presence of high concentrations of NaCl by flow injection-cold vapour atomic spectrometry using SnCl₂ and NaBH₄ as reductants**, The Analyst, Cambridge, 123, p.1219-1222, 1998.

HONG, Y. S.; RIFKIN, E.; BOUWER, E. J. **Combination of Diffusive Gradient in a Thin Film Probe and IC-ICP-MS for the Simultaneous Determination of MeHg and Hg²⁺ in Oxidic Water**. Environmental Science & Technology, Washington; 45, 15, p.6429-6436, 2011.

HOSHINA, M.; MORALES, M. A. **Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Maryland Heights, 72, p. 2090–2095, 2009.

IGME. Instituto Geológico e Mineiro de Espanha. (Direção Geral da Política de Energia e Minas). **Panorama de mineração de mercúrio**. 2003.

JARDIM, W. F.; FADINI, P. S. **A origem do mercúrio nas águas do rio Negro**. Ciência Hoje, São Paulo, 30, 177, p. 62 -64, 2001.

YABUKI, L. N. et al. **Evaluation of diffusive gradients in thin films technique (DGT) for measuring Al, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, and Zn in Amazonian rivers**. Environmental Monitoring and Assessment, Dordrech, 186, p. 961-969, 2014

LARNER, B. L.; SEEN, A. J. **Evaluation of paper-based diffusive gradients in thin films samplers for trace metal sampling**. Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 539, p. 349–355, 2005.

LACERDA, L.D.; MALM, O. **Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos brasileiros: uma análise das áreas críticas**. Estudos Avançados (USP), São Paulo, 22, p. 173-190. 2008.

LENG, G. et al. **Speciation analysis of mercury in sediments using vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled to high-performance liquid chromatography–cold vapor atomic fluorescence spectrometry**. Talanta, Londres, 99, p. 631-636, 2012.

LEENHEER, J. A. **Origin and nature of humic substances in the waters of the Amazon River Basin.** Acta Amazônica. Manaus, 10, p. 513-526. 1980.

LI, W. et al. **Application of a cellulose phosphate ion exchange membrane as a binding phase in the gradients in thin films technique for measurement of trace metals.** Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 464, p. 331–339, 2002.

LI, W. et al. **Diffusive gradients in thin films technique for uranium measurements in river water.** Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 592, p. 106–113, 2007.

LI, Y. et al. **Development of an ambient temperature post-column oxidation system for high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation in seafood.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Cambridge, 20, p. 467-472, 2005.

MANSON, R., FITZGERALD W., MOREL F. **The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences.** Geochemical Cosmochimica Acta, Kidlington, 58, p. 3191-3198. 1994

ZHANG, H. **Manual técnico de informações DGT.** DGT Research Ltd, Skelmorlie, Quernmore, Lancaster LA2 0QJ, UK.

MADRID, Y. et al. **Speciation of methylmercury and Hg(II) using baker's yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*). Determination by continuous flow mercury cold vapor generation atomic absorption spectrometry.** Analytical Chemistry, Washington, 67, p. 750-754, 1995.

MASON, R. P.; FITZGERALD, W. F.; MOREL, F. M. **The biogeochemical cycling of elemental mercury — anthropogenic influences.** Geochemical Cosmochim Acta, Kidlington, 58, p. 3191-3198., 1994

MENEGÁRIO, A. A.; TONELLO, P. S.; DURRANT, S. F. **Use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent for diffusive gradients in thin films.** Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 683, p. 107-112, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. Secretaria de Mudanças Climáticas e Qualidade Ambiental – SMCQ. **Perfil do Gerenciamento de Mercúrio no Brasil, incluindo seus Resíduos**. Brasília. 2011.

MOREL, F.; KRAEPIEL, A.; AMYOT, M. **The chemical cycle and bioaccumulation of mercury**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, 29, p. 543-566, 1998.

MORRISON, J. Exposure assessment of household mercury spills. *Journal of Chemical Health Safety*, Philadelphia, 17-21, 2007.

NAGANUMA, A. et al., 2000. **GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae***. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14, pp.968–972.

OLIVEIRA, A. A.; DALY, D. C. **Florestas do Rio Negro**. 9.ed. Rio de Janeiro: Cia das Letras. 2001.

OLIVEIRA, W. et al. **Determination of labile barium in petroleum-produced formation water using paper-based DGT samples**. *Talanta*. Londres, 100, p. 425-431, 2012.

OMS (Organización Mundial de la Salud). **Guías para la calidad del agua potable: Mercurio**. 2ª ed. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, v 1, 1993.

PARKER, J. L.; BLOOM, N. S. **Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation**. *Science of the Total Environment*, Amsterdã, 337, p. 253-263, 2005.

PELCOVA, P. et al. **Development of the diffusive gradient in thin films technique for the measurement of labile mercury species in waters**. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdã, 819. p. 42–48. 2014.

PESCIM, G. F. et al. **Speciation of lead in seawater and river water by using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent in the diffusive gradients in thin films technique**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, 404, 1581-1588. 2012.

PS ANALYTICAL. **Method for mercury in drinking.** Methods of analysis Manual PS Analytica Ltda, 2002.

SÁNCHEZ-RODAS, D. et al. **Atomic Fluorescence Spectrometry: a suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Cambridge, 25, 933-946, 2010.

SOIN, A. V. et al. **Sample preparation in the determination of metals in oil and petroleum products by ICP MS.** Journal of Analytical Chemistry, Washington, 65, 6, p. 571–576, 2010.

SOUZA, J. R.; BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. **Revista Química Nova na Escola.** Seção Química e Sociedade, n° 12, nov. 2000.

SHADE, C. W.; HUDSON, R. J. M. **Determination of MeHg in environmental sample matrices using Hg-thiourea complex ion chromatography with on-line cold vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection.** Environmental. Science & Technology, Washington, 39, 13, : p. 4974–4982, 2005.

STEFFEN, A. et al. **Synthesis of atmospheric mercury depletion event chemistry in The atmosphere and snow.** Atmospheric Chemistry and Physics, Goettingen, 8, p. 1445–1482, 2008.

STOICHEV, T. et al. **Improvement of analytical performances for mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry.** Talanta, Londres, 62, p. 433-438, 2004.

TAKASE, I. et al. **A geração química de vapor em espectrometria atômica.** Química Nova, São Paulo, 25, 6b, p. 1132-1144, 2002.

TEMPLETON, D. M. et al. **Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements.** Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). Pure Applied Chemistry, Berlin, 72, 8, p. 1453-1470, 2000.

TORRES, D. P. **Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com**

vapor frio. 2009. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TSENG, C.; HAMMERSCHMIDT, C.; FITZGERALD, W. **Determination of ethylmercury in environmental matrixes by on-line flow injection and atomic Fluorescence Spectrometry**. Analytical Chemistry, Washington, 76, p. 7131-7136, 2004

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Global Mercury Assessment: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport**. UNEP. Chemical Branch, Geneva, 2013.

VEGA, M.; FERNANDEZ, M.; TARAZONA, T. B. **Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain**. Environmental Pollution, Kidlington, 93, p. 135–139, 1996.

WHATMAN Ltd. **Ion exchange paper**. Kent, UK, 2007-2009.

WEIJIA L. et al. **Diffusive gradients in thin films technique for uranium measurements in river water**. Analytica Chimica Acta, Amsterdã, 592, p. 106–113. 2007.

WEINBERG J. Introdução à contaminação por mercúrio para a ONG. In: **Rede Internacional para a Eliminação de Poluentes Orgânicos Persistentes (IPEN)**. 11,17, 25,147. 2010.

WILHEM M. BLOOM N. **Mercury in petroleum**. Fuel Processing Technology, Amsterdã, 63, p. 1–27, 2000.

YU, L. P. et al. **Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage**. Trends in Analytical Chemistry, Amsterdã, 22, 4, p. 245–253, 2003.

YU, L. **Cloud point extraction pre-concentration prior to high-performance liquid chromatography coupled with cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry for speciation analysis of mercury in fish samples**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Columbus, 53, p. 9656-9662, 2005.

ZHANG, H.; DAVISON.W. **Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution**. Analytical Chemistry, Lancaster, 67, p. 3391-3400, 1995.

