
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARLOS EDUARDO EISMANN

AVALIAÇÃO DA *Saccharomyces cerevisiae*
COMO AGENTE LIGANTE NA TÉCNICA DE
DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR
GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)
PARA A DETERMINAÇÃO DE
METILMERCÚRIO

CARLOS EDUARDO EISMANN

AVALIAÇÃO DA *Saccharomyces cerevisiae* COMO AGENTE
LIGANTE NA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR
GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT) PARA A
DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO

Orientador: Amauri Antonio Menegário

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Rio Claro
2015

589.2 Eismann, Carlos Eduardo
E36a Avaliação da *Saccharomyces cerevisiae* como agente
ligante na técnica de difusão em filmes finos por gradiente de
concentração (DGT) para a determinação de metilmercúrio /
Carlos Eduardo Eismann. - Rio Claro, 2015
43 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Amauri Antonio Menegário

1. Fungos. 2. Amostradores passivos. 3. Levedura. 4. AFS.
I. Título.

AVALIAÇÃO DA *Saccharomyces cerevisiae* COMO AGENTE LIGANTE NA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO (DGT) PARA A DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO

RESUMO

Sabendo-se do potencial de toxicidade do mercúrio, mais especificamente de sua forma orgânica, o metilmercúrio (MeHg), faz-se necessária a busca por métodos analíticos eficientes e precisos para a determinação e especiação do metal. A técnica de difusão por gradiente em filmes finos (DGT) já vem sendo utilizada para tal fim de maneira eficiente tendo apresentado resultados satisfatórios em diversos estudos. Porém, a utilização de ligantes alternativos aos convencionais, que tornem a aplicação da técnica menos custosa em termos laborais e financeiros, faz-se importante para um monitoramento constante e eficiente do metilmercúrio no ambiente. No presente trabalho buscou-se avaliar o potencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose em combinação com a poliacrilamida como agente difusivo para determinação seletiva de MeHg. Os resultados demonstraram-se positivo, com um coeficiente de difusão médio de $7,03 \pm 0,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Os resultados demonstraram também baixa influencia do pH, força iônica e outros íons na retenção do analito pelos dispositivos. As recuperações de Hg^{2+} demonstraram-se insatisfatórios, evidenciando a seletividade dos dispositivos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fundidor.....	19
Figura 2 - Discos de levedura.....	20
Figura 3 - Dispositivos do DGT	23
Figura 4 - Imersão dos dispositivos.....	24
Figura 5 - Curva de imersão 48h (MeHg 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; pH 5,5; FI 0,05 mol L^{-1})	29
Figura 6 - Curva de Imersão 6h (MeHg 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; pH 5,5; FI 0,05 mol L^{-1})	29
Figura 7 - Efeito dos diferentes pH testados na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i> (MeHg = 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; força iônica = 0,05 mol L^{-1} NaCl).....	32
Figura 8 – Efeito das diferentes forças iônicas testadas na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i> (MeHg = 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. pH = 5,0)	33
Figura 9 - Efeito da interferência de Mn, Cu, Zn, Fe, Pb e Cd na retenção de MeHg pelo ligante <i>S. cerevisiae</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Técnica para mercúrio em AFS.....	14
Tabela 02 - Especiação de Hg em AFS	15
Tabela 03 - Condições de operação do CV-AFS	28
Tabela 04 - Coeficientes de Difusão (D) determinados nos diferentes experimentos realizados no laboratório. Curvas de imersão, efeitos do pH e força iônica e estudos de especiação	31
Tabela 05 - Coeficientes de difusão obtidos em trabalhos anteriores	31
Tabela 06 - Recuperações dos analitos pelos ligantes nos testes de especiação	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	6
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. Mercúrio inorgânico e DGT	8
2.2. Metilmercúrio e DGT	11
2.3. Especiação de Hg usando AFS	13
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Equipamentos e acessórios	16
4.2. Reagentes e soluções.....	17
4.3. Princípios da técnica DGT.....	21
4.4. Procedimento de eluição.....	22
4.5. Pré tratamento das amostras	22
4.6. Montagem dos dispositivos DGT	23
4.7. Imersão de 48h	23
4.8. Cálculo do coeficiente de difusão.....	24
4.9. Efeito da Força Iônica na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i> Efetivo...	25
4.10. Efeito do pH na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i>	25
4.11. Teste de Interferentes	26
4.12. Teste de Especiação	26
4.13. Determinação de MeHg por CV-AFS.....	27
4.14. Condições de operação do CV-AFS	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Curvas de Imersão	28
5.2. Coeficiente de Difusão <i>S. cerevisiae</i>	30
5.3. Efeito da Força Iônica na capacidade de ligação da <i>S. cerevisiae</i>	32

5.4. Teste de interferentes	33
5.5. Testes de Especificação	34
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mercúrio é um metal conhecido pela sua toxicidade, sendo considerado como de grande preocupação, uma vez que a constante entrada deste metal no meio ambiente e a ocupação populacional têm colocado continuamente pessoas em risco de contaminação (HORVAT, 2001).

Calcula-se que apenas um terço do mercúrio presente no meio ambiente seja proveniente da natureza (principalmente erupções vulcânicas), sendo aproximadamente dois terços originários de atividades antrópicas (USEPA, 1997). Dentre as várias formas em que o mercúrio chega ao meio ambiente, a mineração tem papel de destaque, onde o mercúrio aparece como subproduto da refinação de metais como cobre, ouro, chumbo e zinco. Em países como Colômbia, Venezuela e Brasil, onde a mineração é muito comum, inúmeros casos de contaminação por mercúrio são conhecidos (WEINBERG, 2010).

No ambiente aquático, o mercúrio é transformado em metilmercúrio (MeHg) de maneira biótica principalmente através de bactérias sulfato redutoras, podendo ocorrer também metilação abiótica em ambientes ricos em matéria orgânica. Esta metilação pode acontecer tanto a partir do mercúrio inorgânico quanto do mercúrio metálico, evidenciando a participação da atividade garimpeira na formação do metilmercúrio (BISNOTI e JARDIM, 2004). O MeHg é altamente solúvel e é rapidamente absorvido pelos organismos por difusão, ligando-se a proteínas de forma relativamente estável. A taxa de eliminação do composto pelos organismos é, portanto, muito baixa e por este motivo o MeHg acaba sendo bioacumulado nos organismos e biomagnificado ao percorrer os diferentes níveis da cadeia trófica aquática quando um organismo é consumido por outro (HORVAT, 2001). Através do consumo de peixes, mariscos e outros animais aquáticos o MeHg chega até o ser humano, onde é rapidamente absorvido através do intestino, de onde passa rapidamente a corrente sanguínea, onde será transportado para todo o corpo, causando inúmeros efeitos adversos em órgãos como o cérebro, coração, rins, entre outros (WEINBERG, 2010).

Alguns desastres causados pelo MeHg são conhecidos. Dois casos bem relatados são os envenenamentos por consumo de peixes e mariscos contaminados com MeHg em Minamata e Niigata, no Japão respectivamente nas décadas de 1950

e 1960 onde a causa de centenas de mortes foi relacionada a esse composto (HORVAT, 2001; WEINBERG, 2010; BISINOTI e JARDIM, 2004).

O MeHg é, portanto, a forma do mercúrio mais danosa para a biota e diante deste fato, faz-se necessária a quantificação de forma específica e eficiente do metilmercúrio para que decisões mais eficientes na forma de lidar com a presença desta forma do metal no ambiente possam ser tomadas.

Nesse sentido a técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT) (DAVISON e ZHANG, 1994), que já vem sendo utilizada para medir concentrações de diferentes metais e suas espécies em águas, solos e sedimentos aparece como uma possibilidade satisfatória para tal perspectiva. A DGT apresenta uma série de vantagens em comparação com outras técnicas analíticas como capacidade de amostragem *in situ*, pré-concentração das espécies de interesse, amostragem integrada durante o tempo (DAHLQVIST et al, 2002; GILLAN et al, 2012; LI et al, 2007).

O dispositivo DGT convencional consiste principalmente de duas camadas. Uma camada de ligante, convencionalmente a resina Chelex-100 imobilizada em um gel de poliacrilamida (acrilamida (15%) e agarose (0,3 %)). Sobre esta, uma camada permeável, com porosidade controlada, chamada de difusivo, sendo também, convencionalmente, um gel de poliacrilamida. As duas camadas são fixadas a um pistão de polipropileno com um anel tendo uma abertura de 20 mm de diâmetro, onde ocorre a difusão dos analitos da solução para o interior do da camada mais interna. Um filtro, geralmente de nitrato ou acetato de celulose é colocado sobre as camadas de géis ligante e difuso, com função de proteger os géis de possíveis danos ao longo da imersão (ZHANG & DAVISON, 1995). A especiação dos metais depende das propriedades da fase ligante (ligação seletiva de espécies diferentes) e da camada difusiva (LI et al, 2007).

A técnica de DGT foi utilizada por para a determinação de MeHg em águas utilizando sílica gel funcionalizada com mercaptopropil como agente ligante e o gel de poliacrilamida como agente difusivo (CLARISSE e HINTELMANN, 2006; CLARISSE et al, 2009). Hong et al, 2011 também utilizaram o DGT para o MeHg utilizando também a agarose como camada difusiva e uma resina com grupos tióis como agente ligante.

O presente trabalho pretende utilizar a técnica de DGT, propondo, porém, outro material como agente ligante, sendo este a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A *S. cerevisiae* é um substrato biológico interessante, já tendo sido avaliado seu potencial para especiação e concentração de vários metais (BAG et al, 1998; BAG, 1999; MAQUIEIRA, 1994; BISCARO et al, 2007), além disso, é um material barato e encontrado facilmente e em grandes quantidades na sua forma desidratada nos comércios locais (MENEGÁRIO et al, 2010). Seu uso já foi testado com sucesso anteriormente para a determinação seletiva de espécies de MeHg na presença de Hg^{2+} (MADRID et al, 1995). Estudos preliminares realizados nos laboratórios do Centro de Estudos Ambientais da UNESP - Rio Claro utilizando *Saccharomyces 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 et al, 2010; MADRID et al, 1995; PESCIM et al, 2012). Deste modo, considerando a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* para reter as espécies químicas descritas acima, pode-se considerar que a possibilidade da ampliação do uso da levedura imobilizada em agarose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mercúrio inorgânico e DGT

Docekalová e Divis (2005) testaram o potencial de duas resinas para sua utilização como géis ligantes para o mercúrio na técnica DGT, a Chelex 100 com grupos iminodiacéticos e a Spheron-Thiol com grupos tióis, utilizando a agarose como gel difusivo. O estudo realizado no rio Svitava mostrou maiores valores de concentração de Hg quando utilizada a resina Spheron-Thiol ($0.0116 \pm 0.0009 \mu g L^{-1}$) em comparação a Chelex 100 ($0.0042 \pm 0.0005 \mu g L^{-1}$). Os resultados obtidos pelas duas resinas ficaram muito abaixo dos valores medidos diretamente no rio ($0.088 \pm 0.012 \mu g L^{-1}$). Essa diferença indica a seletividade dos dispositivos utilizados por íons inorgânicos e espécies instáveis, não sendo capaz amostrar espécies orgânicas inertes e coloides.

Divis et al (2010) avaliaram o desempenho quatro diferentes géis ligantes para determinação de mercúrio na técnica de DGT, as resinas Chelex 100, Duolite GT73, Lantosorb modificada, Spheron-Thiol, utilizando sempre a agarose como gel difusivo. A Duolite GT73 demonstrou melhor capacidade de sorção para o mercúrio, porém todas as resinas demonstraram capacidade de sorção para amostragem em longos períodos (semanas). Concentrações abaixo de 5 ng L^{-1} puderam ser medidas em períodos de imersão 3 a 5 dias. A Duolite GT73 também foi considerada o melhor gel ligante entre os quatro testados, por permitir trabalhar em uma faixa mais larga de pH e boa capacidade para mensurar também o mercúrio ligado em complexos fortes. Todos os outros géis ligantes podem ser usados para medir o mercúrio em uma faixa de pH de 6 a 8 e, exceto a Spheron-Thiol, são capazes de reter apenas espécies lábeis de mercúrio.

Fernández-Gómez et al (2011) compararam diferentes configurações dos dispositivos de DGT para determinação de mercúrio biodisponível em águas. O primeiro consistiu de Spheron-Thiol imobilizada em poliacrilamida como gel ligante e a agarose (0,76 mm de espessura) como gel difusivo (C-DGT); o segundo, a sílica gel funcionalizada com 3-mercaptopropil como gel ligante e a agarose (0,5 mm de espessura) como gel difusivo (A-DGT); e a sílica gel funcionalizada com 3-mercaptopropil como gel ligante e a poliacrilamida (0,4 mm de espessura) como gel difusivo (P-DGT). O estudo foi realizado em águas com e sem matéria orgânica dissolvida (MOD). Os três dispositivos se mostraram eficientes na água sem MOD, demonstrando a possibilidade de utilização da poliacrilamida como agente difusivo, uma vez que esta não compete com o gel ligante pela ligação com os íons de Hg^{2+} . Contudo, nas amostras com MOD a C-DGT não foi eficiente para retenção do analito. Dentre os dispositivos testados o P-DGT demonstrou maior linearidade com o tempo ($R^2 = 0,983$ e $0,989$ com e sem MOD respectivamente) e menor limite de detecção.

Gao et al (2011) testaram 4 resinas para a determinação de mercúrio, além da resina Chlexe 100. Foram testadas as resinas SH-SBA (3-Mercaptopropyl functionalized SBA-15), SH-PMO (3-mercaptopropyl functionalized ethenylene bridged periodic mesoporous organosilica), a resina SQR (Sumichelate Q10R) e a SH-KG (3-mercaptopropyl functionalized silica gel). Os estudos das mesmas como géis ligantes foram feitos utilizando-se a agarose como agente difusivo. A resina

Chelex 100 não demonstrou linearidade entre a retenção e o tempo enquanto as outras 4 resinas mostraram resultados positivos, não diferindo muito entre os valores (coeficiente de difusão em média $8.44 + 0.33 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). A SH-PMO mostrou-se ligeiramente melhor (maior taxa de retenção) que as outras três, seguida por SQR, SH-SBA e SH-KG.

Zhou et al (2013) testaram um novo material ligante, baseado em sílica gel com grupos tióis funcionalizados para a técnica DGT, para a determinação de Hg em águas. Como agente difusivo os autores utilizaram uma camada híbrida de amido orgânico/sílica. O coeficiente de difusão obtido foi de $0,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e a capacidade de retenção foi de $0,64 \mu\text{g cm}^{-2}$. Este valor para o coeficiente de difusão está abaixo quando comparado a estudos semelhantes realizados anteriormente. O dispositivo proposto no estudo representa uma nova perspectiva para a técnica de DGT, porém, estudos mais detalhados em condições variadas são necessários para um melhor entendimento do método.

Szkandera et al (2014) utilizaram dióxido de titânio imobilizado em poliacrilamida como agente ligante para a determinação de diferentes espécies de mercúrio lábil em sistemas aquáticos. Os estudos demonstraram pouca influência do pH e da força iônica sobre a eficiência dos dispositivos. Os estudos da influência da substância húmica mostraram interferências muito baixas quando comparadas com a resina Chelex-100 comumente utilizada. A aplicação do método em água do mar é limitada, uma vez que foi verificada grande influência de cloretos na retenção do Hg pelo ligante.

Colaço et al (2014) utilizaram recentemente dispositivos DGT com a membrana Whatman P81 como agente ligante e a agarose como agente difusivo para a determinação de Hg^{2+} em águas. Os autores relataram recuperações de 97% e coeficiente de difusão de $7,8 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Segundo os autores, o dispositivo proposto demonstrou-se eficiente em uma larga faixa de pH e força iônica, apesar de não ser eficiente em força iônica próxima ou superior a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A influência de outros íons metálicos na retenção do analito pelo dispositivo proposto foi baixa. Os autores ainda relataram que no estudo realizado *in situ*, mesmo com concentrações de Hg^{2+} muito baixas, os dispositivos foram capazes de quantificar o analito devido à capacidade de pré-concentração dos dispositivos DGT.

2.2. Metilmercúrio e DGT

Clarisse e Hintelmann (2006) já aplicaram com sucesso técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração para determinação de MeHg em águas utilizando a sílica gel funcionalizada com 3-mercaptopropil e a poliacrilamida como géis ligantes e difusivos, respectivamente. A quantificação foi feita por 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 ($[\text{NaCl}]$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e um forte efeito de matriz causado pela presença de tiouréia. A tiouréia foi utilizada juntamente com o ácido hidrocloreídrico para a eluição do analito, porém, este forma complexos muito estáveis com o metilmercúrio, interferindo na reação de etilação utilizada no procedimento analítico. Para analisar o potencial de interferência, foram realizados experimentos com diferentes concentrações de tiouréia para a eluição. Os resultados mostraram a concentração máxima de $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ como ideal para uma eficiente eluição com pouco efeito de matriz na determinação por ICP-MS.

Resultados positivos também foram obtidos na caracterização das espécies de mercúrio em solos através de 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%), sendo assim os experimentos seguintes foram realizados utilizando-se apenas a Spheron-Thiol. A utilização da técnica de HPLC-ICP-MS demonstrou boa separação e sensibilidade para as espécies investigadas (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) (CATTANI et al, 2008).

A determinação de metilmercúrio por DGT também foi utilizada com sucesso para monitorar a especiação de MeHg dissolvido em um lago boreal estratificado de Ontario, no Canadá. O estudo permitiu identificar as diferentes formas do MeHg no epilímnio, metalímnio e hipolímnio deste lago (CLARISSE et al, 2009). Outro estudo foi realizado para medir a fração lábil de MeHg dissolvida na água intersticial em sedimentos na Baía de São Francisco. Os resultados foram positivos e demonstraram que o DGT tem potencial para prever as taxas de metilação nestes sedimentos (CLARISSE 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. 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 et al, 2012). Os três estudos utilizaram a sílica gel funcionalizada com 3-mercaptopropil como gel ligante e a poliacrilamida como gel difusivo, quantificando o material por GC-ICP-MS.

Gao et al (2014) utilizaram a sílica gel funcionalizada com 3-mercaptopropil como gel ligante, substituindo a poliacrilamida como gel difusivo pelo gel de agarose, para a determinação de MeHg pelo DGT em águas. Os autores testaram dois processos para a extração do analito do gel ligante: Um utilizando a tiouréia como complexante e outro através de extração ácida. A tiouréia demonstrou recuperações muito baixas, enquanto a extração ácida obteve recuperações do analito de 100%. Após a extração, seguiu-se a etilação do MeHg liberado, permitindo assim a sua determinação em concentrações muito baixas através de cromatografia gasosa com amostragem por *headspace* acoplado a AFS. O coeficiente de difusão obtido no experimento foi de $5,1 \pm 0,20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e o dispositivo testado demonstrou pouca influência das diferentes forças iônicas e pH.

Estudos recentes para a determinação de 4 espécies de mercúrio (mercúrio iônico - Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$) em águas foram realizados utilizando a agarose como gel difusivo e dois ligantes com grupos funcionais tióis imobilizados em gel de poliacrilamida: a Duolite GT73 e a Ambersep GT74. A análise das amostras líquidas ou dos géis de resina foi feita diretamente através de um analisador de mercúrio para amostras sólidas com formação de amálgama e posterior leitura por espectrometria de absorção atômica acoplado a geração de vapor frio (CV-AAS). As variáveis do sistema foram avaliadas. A Duolite GT73 demonstrou alta capacidade de acumulação em condições muito alcalinas ($\text{pH} > 8$) enquanto a Ambersep GT74 demonstrou alta capacidade de acumulação em condições muito ácidas ($\text{pH} < 3$). A acumulação de fenilmercúrio foi bastante afetada na presença de cloretos enquanto a presença de substância húmica afetou as acumulações na sequência $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+ \leq \text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+ < \text{CH}_3\text{Hg}^+ < \text{Hg}^{2+}$ devido à baixa afinidade das espécies de mercúrio orgânico pelos grupos funcionais da substância húmica. Os coeficientes de difusão encontrados para o Hg^{2+} e o CH_3Hg^+ foram bastante semelhantes ($9,07 \pm 0,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $9,06 \pm 0,30 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente) enquanto para o $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ e o $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ foram significativamente

mais baixos ($6,87 \pm 0,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $3,86 \pm 0,19 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente) (PELCOVA et al, 2014).

Fernández-Gómez et al (2014) estudaram uma resina funcionalizada com grupos tióis como agente ligante, comparando a agarose (A-DGT) e a poliacrilamida (P-DGT) como agentes difusivos para a determinação de MeHg. Os autores observaram diferenças significativas entre os valores do coeficiente de difusão (D) na presença e ausência de matéria orgânica dissolvida (MOD). Para o A-DGT, os valores de D obtidos na ausência e presença de MOD foram de $3,15 \times 10^{-6}$ e $2,68 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Para o P-DGT, estes valores foram de $2,49 \times 10^{-6}$ e $1,69 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Os autores afirmam ainda que mesmo com um coeficiente de difusão maior para a agarose na ausência e presença de MOD, a poliacrilamida parece ser uma escolha melhor para monitoramento de concentrações muito baixas em águas eutróficas.

2.3. Especiação de Hg usando AFS

Muitos estudos foram feitos utilizando-se diferentes técnicas para a análise de especiação de mercúrio e sua quantificação. A Tabela 01 cita as principais técnicas utilizadas para este fim. Uma vez que é muito comum o uso de siglas quando trata-se do assunto, a Tabela 01 também nos mostra as siglas e suas respectivas técnicas.

Tabela 01 - Técnica para mercúrio em AFS

Sigla	Técnica	Referência
HG-CT-GC-AFS	Hydride Generation Cryofocussing Gas Chromatography Atomic Fluorescence Spectrometry	STOICHEV et al, 2009
Eth-CT-GC-AFS	Ethylation Cryofocussing Gas Chromatography Atomic Fluorescence Spectrometry	STOICHEV et al, 2009
FIA-GC-CV-AFS	Flow Injection Analysis Gas Chromatography Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	TSENG et al, 2004
CPE-HPLC-CV-AFS	Cloud Gas Extraction High Performance Liquid Chromatography Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	YU, 2005
HPLC-CV-AFS	High Performance Liquid Chromatography Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	LI et al, 2005
FIA-CE-AFS	Flow Injection Analysis Capillary Electrophoresis Atomic Fluorescence Spectrometry	WANG et al, 2006
FIA-KR-CV-AFS	Flow Injection Analysis Capillary Knotted Reactor Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	WU et al, 2006
CR-PVG-AFS	Coiled Reactor Photochemical Vapor Generation Atomic Fluorescence Spectrometry	GAO et al, 2010
MSC-CV-AFS	Multisyringe Chromatography Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	GUMÁN-MAR, 2011
ECV-AFS	Electrochemical Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	ZHANG et al, 2012
MCV-AFS	Microwave-enhanced Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	WU et al, 2012
HPLC-CV-AFS	High Performance Liquid Chromatography Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry	LENG et al, 2012

A Tabela 02 mostra alguns estudos realizados com AFS para a especiação de mercúrio, as principais espécies detectadas, seus limites de detecção e sua aplicação.

Tabela 02 - Especificação de Hg em AFS

Técnica	LD Hg ²⁺	LD MeHg	LD EtHg	Amostra	Referência
HG-CT-GC-AFS	0,13 ng L ⁻¹	0,01 ng L ⁻¹	-	Água.	STOICHEV et al, 2004
Eth-CT-GC-AFS	0,22 ng L ⁻¹	0,2 ng L ⁻¹	-	Sedimento	STOICHEV et al, 2004
FIA-GC-CV-AFS	-	10 ng L ⁻¹	-	Sedimento e água	TSENG et al, 2004
CPE-HPLC-P-CVAFS	2 ng L ⁻¹	9 ng L ⁻¹	4 ng L ⁻¹	Biológica	YU, 2005
HPLC-CV-AFS	190 ng L ⁻¹	270 ng L ⁻¹	260 ng L ⁻¹	Frutos do mar	LI et al, 2005
FIA-CE-AFS	100000 ng L ⁻¹	200000 ng L ⁻¹	-	Água	WANG et al, 2006
FIA-KR-CV-AFS	3,6 ng L ⁻¹	2,0 ng L ⁻¹	-	Biológicas e Ambiental	WU et al, 2006
CR-PVG-AFS	4 - 8 ng L ⁻¹	4 – 8 ng L ⁻¹	-	Água	GAO et al, 2010
MSC-CV-AFS	110000 ng L ⁻¹	30000 ng L ⁻¹	90000 ng L ⁻¹	Biológica e Ambiental	GUMÁN-MAR et al, 2011
ECV-AFS	98 ng L ⁻¹	73 ng L ⁻¹	-	Frutos do mar	ZHANG et al, 2012
MCV-AFS	5 ng L ⁻¹	5 ng L ⁻¹	-	Biológica e geológica	WU et a, 2012
HPLC-CV-AFS	29 ng L ⁻¹	28 ng L ⁻¹	57 ng L ⁻¹	Sedimento	LENG et al, 2012

Hg = Mercúrio inorgânico

MeHg = Metilmercúrio

EtHg = Etilmercúrio

Com base nos dados da Tabela 02, é possível notar que grande parte dos trabalhos de análise de especificação de mercúrio em AFS envolve o acoplamento de cromatografia, líquida (YU et al, 2005; LI et al, 2005; LENG et al, 2012) ou gasosa (STOICHEV et al, 2004; TSENG et al, 2004). 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 et al, 2005).

Dentre os métodos não cromatográficos, com exceção da eletroforese capilar, que não apresentou limites de detecção satisfatórios para aplicações ambientais (WANG et al, 2006), os métodos propostos apresentaram bons limites de detecção (na faixa de ng L⁻¹).

3. OBJETIVOS

Desenvolver um método para determinar MeHg *in situ* em águas de rios usando a técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) baseado no uso da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose como agente ligante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e acessórios

- Espectrômetro de fluorescência atômica- AFS (Millenium Merlin, PS Analytical, UK);
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) (ICap 6300, Thermo Scientific, UK);
- Sistema de purificação de água com resistividade final de 18,2 MΩ cm⁻¹ (Milli-Q, Millipore, USA)
- Dispositivos de DGT de polipropileno (pistão e anel) (DGT Research Lda, UK)
- Agitador magnético (Fisatom – modelo 752, Brazil)
- Agitador com movimento orbital (PR70, Hoeter Pharmacia Biotech, USA)
- Balança analítica (AG 200, Gehaka, Brazil).
- Chapa de aquecimento (Te-018, Tecnal, Brazil).
- Pipetas automáticas (Gilson, France).

-Vidrarias, acessórios de laboratório e equipamentos de uso rotineiro em laboratórios de química analítica, como, medidores de pH, micropipetas e termômetros.

4.2. Reagentes e soluções

Preparo da solução-estoque de MeHg 100 mg L⁻¹

A preparação da solução de estoque de 100 mg L⁻¹ de MeHg foi feita a partir cloreto de metilmercúrio (Aldrich). Foram diluídas 0,0130 g do soluto com 20 mL de metanol, completando-se com água ultrapura até 100 mL, formando assim uma solução de 100 mg L⁻¹ de MeHg em metanol 20% (v/v). A solução foi mantida refrigerada e livre de luz, evitando assim a degradação do MeHg (FERNÁNDEZ-GÓMEZ et al, 2011).

Preparo da solução de KBrO₃ (0,0333 mol L⁻¹)

A solução de brometo de potássio foi preparada semanalmente segundo procedimento descrito no manual PS Analytical (PS Analytical, 2002). Foram diluídos 1,39 g de KBrO₃ (Merck) em 250 mL de água ultrapura.

Preparo da solução de KBr (0,2 mol L⁻¹)

A solução de bromato de potássio foi preparada mensalmente segundo procedimento descrito no manual PS Analytical (PS Analytical, 2002). Foram diluídos 5,95 g de KBr (Merck) em 250 mL de água ultrapura.

Preparo do KBr-KBrO₃

A solução brometo de potássio – bromato de potássio utilizada para a oxidação das diferentes espécies de mercúrio para Hg (II) foi preparada diariamente misturando-se partes iguais de KBr e KBrO₃.

Preparo da OHNH₃Cl (12% m/v)

A solução de hidroxilamina utilizada para a neutralização do excesso de KBr-KBrO₃ foi preparada semanalmente segundo procedimento descrito no manual PS Analytical (PS Analytical, 2002). Foram diluídos 12 g de cloridrato de hidroxilamina (Mallinckrodt) em 100 mL de água ultrapura.

Preparo dos padrões de MeHg

Os padrões de metilmercúrio utilizados nas curvas analíticas foram preparados conforme procedimento descrito no manual PS Analytical. Foram preparados padrões de 0,25 - 0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 – 5,0 – 10,0 mol L⁻¹. Em frascos de 50 mL adicionou-se os volumes de MeHg correspondentes às respectivas concentrações, em seguida foram adicionados 7,5 mL de HCl 33% (m/v) e 1 mL de KBr/KBrO₃, completando-se o volume para 50 mL com água ultrapura. Os padrões são deixados para reagir durante 30 minutos. Após este período foram adicionados 30 µL de OHNH₃Cl 12% (m/v) e as amostras são então levadas à leitura.

Preparo da solução de SnCl₂ 2%(m/v)

A solução de cloreto estanoso 2% (m/v) utilizada para a redução do Hg (II) na geração de vapor frio foi preparada segundo o método descrito no manual PS Analytical, 2002. Para o preparo de 500ml de SnCl₂ 2% foram diluídas 10 g de SnCl₂ (Caledon) em 225 mL de HCl 33% (v/v). Em seguida a solução foi aquecida para que haja a completa dissolução do SnCl₂, completando-se posteriormente até 500 mL com água ultrapura.

Preparo do reagente branco

A solução do reagente branco utilizada na geração de vapor frio foi preparada segundo o método descrito no manual PS Analytical, 2002. Para o preparo de 1 L de reagente branco foi preparada uma solução com 150 mL de HCl 33% (m/v), 20 mL de solução KBr/KBrO₃ e o restante do volume de água ultrapura. Esta solução foi deixada para reagir durante 30 minutos e após este período foram adicionados 600 µL de O₂NH₄Cl 12% (m/v)

Preparo dos discos de S. cerevisiae (agente ligante)

A preparação do gel de levedura foi realizada dissolvendo-se a agarose (Pharmacia Biotech AB) (0,9 g, 3% m/v) em 50 mL de água em banho-maria (80°C) e adicionando-se *S. cerevisiae* desidratada (6 g, 20% m/v) sob agitação com bastão de vidro. Em seguida a suspensão foi transferida para o molde de vidro com espaçadores de 0,6mm (Figura 1) e mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente. A lâmina de gel formada foi cortada na forma de discos de 25 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 2). Os discos foram então lavados e preservados a 4°C em água purificada até sua utilização.



Figura 1 - Fundidor



Figura 2 - Discos de levedura

Preparo do gel de poliacrilamida (agente difusivo)

O gel de poliacrilamida é vendido comercialmente por DGT Research LTD sendo obtido em forma de lâminas de, com 0,8 mm de espessura. A partir da lâmina são cortados discos de 2,5 cm de diâmetro. Os discos são então armazenados em solução NaCl 0,05 mol L⁻¹, por pelo menos 24h, podendo ser utilizados após este período.

Preparo do nitrato de celulose (filtro)

O filtro de nitrato de celulose (Sartorius Stedim Biotech Ltda) utilizado no estudo é encontrado na forma de discos de 2,5 cm de diâmetro com porosidade de 0,45 µm e espessura entre 115-145 µm.

Os filtros passaram por processo de descontaminação: imersão dos filtros em solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹ por 24 horas, em seguida lavados com água deionizada até o pH da solução de lavagem chegar próximo da neutralidade (pH 5,5 – 7,5)

Após o processo de descontaminação os filtros foram acondicionados em solução de NaCl 0,05 mol L⁻¹.

4.3. Princípios da técnica DGT

Na técnica DGT (DAVISON e ZHANG, 1994), um dispositivo é imerso no sistema a ser monitorado (por exemplo, no mar ou em um rio) durante um intervalo de tempo definido. A quantidade dos íons acumulados é recuperada do dispositivo, determinada por uma técnica analítica apropriada e usada para quantificar as concentrações das espécies lábeis no sistema.

Espécies lábeis podem ser íons livres hidratados ou espécies (orgânicas ou inorgânicas) fracamente complexadas que podem se dissociar rapidamente. Para o avaliações ambientais e controle de contaminações o estudo da fração lábil dos metais se faz importante por estar diretamente relacionado a biodisponibilidade destes metais (ZHANG e DAVISON, 1995).

A técnica DGT se baseia na 1ª lei de difusão de Fick. O fluxo (F) dos íons que difundem da camada do gel difusivo para a resina é dado pela eq. 1:

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

onde **D** é o coeficiente de difusão do gel, **C_b** é a concentração do íon lábil na solução externa, **C'** é a concentração do íon livre na resina e **Δg** é a espessura do gel difusivo. Se os íons estiverem em rápido equilíbrio com a resina e apresentarem uma forte ligação, a concentração **C'** será zero, caso não ocorra a saturação da resina, assim temos a eq. 2:

$$F = DC_b / \Delta g \quad (2)$$

Sendo a definição de fluxo $F = M / At$, onde **M** é a massa do íon, **A** a área da janela do dispositivo e **t** o tempo, podemos reescrever a eq. 2 :

$$M = DC_b t A / \Delta g \quad (3)$$

Determina-se a massa **M** do íon e calcula-se a concentração **C_b** do metal na solução externa (solução onde dispositivo foi imerso) com a eq. 4:

$$C_b = M \Delta g / DtA \quad (4)$$

A massa do íon acumulada **M** no disco de gel com resina é obtida através da equação (5).

$$M = C_e (V_{eluyente} + V_{bgel}) / f_e \quad (5)$$

onde **C_e** é a concentração do íon determinada no eluído, **V_{eluyente}** é o volume de eluente adicionado ao gel com resina, **V_{gel}** é o volume do gel com resina e **f_e** é o fator de eluição para cada íon.

4.4. Procedimento de eluição

Após a retirada dos dispositivos de DGT das soluções, os dispositivos são desmontados, sendo o nitrato de celulose e a poliacrilamida descartados. Os discos de levedura foram então lavados e colocados, todos no mesmo momento, em tubos de 15ml contendo 5ml de HCl 1 mol L⁻¹ e mantidos sob agitação durante 24h. Este procedimento visa a recuperação de todos os íons retidos nos discos de levedura.

4.5. Pré tratamento das amostras

Após o processo de eluição, os discos foram removidos de seus respectivos tubos e então centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, 1 mL de cada solução contida no tubo foi retirado (da parte superior da solução, evitando a agitação e o contato com o precipitado) e colocado em tubos de 50 mL. A cada tubo de 50 mL com 1 mL de solução de MeHg (já eluída e centrifugada), foram adicionados 7,5 mL de HCl 33% (v/v), 1 mL de solução KBrO₃/KBr, completando-se o conteúdo com água ultrapura até 50 mL (diluição de 50x). As soluções foram deixadas para reagir durante 30 minutos e após este período foram adicionados 30

μL de OHNH_3Cl . Após este procedimento, as amostras foram então levadas para a leitura por CV-AFS.

4.6. Montagem dos dispositivos DGT

Os dispositivos foram montados em capela de fluxo laminar, minimizando assim o risco de contaminação, colocando-se sobre o pistão de polipropileno (parte inferior do dispositivo) um disco de gel de levedura (agente ligante), sobre este um disco poliacrilamida (agente difusivo) e sobre ambos um filtro de acetato de celulose. Os discos foram fixados por uma luva de polipropileno (parte superior do dispositivo), com abertura de 20 mm de diâmetro, permitindo assim a difusão dos íons para dentro do dispositivo (Figura 3).



Figura 3 - Dispositivos do DGT

4.7. Imersão de 48h

Para a construção da curva de imersão e o cálculo do coeficiente de difusão foram preparados 4 L de solução de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg (Força Iônica de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada com NaCl e pH 5,5 ajustado com HCl e NaOH). A solução foi mantida em constantemente sob agitação em incubadora a $23 \pm 1 ^\circ\text{C}$ (Figura 4) durante 24h para estabilização.

Após o período de estabilização foram imersos 8 dispositivos DGTs montados conforme procedimento descrito anteriormente. Os dispositivos foram mantidos imersos durante 4, 12, 24 e 48h, retirando-se dois dispositivos em cada um dos tempos de imersão. Após a retirada, os DGTs foram desmontados, sendo o nitrato de celulose e a poliacrilamida descartados. Os discos de levedura são então lavados e colocados em tubos de 15 mL vazios para posterior eluição, 1 dispositivo por tubo.



Figura 4 - Imersão dos dispositivos

4.8. Cálculo do coeficiente de difusão.

O coeficiente de difusão foi calculado segundo a eq. (6)

$$D = (a\Delta g) \cdot (C_A S)^{-1} \quad (6)$$

Onde **D** é coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); **a** é o coeficiente angular da reta definida pela relação massa do íon retida por unidade de tempo (ng s^{-1}); Δg é a espessura do agente difusivo (cm), **C_A** é a concentração do metal livre ou lábil na solução de imersão (mg L^{-1}) e **S** é a área do orifício da câmara (cm^2).

4.9. Efeito da Força Iônica na capacidade de ligação da *S. cerevisiae* Efetivo

Para o experimento que visou avaliar a influência da força iônica foram preparadas 4 soluções de 2 L de MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH 5,5 ajustado com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$). As soluções foram preparadas com as seguintes forças iônicas: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ – $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ – $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ – $0,0005 \text{ mol L}^{-1}$. Para o ajuste das forças iônicas das soluções de imersão foi utilizada solução de NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi mantida em constantemente sob agitação em incubadora a $23 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4) durante 24h para estabilização.

Após o período de estabilização, em cada uma das soluções foram imersos 3 dispositivos DGT preparados conforme procedimento descrito anteriormente, que ficaram imersos durante 6h, sendo todos retirados no final deste período. Após a retirada, os DGTs foram desmontados, sendo o nitrato de celulose e a poliacrilamida descartados. Os discos de levedura são então lavados e colocados em tubos de 15 mL vazios para posterior eluição, 1 dispositivo por tubo.

4.10. Efeito do pH na capacidade de ligação da *S. cerevisiae*

Para o experimento que visou avaliar a influência do pH foram preparadas 4 soluções de 2 L de MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Força iônica $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada com NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$). As soluções foram preparadas com os seguintes pH: 3,5 – 5,0 – 6,5 – 8,5. Para o ajuste do pH das soluções de imersão foram utilizadas soluções de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi mantida em constantemente sob agitação em incubadora a $23 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4) durante 24h para estabilização.

Após o período de estabilização, em cada uma das soluções foram imersos 3 dispositivos DGT preparados conforme procedimento descrito anteriormente, que ficaram imersos durante 6h, sendo todos retirados no final deste período. Após a retirada, os DGTs foram desmontados, sendo o nitrato de celulose e a poliacrilamida

descartados. Os discos de levedura são então lavados e colocados em tubos de 15 mL vazios para posterior eluição, 1 dispositivo por tubo.

4.11. Teste de Interferentes

Para avaliar a influência de interferentes na retenção de MeHg pela *S. cerevisiae* foram conduzidas imersões dos dispositivos *S. cerevisiae* + poliacrilamida em soluções de Mn, Cu, Zn, Fe, Pb e Cd. As imersões ocorreram durante 6h em soluções de 1L de MeHg $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (pH = 5,0; Força Iônica = NaNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com cada um dos elementos (Mn, Cu, Zn e Fe = $100 \mu\text{g L}^{-1}$; Pb Cd = $1000 \mu\text{g L}^{-1}$). A determinação da concentração dos interferentes foi feita por Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES).

4.12. Teste de Especiação

Foram realizados três experimentos utilizando-se diferentes dispositivos na tentativa de obter a especiação do mercúrio.

No Teste 1 foram preparadas 3 soluções de 3 L cada: Hg^{2+} ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+}), MeHg ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg) e Mistura ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg). As soluções foram mantidas em incubadora a 23°C . O pH (5,0) e a força Iônica ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl) foram mantidos para as três soluções. Foram imersos três dispositivos DGT montados com *S. cerevisiae* + poliacrilamida. Os dispositivos ficaram imersos por um período de 6 horas. Após este período os dispositivos foram retirados, desmontados e os ligantes seguiram então para o procedimento de eluição, conforme descrito no relatório anterior.

O teste 2 seguiu o procedimento realizado no Teste 1, com exceção do ajuste da força Iônica. Neste experimento, a Força Iônica foi ajustada para $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 (removendo o NaCl da solução). Esta modificação foi realizada uma vez que verificou-se que nesta concentração de NaCl, o mercúrio liga-se ao Cl, formando uma molécula aniônica (BOSZKE et al, 2002), podendo levar assim, à resultados distorcidos. Levando-se este fato em consideração, para todos os experimentos subsequentes, a força Iônica foi ajustada com NaNO_3 .

No Teste 3 os dispositivos foram imersos por 4h. Foram preparadas 3 soluções de 3 L cada: Hg^{2+} ($75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+}), MeHg ($75 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg) e Mistura ($75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} + $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeHg). As soluções foram mantidas em incubadora a 23 °C. O pH (6,5) e a força iônica ($0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_3$) foram mantidos para as três soluções. Neste experimento foram imersos dois dispositivos DGT montados com *S. cerevisiae* + poliacrilamida.

Nos experimentos com mercúrio, verifica-se uma grande diminuição da concentração do elemento no momento final da imersão em relação ao momento do preparo da solução devido à adsorção do elemento à superfície dos recipientes e dispositivos. Na tentativa de minimizar as dificuldades causadas por este efeito, todos os dispositivos (apenas pistão e capa, sem os discos) e suportes foram mantidos imersos nas suas respectivas soluções durante 24h. Após este período, os materiais são retirados das soluções, os dispositivos são montados e a imersão é realizada. Este procedimento minimiza as diferenças entre concentração do mercúrio no momento inicial e final da imersão dos dispositivos, permitindo-se assim, uma quantificação mais precisa do analito.

4.13. Determinação de MeHg por CV-AFS

. Para a determinação de MeHg foi utilizado o espectrômetro de fluorescência atômica equipado com detector de Hg Merlin. O gás de arraste e de secagem utilizado foi o argônio. Para a determinação do MeHg e do Hg^{2+} nos experimentos conduzidos foi utilizado o espectrômetro de fluorescência atômica equipado com detector de Hg Merlin. O gás de arraste e de secagem utilizado foi o argônio.

A geração de vapor frio foi montada utilizando-se o cloreto estanoso (SnCl_2) 2% m/v para a redução do Hg (II) e reagente branco preparado conforme procedimento descrito no manual PS Analytical (PS Analytical, 2002).

Todas as medidas utilizadas foram baseadas nas leituras relativas à altura de pico.

4.14. Condições de operação do CV-AFS

A Tabela 03 apresenta os principais parâmetros utilizados nas análises pelo CV-ICP-OES.

Tabela 03 - Condições de operação do CV-AFS

Condições de Operação CV-AFS	
Vazão do gás de arraste (Ar)	0,3 L / min
Vazão do gás de secagem (Ar)	2,5 L / min
Vazão do branco/amostra	5,6 mL / min
Vazão do redutor	2,8 mL / min
Ganho	10
Delay time	15 s
Analysis time	30 s
Memory time	20 s

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curvas de Imersão

As figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, as curvas de imersão, em solução de MeHg, durante 48 e 6 horas. Os dados estão expressos em relação massa retida / concentração da solução (M/C) em função do tempo de imersão. Este experimento foi realizado com dispositivos DGT utilizando a *S. cerevisiae* imobilizada em agarose (gel ligante) e a poliacrilamida (gel difusivo). Uma vez que houve uma pequena variação na concentração das soluções de imersão, preferiu-se expressar os dados utilizando-se a curva de massa retida/concentração da solução em função do tempo de imersão, ao invés da curva de massa retida em função do tempo de imersão comumente utilizada, permitindo assim uma normalização dos dados considerando a variação da concentração da solução. Esta variação da concentração da solução de imersão, encontrada em imersões em laboratório, principalmente, para soluções de mercúrio, não é um problema prático, pois não ocorre em imersões *in situ*.

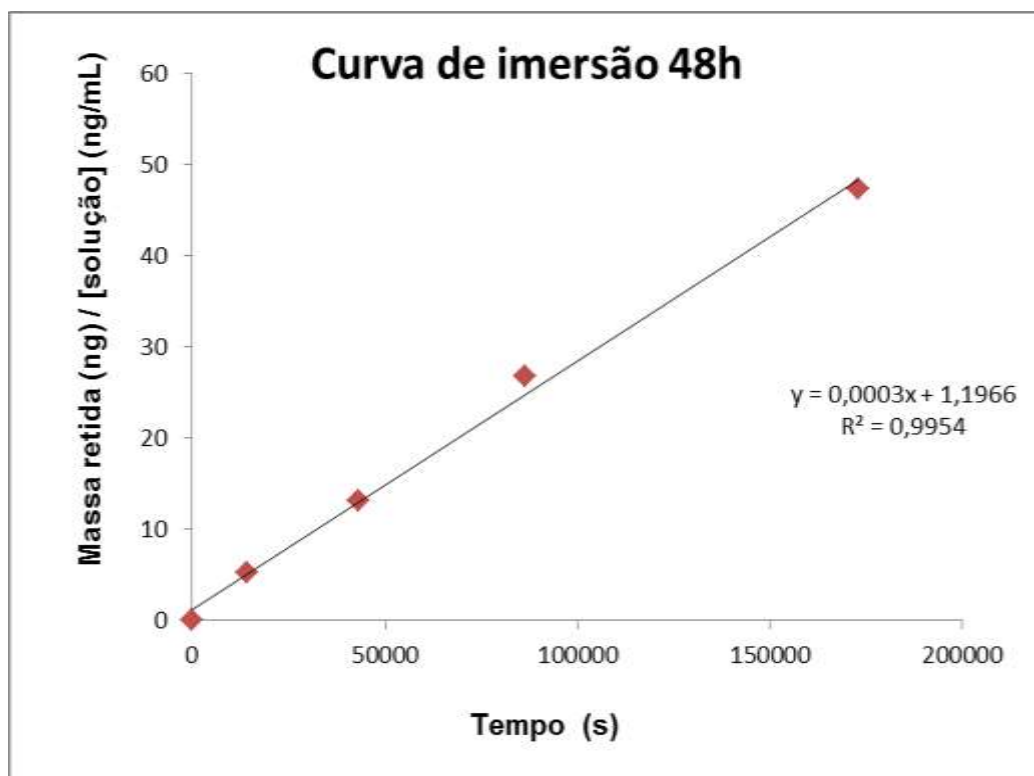


Figura 5 - Curva de imersão 48h (MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$; pH 5,5; FI $0,05 \text{ mol L}^{-1}$)

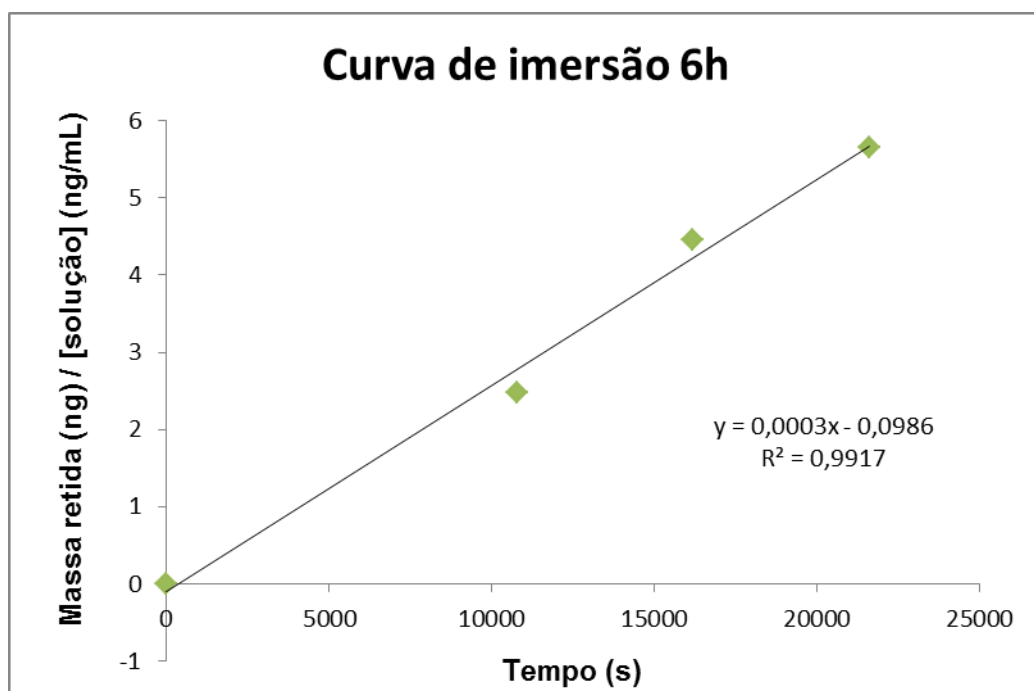


Figura 6 - Curva de Imersão 6h (MeHg $100 \mu\text{g L}^{-1}$; pH 5,5; FI $0,05 \text{ mol L}^{-1}$)

A retenção do analito foi significativa (média de 75,03 ng MeHg h⁻¹) e linearidade da relação M/C em função do tempo foi bastante alta ($R^2 = 0,9954$ e $0,9917$ para as imersões longa e curta, respectivamente), evidenciando que o MeHg é quantitativamente retido pelos discos de *S. cerevisiae* imobilizada em agarose e confirmam a possibilidade de utilização do material proposto na técnica de DGT para a determinação de MeHg em sistemas aquáticos. Os valores dos coeficientes de difusão obtidos na imersão longa e curta foram de $8,08 \pm 0,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $7,91 \pm 0,51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (23 °C), respectivamente. Os dois valores não apresentam diferença significativa entre si e ambos estão próximos àquele obtido por Pelcova et al, 2014 ($9,6 \pm 0,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Os valores obtidos também são superiores em relação a outros experimentos com MeHg e DGT realizados anteriormente (5 – 5,26 $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (GAO et al, 2014; CLARISSE e HINTELMANN, 2006; CLARISSE et al, 2009; HONG et al, 2011))

As determinações usando CV-AFS foram caracterizadas por um limite de detecção instrumental de 8,1 ng mL⁻¹ ($LD = 3 \times SD_{\text{branco}}$). Considerando um fator de pré concentração de 8,43, obtido com imersões de 48 horas, pode-se estimar um limite de detecção para a associação da DGT com AFS-CV de 0.96 ng mL⁻¹. Estes valores evidenciam a possibilidade de aplicação da técnica para a determinação quantificação do analito em concentrações muito baixas.

5.2. Coeficiente de Difusão *S. cerevisiae*

Os experimentos subsequentes demonstraram uma pequena variação nos valores do coeficiente de difusão. Sendo assim, foi estabelecido um novo valor para o mesmo, levando em conta o valor médio e a variação do mesmo em todos os experimentos. A Tabela 4 exibe os valores do coeficiente de difusão obtidos em cada experimento.

Tabela 04 - Coeficientes de Difusão (D) determinados nos diferentes experimentos realizados no laboratório. Curvas de imersão, efeitos do pH e força iônica e estudos de especiação

Expe rimento	D 23°C (cm² 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

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 °C. Este resultado está próximo aos valores obtidos em trabalhos anteriores de determinação de MeHg pelo DGT (Tabela 05).

Tabela 05 - Coeficientes de difusão obtidos em trabalhos anteriores

Trabalho	D (cm² s⁻¹)
CLARISSE e HINTELMANN, 2006	5,0 x 10 ⁻⁶
GAO et al 2014	5,1 ± 0,2 x 10 ⁻⁶
PELCOVA et al 2014	9,6 ± 0,3 x 10 ⁻⁶
FERNÁNDEZ-GÓMEZ, 2014	3,15 x 10 ⁻⁶
	2,68 x 10 ⁻⁶
Média	5,1 x 10⁻⁶
Desvio padrão	0,27 x 10⁻⁶

5.3. Efeito da Força Iônica na capacidade de ligação da *S. cerevisiae*

Os resultados sobre a influência da Força Iônica e do pH na capacidade de retenção da *S. cerevisiae* imobilizada em agarose para o MeHg foram apresentados normalizados em função do pH 5,0 e da Força Iônica = 0,005 mol L⁻¹ NaCl. Os dados foram expostos desta forma uma vez que estes parâmetros foram definidos como os ideais de aplicação do método e foram aqueles utilizados na maioria dos experimentos subsequentes. Os dados expostos na sequência utilizam o coeficiente de difusão médio dos experimentos ($7,03 \pm 0,77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). As figuras 7 e 8 demonstram respectivamente a influência do pH e da Força Iônica na capacidade de retenção da *S. cerevisiae* imobilizada em agarose para MeHg.

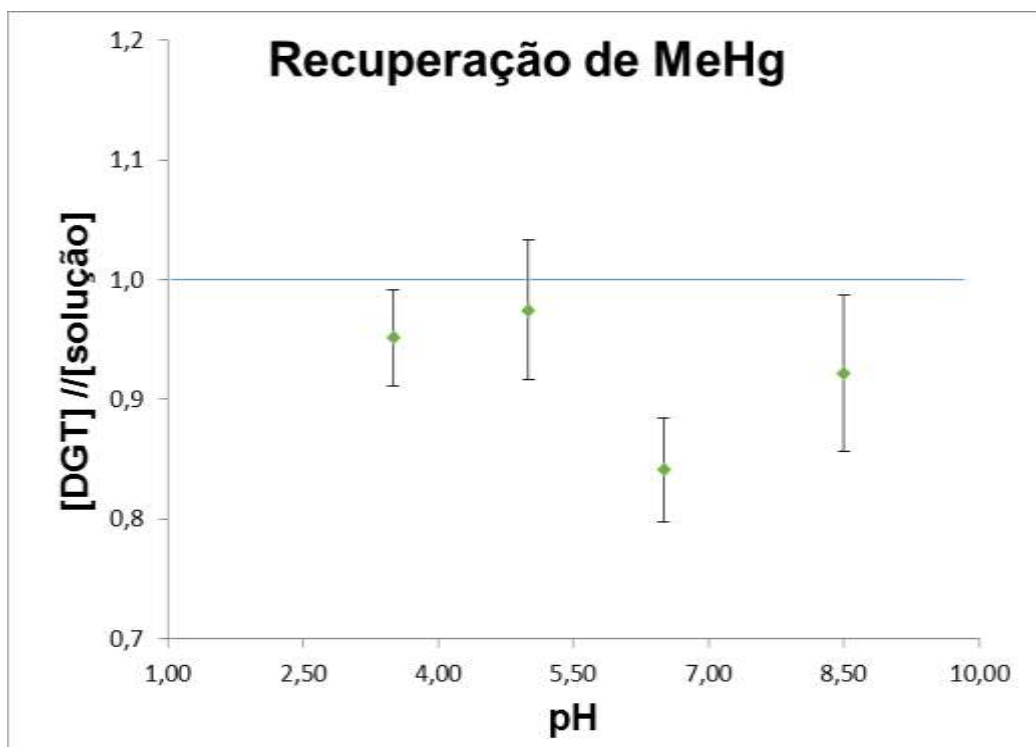


Figura 7 - Efeito dos diferentes pH testados na capacidade de ligação da *S. cerevisiae* (MeHg = 100 µg L⁻¹; força iônica = 0,05 mol L⁻¹ NaCl)

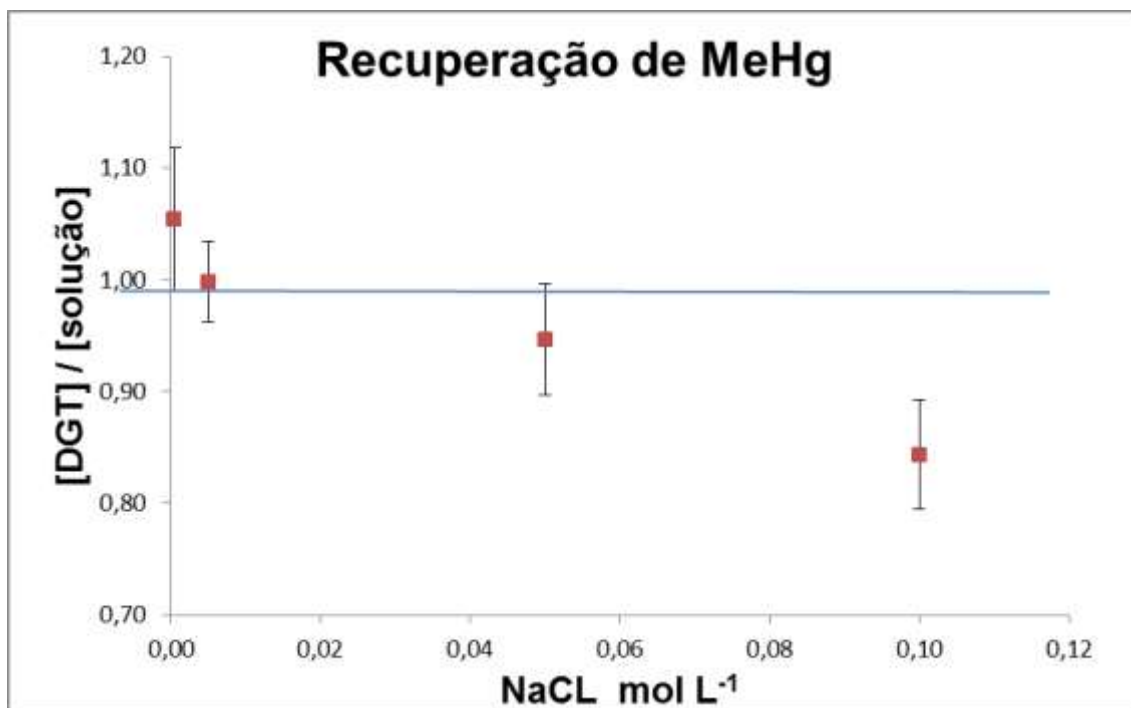


Figura 8 – Efeito das diferentes forças iônicas testadas na capacidade de ligação da *S. cerevisiae* (MeHg = 100µg L⁻¹. pH = 5,0)

Foi verificada uma baixa influência do pH e da Força Iônica na capacidade de retenção do ligante. Os valores de pH testados demonstraram recuperações de 84 a 98%, enquanto as Forças Iônicas testadas demonstraram recuperações de 84 a 105%. Estes valores evidenciam a capacidade de aplicação do método em uma larga faixa de pH e Força Iônica.

5.4. Teste de interferentes

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos no teste para avaliação do potencial de interferência do Mn, Cu, Zn, Fe, Pb, Cd, na retenção de MeHg pelo ligante *S. cerevisiae*.

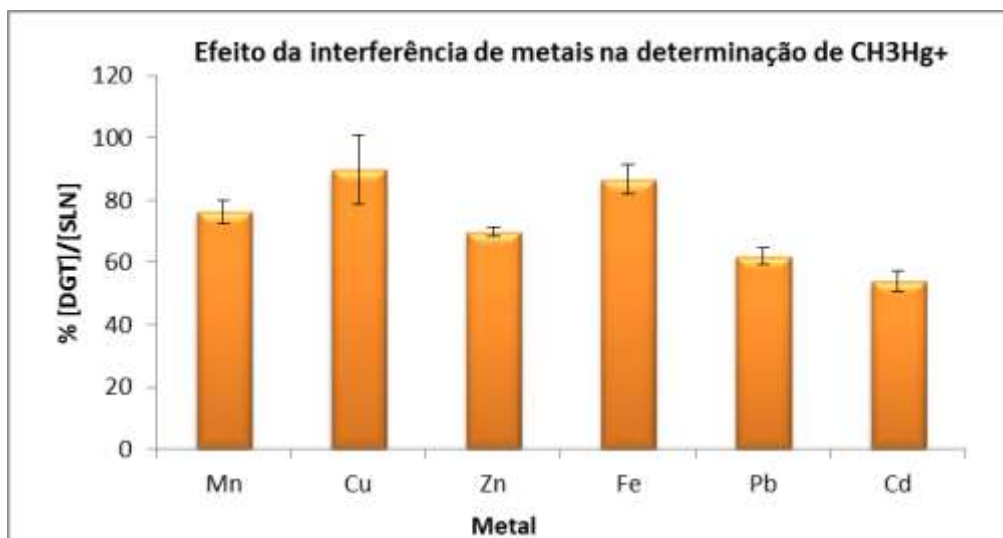


Figura 9 - Efeito da interferência de Mn, Cu, Zn, Fe, Pb e Cd na retenção de MeHg pelo ligante *S. cerevisiae*

As recuperações de MeHg obtidas no experimento (70-87%) demonstram baixa interferência do Mn, Cu, Zn e Fe na retenção do analito pelo ligante. Em relação ao Pb (62 ± 5 %) e ao Cd (54 ± 6 %), foi verificada recuperações abaixo do esperado, indicando influência destes elementos na retenção de MeHg pela *S. cerevisiae*. É provável que estes elementos, por estarem em concentração mais alta que o MeHg, estejam competindo fortemente pelos sítios de ligação da levedura, uma vez que o ligante já foi utilizado com sucesso para a determinação dos dois elementos (PESCIM et al, 2012; MENEGARIO et al, 2010)

5.5. Testes de Especificação

A Tabela 06 exibe os resultados obtidos nos testes de especificação realizados no período.

Tabela 06 - Recuperações dos analitos pelos ligantes nos testes de especiação

Teste	[Sol] Hg ²⁺ (µg L ⁻¹)	[DGT] Hg ²⁺ (µg L ⁻¹)	[Sol] MeHg (µg L ⁻¹)	[DGT] MeHg (µg L ⁻¹)	[Sol] Hg ²⁺ + MeHg (µg L ⁻¹)	[DGT] Hg ²⁺ + MeHg (µg L ⁻¹)
T1	30,5 ± 6,5	0,06 ± 0,03	29,3 ± 1,3	16,2 ± 0,7	50,4 ± 1,2	18,5 ± 2,0
T2	16,5 ± 5,3	0,2 ± 0,04	30,7 ± 7,3	27,7 ± 4,6	67,5 ± 1,0	33,4 ± 5,7
T3	23,5 ± 3,9	0,01 ± 0,01	76,6 ± 4,8	73,4 ± 7,1	87,6 ± 3,5	64,0 ± 4,0

T1 = Teste 1; T2 = Teste 2; T3 = Teste 3

Os resultados obtidos com a *S. cerevisiae* demonstraram baixíssima retenção de Hg²⁺ (< 1,0%) pelo ligante em todos os 3 testes realizados. A recuperação de MeHg no teste 1 ficou abaixo do valor esperado. Este resultado justifica-se pelo fato de, neste experimento, as amostras não terem sido centrifugadas antes da leitura, havendo muita matriz no sobrenatante das amostras, levando a uma supressão no sinal na hora de leitura. Nos demais testes os resultados mostraram-se positivos (recuperações acima de 90%), evidenciando a seletividade dos dispositivos propostos, confirmando os resultados obtidos anteriormente.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam a eficiência da *S. cerevisiae* como agente ligante seletivo para o MeHg na técnica DGT, permitindo a sua utilização de forma eficiente em uma ampla gama de condições. A seletividade do dispositivo para o MeHg em relação ao Hg²⁺ evidenciam ainda a possibilidade de utilização futura dos dispositivos propostos em estudos de especiação de mercúrio.

7. REFERÊNCIAS

- BAG, H.; LALE, M.; TURKER, A. R. Determination of Cu, Zn and Cd in water by FAAS after preconcentration by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized on sepiolite. **Analytical Chemistry**, 363, 224-230, 1999.
- BAG, H.; LALE, M.; TURKER, A. R. Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite. **Talanta**, 47, 689-696, 1998.
- 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**, vol.30, No. 2, 323-326. 2007.
- BISINOTI, M.C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quím. Nova**, vol.27, n.4, 593-600, 2004.
- CATTANI, I. et al. Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP–MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films. **Talanta**, 74, 1520-1526, 2008
- 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
- 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.; FUCHER, D.; HINTELMANN, H. Methylmercury speciation in the dissolved phase of a stratified lake using the diffusive gradient in thin film technique. **Environmental Pollution**, 157, 987-993 2009.
- CLARISSE, O.; HINTELMANN, H. Measurements of dissolved methylmercury in natural waters using diffusive gradients in thin film (DGT). **Journal of Environmental Monitoring**, 8, 1242-1247, 2006.

- COLAÇO, C. D. **Determinação da fração lábil de mercúrio em águas fluviais**. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2012.
- COLAÇO, D.C.; YABUKI, L. N. M.; ROLISOLA, A.M.; MENEGARIO, A. A.; ALMEIDA, E.; SUÁREZ, C. A.; GAO, Y.; CORNS, W.T.; FILHO, V. F. M. Determination of mercury in river water by diffusive gradients in thin films using P81 membrane as binding layer. **Talanta**. 129, 417-421, 2014.
- DAHLQVIST, R. et al. Performance of the diffusive gradients in thin films technique for measuring Ca and Mg in freshwater. **Analytica Chimica Acta**, 460, 247-256, 2002.
- DAVISON, W.; ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, 367, 546-548, 1994.
- DIVIS, P.; SZKANDERA, R. e DOCEKALOVÁ, H. Characterization of sorption gels used for determination of mercury in aquatic environment by diffusive gradients in thin films technique. **European Journal of Chemistry**, 8(5), 1105-1109, 2010
- DOCEKALOVA H.; DIVIS P. Application of diffusive gradiente in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. **Talanta**, 65, 1174-1178, 2005.
- 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**, 85, 1452-1457, 2011.
- FERNÁNDEZ-GÓMEZ, C.; BAYONA, J. M.; DÍEZ, S. Comparison of diferente types of diffusive gradient in thin films samplers for measurement of dissolved methylmercury in freshwaters. **Talanta**. 129, 486-190, 2014.
- GAO, Y. et al. On-line preconcentration and in situ photochemical vapor generation in coiled reactor for speciation analysis of mercury and

- methylmercury by atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 26, 126-132, 2010.
- GAO, Y. et al. Synthesized mercaptopropyl nanoporous resins in DGT probes for determining dissolved mercury concentrations. **Talanta**, 87, 262-267, 2011.
 - GAO, Y.; CRAEMER, S.; BAEYENS, W. A novel method for the determination of dissolved methylmercury concentrations using diffusive gradients in thin films technique. **Talanta**. 120, 470-474, 2014
 - 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**, 64, 353–362, 2012.
 - GUMÁN-MAR, J. et al. Applicability of multisyringe chromatography coupled to cold-vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation analysis. **Analytica Chimica Acta**, 708, 11-18, 2011.
 - 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 CH₃Hg⁺ and Hg²⁺ in Oxidic Water. **Environmental Science & Technology**, 45, 6429-6436, 2011.
 - HORVAT, M. **Mercury - do we know enough?** In: EBDON L., PITTIS, L., CORNELIS, R., CREWS, H., DONART, O. F. X., QUEVAUVILLERS P. (Eds.), *In: Trace Elements Speciation for Environment Food and Health*, Bodmin, Cornwall UK, 2001, pp. 127-141.
 - KAERCHER, L. E. et al. Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell. **Spectrochimica Acta Part B**, 60, 705-710, 2005.
 - 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**, 99, 631-636, 2012.

- LI, W. et al. Diffusive gradients in thin films technique for uranium measurements in river water. **Analytica Chimica Acta**, 592, 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**, 20, 467-472, 2005.
- 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**, 67, 750-754, 1995
- MAQUIEIRA, A.; ELMAHADI, H. A. M.; PUCHADES, R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* in flow injection atomic absorption spectrometry for trace metal preconcentration. **Analytical Chemistry**, 66, 1462-1467, 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**, 683, 107-112, 2010.
- PELCOVA, P.; DOCEKALOVA, H.; KLECKEROVA, A. Development of the diffusive gradient in thin films technique for the measurement of labile mercury species in water. **Analytica Chimica Acta**, 819, 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. **Anal Bioanal Chem**, 404, 1581-1588, 2012
- PS ANALYTICAL. Millenium Merlin method for total mercury in drinking, surface, ground, industrial and domestic waste waters and saline waters. PS Analytica Ltda, 2002.
- STOICHEV, T. et al. Improvement of analytical performances for mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, 62, 433-438, 2004.

- SZKANDERA, R. et al. A Sorption Gel with Titanium Dioxide for Mercury Determination by the Technique of Diffusion Gradient in Thin Film. **Chemicke Listy**. 107, 160-164, 2013.
- TSENG, C.; HAMMERSCHMIDT, C. e FITZGERALD, W. Determination of ethylmercury in environmental matrixes by on-line flow injection and atomic Fluorescence Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 76, 7131-7136, 2004.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Mercury Study Report to the Congress**, EPA 452/R-97-0003, 1997.
- WANG, D.; LI, F. e YAN, X. On-line hyphenation of flow injection, miniaturized capillary electrophoresis and atomic fluorescence spectrometry for high-throughput speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, 1117, 246-249, 2006.
- WEINBERG, J. **Introducción a la Contaminación por Mercurio para las ONG**. In: Red Internacional para a Eliminación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (IPEN). 2010.
- WHATMAN Ltd. **Ion exchange papers**. Kent, UK, 2007-2009. Disponível em: <<http://www.whatman.com/IonExchangePapers.aspx>>. Acesso em: 21 de abril de 2013
- WU, H. et al. Non-chromatographic speciation analysis of mercury by flow injection on-line preconcentration in combination with chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 61, 831-840, 2006
- WU, L. et al. Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, 94, 146-151, 2012.
- YU, L. Cloud point extraction preconcentration 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**, 53, 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, Reino Unido, 67, 3391-3400, 1995.
- ZHANG, W. et al. Speciation of inorganic- and methyl-mercury in biological matrixes by electrochemical vapor generation from an L-cysteine modified graphite electrode with atomic fluorescence spectrometry detection. **Analytical Chemistry**, 84, 9199-9207, 2012.
- ZHOU, Y. et al. Novel silica sol-gel passive sampler for mercury monitoring in aqueous systems. **Chemosphere**. 90, 323-328, 2013