

Técnicas Analíticas para Determinação de Mercúrio Orgânico e Inorgânico e em Amostras Ambientais e Biológicas no LEMA/CETEM

Patrícia Correia de Araujo
Bolsista, Técnica Química

Zuleica Carmen Castilhos
Orientadora, Farmacêutica, D. Sc.

Resumo

O presente trabalho está dividido em quatro etapas, que resumem as atividades desenvolvidas para a determinação quantitativa das espécies de mercúrio, nas dependências do Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental (LEMA/CETEM) no período de jan/07 a nov/07: 1) desenvolvimento e otimização de técnicas de quantificação de mercúrio orgânico por Cromatografia Gasosa (CG) com detecção de captura de elétrons (ECD) em sangue de peixes; 2) controle de qualidade analítica para as técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica (CVAAS), Fluorescência Atômica (CFVAS) e Zeeman (ZAAS), utilizando músculo de peixe como matriz; 3) monitoramento de mercúrio gasoso por Espectrometria de Absorção Zeeman e 4) prestação de serviços analíticos.

O valor médio obtido para a amostra certificada (DORM 2) no trabalho de qualidade analítica para os métodos de CVAAS e CVAFS foi de 4,19 mg.k⁻¹, o que representa um erro absoluto de 9,7% do valor de referência (4,64mg.kg⁻¹). Para o método de ZAAS, o valor obtido foi de 4,60 mg.kg⁻¹, representando 0,86% de erro.

1. Introdução

A importância do estudo do mercúrio está relacionada principalmente aos danos que causa à saúde dos organismos vivos, e algumas de suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas são importantes sob o ponto de vista toxicológico, como: elevada pressão de vapor (0,00112 mmHg a 20°C), sua habilidade de ultrapassar as biomembranas, suas possibilidades reacionais “in vitro” e “in vivo” (oxidação com a formação de íons mercuriosos e/ou mercúricos; formação de compostos organomercuriais, etc.) (Moreira et. al., 1996).

Todas as formas químicas do mercúrio provocam alterações nos seres vivos, sendo que o mercúrio elementar e os compostos inorgânicos têm menor toxicidade que os organomercuriais. A metilação do mercúrio ocorre a partir da conversão das formas inorgânicas liberadas para o meio ambiente, mediada por processos biológicos, e é considerado como um dos seis elementos mais tóxicos presentes no meio ambiente. Os compostos organomercuriais podem atravessar membranas biológicas e fixar-se às proteínas através dos grupos sulfidríla (Boening, 2000; Cabañero, et. al., 2001). No sangue humano, o mercúrio derivado dos compostos organomercuriais se fixa, sobretudo, à hemoglobina (Komsta-Szumaska et al., 1983; Prasad et al., 1976), numa taxa significativa que pode atingir até 90% (Galvão e Corey, 1987; Swensson e Ulfarsson, 1963). A relação entre as concentrações eritrócito-plasma para o metilmercúrio é de cerca de 10 (Goyer, 1986) até 20 (Kershaw et al.,

1980; USEPA, 1997). Mais de 90% do mercúrio presente nos glóbulos vermelhos estão na forma metilada, enquanto no plasma, 25% do total estão na forma inorgânica (Bakir et al., 1973).

Nos ambientes aquáticos, o metilmercúrio apresenta os fenômenos de bioconcentração e de biomagnificação, sendo ampliado através da cadeia trófica. A permanência do MeHg nos peixes é relativamente alta, devido à lenta mobilização e o tempo de meia-vida ocorre em função das espécies, variando geralmente de um a três anos (Nascimento, 2001).

O principal meio de exposição humana ao MeHg dá-se através da dieta, onde é absorvido rapidamente e eliminado lentamente se comparado às outras formas mercuriais. Os peixes, frutos do mar e derivados representam a maior fonte de MeHg na alimentação.

A concentração de MeHg em peixes não deve ultrapassar 0,5 mg/kg de mercúrio total (WHO, 1990), sendo que, em média, 85% se encontra na forma de MeHg (Nascimento, 2001). O mecanismo pelo qual os peixes acumulam MeHg difere daquele observado para mercúrio inorgânico. Demonstrou-se que para peixes de aquário expostos a mercúrio inorgânico, o coeficiente de partição peixe-água foi de 5000-7000. Após a produção de MeHg na água, este coeficiente foi de 10000-22000 (Ikingura & Akagi, 1999).

Desta forma, técnicas de especiação química de traços de mercúrio em amostras biológicas são importantes, na medida que a toxicidade do metal não está somente relacionada à concentração, mas principalmente à sua forma química. Para projetos de pesquisa, os resultados apresentados pelas análises de HgT não são suficientes para a compreensão dos mecanismos de interação do metal em sua forma orgânica e a matriz em questão, servindo para estudos exploratórios, principalmente para monitoramento ambiental.

Vários métodos analíticos são utilizados para a quantificação das espécies de mercúrio e, são selecionados de acordo com a natureza da amostra e o nível de concentração de mercúrio esperado. Em geral, a determinação envolve os seguintes passos: coleta da amostra, pré-tratamento/preservação/estocagem da amostra, liberação do mercúrio da matriz, extração/purificação/pré-concentração, separação das espécies de mercúrio de interesse e quantificação (Horvat, 1996).

Quanto à detecção instrumental, a maioria dos métodos para a quantificação de mercúrio total são baseados na medida de absorção do mercúrio na faixa de ressonância de 253,7 nm. Os limites de detecção dependem basicamente da técnica de transferência do mercúrio presente nas amostras para a fase gasosa, o que é obtido por decomposição térmica ou por redução química.

A espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS) é, atualmente, o método mais comum de análise. Os íons do metal são primeiramente reduzidos à forma elementar e carregados por um gás até o caminho ótico, onde os átomos sofrem interação com a radiação. Devido à volatilidade apresentada pelo mercúrio elementar, não necessita da utilização de chama, daí a denominação "vapor frio".

A espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS) consiste na detecção do sinal de fluorescência emitido pelo mercúrio. Os átomos de mercúrio são excitados do estado fundamental, 1S_0 , para o estado excitado,

3P_1 , por uma radiação de comprimento de onda de 253,7 nm. O mercúrio é considerado um bom elemento para a fluorescência porque absorve e emite no mesmo comprimento de onda. Este método é considerado mais sensível para a determinação do mercúrio do que a CVAAS, pois a detecção da energia emitida é feita perpendicularmente ao feixe de luz incidente, sendo medido com relação ao sinal de valor zero, e não como uma pequena variação de um sinal intenso, como no caso da CVAAS.

Para a determinação de mercúrio total, tanto por CVAAS quanto por CVAFS, os compostos de mercúrio são normalmente convertidos a íons Hg^{+2} com uma mistura fortemente ácida. Posteriormente, o Hg^{+2} é reduzido a Hg^0 através de uso de $NaBH_4$ ou $SnCl_2$ (Micaroni et. al., 2000).

Matrizes sólidas contendo mercúrio também podem ser decompostas termicamente, e o metal quantificado através de espectrometria de absorção atômica Zeeman (ZAAS) pela conversão dos átomos a Hg^0 através de pirólise da amostra a 800°C. A concentração é medida pelo sinal na faixa de absorção de 253,7 nm. As interferências espectrais são anuladas devido à correção de background Zeeman.

Para a especiação do mercúrio, geralmente, os métodos envolvem separação por cromatografia gasosa (CG) ou líquida (CL). Um dos métodos de cromatografia gasosa é baseado na digestão alcalina da amostra, lavagem do extrato com n-hexano e complexação do MeHg com ditizona na forma de ditizonato de metilmercúrio/tolueno. A determinação é feita com detector de captura de elétrons (Akagi, 2004).

No presente trabalho, para as atividades desenvolvidas utilizou-se a técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica com vapor frio (CVAAS), Espectrometria de Fluorescência Atômica com vapor frio (CVAFS) e Espectrometria de Absorção Atômica Zeeman (ZAAS), para determinação de mercúrio total. Para a quantificação de metilmercúrio, utilizou-se a separação por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. As duas determinações de mercúrio, total e metilmercúrio, são baseadas na metodologia desenvolvida por Akagi (2004).

2. Materiais e métodos

2.1) Implantação e otimização da técnica de Cromatografia Gasosa para determinação de metilmercúrio em amostras de sangue de peixe

Esta atividade consistiu na implantação da metodologia de determinação de metilmercúrio em amostras biológicas baseada no método Akagi (2004). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso (CG) com detector de captura de elétrons (ECD) da marca Yanaco, série G 6800.

As amostras de sangue (~0,5g) foram digeridas em banho-maria por 1 hora a 100°C com 10mL de solução alcalina de KOH em etanol. O extrato, após resfriamento a temperatura ambiente foi acidificado com ácido clorídrico 1N e lavado com n-hexano. Depois da remoção da camada orgânica, o MeHg foi extraído com 10 mL de solução purificada de ditizona em tolueno a 0,05%. O excesso de ditizona da solução metilmercúrio-tolueno foi eliminado por duas lavagens sucessivas de NaOH 0,1N. Desta solução foram retirados 5 mL que foram purificados com solução de 0,01% de sulfeto de sódio (Na_2S) em NaOH 0,1 N - Etanol (1:1). O excesso de íons

sulfeto presentes na solução contendo o MeHg foi eliminado através de borbulhamento com N₂ durante 3 minutos e 3 gotas de HCl 1N. Após, adicionou-se solução tampão de acetato de sódio (pH 3) e reextraiu-se o MeHg da camada inorgânica com 0,5 mL de ditizona 0,05%. Após duas lavagens de NaOH 1N para retirar o excesso de ditizona da solução, o extrato de ditizonato de metilmercúrio-tolueno foi injetado no CG-ECD. A coluna utilizada foi de vidro de 3,0 mm x 0,75 m, e empacotada com 10% KOCL-Hg sobre Chromosorb W (AW-DMCS, 60-80 mesh, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).

Condições Cromatográficas:

- Temperatura da coluna: 160°C
- Temperatura do injetor: 180°C
- Temperatura do detector: 200°C
- Gás de arraste: N₂ ultrapuro – 30-40mL- min

2.2) Controle Interno de Qualidade Analítica

Para a atividade que visou o controle de qualidade das análises executadas no LEMA, testou-se as técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica com vapor frio (CVAAS), com o equipamento Automatic Mercury Analyser, marca K.K. Sanso S.S., Espectrometria de Fluorescência Atômica com vapor frio (CVAFS), com o equipamento CVFS-2 Mercury Analyser, marca Brooks Rand, e a Espectrometria de Absorção Atômica Zeeman (ZAAS), utilizando o Portable Zeeman Mercury Analyser, marca Lumex, para determinação de mercúrio total em amostras de peixes.

Utilizou-se amostras do músculo de 12 peixes procedentes da Bacia do Rio Tapajós, adquiridas em dois mercados populares de Itaituba, PA: piranha, pintado, cachorro, filhote, dourada, traíra, pescada, tucunaré, tambaqui, sarda, curimatá e pacu.

Os músculos dos peixes foram limpos e picados de forma homogênea. Após, as amostras foram pesadas

(~ 0,5g) e digeridas em mistura de ácidos nítrico, perclórico e sulfúrico, na proporção 1:1:5, e aquecidos a 230°C por 20 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as concentrações das soluções foram determinadas pelos métodos de CVAAS e CVAFS, utilizando solução de cloreto estânico a 10% em meio clorídrico para redução da espécie Hg⁺² a Hg⁰. O cálculo foi realizado através de interpolação das alturas dos picos das amostras em curva de padrão de nitrato de mercúrio para ambos equipamentos. Para a certificação dos resultados encontrados, utilizou-se a amostra de referência DORM 2 – Dogfish Muscle – NRCC (valor certificado – 4,64 mg.kg⁻¹). O limite de detecção para as técnicas de CVAAS e CVAFS é de 10ng/g e de 0,8ng/g, respectivamente.

Para a determinação da concentração através de ZAAS, as amostras (~20mg) foram introduzidas no acessório de pirólise do equipamento e decompostas à 800°C. As concentrações foram medidas através de curva de calibração feita a partir de amostra certificada (DORM 2). O limite de detecção para esta técnica é de 0,5 ug/kg.

2.3) Monitoramento de mercúrio gasoso na atmosfera

O equipamento utilizado para determinação de mercúrio total em amostras biológicas e ambientais (ZAAS-Lumex), também possibilita a determinação de mercúrio na atmosfera, com limite de detecção de 0,5 ng/m³.

Durante o período de 24.09 a 07.10.07 realizou-se monitoramento ambiental no município de Paulínia (Campinas-SP) em dois pontos de coleta para a verificação de possíveis emissões de mercúrio gasoso de uma empresa de reciclagem de lâmpadas fluorescentes. Foram realizadas amostragens do ar ambiente num intervalo de 10 segundos cada, e as concentrações de mercúrio gasoso foram determinadas em tempo real. A média de monitoramento foi de 12 horas diárias, totalizando 93300 determinações. Esta atividade, possibilitou a capacitação técnica do LEMA para a análise em questão.

2.4) Prestação de Serviços

A prestação de serviços externo e interno foi conduzida paralelamente aos trabalhos acima relacionados, utilizando as técnicas para a determinação de mercúrio já citadas.

3. Resultados e Discussões

3.1) Implantação e otimização da técnica de Cromatografia Gasosa para determinação de metilmercúrio em amostras de sangue de peixe

O propósito desta análise, neste primeiro momento não foi a quantificação do metilmercúrio na amostra de sangue de peixe, e sim o comportamento da matriz durante os passos de digestão, *clean-up*, e verificação da resposta do sistema de detecção; etapas estas, que foram, plenamente satisfatórias.

3.2) Controle Interno de Qualidade Analítica

Os resultados obtidos no controle de qualidade analítica mostram que as técnicas utilizadas para determinação de mercúrio total na matriz pesquisada (peixe), apresentam pouca diferença entre as concentrações, como mostra a figura 1. Para a amostra de controle, DORM 2, o valor médio obtido para os métodos de CVAAS e CVAFS foi de 4,19 mg.k⁻¹, o que representa um erro absoluto de 9,7% do valor de referência (4,64 mg.kg⁻¹). Para o método de ZAAS, o valor obtido foi de 4,60 mg.kg⁻¹, representando 0,86% de erro.

Estes resultados não procuram correlacionar concentração de mercúrio total com as espécies analisadas, o que necessitaria de outros dados relativos à matriz, como: tamanho, amostragem representativa, idade, entre outros.

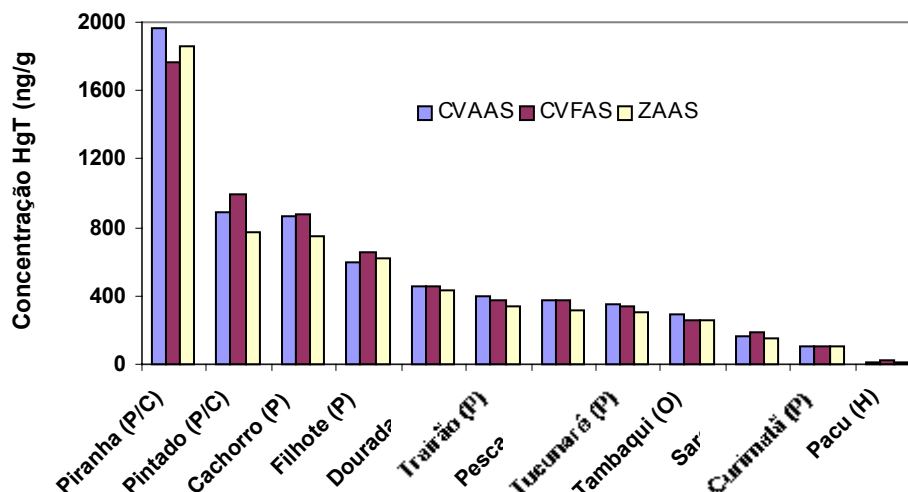


Figura 1. Comparação de metodologia analítica para HgT (ng/g) em peixes piscívoros(p), onívoros e carnívoros(c)

3.3) Monitoramento de mercúrio gasoso na atmosfera

Pelos dados obtidos na realização desta atividade (Tabela 1), observou-se que as concentrações mínimas (0,5 ng/m³) mantiveram-se estáveis quando comparadas ao ano de 2006, ao passo que as concentrações máximas (84,3 e 173,57 ng/m³) sofreram um aumento significativo em relação ao mesmo ano. Todavia, em termos de concentração média, houve redução de cerca de quatro vezes (~4,0ng/m³) com menor variabilidade entre os valores (menor desvio padrão) em 2007 do que no ano anterior, em ambos os pontos de amostragem. Os valores das medianas também acompanham a redução dos índices de concentração, comparativamente ao ano de 2006.

Não foi possível correlacionar a contribuição de emissões provenientes dos processos de reciclagem de lâmpadas e resíduos de mercúrio da empresa com a concentração de mercúrio na atmosfera para o ambiente em estudo. É importante observar que a direção dos ventos durante o monitoramento foi predominantemente contrário às estações de coleta, e que não foi possível estabelecer correlação entre os teores e as condições meteorológicas. O que se pode observar nitidamente é uma acentuada diminuição anual dos índices de Hg gasoso presentes nos pontos de amostragem para as concentrações médias, ainda que altos teores máximos tenham sido detectados (84,3 e 173,57 ng/m³). Avaliando-se os resultados obtidos neste trabalho e no estudo pretérito de Michelazzo (2003), verificou-se que as concentrações médias de mercúrio gasosos são condizentes com as concentrações encontradas em áreas próximas às fontes de emissão, indicando que estas áreas sofrem influência de fontes antrópicas. Michelazzo (2003) sugere que estas fontes poderiam, inclusive, ser do tipo difuso, provenientes de emissões de solos e/ou veiculares. A autora acredita que não somente a área industrial

de Paulínia seja responsável por estes resultados, mas também o distrito industrial de Campinas e fontes difusas.

Tabela 1. Comparação entre as concentrações máximas, mínimas e médias de mercúrio gasoso (ng/m³) nos monitoramentos anteriores (Jul/Ago) de 2003, 2005 e 2006 e, no presente trabalho (Set/Out 2007).

Pontos de monitoramento	Mercúrio gasoso (ng/m ³)			
	Conc. Min.	Conc. Max.	Media ± DP	Mediana
P1 (2006)	<1	49,8	11,0 ± 13,2	6,2
P2 (2006)	<1	60,5	12,4 ± 10,6	10,1
P1 (2007)	0,5	84,3	3,91 ± 1,77	3,66
P2 (2007)	0,5	173,57	3,85 ± 2,22	2,66

3.4) Prestação de Serviços

A prestação de serviços internos e externos seguiu paralelamente aos trabalhos acima citados. A Tabela 2 apresenta qualitativamente as análises realizadas pelo LEMA no ano de 2007, e as quantifica.

Tabela 2. Análises realizadas no LEMA, no período de janeiro “a novembro de 2007

Equipamento	Número de Análises
CVAAS	813
CVFAS	128
ZAAS	1587
Total de análises HgT	2000 + 93.000 (monitoramento ambiental)
CG-ECD	190

4. Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Capacitação Institucional (PCI-CnPq) pela bolsa concedida, ao Centro de Tecnologia Mineral pela estrutura laboratorial; ao staff da Coordenação de Planejamento, Acompanhamento e Avaliação (CPAA), em especial a Dra. Zuleica Castilhos e Sílvia Egler pela confiança e credibilidade concedida a mim; a Antonieta Middea e Tatiana Vianna; e a Jorge Luis Florindo pelo profissionalismo desempenhado no trabalho de monitoramento de Paulínia.

5. Referências Bibliográficas

- Akagi, H. **Mercury Analysis Manual** – Ministry of the Environmental, Japan, 2004.
- AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do Mercúrio**. 1ed. São Paulo: Inter Tox, 2003. p.122-123.
- BAKIR, F. ET AL. Methylmercury poisoning in Iraq. An interuniversity Report. **Science**, v. 181, p. 230-241, 1973.
- BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v.40, p. 1335-1351, 2000.
- CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÂMARA, C. Effect of animal feed enriched with Se and clays on Hg bioaccumulation in chickens: In Vivo Experimental Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53. p. 2125-2132, 2005.
- GOYER, R.A. Efeitos tóxicos dos metais. In: KLAASSEN, C.D.; WATKINS III, J.B. **Toxicologia a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**. 5ª. ed. Editora Mcgraw-Hill de Portugal Ltd., 2001, p. 603.
- GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI,S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN,N.; DAHL, R.; JORGENSEN,P.J. Cognitive deficit in 7 year old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and teratology*, v. 19, n.6, p. 417-428, 1997.
- KERSHAW, T.G.; DHAHIR, P.H.; CLARKSON, T.W. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. **Arch. Environ. Health**, v. 35, p. 28-36, 1980.
- KOMSTA-SZUMSKA, E.; CZUBA, M.; REUHL, K.R.; MILLER, D.R. Dimethylation and excretion of methylmercury by the guinea pig. **Environ. Res.**, v.32, n. 2, p. 247-257, 1983.
- HORVAT, M. In *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balance*, 1996, p 1.
- IKINGURA, J. R.; AKAGI, H. Methylmercury production in aquatic systems. **Sci. Total Environ.**, v. 234, n.1-3, p. 109-118, 1999.
- MICARONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M.S.; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte – Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – UNICAMP, 2000.
- MICHELAZZO, P. A. M. **Monitoramento das Concentrações de Mercúrio Gasoso e Particulado na Atmosfera da Região de Paulínia (SP)**. 2003. 64p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP (Brasil).
- MOREIRA, J.C.; PIVETTA, F.R.; KURIYAMA, G.S.; BARROCAS, P.R.; NICOLA, F.L.G.; ROSA, F.C.G.; JACOB, S.C. **A presença de mercúrio em casa constitui um risco de contaminação humana e/ou ambiental? Relato de um caso.**- Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana

(CESTEH) – Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) – Fundação Osvaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), 1996.

- NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A.A.M. **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2001.
- PRASAD, A.S.; OBERLEAS, D. Trace elements in human health and disease. New York: Academic Press, v. 2, p. 453-475, 1976.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; **Mercury study report to Congress**. V. 5 : Health effects of mercury and mercury compounds, 1997.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals**. Report of a WHO study group inorganic mercury – (Tech. Rep. Ser. 647). Genève, WHO, 1980.