

# Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes

## Determination of mercury and methylmercury in fish and hair samples

RIALA6/1243

Luciana Aparecida FARIAS<sup>1</sup>\*, Déborah Inês Texeira FÁVARO, Marina Beatriz Agostini VASCONCELLOS

\*Endereço para correspondência: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP

Recebido: 05.06.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

### RESUMO

A Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS) está entre os métodos mais utilizados atualmente para a determinação de mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg) em materiais biológicos devido a vantagens, tais como: facilidade de operação, rápida resposta analítica, boa sensibilidade e baixo custo. Neste estudo apresentam-se os resultados obtidos no programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005. A precisão e a exatidão do método para determinação de Hg e MeHg foram verificadas por meio da análise de materiais de referência com valores certificados para ambos. Os resultados obtidos apresentaram boa precisão e exatidão, com desvio padrão relativo de 2,2 a 10 % e erro relativo, de 0,4 a 12% para MeHg e desvio padrão relativo de 2,6 a 11,7% e erro relativo, de 0,9 a 3,11%, para Hg. O método apresentado mostrou-se adequado para determinação de baixos níveis destes contaminantes em amostras de cabelo e peixe e pode ser usado em estudos relacionados aos efeitos do Hg e suas espécies na saúde do ser humano.

**Palavras chave.** metilmercúrio, peixe, cabelo, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

### ABSTRACT

The cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) is one of the most useful analytical technique for mercury and methylmercury determinations in biological materials due to several advantages such as operation facility, fast analytical response, good sensitivity and low cost. This study also shows the results obtained by our laboratory in the *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), during the period of October 2004 and July 2005. The precision and accuracy of the method for total mercury and MeHg determinations were verified by means of the reference material analyses. The results obtained showed good precision and accuracy with relative standard deviation ranged from 2.2 to 10 % and relative error from 0.4 to 12% for MeHg and relative standard deviation ranged from 2.6 to 11.7 % and relative error from 0.9 to 3.1% for Hg. The method presented has been shown to be suitable for determination of background levels of these contaminants in fish and hair samples and can be used in studies related to the health effects of mercury and its species in man.

**Key words.** methylmercury, fish, hair, cold vapor atomic absorption spectrometry.

## INTRODUÇÃO

O impacto tóxico do metilmercúrio (MeHg) é amplamente conhecido e inúmeros estudos no Brasil têm sido realizados nas últimas décadas<sup>1, 2, 3</sup>. O mercúrio (Hg) que entra em oceanos, lagos e rios pode ser convertido para MeHg pela ação de bactérias e bioacumula-se na cadeia alimentar aquática. Fatores ambientais tais como pH, condutividade, disponibilidade de oxigênio, temperatura, atividade biológica e concentração de nutrientes, entre outros, são relevantes nos processos de metilação do Hg no ambiente<sup>4</sup>. A conversão entre as diferentes formas é a base do complexo padrão de distribuição do mercúrio em ciclos locais e globais e de seu enriquecimento biológico<sup>5</sup>. Os seres humanos estão expostos ao MeHg principalmente por meio do consumo de peixe contaminado, particularmente espécies de peixes predadores<sup>6, 7, 8</sup>. Consequentemente, os teores de MeHg em peixes são frequentemente avaliados por inúmeras organizações e pesquisadores com o objetivo de avaliar os níveis de contaminação e estes resultados são, frequentemente, utilizados para checar a qualidade dos peixes disponíveis para a população.

Entretanto, a especiação do Hg em amostras clínicas, biológicas ou ambientais é particularmente complexa, devido às várias formas químicas que este metal pode assumir, à variedade de comportamento das mesmas e a grande diferença na concentração que pode existir entre elas, sendo que da mesma forma que para outras espécies organometálicas, as técnicas utilizadas para a determinação de MeHg envolvem várias etapas analíticas<sup>9</sup>.

Em relação ao Hg e MeHg, na literatura são relatados vários procedimentos e técnicas analíticas para a sua determinação, contudo, o desenvolvimento destes métodos para quantificação de MeHg em amostras biológicas não é tão simples, devido aos problemas relacionados à extração do analito da amostra e ao método de quantificação final empregado. Este deve ser capaz de trazer os compostos de Hg presentes na amostra a formas convenientes à etapa posterior de determinação sem, entretanto, modificar a identidade das espécies ao longo do processo. Para diferenciar o MeHg do Hg total (inorgânico), geralmente utiliza-se uma etapa de separação ou extração, antes de sua quantificação<sup>10</sup>. São sugeridos, dependendo da amostra, diversos procedimentos, que envolvem, por exemplo a digestão alcalina<sup>11</sup>, extração com solventes<sup>12</sup> ou troca iônica<sup>13,14</sup>.

Uma revisão completa dos métodos de especiação de Hg não é o escopo deste trabalho, mas, a título de

exemplificação, alguns métodos de especiação serão citados a seguir.

Uma das primeiras técnicas desenvolvidas para a especiação do Hg foi baseada na lixiviação ácida, extração com solventes e separação cromatográfica com a utilização de colunas empacotadas e determinação por captura de elétrons (ECD)<sup>15</sup>. Todavia, a dificuldade devido à diversidade de matrizes e os níveis muito baixos de MeHg, fez com que este método apresentasse baixa especificidade, alto limites de detecção e difícil empacotamento das colunas. Porém, o interesse em determinar teores de Hg para estimar o seu real impacto no meio ambiente, principalmente em sistemas aquáticos e nos seres humanos, levou a um grande progresso no desenvolvimento de procedimentos de análise para este metal. Além disso, a sua alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações, bem como a sua natureza volátil e possibilidade de associação com outros compostos, fez com que fossem necessários procedimentos bastante sensíveis e precisos para a sua determinação em diferentes matrizes.

Entretanto, quanto à detecção instrumental, a cromatografia gasosa é e foi, desde o início, foi o método mais utilizado<sup>16</sup>, permitindo a discriminação das diferentes espécies organomercuriais entre si, mas encontrando dificuldades quanto às espécies inorgânicas, sendo também procedimentos normalmente longos e tediosos<sup>17</sup>. Contudo, além dos métodos cromatográficos citados, há outros procedimentos de especiação, cromatográficos ou não, encontrados na literatura. Por exemplo, Evans & McKee<sup>18</sup>, utilizaram a combinação de cromatografia líquida de alta resolução com detecção amperométrica. Gibičar e colaboradores determinaram MeHg e etilmercúrio (EtHg) utilizando cromatografia gasosa, pirólise e espectrometria de fluorescência atômica<sup>19</sup>. Saouter & Blattman<sup>20</sup> usaram a cromatografia gasosa/espectrometria de fluorescência atômica. Há estudos também que avaliaram a detecção por ICP-MS, a partir de diferentes processos de extração utilizados para a etapa de separação<sup>21, 22</sup> e aqueles que se utilizaram de técnicas voltamétricas<sup>23, 24</sup>.

Entretanto, com o progresso obtido na determinação das diferentes espécies mercuriais, criou-se a necessidade de avaliar constantemente os resultados obtidos a partir dos inúmeros métodos atualmente existentes, verificando-se a necessidade cada vez maior da organização de intercomparações laboratoriais por meio de análises de materiais candidatos a material de referência, preparados por um organismo internacional competente.

E um exemplo de intercomparações realizadas, com a participação de diversos países, são as organizadas pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) que há mais de quatro décadas vem produzindo materiais de referência certificados. O Laboratório Ambiental da Agência, em Mônaco (IAEA\_MEL), desde 1973 vem conduzindo essas intercomparações por meio de do “*Analytical Quality Control Services (AQCS)*” com o principal objetivo de avaliar a precisão e exatidão dos resultados obtidos a partir desses materiais de referência e assim, disponibilizar dados confiáveis e de qualidade, aumentando a demanda por materiais de referência certificados para diversos contaminantes em nível de traço, principalmente em amostras marinhas.

Neste estudo são apresentados os resultados obtidos no programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005 utilizando um procedimento simples, sensível, confiável e com baixo limite de detecção para quantificação de Hg total e MeHg. Esse procedimento pode ser utilizado tanto para amostras de cabelo quanto para amostras de peixe (potenciais indicadores biológicos na avaliação da exposição ao Hg e MeHg) e que se destaca pelo protocolo de procedimento analítico, o qual garante a integridade do analito até a etapa posterior de determinação sem, entretanto, modificar a identidade das espécies ao longo do processo de separação. Este método é baseado na lixiviação ácida (HCl) e posterior separação do MeHg do Hg total em uma coluna de troca iônica. Após a etapa de separação, o MeHg sofre uma digestão ácida ( $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), seguida da redução com cloreto estano, para posterior quantificação por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS). Esse procedimento é baseado no trabalho de Horvat e colaboradores<sup>25</sup>. Estamos considerando nesse estudo que o mercúrio orgânico presente em amostras biológicas de peixe e cabelo, está em sua maioria, na forma de metilmercúrio<sup>26</sup>.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### Aparatos e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico. O ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) utilizados foram

Suprapuros da Merck. A alta pureza da água, de  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  de resistividade foi obtida usando sistema Milli-Q.

Uma solução nova de 1,1% (m/v) de  $\text{SnCl}_2$  em HCl 3% foi preparada a cada experimento dissolvendo-se a quantidade apropriada do sal (Merck) em aproximadamente 50 mL de água Milli-Q e transferida para um balão volumétrico já contendo 15 mL de HCl concentrado. O volume foi completado até a capacidade do balão (500 mL) com água Milli-Q e a solução borbulhada com gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) por aproximadamente 10 minutos. Foi preparada também uma solução de HCl 3% a cada experimento para ser utilizada como solução carreadora.

A solução de 10% (m/v) de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) utilizada foi preparada previamente pesando-se 50 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  em um balão volumétrico de 500 mL e em seguida adicionou-se aproximadamente 250 mL de água Milli-Q. A solução, foi colocada então sob agitação até dissolver completamente o  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e o volume foi completado até a capacidade do balão.

Uma solução estoque 1 de Hg ( $1255 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada dissolvendo-se HgO (Johnson Matthey Chemicals Limited) de alta pureza (99,99995 %) em  $\text{HNO}_3$  ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e foi utilizada para preparar a solução estoque 2 ( $1255 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Uma coluna de troca iônica foi preparada com pequena quantidade de lã de vidro e preenchida com 1 mL de resina de troca iônica - Dowex 1-X8, 200-400 mesh, tomando-se o cuidado que todas as colunas apresentassem a mesma quantidade de resina. Após o assentamento da resina sobre a base de lã de vidro, colocou-se novamente uma pequena quantidade de lã de vidro sobre a resina para evitar que a mesma não ressuspendesse no procedimento de lavagem. A coluna foi lavada então duas vezes seguidas com 10 mL de água Milli-Q e a vazão ajustada em aproximadamente 5 mL/min. Após a medida da vazão, a coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de  $\text{HNO}_3$  8 M. Antes da percolação da solução contendo a amostra, a coluna foi ativada com 10 mL de HCl 6M.

Na determinação de Hg ou MeHg, meticulosa limpeza dos materiais é essencial. Toda a vidraria utilizada é deixada por 24 horas em Extran 2% (v/v) e enxaguada com água Milli-Q. Em seguida, é deixada por 72 horas em 20% (v/v)  $\text{HNO}_3$  e finalmente é enxaguada novamente com água Milli-Q por pelo menos três vezes.

### Curvas de Calibração

Neste trabalho as curvas de calibrações foram construídas com a utilização de soluções padrão

preparadas a partir de uma solução estoque de Hg (estoque 2), pipetada em volumes apropriados diretamente nos frascos de Teflon fechado da Savilex, com capacidade de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) conc. com baixo teor de Hg e 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc., ambos da Merck, e deixados reagir durante toda a noite. Este procedimento também foi realizado para as amostras. As soluções de calibração foram preparadas diariamente e as concentrações utilizadas dependeram das amostras e/ou materiais de referência analisados, sendo utilizadas sempre cinco soluções de concentrações diferentes ( $2,51 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5,02 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $10,04 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $20,08 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $25,10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) para a obtenção da curva de calibração.

Uma vez cumpridas todas as etapas do processo de preparação das condições experimentais e instrumentais, foi realizada a avaliação parcial da metodologia empregada, com o objetivo de garantir a confiabilidade da resposta analítica obtida das amostras sob análise. Esta avaliação da metodologia analítica permitiu obter alguns parâmetros analíticos de mérito, indicados a seguir: faixa linear de trabalho ( $\text{ng mL}^{-1}$ ), inclinação ( $\text{ng mL}^{-1}$ ), regressão linear, limite de detecção ( $\text{ng mL}^{-1}$ ), limite de quantificação ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros analíticos de mérito para a metodologia empregada na determinação de mercúrio e metilmercúrio

Faixa Linear de Trabalho ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	0,5 - 50
Inclinação	0,0181
Regressão Linear	0,9995
Limite de Detecção ( $\text{ng g}^{-1}$ )	0,1
Limite de Quantificação ( $\text{ng g}^{-1}$ )	10

### Procedimento analítico para a determinação de MeHg em amostras biológicas

#### *Separação do MeHg do Hg total, digestão e análise para a determinação do Hg orgânico (MeHg)*

O método empregado é baseado na lixiviação ácida e separação de Hg orgânico (MeHg) e inorgânico numa coluna de troca iônica, seguido pela espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS). O HCl 6 M extrai quantitativamente o MeHg dos tecidos biológicos e uma coluna de troca iônica é usada para

separar o  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  não iônico (que passa através da resina de troca iônica) do complexo  $\text{HgCl}_4^{-2}$ , que fica retido na coluna. Uma vez separado, o Hg orgânico tem que ser decomposto para  $\text{Hg}^{2+}$ , porque o  $\text{SnCl}_2$  pode reduzir somente o Hg iônico inorgânico. A decomposição pode ser feita por radiação ultravioleta (UV) ou decomposição ácida. No presente trabalho, optou-se pela digestão ácida visto que a decomposição pela irradiação UV é simples e efetiva, mas pode demorar horas e deve ser conduzida em tubos de quartzo ou frascos de Teflon transparentes (pois ambos refletem a luz UV). A digestão ácida é mais rápida e também efetiva, deve ser feita em tubos de digestão fechados e devido a grande quantidade de ácidos utilizada, o branco do reagente é mais alto, mas não alto o suficiente que prejudique a determinação do Hg.

Para a determinação do Hg orgânico, pesaram-se cerca de 0,2 a 0,5 g de amostra diretamente em um frasco com tampa de rosca e capacidade de 15 mL. Após a pesagem, foram adicionados 10 mL de HCl 6M e deixados reagir durante toda a noite. Os frascos foram envolvidos em papel alumínio para impedir a passagem de luz e evitar a decomposição do MeHg. No dia seguinte, os frascos foram colocados no agitador por duas horas e posteriormente centrifugados por aproximadamente 10 min a uma velocidade de 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi percolado através de uma resina de troca iônica condicionada previamente na forma  $\text{Cl}^-$  (1 mL de resina de troca iônica - Dowex 1-X8, 200-400 mesh). O material eluído da coluna foi recolhido em frascos de Teflon com tampa, com capacidade de 50 mL e adicionados então 4 mL de  $\text{HNO}_3$  conc. e 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. com a finalidade de decompor o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . As amostras foram digeridas em sistema fechado, em temperatura de  $90^\circ\text{C}$ , durante três horas. Após a digestão, os frascos foram colocados em banho de gelo até o completo resfriamento e, em seguida, adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  10% (m/v), para a oxidação e estabilização do Hg. Completou-se o volume até a marca de 50 mL. Finalmente, após a decomposição do MeHg em  $\text{Hg}^{+2}$ , a quantificação do Hg é feita por CVAAS.

#### **Digestão e análise da amostra para a determinação de Hg total**

Pesou-se de 0,2 a 0,5 g de amostra diretamente em um frasco de Teflon fechado da Savilex, com capacidade de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) conc. com baixo teor de Hg e 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc., ambos da Merck, e deixados reagir com as

amostras durante toda a noite. No dia seguinte, os frascos foram colocados no bloco digestor da Tecnal e as amostras foram digeridas em sistema fechado, em temperatura de 90°C, durante três horas. Esse procedimento foi necessário para permitir uma digestão completa das amostras, devido ao alto teor de gordura presente. Após a digestão, os frascos foram colocados em banho de gelo até o completo resfriamento e, em seguida, adicionados, 500 µL de solução de (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 10% (m/v), para a oxidação e estabilização do Hg. Completou-se o volume até a marca de 50 mL.

### Teste de eficácia de retenção do MeHg em uma coluna de resina de troca iônica e taxa de recuperação (R<sub>p</sub>)

Foram realizados três experimentos para avaliação da eficácia de retenção do MeHg na resina Dowex x-8 e separação do Hg inorgânico. O primeiro experimento consistiu da lixiviação do MeHg da matriz biológica e posterior percolação por uma coluna de troca iônica (Experimento 1). Com posterior determinação do Hg de acordo com o item “Procedimento analítico para a determinação de MeHg em amostras biológicas”. Nesse experimento, no final do procedimento analítico, estaríamos quantificando somente o MeHg presente no MR. O segundo experimento, consistiu entretanto, de

igual lixiviação do MeHg da matriz biológica, porém sem percolação por uma coluna de troca iônica (Experimento 2). No final do processo, estaríamos quantificando o Hg total (inorgânico e MeHg) presente nas amostras. Para tanto, foi escolhido o material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), pois este apresenta valores certificados bem diferentes para Hg Total (3,7 ± 0,14 mg kg<sup>-1</sup>) e MeHg (1,59 ± 0,12 mg kg<sup>-1</sup>), ou seja, as faixas de concentração de ambos não se sobrepõem, facilitando a avaliação da eficácia da separação do MeHg do Hg inorgânico.

O terceiro experimento foi feito com duas soluções de Hg Total de concentração conhecida (2,51 ng mL<sup>-1</sup> e 5,02 ng mL<sup>-1</sup>), obtidas a partir da mesma solução utilizada para a preparação da curva de calibração (estoque 2), com o objetivo de avaliar o potencial de retenção do Hg inorgânico pela coluna de troca iônica (Experimento 3). Estas soluções foram submetidas ao mesmo tratamento necessário para determinação de MeHg, com duas alíquotas (de 2,51 ng mL<sup>-1</sup> e 5,02 ng mL<sup>-1</sup>) passando pelo processo de percolação pela coluna (Experimento 3.1) e duas alíquotas de mesma concentração sem percolação (Experimento 3.2).

O fluxograma a seguir, apresenta um esquema resumido dos experimentos realizados nesse estudo (Figura 1).

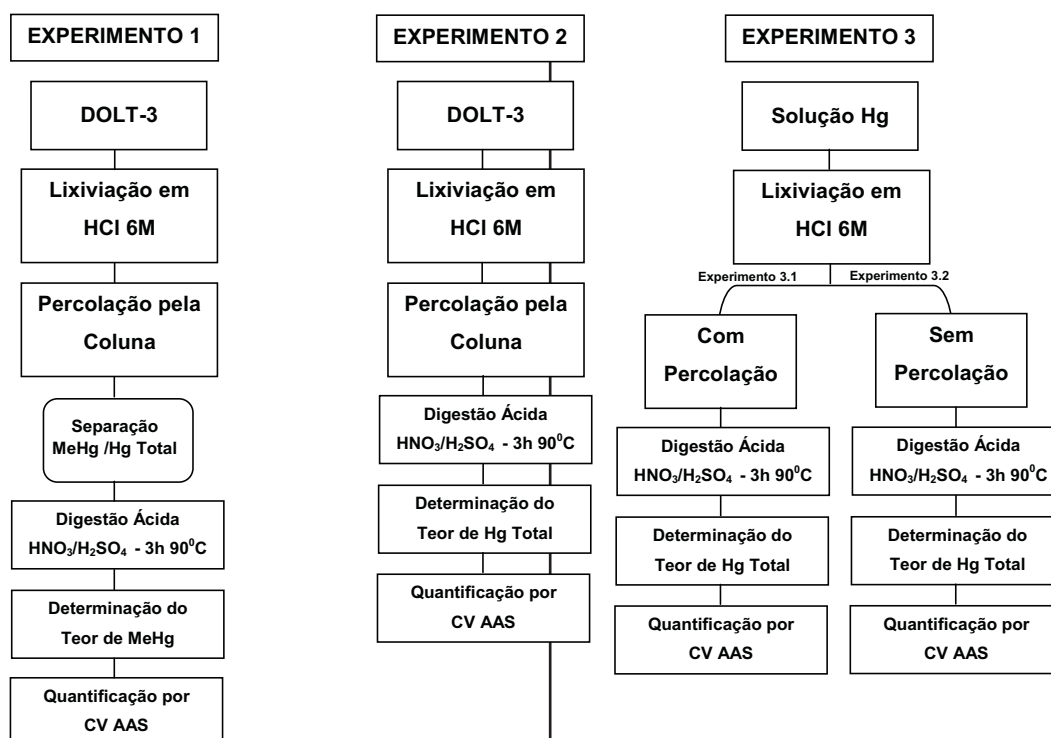


Figura 1. Fluxograma dos experimentos realizados para avaliação da eficácia na determinação de MeHg.

Também foi realizada a avaliação de taxa de recuperação ( $R_p$ ) do analito (MeHg) extraído das amostras, pela análise de materiais de referência: Dogfish muscle (DORM-1 NRCC) e Human Hair Spiked (IAEA 085).

### Equipamentos

A quantificação de Hg foi realizada por meio da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV AAS), empregando a Análise por Injeção em Fluxo, e equipamento FIMS da Perkin Elmer, usando argônio como gás de arraste. O agitador empregado foi o modelo Khan da Nova Ética, bloco digestor da Tecnal e centrífuga Safeguard Centrifuge da Clay-Adams INC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Exatidão e precisão

A exatidão e precisão da metodologia para a determinação de Hg total e MeHg em amostras de cabelo e peixe, foram avaliadas por meio da análise de materiais de referência com valores certificados, a saber: IAEA-085 e 086 (Human Hair), NIST SRM 2976 (Mussel Tissue), DORM-1 (Dogfish Muscle) e DOLT-3 (Dogfish Liver).

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios obtidos na análise desses materiais de referência, bem como os valores certificados. Os resultados obtidos para a determinação do MeHg nos materiais de referência apresentaram desvio padrão relativo variando de 2,2 a 10 % e erro relativo, de 0,4 a 12 % e, desvio padrão relativo de 2,6 a 11,7 % e erro relativo, de 0,9 a 3,1%, para Hg Total, verificando-se a precisão e exatidão do método, respectivamente.

### Teste de eficácia de retenção do MeHg em uma coluna de resina de troca iônica e taxa de recuperação ( $R_p$ ):

Na Tabela 3 estão os resultados obtidos para MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) no material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), com (Experimento 1) e sem percolação (Experimento 2) pela coluna de troca iônica e avaliação do potencial de retenção da coluna de troca iônica para o Hg inorgânico (Experimento 3).

Pelos resultados, pôde-se observar que com o procedimento de percolação da solução, houve uma perfeita separação do MeHg do Hg inorgânico e os resultados obtidos ( $1,40 \pm 0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram bem próximos do valor certificado esperados para o MeHg ( $1,59 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ ), comprovando a eficácia de separação

**Tabela 2.** Resultados obtidos para Hg Total e MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nos materiais de referência IAEA-085 e 086 (Human Hair), NIST SRM 2976 (Mussel Tissue), DORM-1 (Dogfish Muscle) e DOLT-3 (Dogfish Liver)

Materiais de Referência	Total Hg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )				
	Hg Total	Valor Certificado	DPR	ER	MeHg	Valor Certificado	DPR	ER
	(média $\pm$ d.p.)	(%)	(%)	(%)	(média $\pm$ d.p.)	(%)	(%)	(%)
IAEA-085	22,97 $\pm$ 0,60	23,2 (22,4 - 24,0)	2,6	1,0	22,8 $\pm$ 0,5	22,9 (21,9 - 23,9)	2,2	0,4
IAEA-086	0,579 $\pm$ 0,021	0,573 (0,534 - 0,612)	3,6	1,0	0,254 $\pm$ 0,016	0,258 (0,236-0,279)	6,3	1,5
NIST SRM 2976 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	59 $\pm$ 6	61,0 $\pm$ 3,6	10,2	3,0	0,031 $\pm$ 0,003	0,028 $\pm$ 0,011	10	11
DORM-1	0,773 $\pm$ 0,033	0,798 $\pm$ 0,074	4,2	3,1	0,718 $\pm$ 0,042	0,731 $\pm$ 0,060	5,8	1,8
DOLT-3 (n = 4)	3,4 $\pm$ 0,4	3,37 $\pm$ 0,14	11,7	0,9	1,40 $\pm$ 0,1	1,59 $\pm$ 0,12	8	12

(n) – número de determinações - n = 15)

das espécies de mercúrio (Experimento 1). Os resultados obtidos para o material de referência que não sofreu a percolação após a lixiviação, com valor médio de  $(3,19 \pm 0,68 \text{ mg kg}^{-1})$  foi próximo ao esperado para Hg Total  $(3,37 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1})$ , ou seja, tanto o complexo  $\text{HgCl}_4^{-2}$ , quanto o  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  formados na etapa de lixiviação foram quantificados. Esse resultado permitiu concluir também que não ocorreu metilação do Hg inorgânico em meio ácido, na etapa de lixiviação (Experimento 2).

Os valores esperados para a taxa de recuperação do Hg inorgânico a partir de soluções de concentrações conhecidas foram mais baixos com relação a quantidade de Hg pipetada para o Experimento 3.2, ou seja, sem percolação pela coluna de troca iônica. Possivelmente reações ocorridas, dificultaram a liberação do  $\text{Hg}^{2+}$  em solução e conseqüentemente, não foi possível reduzi-lo a Hg elementar, forma exigida para determinação por CV AAS. Contudo, observou-se também que não foi detectado a presença de Hg inorgânico nas soluções de concentrações conhecidas analisadas para o Experimento 3.1, com percolação pela coluna de troca iônica. Todos os resultados deram negativos, ou seja, todo o Hg inorgânico ficou retido na coluna.

Estudos encontrados na literatura científica também relatam que não ocorrem problemas de

interferentes na extração de MeHg, indicando, como já testado anteriormente, que o  $\text{Hg}^{2+}$  não é transferido para a fase orgânica<sup>27</sup>.

#### Taxa de recuperação ( $R_i$ )

O resultado do estudo de recuperação de analito (MeHg) obtido pela análise dos materiais de referência indicou uma recuperação percentual conforme segue:

- Dogfish muscle (DORM-1 NRCC) – 99,25% com desvio padrão relativo (RSD) de 7,0%.
- Human Hair Spiked (IAEA 085) – 102,54% com desvio padrão relativo (RSD) de 3,3 %.

Portanto, a taxa de recuperação foi de:

$$R_{i\text{DORM}} = \frac{99,25}{100} = 0,9925 \quad \text{Equação 1}$$

$$R_{i085} = \frac{102,54}{100} = 1,0254 \quad \text{Equação 2}$$

Nos dois casos, a taxa de recuperação foi muito próxima de 1, não havendo a necessidade de correção no valor final.

**Tabela 3.** Resultados obtidos para MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) no material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), com (experimento 1) e sem (experimento 2) percolação pela coluna de troca iônica e avaliação do potencial de retenção da coluna de troca iônica para o Hg inorgânico

Material de Referência (Experimento 1)	MeHg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (média $\pm$ d.p.)	Valor Certificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	DPR (%)	ER (%)
<b>DOLT-3 (Dogfish Liver)</b>	1,40 $\pm$ 0,10	1,59 $\pm$ 0,12	7,1	11,9
<b>Padrão Pipetado</b> (Experimento 3.1)	<b>Hg Total (<math>\text{ng mL}^{-1}</math>)</b> (média $\pm$ d.p.)	<b>Valor esperado</b> ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	<b>DPR</b> (%)	<b>ER</b> (%)
<b>Padrão – Ponto 2</b>	-	2,51 $\text{ng mL}^{-1}$	-	-
<b>Padrão – Ponto 3</b>	-	5,02 $\text{ng mL}^{-1}$	-	-

Material de Referência (Experimento 2)	Hg total ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (média $\pm$ d.p.)	Valor Certificado ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	DPR (%)	ER (%)
<b>DOLT-3 (Dogfish Liver)</b>	3,19 $\pm$ 0,68	3,37 $\pm$ 0,14	21,3	5,3
<b>Padrão Pipetado</b> (Experimento 3.2)	<b>Hg Total (<math>\text{ng mL}^{-1}</math>)</b> (média $\pm$ d.p.)	<b>Valor Esperado</b> ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	<b>DPR</b> (%)	<b>ER</b> (%)
<b>Padrão – Ponto 2</b>	0,36 $\pm$ 0,02	2,51 $\text{ng mL}^{-1}$	-	-
<b>Padrão – Ponto 3</b>	1,39 $\pm$ 0,03	5,02 $\text{ng mL}^{-1}$	-	-

### Exercício de intercomparação

Com o objetivo de avaliar a metodologia analítica utilizada na determinação de MeHg, bem como a qualidade final dos resultados, participou-se do programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o “World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436), realizado para avaliação de um material candidato a material de referência (“Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436)), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005. A performance dos laboratórios participantes foi avaliada através de gráficos Z-score e os resultados foram publicados no Report nº IAEA/AL/157-MEL/77 “Marine Environment Laboratory, 4 quai Antoin 1<sup>er</sup>”, MC 98000 Monaco.

Os valores obtidos no exercício de intercomparação para determinação de Hg total e MeHg no material candidato a material de referência são apresentados na Tabela 4.

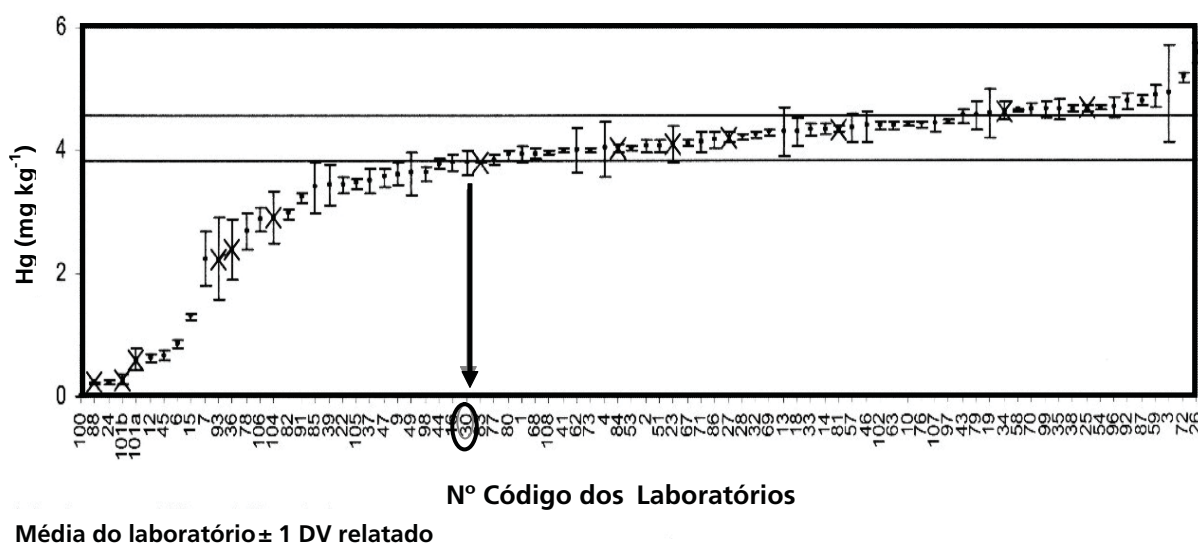
A participação em um exercício de intercomparação patrocinado pela IAEA apresentou resultados bastante satisfatórios. Foram observados valores de desvio padrão relativo 1,1 e 1,4% e erros relativos de 10,5 e 0,5%, respectivamente para as determinações de Hg total e MeHg, comprovando a precisão e a exatidão das metodologias analíticas utilizadas.

Os gráficos de Z-score com os resultados obtidos no programa de intercomparação para as análises de Hg total e MeHg encontram-se nas Figuras 2 e Figura 3, representados pelo código 30.

**Tabela 4.** Hg total e MeHg no material Tuna Fish Flesh Homogenate (IAEA-436)(mg kg<sup>-1</sup>)

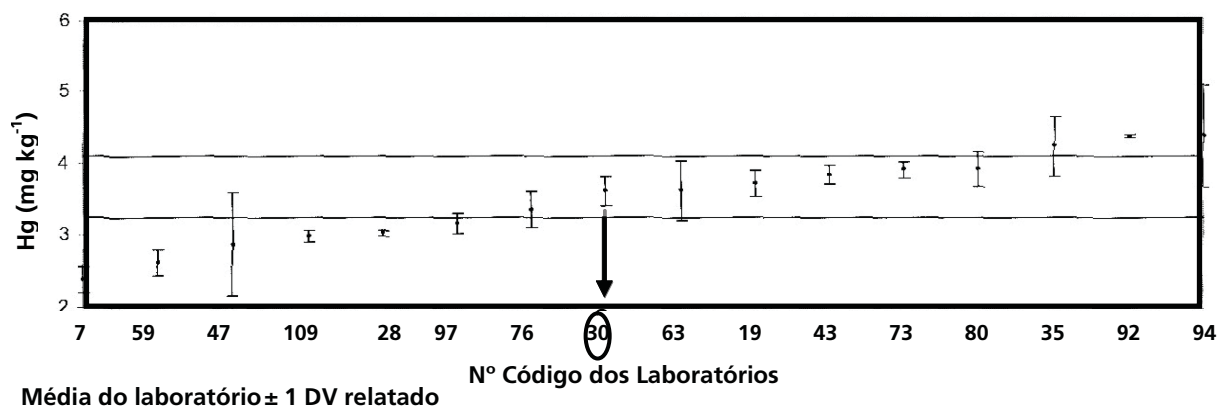
Material de Referência (média ± s.d.)	Valor Encontrado (mg kg <sup>-1</sup> )	Valor Certificado (mg kg <sup>-1</sup> )	DPR (%)	ER (%)
Hg <sub>total</sub>	3,75 ± 0,04	4,19 ± 0,36	1,1	10,5
MeHg	3,66 ± 0,05	3,68 ± 0,42	1,4	0,5

(n = 6, n= número de determinações)



**Figura 2.** Gráfico de apresentação dos resultados obtidos para Hg total na intercomparação pelos laboratórios participantes (gráfico adaptado do Report nº IAEA/AL/157-MEL).





Média do laboratório  $\pm$  1 DV relatado

Linha horizontal: valor médio  $\pm$  1 DV

**Figura 3.** Gráfico de apresentação dos resultados obtidos para MeHg total na intercomparação pelos laboratórios participantes (gráfico adaptado do Report nº IAEA/AL/157-MEL).

## CONCLUSÕES

A participação em um exercício de intercomparação patrocinado pela IAEA, com o objetivo de avaliar a qualidade dos resultados analíticos utilizados na determinação de Hg Total e MeHg em um material candidato a material de referência (“Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436) apresentou resultados bastante satisfatórios. Foram observados valores de desvio padrão relativo 1,1 e 1,4% e erros relativos de 10,5 e 0,5%, respectivamente para as determinações de Hg Total e MeHg, comprovando a precisão e a exatidão das metodologias analíticas utilizadas.

Verificou-se também que a utilização da espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio (CVAAS), com anterior lixiviação ácida e posterior separação do MeHg e Hg Total, utilizando-se uma coluna de troca iônica, mostrou-se efetiva para a determinação dessa espécie de Hg. Esse método se constitui num método simples para a determinação de MeHg em laboratórios que não dispõem de equipamentos sofisticados para a especiação do Hg. O uso da técnica de CVAAS juntamente com a separação por meio de uma coluna de troca iônica, permitiu a determinação da concentração de ambos, o Hg Total e o MeHg em amostras biológicas, tais como músculo e tecidos de peixes e cabelos que possuem, em geral, uma grande proporção de MeHg em relação ao conteúdo de Hg total.

## REFERÊNCIAS

1. Mergler, D, Passos, C. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (4): 5503-20.
2. Hacon, S e col. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (7): 1479-92.
3. Farias, LA, Santos, NR, Favaro, DIT, Braga, ES. Mercúrio total em cabelo de crianças de uma população costeira, Cananeia, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2008, 24 (10):1-8.
4. Canela MC. Determinação de Mercúrio. Campinas: UNICAMP, 1995.
5. Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J, eds. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York, NY: Macmillan Publishing In: Klaassen CD, Amdur MD, Doull J, eds. Casarett and Doull's toxicology - the basic science of poisons. 3rd ed. New York, NY: Macmillan Publishing, 1986.
6. Passos CJS., Mergler D, Lemire M, Fillion M, Guimarães JRD. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. *The Science Total Environment* 2003; 373:68-76.
7. Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18:75-85.
8. Farias LA, Favaro DIT, Maihara VA, Vasconcellos MBA, Yuyama LK, Aguiar JPL, Alencar FJ. Assessment of daily dietary intake of Hg and some essential elements in diets of children from the Amazon region. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2006; 260 (2):383-7.
9. Quevauviller, P, Filippelli, M, Horvart, M. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in analytical chemistry* 2000, 19:157-79.
10. Lai, R, HuanG, EL, Zhou, F, Wipf, DO. Selective Determination of Methylmercury by Flow-Injection Fast-Scan Voltammetry Selective

- Determination of Methylmercury by Flow- Injection Fast-Scan Voltammetry. *Electroanalysis* 1998, 10 (13):926-32.
11. Cappon, C J, Smith, J.C. Breakdown of methylmercury in sodium hydroxide solution. *Anal. Chem.*, 1980, 52:1527-9.
  12. Ealy, J.A, Shults, W.D, Dean, J.A. Extraction and Gas Chromatographic Determination of Methyl-, Ethyl-, and Methoxyethylmercury (II) Halides. *Anal. Chem. Acta.* 1973, 64: 235- 41.
  13. Sanema A.I., Haraguchi, K, Nagai, H. Preconcentration of inorganic mercury with an-exchange resin and direct reduction-aeration measurements by cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 1981, 130 (1):149-56.
  14. Neagu, V., Cornelia, L., Simina, S., Untea, I. Unconventional ion exchange resins and their retention properties for Hg<sup>2+</sup> ions. *Reactive & Functional Polymers*, 2007, 67:1433-9.
  15. Horvat, M, Byrne, A.R. Preliminary study of the effects of some physical parameters on the stability methylmercury in biological samples. *Analyst* 1992, 117:665-8.
  16. Westöo, G. Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20 (8): 2131- 7.
  17. Dan-YY., Hoang-YTT, Yu-Wei C, Nelson B. Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 633:157-64.
  18. Evans, O. & Mckee, G.D. Determination of mercury (II) and organomercury compounds by reversed-phase liquid chromatography with reductive electrochemical detection. *Analyst.*, 1988, 113: 243-6.
  19. Gibicar, D, Logar, M, Horvat, N, Marn-Pernat, A, Ponikvar, R. Horvat, M. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra (n-propyl) borate as derivatizing agent. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388 (2):329-40.
  20. Saouter, E. & Blattmann, B. Analyses of organic and inorganic mercury by atomic fluorescence spectrometry using a semiautomatic analytical system. *Anal. Chem.*, 1994, 66:2031-7.
  21. Hatch, W.R, Ott, W.L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 1968, 40: 2085-7.
  22. Poluektov, N. S.; Zelyukova, Y. V. Atomic absorption determination of mercury microcontaminations in alkali metal hydroxides (exchange of experience). *Industrial Laboratory*, 1969, 35 (2): 222-30.
  23. Ribeiro, F, Neto, M.M.M, Rocha, M.M, Fonseca, I.T.E. Voltammetric studies on the electrochemical determination of methylmercury in chloride medium at carbon microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579:227-34.
  24. Mieczyslaw K, Iwona R. New methodology for anodic stripping voltammetric determination of methylmercury. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10:1024-6.
  25. Horvat, M. Mercury analysis and speciation. In *Environmental Sample in Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*, p. 1-31, W. Baeyens et al (eds), 1996.
  26. Deng, D-F; Teh, F-C; Teh, S.J. Effect of dietary methylmercury and seleno-methionine on Sacramento splittail larvae. *Science of The Total Environment*, 2008, 407:197-208.
  27. Bisinoti, M. C.; Jardim, W.F.; Brito Junior, J. L.; Malm, O.; Guimarães, J. R. Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica