

MANUAL DE ANÁLISES DE MERCÚRIO

(Tradução de Terezinha M. Cid de Souza)

Março de 2004

Ministério do Meio Ambiente, Japão

Comentários da tradutora

Desde que comecei a analisar mercúrio, sentia a necessidade de um manual como este, como uma forma de orientação e esclarecimento de cada ação envolvida nas análises. Então, quando o Dr. Akagi me pediu para traduzir o Manual de Análises de Mercúrio, fiquei muito à vontade para realizar esse trabalho.

Tudo começou em 1992 quando tive o meu primeiro contato com a metodologia Akagi de análise de mercúrio total. Em minha primeira viagem ao Japão, participando de um projeto de controle da poluição por mercúrio em um centro de pesquisa próximo de Tóquio, pedi para visitar o *National Institute for Minamata Disease-NIMD* e conhecer um pouco mais da experiência do Japão sobre a Doença de Minamata.

No NIMD, fui convidada pelo Dr. Akagi para analisar o teor de mercúrio total de meu próprio cabelo. Fiquei impressionada com a rapidez e precisão da metodologia. À partir daí teve início as negociações entre o DNPM e a JICA, e dois anos depois eu voltava a Minamata para o meu primeiro período de treinamento nas metodologias Akagi de análises de mercúrio. Nesta época, acompanhava o desenvolvimento das análises fazendo diversas anotações em meus cadernos, sem as quais, seria difícil prosseguir. Eram muitas as informações: preparação das soluções usadas nas análises, descontaminação da vidraria, o manuseio de equipamentos novos e as metodologias analíticas propriamente ditas.

Um ano depois, o convênio DNPM/JICA implantou o Laboratório de Análises de Mercúrio no DNPM em Belém-PA e equipou o Instituto Evandro Chagas-IEC e o Centro de Tecnologia Mineral-CETEM com equipamentos para dar suporte a implementação das metodologias Akagi em seus laboratórios. Desde então, os laboratórios receberam diversos treinamentos

ministrados pelo Dr. Akagi. E a cada período, aumentava o volume das anotações, uma vez que, ao longo desse tempo, tanto os equipamentos quanto as análises foram sendo aprimorados, refletindo em mudanças nas metodologias. Desta forma, foi com grande satisfação que recebemos o Manual de Análises de Mercúrio do Dr. Akagi, que conseguiu sintetizar quase duas décadas de estudos em um único manual, objetivo e de fácil entendimento, mesmo para os iniciantes.

Ao longo da leitura descobrimos que não se trata apenas de um manual tipo “receita de bolo” para executar uma análise, mas de todo um procedimento analítico visando o entendimento de cada passo das análises. E este procedimento envolve desde a amostragem de matrizes ambientais e biológicas nos diversos compartimentos, passando pela lavagem e descontaminação de todos os materiais utilizados, a preparação das soluções, o manuseio dos equipamentos até as etapas das análises, tanto para mercúrio total quanto para metilmercúrio, além dos cálculos dos resultados. Para algumas análises ainda é apresentada uma alternativa de metodologia simplificada. E o que é melhor, todas essas etapas vem com explicações detalhadas (Notas de Procedimentos) sobre cada procedimento.

Enfim, agora dispomos de um manual não só para executar análises de mercúrio total e metilmercúrio, mas um manual para pesquisa permanente sobre tudo que envolve as análises de mercúrio. Espero que toda a comunidade tenha bom proveito.

Terezinha M. Cid de Souza, MSc.
Laboratório de Análises de Mercúrio do DNPM 5°. DS/PA
Fone: 91-32994572
E-mail: terezinha.cid@dnpm.gov.br

Prefácio

A reunião de fevereiro de 2003 do Conselho Administrativo do 22º Programa Ambiental da ONU (UNEP) fez o relatório de Avaliação do Mercúrio Global e adotou uma resolução para ação internacional futura.

Países desenvolvidos estão atualmente direcionando o problema dos efeitos adversos à saúde da exposição humana para baixos níveis de metilmercúrio. No Japão, peixes e moluscos são uma valiosa fonte de proteína como também um pilar da cultura culinária da nação; então, uma cuidadosa e rápida resposta ao risco da exposição ao mercúrio pelo consumo de peixes e moluscos, baseada na ciência é necessária.

Para estudar os efeitos adversos à saúde no desenvolvimento de fetos e crianças expostos a baixos níveis de metilmercúrio, o Japão iniciou um estudo de grupos em 2002 seguindo dois estudos de grupos antecedentes: um empreendido nas ilhas Faroe e outro na República Seychelles.

Ainda hoje, plantas de geração de energia pela queima de carvão em vários países ao redor do mundo continuam descarregando mercúrio no meio ambiente, enquanto plantas industriais produzindo cloro e álcali continuam descarregando mercúrio nos sistemas aquáticos. Além disso, países em desenvolvimento com operações de mineração de ouro estão sofrendo de poluição séria causada pelo uso de mercúrio no refino de ouro. Então, fica claro que é essencial que o estado de poluição de mercúrio seja monitorado.

Contra este cenário, tecnologia capaz de análise altamente precisa de mercúrio total e metilmercúrio deve ser disponibilizada no Japão e em outros lugares de forma que a avaliação precisa do risco possa ser conduzida. Neste espírito, o Ministério do Meio Ambiente preparou o *Manual de Análises de*

Mercúrio para dar lugar a métodos analíticos testados e aceitos internacionalmente para uma aplicação prática mais difundida.

Como presidente do comitê para este manual, eu gostaria de expressar minha gratidão a todos que participaram de sua preparação. Eu estou confiante de que este manual será amplamente empregado em várias partes do mundo como uma ajuda prática para a análise de mercúrio.

Tsuguyoshi Suzuki

Presidente

Comitê para o *Manual de Análises de Mercúrio*

Membros do Comitê para o *Manual de Análises de Mercúrio*

- Tsuguyoshi SuzukiProfessor Honorário, Universidade de Tóquio
(Presidente)
- Hirokatsu Akagi.....Diretor, Laboratório Internacional de Mercúrio
(Ex-Diretor, Departamento de Relações
Internacionais e Ciências Ambientais, Instituto
Nacional para Doença de Minamata)
- Kimiyoshi Arimura.....Professor Associado, Faculdade de Medicina,
Universidade de Kagoshima
- Tetsuo Ando.....Pesquisador Assistente, Faculdade de Medicina,
Universidade de Kagoshima
- Mineshi Sakamoto.....Chefe, Seção de Pesquisa, Departamento de
Epidemiologia, Instituto Nacional para Doença de
Minamata
- Hiroshi Satoh.....Professor, Faculdade de Medicina, Universidade
de Tohoku
- Akira Naganuma.....Professor, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de Tohoku
- Makoto Futatsuka.....Professor, Faculdade de Medicina, Universidade
de Kumamoto
- Akito Matsuyama.....Pesquisador Chefe, Instituto Nacional para Doença
de Minamata

Sumário

Comentários da tradutora.....	2
Prefácio.....	4
1. Introdução.....	9
2. Amostragem.....	11
2-1 Amostras ambientais.....	11
2-1-1 Amostras biológicas (peixes e moluscos).....	11
2-1-2 Água.....	13
2-1-3 Sedimento/solo.....	14
2-1-4 Plantas.....	17
2-1-5 Atmosfera/ar.....	18
2-2 Amostras humanas.....	20
2-2-1 Cabelo.....	20
2-2-2 Sangue.....	21
2-2-3 Urina.....	22
2-2-4 Cordão umbilical.....	23
3. Método Analítico para Mercúrio Total.....	25
3-1 Determinação por digestão úmida/redução/espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CVAAS) (sistema aberto de circulação de ar).....	27
3-1-1 Amostras biológicas (incluindo peixe, molusco, sangue humano, urina, e tecidos como cordão umbilical).....	30
3-1-2 Cabelo.....	39
3-1-3 Sedimento/solo.....	45
3-1-4 Água.....	51
4. Método Analítico para Metilmercúrio.....	60
4-1 Determinação pelo método de extração de ditizona/cromatografia gás-líquido com detecção de captura de elétron (GLC-ECD).....	61

4-1-1 Amostras biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical).....	62
4-1-2 Amostras biológicas contendo concentrações relativamente altas de mercúrio, particularmente peixes e moluscos (Método simplificado).....	74
4-1-3 Urina.....	83
4-1-4 Sedimento/solo.....	91
4-1-5 Água.....	100
4-2 Determinação pelo método de lixiviação de ácido clorídrico/extração de tolueno/cromatografia gás-líquido com detecção de captura de elétron (GLC-ECD).....	110
4-2-1 Cabelo.....	110
Referências.....	118

1. Introdução

A obtenção de dados analíticos confiáveis para mercúrio requer o seguinte: coleta apropriada de amostra; pré-tratamento para análise; a seleção de um método de medida e método de preparação para soluções de amostras teste aplicável às amostras; experiência no seu uso; e confirmação da confiança nos próprios dados analíticos. Além disso, ao executar uma análise, tem-se que prestar atenção regularmente para prevenir contaminação das amostras mantendo o laboratório limpo; provendo ventilação apropriada; e lavando adequadamente aparatos de vidro, ferramentas, e demais recipientes.

Quando avaliar os efeitos do mercúrio adversos à saúde e explicar sua dinâmica e rotas no homem e no ambiente, além de executar uma análise quantitativa para mercúrio total, deveria executar também análises quantitativas para metilmercúrio e mercúrio inorgânico separadamente. Este manual primeiro provê uma descrição de amostragem seguida pelas descrições dos métodos analíticos para mercúrio total e metilmercúrio para cada amostra designada.

Deve ser observado que, para análise de mercúrio em peixes e moluscos, água, ar, solo (conteúdo e seu filtrado) e similares, os seguintes regulamentos oficiais foram observados, entre outros: "Padrões Reguladores Provisórios para Peixes e Outros Produtos Marinhos" (Notificação Diretor-geral N^o. 99, Agência de Saúde Ambiental, Ministério da Saúde e Bem-Estar, de 23 de julho de 1973); o método listado na tabela anexada à Agência de Informações Ambientais N^o. 59 emitido em Dec. 1971 (Padrões de Qualidade Ambiental para Poluição de Água); o *Manual de Métodos de Medição para Poluentes Perigosos de Ar* (Regulamento Ambiental de Ar N^o. 88, de 31 de março de 1999); e Ministério da Informação Ambiental N^o. 19, de 6 de março de 2003. Em casos onde a análise é uma exigência do regulamento oficial, um

método analítico satisfatório para cada caso pode ser usado. Mais adiante, foram informados vários outros métodos para análise de mercúrio. Ao usar quaisquer destes métodos analíticos, a pessoa deveria praticar um cuidadoso controle de qualidade/garantia de qualidade dos dados obtidos, incluindo determinação simultânea de materiais de referência certificados satisfatórios (CRMs).

Atualmente, os CRMs preparados para o controle de qualidade/garantia de qualidade de valores analíticos para mercúrio como também para metilmercúrio em várias matrizes biológicas e ambientais estão comercialmente disponíveis em várias organizações, inclusive o IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica, Serviços de Controle de Qualidade Analíticos), NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Escritório de Materiais de Referência, EUA), NRCC (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá), e NIES (Instituto Nacional para Estudos Ambientais, Japão). Estes CRMs podem ser usados conforme a necessidade.

2. Amostragem

2-1 Amostras ambientais

2-1-1 Amostras biológicas (peixe e molusco)

A poluição da água causada por metilmercúrio pode ser convenientemente monitorada medindo-se a bioacumulação de mercúrio em peixes. Adicionalmente, o monitoramento do mercúrio em peixes e moluscos freqüentemente ingeridos pela população em uma região particular é um meio satisfatório de se avaliar os níveis da exposição humana, porque a exposição humana ao metilmercúrio ocorre principalmente pelo consumo de peixes e moluscos. Além disso, uma vez que a maioria do mercúrio presente no peixe está na forma de metilmercúrio, a medida de mercúrio total em peixes pode ser usada para se avaliar o consumo de metilmercúrio por humanos. Entretanto, o metilmercúrio também deveria ser medido em casos onde aparecem valores extremamente altos e em casos que envolvem consumo de carne de baleia e tecidos de órgão cuja proporção de metilmercúrio para mercúrio total não é sempre constante.

Quando coletar amostras de peixes, registrar a data da coleta, local, espécies, e idades. Medir também comprimento e peso e registrar a aparência. Para peixes, coletar 10-20 gramas da porção comestível, colocar em sacos de polietileno, e armazenar em congelador. Para moluscos, dividir o músculo, conteúdo da área digestiva, e músculo adutor (para caracóis que falta um músculo adutor, dividir a porção comestível), colocar as porções em sacos de polietileno, e armazenar em congelador. Uma vez que partículas de sedimento de fundo estão freqüentemente contidas nas áreas digestivas de moluscos, remover estas partículas antes do armazenamento.

De acordo com o Regulamento de Higiene de Alimentos do Japão, o padrão regulador para mercúrio em peixes e moluscos é de 0,4 mg/kg (peso úmido) como mercúrio total. O nível de base de mercúrio total em peixes e moluscos é considerado entre 0,01-0,1 mg/kg (peso úmido).

2-1-2 Água

Quando a fonte de contaminação está conectada diretamente a um rio, lago, pântano, ou oceano, ou quando a contaminação é esperada de ter esparramado de um rio a um lago, pântano, ou oceano, coletar amostras de água de várias áreas. Usar um amostrador de água Bandon ou um similar para coletar as amostras de água, preferencialmente a 20-30 cm abaixo da superfície. Tomar muito cuidado para impedir que sedimento de fundo entre em amostras de água coletadas próximo ao fundo. Em princípio, coletar amostras de água do mar em maré alta e evitar dias ventosos ou chuvosos. Para lagos, pântanos, e regiões de oceano, declarar claramente a data de coleta, local, qualidade da água em geral, posição relativa à fonte de contaminação, e outras informações.

Manter as amostras de água em recipientes lacrados de vidro ou Teflon que tenham sido bem lavados com ácido clorídrico ou outros agentes antes de serem transportados. Para mercúrio total, o Padrão de Efluentes do Japão e o Padrão de Qualidade Ambiental são 0,005 mg/L (ppm) e 0,0005 mg/L (ppm), respectivamente, de acordo com Notificação No. 64 da Agência Ambiental (setembro de 1974) baseado na Lei de Controle da Poluição de Águas no Japão. Para alquilmercúrio, ambos os Padrão de Efluentes e Padrão de Qualidade Ambiental estipulam que não deve ser detectável acima do limite de detecção de 0,0005 mg/L (ppm) quando analisado com os métodos oficiais providos pela Lei de Controle da Poluição de Águas. Quando um acidente de contaminação causar uma liberação súbita de esgoto contendo níveis altos de mercúrio, os níveis de mercúrio total e alquilmercúrio devem ser avaliados de acordo com estes padrões oficiais. Os níveis de base de mercúrio total são geralmente 0,5-3 ng/L (ppt) para água de oceano, 2-15 ng/L (ppt) para água de costa, e 1-3 ng/L (ppt) para rios e lagos.

2-1-3 Sedimento/solo

Quando coletar amostras de solo, variar a frequência de coleta de amostras dependendo da posição plana da fonte de poluição de mercúrio e da extensão da contaminação suspeita. Enquanto vários métodos de coleta de amostras de solo têm sido propostos, a Lei de Medidas Defensivas contra a Poluição do Solo do Japão (Ministério do Meio Ambiente, 2003) implementada em 2003 provê descrições detalhadas dos métodos para coleta de amostras de solo. Estes métodos serviram como a base para os métodos de amostragem disponibilizados neste manual. Resumidamente, na maioria das situações de poluição, coletar uma amostra por 100 m² (baseado em uma malha de 10 m × 10 m). Em locais onde o registro de poluição sugere que o risco de poluição não é extremo, obter uma amostra misturando amostras obtidas em cinco pontos por 900 m² (baseado em uma malha de 30 m × 30 m). Com este método de misturar cinco pontos, coletar amostras individuais de um total de cinco pontos: o ponto do centro de cada malha e quatro sub-pontos fixados ao redor. Combinar estas cinco amostras para obter uma amostra composta final. Isto aumenta a representatividade das amostras de solo obtidas de cada malha. Embora os locais dos quatro sub-pontos não sejam fixados precisamente, é desejável coletar as quatro amostras em pontos ao norte, sul, leste, e oeste do ponto do centro.

A cada ponto de amostragem, coletar as amostras de solo entre a superfície da terra e 50 cm abaixo. Especificamente, coletar as amostras individuais de duas regiões separadas, uma entre a superfície da terra e um ponto 5 cm abaixo da superfície, e a outra na área de 5 cm para 50 cm abaixo da superfície da terra. Depois de coletar as amostras de solo, remover a maioria dos corpos estranhos (seixos, raízes, etc.) de cada amostra e homogeneizar cada amostra misturando através do método de quarteamento.

Depois da homogeneização, misturar um peso igual de cada amostra para obter uma amostra composta final. Semelhantemente, para o método de mistura de cinco pontos, misturar um peso igual de cada uma das cinco amostras (homogeneizadas com o método de pré-tratamento de solos mencionado acima) para obter uma amostra composta para as análises de mercúrio.

Para rios, são escolhidos pontos de amostragem que permitam fácil coleta do sedimento de fundo a intervalos de 50-200 m a jusante do ponto de descarga de esgoto industrial ou drenos urbanos; além disso, é desejável que cerca de dois pontos sejam fixados a montante para coleta de sedimento de fundo como controle. O ponto de coleta para as amostras de sedimento normalmente é especificado em ambas as margens e no centro do rio. Onde o rio é largo, aumentar o número de pontos de amostragem.

Para lagos, pântanos, e áreas de oceano, centralizar radialmente os pontos de amostragem no ponto de liberação ou foz do rio e conduzir uma pesquisa em malha conforme a necessidade.

Para os métodos de amostragem, o amostrador tipo draga Ekman é usado para coletar a camada de superfície do sedimento de rios, lagos, pântanos, e beira-mar, ao passo que o classificador de sedimento tipo tubo é usado para coletar amostras de colunas que permitem estimar o estado do sedimento e a história de contaminação e acumulação de mercúrio.

Limpar o sedimento de fundo coletado de pedaços de madeira, seixos, conchas, e pó e passar por uma peneira de malha de 2 mm para preparar a amostra. Se a amostra tiver um conteúdo alto de água, centrifugar para remover bem o sobrenadante e misturar para homogeneizar antes de submeter a amostra à análise. Registrar a data, local, e condições gerais (aparência, cor, cheiro, impurezas, etc.).

Embora recipientes de vidro sejam os melhores para as amostras coletadas, outros recipientes lacrados também podem ser usados. Lavar bem os recipientes com ácido clorídrico ou outro agente, antes do uso. Armazenar as amostras em um lugar escuro refrigerado. Amostras que contêm mercúrio metálico ou mercúrio divalente devem ser armazenadas em um congelador.

Geralmente, o nível de mercúrio em solo é menor que 0,2 mg/kg em peso seco (ppm). Quando o nível de mercúrio total em solo é encontrado excedendo alguns mg/kg (ppm), existe o risco de que o mercúrio migre do solo para outros setores ambientais. Nestes casos, a contaminação de mercúrio em sistemas de água próximos também deve ser investigada.

2-1-4 Plantas

Plantas normalmente apresentam pouca magnificação biológica de metais pesados e por isso não são satisfatórias para avaliar contaminação. Entretanto, os líquens têm várias propriedades que os tornam satisfatórios como um indicador biológico de poluentes atmosféricos. Como em outras plantas aéreas sem raiz, eles absorvem nutrientes diretamente do ar, acumulam metais eficazmente, e apresentam resistência a altas concentrações de metais em seus tecidos.

Os líquens são bem distribuídos geograficamente, tornando-os satisfatórios não somente para uso doméstico, mas também para avaliações internacionais da poluição de ar. Na realidade, os líquens (inclusive o *Parmelia* e espécies *Usunera*) têm sido frequentemente usados em pesquisa para avaliar a poluição de ar causada por mercúrio e vários outros metais pesados poluentes, e Garty (2001) publicou um artigo de revisão relacionado ao tema. Os líquens, que normalmente crescem em árvores ou galhos, são coletados, bem lavados com água, limpos de pedaços de madeira e poeira, e secos para fazer uma amostra. Para análises de mercúrio, coloque alguns gramas da amostra em um frasco e corte em pedaços com tesouras de dissecação.

2-1-5 Atmosfera/ar

As amostras de ar são coletadas quando se acredita que poluição por mercúrio está presente na atmosfera ou em ambiente de recinto fechado. Uma vez que as concentrações de mercúrio na atmosfera variam enormemente, os pontos de amostragem devem ser selecionados de maneira a clarificar a distribuição de mercúrio considerando-se a direção prevalecente dos ventos e a distância da fonte de contaminação. Para obter amostras de ar do ambiente em recinto fechado em geral e de ambiente em recinto fechado de locais de trabalho, etc., divida a sala em uma malha de 3 m² (com a largura da malha ajustada para acomodar a extensão do ambiente de trabalho) e coletar amostras às interseções da malha. Em atenção a possível exposição humana, fixar os pontos de amostragem a 1 a 2 m acima do piso. Para coletar mercúrio na atmosfera ou no ar em recinto fechado, colocar uma solução absorvente que inclui 20 mL de solução de permanganato de potássio a 0,1% e solução de ácido sulfúrico 1N em um *impinger* ou borbulhador semelhante. Para amostrar o ar, usar uma bomba de sucção para coletar o ar na solução absorvente do ponto de amostragem a uma taxa de fluxo de 1 L/min, durante um determinado tempo.

Devido o permanganato de potássio comercialmente disponível freqüentemente conter mercúrio, dissolvê-lo em ácido sulfúrico 1 N e ferver para gerar um precipitado de MnO₂. Esfriar e filtrar para uso como solução absorvente. Este procedimento pode remover todo o conteúdo de mercúrio e pode tornar a absorbância da solução teste do branco quase zero. A solução absorvente obtida desta maneira pode coletar vapor de mercúrio eficazmente, e um borbulhador contendo solução absorvente é normalmente suficiente.

Se a solução absorvente evaporou e diminuiu de volume depois das amostras de ar terem sido coletadas, completar a solução absorvente a um

volume fixo para fazer uma amostra teste. Separadamente desta amostra, colocar em dois frascos volumes idênticos de solução absorvente que não foi aerada. Deixar um desses frascos para a solução teste do branco; para o outro, adicionar um volume fixo de solução padrão de mercúrio inorgânico (II) para criar uma solução padrão de teste.

À medida, acrescentar cloridrato de hidroxilamina a 10% gota a gota até descolorir o permanganato de potássio; determinar a concentração de mercúrio na solução da amostra teste através de espectrometria de absorção atômica por vapor frio, como nas outras amostras. Usando o volume de ar coletado, calcular a concentração de mercúrio na amostra de ar. Este método pode ser aplicado amplamente a testes da atmosfera ambiental, do ar de um ambiente de trabalho, e do gás descarregado de uma fonte de emissão ou de eventos similares.

No Japão, não foram estabelecidos valores padrões para mercúrio na atmosfera nem para o ambiente nem para a fonte geradora. Entretanto, a Sociedade de Saúde Industrial do Japão recomenda uma concentração de $0,025 \text{ mg/m}^3$ como a concentração permissível de vapor de mercúrio no ambiente de trabalho.

2-2 Amostras Humanas

Mercúrio em amostras biológicas - geralmente cabelo, sangue, urina ou cordão umbilical - é medido para avaliar o nível de exposição humana e a carga no corpo.

2-2-1 Cabelo

A concentração de mercúrio no cabelo é freqüentemente usada como um marcador biológico para exposição ao metilmercúrio porque reflete a concentração no sangue na ocasião em que o cabelo foi formado. Ao mesmo tempo, uma amostra de cabelo provê um método de amostragem simples e não invasivo como também um método de armazenamento que oferece uma boa preservação da amostra. A concentração de mercúrio detectada no cabelo é geralmente 250-300 vezes a concentração no sangue. Uma vez que o cabelo cresce a uma taxa de aproximadamente 1 cm por mês, é possível a avaliação da exposição passada. Entretanto, a concentração de mercúrio no cabelo pode aumentar como resultado da adesão de vapor externo de mercúrio e mercúrio inorgânico, diminuir como resultado de tratamentos de cabelo como permanentes, e pode ser influenciada pelo local de coleta da amostra.

Em casos de não haver exposição ao mercúrio inorgânico externo ou vapor de mercúrio, quase todo o mercúrio no cabelo está na forma de metilmercúrio; então, o nível de exposição ao metilmercúrio da dieta pode ser avaliado medindo-se o mercúrio total. Porém, como as pessoas envolvidas em mineração e refino de ouro têm um risco alto de contaminação por mercúrio metálico e por vapor de mercúrio, a avaliação da exposição atual ao metilmercúrio só é possível pela medida tanto do metilmercúrio como também do mercúrio total no cabelo. As amostras de cabelo deveriam ser obtidas da área occipital da cabeça e deveriam incluir pelo menos 20 fios de cabelo

medindo 1 cm de comprimento (aproximadamente 10 mg no total) cortado com tesoura à raiz do cabelo. Amarrar os fios do cabelo amostrado juntos pelo final da raiz com uma linha de algodão ou coloque uma fita adesiva ou algo similar de forma que o final da raiz possa ser identificado. Colocar a amostra em um saco de polietileno e armazenar a temperatura ambiente. Entre a população geral no Japão, a concentração de mercúrio no cabelo está na faixa de 1-5 ppm e raramente excede 10 ppm.

2-2-2 Sangue

Para pessoas que ingerem grandes quantidades de peixe e molusco, a relação de concentração de mercúrio de células vermelhas do sangue para plasma (soro) é aproximadamente 10:1, e a maioria do mercúrio contido nas células vermelhas está na forma de metilmercúrio; conseqüentemente, a exposição ao metilmercúrio pode ser avaliada medindo-se o mercúrio total no sangue. É acreditado que 50% do mercúrio inorgânico estão presentes no plasma e a concentração de mercúrio no plasma aumenta em relação à quantidade de mercúrio inorgânico acumulada nos rins. Assim, a exposição ao mercúrio inorgânico/vapor de mercúrio pode ser avaliada medindo-se o mercúrio total no plasma.

Uma amostra de sangue na faixa de vários mililitros é coletada usualmente de uma veia em um tubo de injeção que já contém um anticoagulante (heparina) e transferido para um recipiente lacrado. A amostra é então centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos para separar as células vermelhas do plasma. Amostras a serem armazenadas por um longo período de tempo devem ser congeladas. Enquanto a concentração de mercúrio no sangue da população geral no Japão geralmente não excede 40 ng/g, pessoas cuja dieta é rica em peixe às vezes têm valores mais altos.

2-2-3 Urina

A maioria do mercúrio presente na urina está na forma de mercúrio inorgânico. A concentração de mercúrio na urina aumenta em relação ao nível de mercúrio inorgânico acumulado nos rins. Portanto, o valor de mercúrio total na urina é um importante bio-indicador para avaliar a exposição ao mercúrio inorgânico/vapor de mercúrio. Por outro lado, escoamento de metilmercúrio na urina pode acontecer em casos de doença renal.

Como a concentração de mercúrio na urina também varia com a taxa de excreção, é necessário corrigir isto com a concentração de creatinina na urina ou coletar a amostra de urina em um momento designado.

Geralmente, como nas análises habituais de urina, 50-100 mL de urina é coletada como uma amostra em um copo de papel no início da manhã. A amostra é então armazenada sob refrigeração em um recipiente de polietileno. Amostras a serem armazenadas por mais de um mês devem ser congeladas. Considerando que a urina contém muitos sais inorgânicos, até mesmo urina fresca pode gerar precipitado. Assim, a amostra deve ser homogeneizada por agitação antes da análise. Também pode ser utilizado um método, onde a solubilidade dos sais é aumentada abaixando o pH da amostra de urina pela adição de uma pequena quantidade de ácido clorídrico. Tomar precaução para assegurar que não proliferem microorganismos, pois eles podem causar a redução de mercúrio inorgânico a vapor de mercúrio que escapará e será perdido. É consenso que o nível médio de mercúrio na urina da população em geral em uma região sem qualquer exposição particular ao mercúrio é menos que 10 ng/mL.

2-2-4 Cordão Umbilical

Quando alimento contendo metilmercúrio é ingerido pela mãe durante a gravidez, o metilmercúrio atravessa facilmente a placenta, transferindo-se do corpo da mãe ao feto e expondo o feto ao metilmercúrio. Um grande exemplo disto foi a ocorrência de muitos casos fetais da doença de Minamata acompanhada por sintomas cerebrais severos como paralisia. Isto foi causado pela ingestão de peixe e molusco altamente contaminados com metilmercúrio por mães grávidas quando a doença de Minamata era prevalecente no Japão. O mercúrio no cordão umbilical é usado como um bio-indicador satisfatório de exposição ao metilmercúrio durante o período fetal porque a concentração de mercúrio no cordão umbilical é altamente correlacionada com a concentração no sangue do cordão umbilical, e a maioria do mercúrio presente no cordão umbilical está na forma de metilmercúrio. Vários centímetros do cordão umbilical do lado do feto são coletados na entrega e lavados com solução salina fisiológica para remover o sangue. A amostra é armazenada congelada até a hora de análise.

A amostra de cordão umbilical também pode ser armazenada como uma amostra seca por um longo período se foi seca ao ar após a coleta. Além disso, desde que é uma tradição para as famílias no Japão armazenarem com cuidado o cordão umbilical, a exposição ao mercúrio por ocasião do nascimento de cada criança pode ser avaliada medindo-se o teor de mercúrio. Porém, cordões umbilicais que antecedem os anos setenta, contêm freqüentemente quantidades mais altas de mercúrio inorgânico devido à aplicação de mercúrio-cromo (um anti-microbial que contém mercúrio) que era extensamente usado como uma preparação externa; então, nesses casos é necessário medir o metilmercúrio. O cordão umbilical armazenado é encharcado em água para umedecê-lo, lavado com água para remover o

sangue e outras substâncias aderidas, e seco a temperatura ambiente para preparar a amostra para análise.

A concentração de metilmercúrio no cordão umbilical da população em geral no Japão é considerada estar ao redor de 0,1 $\mu\text{g/g}$ (peso seco).

Tem sido informado que a concentração de metilmercúrio no cordão umbilical pode ser tão alta quanto vários $\mu\text{g/g}$ (peso seco) em crianças nascidas durante a epidemia da doença de Minamata.

Tabela de Conversão

1 ppm = 1 mg/kg (L) = 1 $\mu\text{g/g}$ (mL) = 1 ng/mg (μL)

1 ppb = 1 $\mu\text{g/kg}$ (L) = 1 ng/g (mL)

1 ppt = 1 ng/kg (L)

3. Método Analítico para Mercúrio Total

Os métodos convencionais para medir mercúrio total incluem espectrometria de absorção (colorimetria de ditizona), análise de ativação de nêutron, e espectrometria de absorção atômica por vapor frio. Em espectrometria de absorção, a ditizona forma um complexo com os íons de metal e produz uma solução orgânica colorida. A intensidade de cor varia com a concentração de mercúrio. Embora este método tenha sido usado historicamente por causa da simplicidade dos procedimentos, seu uso diminuiu drasticamente com a introdução da espectrometria de absorção atômica altamente sensível, nos anos sessenta.

Em análise de ativação de nêutron, nêutrons térmicos são irradiados em um reator nuclear e a radiação gama do ^{197}Hg gerado é medida por quantificação comparativa com a amostra padrão. Isto habilita análise não destrutiva na qual a amostra é analisada diretamente sem qualquer pré-tratamento como concentração, e é altamente precisa e sensível. Porém, não é usada freqüentemente devido a seu alto custo, a necessidade de um reator nuclear, e a necessidade de um aparato de medida caro, sem mencionar as exigências de segurança para manusear materiais radioativos.

Em espectrometria de absorção atômica por vapor frio, mercúrio é convertido em vapor de mercúrio elementar, o qual é introduzido em uma célula de absorção e a absorção é medida a 253,7 nm para determinação da quantidade. É um método muito mais sensível quando comparado com a convencional espectrometria de absorção atômica por chama. Outras vantagens incluem sua habilidade para medir mercúrio nas amostras com um espectrofotômetro de UV ou uma simples lâmpada de mercúrio. É grosseiramente classificado no procedimento de redução/aeração e o procedimento de combustão de amostra de acordo com o modo de geração

para mercúrio na forma elementar. O anterior envolve digestão úmida com uma mistura de ácidos fortes seguida pela adição de um agente redutor para gerar vapor de mercúrio elementar (Hg^0). No posterior, o vapor de mercúrio elementar (Hg^0) é gerado através da combustão direta da amostra a ser analisada. Atualmente, o método mais comum está baseado na técnica anterior.

Aqui nós descrevemos - entre estes métodos analíticos altamente sensíveis - um método que envolve digestão úmida, redução e espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS) (o sistema aberto de circulação do fluxo de ar) que oferece melhorias significativas sobre o método convencional.

3-1 Determinação por digestão úmida/redução/espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS) (sistema aberto de circulação do fluxo de ar)

Princípio

O presente método que envolve redução e espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS) (sistema aberto de circulação do fluxo de ar) é, em princípio, semelhante ao sistema de circulação convencional em que o método inclui o seguinte: redução de íons Hg^{2+} na solução da amostra com cloreto estanhoso para gerar vapor de mercúrio elementar (Hg^0); e a introdução de vapor de mercúrio na célula de foto-absorção para a medida de absorbância a 253,7 nm. Porém, diferente do sistema convencional fechado no qual o vapor de mercúrio elementar gerado é continuamente circulado com uma bomba de diafragma por um recipiente reator, um tubo moldado em U empacotado com um agente secante, e a célula de foto-absorção, o presente método usa um sistema aberto de circulação do fluxo de ar como mostrado na Figura 1. O aparato constitui um sistema fechado e inclui uma bomba de diafragma, recipiente de reação, armadilha de gás ácido, armadilha de umidade (banho de gelo), e uma válvula de 4-estágios. Durante sua operação, o vapor elementar gerado pela adição de cloreto estanhoso é circulado via válvula de 4-estágios a uma taxa de fluxo de 1-1,5 L/min por 30 segundos para homogeneizar a concentração na fase gasosa. A válvula de 4-estágios é então girada 90° para introduzir a fase gasosa toda de uma vez na célula de foto-absorção. A medição é completada dentro de um minuto por amostra com este aparato que pode medir até mesmo 0,1 ng de mercúrio com alta precisão.

Adicionalmente, no método para preparar a solução da amostra para o presente método, a forma de digestão úmida convencional é melhorada pelo uso de um frasco de 50 mL com um longo pescoço (pelo menos 10 cm), como

um balão volumétrico de paredes grossas¹ com uma rolha de vidro, como também um sistema misto de ácidos com uma taxa aumentada de ácido sulfúrico, $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ (1+1+5), que já contém ácido perclórico, para a digestão da amostra. Isto é inovador na digestão da amostra que pode ser completada em um tempo relativamente curto sem perda de mercúrio. É um método simples onde a amostra é submetida à digestão úmida em uma chapa elétrica a 200-230°C durante 30 minutos e após resfriada tem seu volume fixo completado com água. Este método pode ser aplicado diretamente à digestão de amostras biológicas inclusive cabelo, sangue, e peixe como também várias amostras sólidas como sedimento e solo. Não é necessário um condensador de refluxo durante o aquecimento.

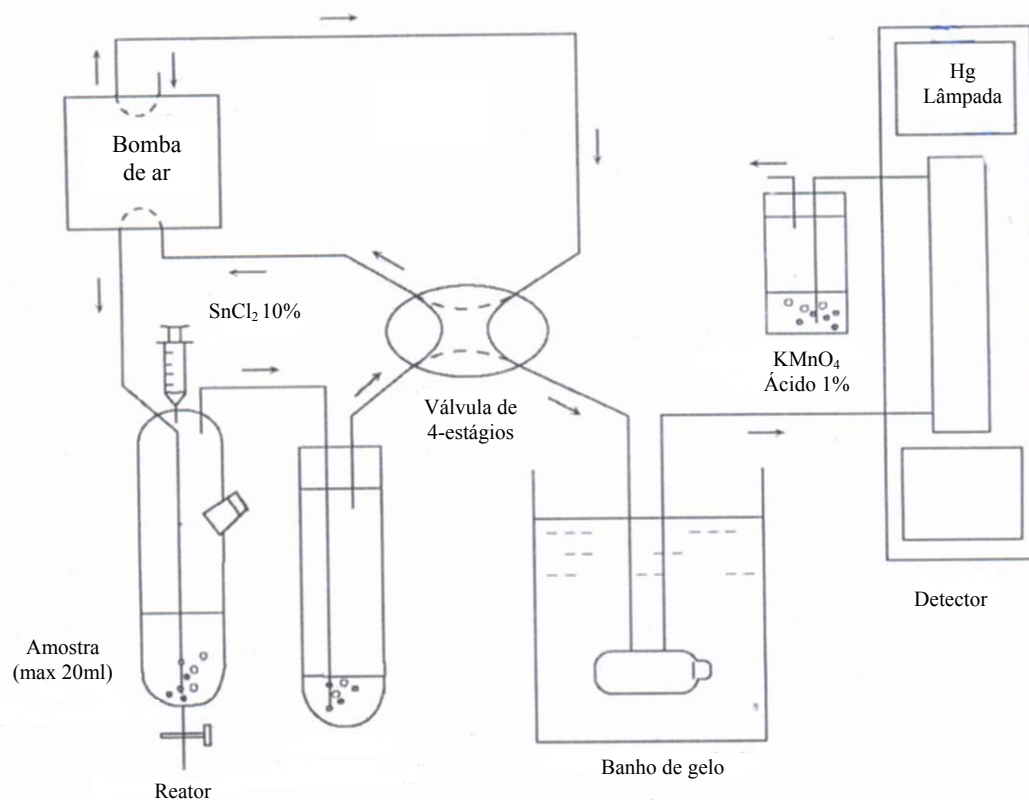


Figura 1. Diagrama Esquemático de Redução/Espectrometria de Absorção Atômica por Vapor Frio (CVAAS) (Sistema de Circulação Aberta de Fluxo de ar)²

Notas de Procedimentos

1. Um balão volumétrico de paredes grossas feito de PyrexR, disponível pela Koei Co. Ltd., Kumamoto, Japan, é recomendado por razões de segurança. Se este for indisponível, um balão volumétrico de PyrexR disponível comercialmente pode ser usado. Além disso, um tubo de ensaio feito de PyrexR (21 mm de diâmetro e 200 mm de altura) pode ser usado em vez do balão volumétrico, e um bloco aquecedor de alumínio pode ser usado em vez de uma chapa elétrica para digestão da amostra usando o mesmo procedimento como descrito acima.
2. O aparato automatizado baseado neste princípio está comercialmente disponível como um Analisador de Mercúrio Semi-automatizado Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tokyo, Japan).

3-1-1 Amostras Biológicas (incluindo peixe, molusco, sangue humano, urina, e tecidos como cordão umbilical)

Este método é aplicado a amostras biológicas como peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical. Antes de ser pesada, a amostra é colocada em um frasco, cortada em pedaços finos com tesouras de dissecação, e homogeneizada a um estado pastoso grosseiro, para preparação para análise. Amostras líquidas como sangue são bem misturadas com uma pipeta Pasteur com um bulbo de borracha na preparação para análise.

a. Reagentes

- (1) $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1): Misturar 100 mL de ácido perclórico (para medida de metais tóxicos) em 100 mL de ácido nítrico (para medida de metais tóxicos). (Armazenar em um local escuro refrigerado).
- (2) H_2SO_4 : Ácido Sulfúrico (para medida de metais tóxicos).
- (3) Água Destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente limpo de vidro.
- (4) HCl : Ácido clorídrico (grau analítico).
- (5) Solução de SnCl_2 10%: Dissolver 10 g de cloreto de estanho (II) dihidratado (grau analítico), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em 9 mL de HCl e diluir a 100 mL com água destilada. Aerar com gás N_2 (100 mL/min., 20-30 minutos) para expelir qualquer mercúrio da solução.
- (6) NaOH 5N: Dissolver 20 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada e completar ao volume final de 100 mL.
- (7) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 5N 50 vezes com água destilada. (Nota da tradutora: Para 50 mL de solução de NaOH 0,1 N, adicionar 1 mL de NaOH 5N e completar com água destilada ao volume final de 50 mL).

- (8) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise.)
- (9) Solução padrão de metilmercúrio¹: Pesar 12,5 mg de CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1,0 μg de Hg.
- (10) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com uma tampa de vidro. Agitar por 3 minutos em agitador para extrair metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm durante 3 minutos, retirar da centrífuga e descartar a fase orgânica (fase superior). Selar o tubo e armazenar em um local refrigerado escuro. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 μg de Hg.
- (11) H_2SO_4 1N: Adicionar gradualmente 30 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (12) Solução ácida de KMnO_4 1% para coletar mercúrio: Dissolver 1 g de permanganato de potássio (grau analítico) em 100 mL de H_2SO_4 1N.
- (13) Solução de KMnO_4 0,5%: Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (14) Tolueno: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (grau de reagente para análises de pesticida residual).

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Analisador de Mercúrio²: Analisador de Mercúrio Semi-automatizado Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- (2) Chapa elétrica: Capaz de atingir uma temperatura na superfície de 250°C.
- (3) Frasco para digestão da amostra³: Balão volumétrico de 50 mL de paredes grossas feito de Pyrex (150 mm de altura total, 13 mm de diâmetro na abertura).
- (4) Balões Volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (5) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (6) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL.
- (7) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (8) Tesouras de dissecação.
- (9) Multi-medidor de fluxo: Medidor de fluxo tipo V4- multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (10) Agitador de sentido recíproco.
- (11) Centrífuga.

Nota: Antes do uso, lavar completamente todos os aparatos de vidro do laboratório e recipientes de amostras a serem usados nas análises com uma solução de KMnO_4 0,5%. Enxaguar com água até a cor da solução de KMnO_4 não ser mais visível.

c. Preparação da solução de amostra

Pesar precisamente uma amostra homogeneizada (máximo de 0,5 g em peso úmido) e colocar no fundo de um frasco de digestão de amostra. (Para

amostras secas como cordão umbilical, pesar precisamente 0,1 g e adicionar 0,5 mL de água destilada para umedecer previamente). Adicionar 1 mL de água destilada, 2 mL de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1), e 5 mL de H_2SO_4 em sequência e aquecer em uma chapa elétrica à 200-230°C por 30 minutos. Deixar esfriar, adicionar água destilada para completar o volume fixo de 50 mL, misturar bem, e usar a solução resultante como a solução de amostra.

Para amostras de urina, adicionar primeiro 2 mL de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1) e 5 mL de H_2SO_4 em um frasco de digestão de amostra. Adicionar gradualmente um volume fixo (normalmente 2 mL) da amostra de urina enquanto se agita lentamente. Para preparar a solução da amostra⁴, aquecer e tratar de maneira similar ao procedimento descrito anteriormente. Separadamente, transferir 0 e 1,0 mL de solução de metilmercúrio-cisteína (0,10 $\mu\text{g Hg/mL}$) em dois frascos de digestão de amostra (correspondendo a 0 e 0,10 $\mu\text{g Hg}$). Adicionar 1 mL de água destilada somente ao anterior (o branco) seguido por 2 mL de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1) e 5 mL de H_2SO_4 em sequência. Seguir os mesmos passos como indicado anteriormente na preparação das soluções de amostra para fazer uma solução de branco e uma solução de padrão para a medida de mercúrio total.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Procedimentos de análises

Transferir suavemente volumes fixos V mL (normalmente 5 mL, para um máximo de 10 mL) de cada uma das soluções de branco, de solução padrão, e de solução de amostra no recipiente de reação do analisador de mercúrio e fechá-lo. Adicionar 1 mL de solução de SnCl_2 10% com o acessório tipo dispenser e apertar o botão INÍCIO (START). A bomba de diafragma será acionada e o vapor de mercúrio elementar gerado será

circulado através da válvula de 4-estágios entre o recipiente de reação e a armadilha do gás ácido durante 30 segundos para homogeneizar a concentração na fase gasosa, enquanto o gás ácido gerado da solução da amostra é coletado na solução alcalina. Após 30 segundos, a válvula de 4-estágios girará automaticamente 90°, permitindo a introdução de vapor de mercúrio na célula de foto-absorção através de um banho de gelo para medida da absorbância. A leitura do registrador aumentará nitidamente e diminuirá com um pico preciso. Quando a leitura do registrador começar a diminuir, abrir a torneira na parte mais baixa do recipiente de reação para descartar a solução contida, fechar novamente, e permitir a aeração até que volte à linha de base. Apertar o botão "RESET" para começar a próxima medida.⁵

Cálculos

As alturas dos picos (mm) obtidos após a medida de volumes fixos V mL⁶ de cada branco, padrão, e soluções de amostras (ou suas soluções diluídas) para a análise de mercúrio total são rotulados Pbl, Pstd, e Ps, respectivamente. A concentração de mercúrio total na amostra é calculada com a seguinte fórmula⁷:

$$\text{Concentração de mercúrio total na amostra } (\mu\text{g/g}) = 0.10 \mu\text{g} \times \\ (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{peso da amostra (g)}$$

Para amostras de sangue e urina, as concentrações de mercúrio são normalmente expressas em ng/g e ng/mL, respectivamente, e assim calculadas com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de Mercúrio total em sangue ou urina (ng/g or mL)} = \\ 100 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{quantidade de amostra (g ou mL)}$$

Notas de Procedimentos

1. Embora uma solução padrão de mercúrio inorgânico (II) geralmente seja usada como uma solução padrão para a análise de mercúrio total na amostra, o presente método usa uma solução de metilmercúrio-cisteína como a solução padrão, a mesma usada para análises de metilmercúrio. Semelhantemente às amostras, é submetida à digestão úmida para fazer uma solução padrão para medida de mercúrio total. Este é um esforço para se evitar erros de medida causados pelo uso de uma solução padrão diferente, porque a maioria do mercúrio contido em peixe e molusco está na forma de metilmercúrio, e o mercúrio total assim como o metilmercúrio na amostra são geralmente medidos ao mesmo tempo. O metilmercúrio em solvente orgânico é extremamente estável. Até mesmo 1 ppm de metilmercúrio em uma solução de tolueno pode ser usado por vários anos se armazenado congelado para prevenir volatilização do solvente. Quando a preparação de uma solução padrão para medida de mercúrio total usando o presente método inevitavelmente requer o uso de um padrão de mercúrio inorgânico (II), o seguinte método é recomendado por sua estabilidade, boas características de armazenamento, e outras vantagens.

Solução padrão de mercúrio inorgânico: Pesar 13,5 mg de cloreto de mercúrio (II) (padrão) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em 4 mL de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1) e 10 mL de H_2SO_4 adicionados em sequência, e completar até a marca com água destilada para fazer uma solução estoque de mercúrio (1 mL da solução estoque de mercúrio = 100 μg Hg). A solução estoque de mercúrio obtida deste modo será estável durante vários anos se lacrada e armazenada em um local

refrigerado escuro. A cada uso, a solução estoque é diluída 1.000 vezes com a solução de branco anterior para fazer uma solução padrão de mercúrio (1 mL desta solução = 0,10 µg Hg). Além disso, quando uma solução padrão comercialmente disponível é usada, a solução de branco é usada da mesma forma para diluí-la adequadamente.

2. O aparato automatizado baseado neste princípio está comercialmente disponível como um Analisador de Mercúrio Semi-automatizado Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tokyo, Japan).
3. Por razões de segurança é recomendado um balão volumétrico de paredes grossas feito de PyrexR, disponível pela Koei Co. Ltd., Kumamoto, Japan. Se este estiver indisponível, pode ser usado um balão volumétrico comercialmente disponível feito de PyrexR. Além disso, um tubo de ensaio feito de PyrexR (21 mm em diâmetro e 200 mm em altura) pode ser usado em vez de um balão volumétrico, e um bloco aquecedor de alumínio pode ser usado em vez de uma chapa elétrica para digestão da amostra que usa o mesmo procedimento como descrito acima.
4. Para amostras de urina, colocando a amostra no frasco de digestão de amostra e adicionando $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1) e ácido sulfúrico em sequência - como é o caso com as outras amostras biológicas - pode resultar em reações súbitas violentas, acompanhadas pelo risco de transbordamento da mistura do recipiente. Para evitar este risco e assegurar uma operação segura, colocar primeiro os ácidos no frasco de digestão de amostra e então adicionar a amostra de urina gradativamente enquanto gira o frasco de digestão de amostra.
5. A menos que tenha decorrido tempo suficiente para purga (pelo menos 15 segundos) depois da medida da amostra, resíduos da solução de teste

anterior podem continuar tendo um efeito. Particularmente quando a medida de uma amostra com uma concentração baixa seguir a medida de uma amostra com uma concentração alta, uma medida com água destilada deveria ser efetuada entre elas para confirmar que o valor diminuiu ao nível de base.

6. A concentração de equilíbrio entre a fase aquosa e a fase gasosa do vapor de mercúrio reduzido e vaporizado pode diferir dependendo da concentração ácida e do volume da solução de amostra na medida. Então, a solução de branco é usada para diluição da solução de amostra e ambas as solução de amostra e solução de padrão são medidas sob as mesmas condições em todos os aspectos (concentração ácida e volume).
7. Em espectrometria de absorção atômica, o método da curva de calibração multi-ponto não é requerido sempre porque a faixa linear da curva de calibração é larga. Então, é freqüentemente usado um método de curva de calibração de um ponto. Ademais, além da solução de branco, escolher a concentração mais satisfatória da solução de padrão de, por exemplo, 0,02, 0,05, ou 0,10 $\mu\text{g Hg}/50 \text{ mL}$ para uma medida de mercúrio total com uma altura de pico próximo do da solução de amostra. Neste caso, usar o mesmo volume de ambas as solução de padrão e solução de amostra durante as medidas. Isto facilitará a quantificação.

**Amostras biológicas ,
(0,5 g max. de peso úmido)**

Frasco de digestão da amostra

Água destilada, 1 mL
HNO₃-HClO₄ (1+1), 2 mL
H₂SO₄, 5 mL
Aquecer a 200-230°C por 30 min.

Amostra Digerida

Resfriar.
Completar p/ 50 mL c/ água destilada

Solução teste, um volume fixo (usualmente 5 mL)

Solução de SnCl₂ 10%, 1 mL

CVAAS

Fluxograma 1. Determinação de Mercúrio Total em Amostras Biológicas (peixe, molusco, cabelo humano, sangue, e tecidos como cordão umbilical)

Frasco de digestão da amostra

HNO₃-HClO₄ (1+1), 2 mL
H₂SO₄, 5 mL

Amostras de urina, 2 mL

Adicionar gota a gota girando lentamente.
Aquecer a 200-230°C por 30 min.

Amostras digeridas

Resfriar.
Completar p/ 50 mL com água destilada.

Solução teste, um volume fixo (usualmente 5 mL)

Solução de SnCl₂ a 10%, 1 mL

CVAAS

Fluxograma 2. Determinação de Mercúrio Total em Urina

3-1-2 Cabelo

Pesar 20-30 mg de amostra de cabelo em um béquer, lavar com detergente neutro (diluído 100 vezes) e água destilada através de decantação, e lavar novamente com uma pequena quantidade de acetona para remover a água. Remover a acetona residual sob pressão reduzida. Transferir a amostra de cabelo para um frasco de 20 mL e cortar a um estado aproximado de pó com tesouras de dissecação para preparar uma amostra para análise.

a. Reagentes

- (1) Acetona: CH_3COCH_3 (grau analítico).
- (2) Etanol: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (grau analítico).
- (3) $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1): Misturar 100 mL de ácido perclórico (para medida de metais tóxicos) em 100 mL de ácido nítrico (para medida de metais tóxicos). (Armazenar em local escuro refrigerado).
- (4) H_2SO_4 : Ácido Sulfúrico (para medida de metais tóxicos).
- (5) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (6) HCl : Ácido clorídrico (grau analítico)
- (7) Solução de SnCl_2 10%: Dissolver 10 g de cloreto de estanho (II) di-hidratado (grau analítico), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em 9 mL de HCl e diluir para 100 mL com água destilada. Aerar com gás N_2 (100 mL/min., 20-30 minutos) para expelir qualquer mercúrio da solução.
- (8) NaOH 5N: Dissolver 20 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (9) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 5N 50 vezes com água destilada.

- (10) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (11) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1,0 μg de Hg.
- (12) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com tampa. Agitar durante 3 minutos com um agitador para extrair metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos e descartar a fase orgânica (fase superior). Selar o tubo e armazenar em um local refrigerado escuro. (Preparar uma solução nova mensalmente.) Um mL desta solução contém 0,1 μg de Hg.
- (13) H_2SO_4 1N: Adicionar gradativamente 30 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) à água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (14) Solução ácida de KMnO_4 1% para coletar mercúrio: Dissolver 1 g de permanganato de potássio (grau analítico) em 100 mL de H_2SO_4 1N.
- (15) Solução de KMnO_4 0,5%: Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (16) Tolueno: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (grau de reagente para análise de pesticida residual).

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Analisador de Mercúrio: Analisador Semi-automático de Mercury Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- (2) Chapa Aquecedora: Capaz de atingir uma temperatura de 250°C na superfície.
- (3) Frasco de digestão da amostra: balão volumétrico de 50 mL, de paredes grossas feito de Pyrex (150 mm de altura total, 13 mm de diâmetro de entrada).
- (4) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (5) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (6) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL.
- (7) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (8) Tesouras de dissecação.
- (9) Multi-medidor de fluxo: Medidor de fluxo tipo V4- multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (10) Agitador de sentido recíproco.
- (11) Centrífuga.
- (12) Béquer.

Nota: Antes do uso, lavar completamente todos os aparatos de vidro do laboratório e recipientes de amostras a serem usados nas análises com uma solução de KMnO_4 0,5%. Enxaguar com água até a cor da solução de KMnO_4 não ser mais visível.

c. Preparação da solução de teste

Pesar precisamente uma amostra finamente cortada (normalmente ao redor de 10 mg) e colocar em um frasco de digestão de amostra. Adicionar 1

mL de água destilada, 2 mL de HNO₃-HClO₄ (1+1), e 5 mL de H₂SO₄ em sequência. Aquecer em uma chapa elétrica à 200-230°C durante 30 minutos. Deixar esfriar, adicionar água destilada para fazer um volume fixo, e usar a solução resultante como a solução amostra.

Separadamente, transferir 0 e 1,0 mL da solução de metilmercúrio-cisteína (100 ng Hg/mL) em dois frascos de digestão de amostra (correspondendo a 0 e 100 ng Hg). Adicionar 1 mL de água destilada somente ao primeiro (o branco) seguido por 2 mL de HNO₃-HClO₄ (1+1) e 5 mL de H₂SO₄ em sequência. Para obter uma solução teste de branco e uma solução teste de padrão para a medida de mercúrio total, seguir os mesmos procedimentos como indicado anteriormente para preparação da solução teste de amostra.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Procedimentos de análise

Transferir suavemente um volume fixo V mL (normalmente 5 mL, para um máximo de 10 mL) de cada uma das soluções de branco, de solução padrão para medida de mercúrio total, e de solução de amostra no recipiente de reação do analisador de mercúrio e fechá-lo. Adicionar 1 mL de solução de SnCl₂ 10% com o acessório tipo dispenser e apertar o botão INÍCIO (START). A bomba de diafragma será acionada e o vapor de mercúrio gerado será circulado através da válvula de 4-estágios entre o recipiente de reação e a armadilha do gás ácido durante 30 segundos para homogeneizar a concentração na fase gasosa, enquanto o gás ácido gerado da solução da amostra é coletado na solução alcalina. Após 30 segundos, a válvula de 4-estágios girará automaticamente 90°, permitindo a introdução de vapor de mercúrio na célula de foto-absorção através de um banho de gelo para medida

da absorvância. As leituras do registrador aumentarão nitidamente e diminuirão com um pico preciso. Quando a leitura do registrador começar a diminuir, abrir a torneira na parte mais baixa do reator para descartar a solução contida, fechar novamente, e permitir a aeração até que volte à linha de base. Aperte o botão "RESET" para começar a próxima medida.⁵

d. Procedimentos de análise e cálculos

Cálculos

As alturas dos picos (mm) obtidos após a medida de volumes fixos V mL de cada branco, padrão, e soluções de amostra (ou suas soluções diluídas) para a análise de mercúrio total são rotulados Pbl, Pstd, e Ps, respectivamente. A concentração de mercúrio total na amostra é calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de mercúrio total na amostra (ng/mg)} = 100 \text{ ng} \times \frac{(Ps - Pbl)}{(Pstd - Pbl)} \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{peso da amostra (mg)}$$

Para os fundamentos da análise de mercúrio total, ver pag. 35-37 para as Notas de Procedimentos em "3-1-1 Amostras Biológicas (inclusive peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical)".

Amostra de cabelo (cerca de 10 mg)

Frasco de digestão da amostra

Água destilada, 1 mL
HNO₃-HClO₄ (1+1), 2 mL
H₂SO₄, 5 mL
Aquecer a 200-230°C por 30 min.

Amostra digerida

Resfriar.
Completar a 50 mL com água destilada.

Solução de teste, um volume fixo (usualmente 5 mL)

Solução de SnCl₂ 10%, 1 mL

CVAAS

Fluxograma 3. Determinação de Mercúrio Total em Cabelo

3-1-3 Sedimento/solo

Remover pedaços de madeira, seixos, conchas, e pó da amostra de sedimento ou solo coletado. Homogeneizar a amostra com o método de quartejamento e passar por uma peneira de malha de 2,0 mm para preparar uma amostra para análise. Se a amostra tiver um conteúdo alto de água, centrifugar para remover o sobrenadante e misturar bem para homogeneizar antes de submetê-la à análise.

a. Reagentes

- (1) $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1): Misturar 100 mL de ácido perclórico (para medida de metais tóxicos) em 100 mL de ácido nítrico (para medida de metais tóxicos). (Armazenar em local refrigerado escuro).
- (2) H_2SO_4 : Ácido Sulfúrico (para medida de metais tóxicos).
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) HCl : Ácido clorídrico (grau analítico)
- (5) Solução de SnCl_2 10%: Dissolver 10 g de cloreto de estanho (II) dihidratado (grau analítico), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em 9 mL de HCl e diluir para 100 mL com água destilada. Aerar com gás N_2 (100 mL/min., 20-30 minutos) para to expelir qualquer mercúrio da solução.
- (6) NaOH 5N: Dissolver 20 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (7) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 5N 50 vezes com água destilada.
- (8) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova a cada análise).

- (9) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1,0 μg de Hg.
- (10) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa. Agitar por 3 minutos com um agitador elétrico para extrair metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos e descartar a fase orgânica (fase superior). Selar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 μg de Hg.
- (11) H_2SO_4 1N: Adicionar gradativamente 30 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) à água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (12) Solução ácida de KMnO_4 1% para coleta de mercúrio: Dissolver 1 g de permanganato de potássio (grau analítico) em 100 mL de H_2SO_4 1N.
- (13) Solução de KMnO_4 0,5%: Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (14) Tolueno: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (grau de reagente para análises de pesticida residual).

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Analisador de Mercúrio: Analisador Semi-automático de Mercury Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tokyo, Japan)
- (2) Chapa Aquecedora: Capaz de atingir uma temperatura de 250°C na superfície.
- (3) Frasco de digestão da amostra: balão volumétrico de 50 mL, de paredes grossas feito de Pyrex (150 mm de altura total, 13 mm de diâmetro de entrada).
- (4) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL
- (5) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL
- (6) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL.
- (7) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (8) Tesouras de dissecação.
- (9) Multi-medidor de fluxo: Medidor de fluxo tipoV4- multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (10) Agitador sentido recíproco.
- (11) Centrífuga.
- (12) Cadinhos de porcelana.

Nota: Antes do uso, lavar completamente todos os aparatos de vidro do laboratório e recipientes de amostras a serem usados nas análises com uma solução de KMnO_4 0,5%. Enxaguar com água até a cor da solução de KMnO_4 não ser mais visível.

c. Preparação da solução da amostra

Pesar precisamente uma amostra homogeneizada (máximo de 0,5 g em peso úmido) no fundo de um frasco de digestão de amostra. Adicionar 1 mL de água destilada, 2 mL de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1+1), e 5 mL de H_2SO_4 em

sequência seguido pelo tratamento de calor em uma chapa elétrica à 200-230°C durante 30 minutos. Deixar esfriar, adicionar água destilada para fazer um volume fixo de 50 mL, misturar bem, e usar a solução resultante como a solução da amostra.

Separadamente, transferir 0 e 1,0 mL de solução de metilmercúrio-cisteína (0,10 µg Hg/mL) em dois frascos de digestão de amostra (correspondendo a 0 e 0,10 µg Hg). Adicionar 1 mL de água destilada somente ao primeiro (o branco) seguido por 2 mL de HNO₃-HClO₄ (1+1) e 5 mL de H₂SO₄ em sequência. Para obter uma solução de branco e uma solução de padrão para a medida de mercúrio total, seguir os mesmos procedimentos como indicado anteriormente para preparação da solução de amostra.

Para amostras úmidas, pesar aproximadamente 10-20 g da amostra em um cadinho de porcelana de peso conhecido. Colocar em uma estufa à 105°C e secar por 2 a 3 horas. Deixar esfriar em um dessecador e pesar para obter a relação de peso úmido/peso seco (WW/DW).

d. Procedimentos de análises e cálculos

Procedimentos de análises

Transferir suavemente um volume fixo V mL (normalmente 5 mL, para um máximo de 10 mL) de cada uma das soluções de branco, de solução padrão, e de solução de amostra no recipiente de reação do analisador de mercúrio e fechá-lo. Adicionar 1 mL de solução de SnCl₂ 10% com o acessório tipo dispenser e apertar o botão INÍCIO (START). A bomba de diafragma será acionada e o vapor de mercúrio elementar gerado será circulado através da válvula de 4-estágios entre o recipiente de reação e a armadilha do gás ácido durante 30 segundos para homogeneizar a concentração na fase gasosa, enquanto o gás ácido gerado da solução da

amostra é coletado na solução alcalina. Após 30 segundos, a válvula de 4-estágios girará automaticamente 90°, permitindo a introdução de vapor de mercúrio elementar na célula de foto-absorção através de um banho de gelo para medida da absorbância. A leitura do registrador aumentará nitidamente e diminuirá com um pico preciso. Quando a leitura do registrador começar a diminuir, abrir a torneira na parte mais baixa do reator para descartar a solução contida, fechar novamente, e permitir a aeração até que volte à linha de base. Apertar o botão "RESET" para começar a próxima medida.

Cálculos

As alturas dos picos (mm) obtidos após a medida de volumes fixos V mL (usualmente 5 mL, máximo de 10 mL) de cada branco, padrão, e soluções de amostra (ou suas soluções diluídas) para a análise de mercúrio total são rotulados Pbl, Pstd, e Ps, respectivamente. A concentração de mercúrio total ($\mu\text{g/g}$ em peso seco) na amostra é calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de mercúrio total na amostra } (\mu\text{g/g}) = 0,10 \mu\text{g} \times \\ (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator diluição} \times 1/\text{peso amostra (g)} \times \text{WW/DW}$$

WW/DW: relação entre peso úmido/peso seco

Nota: Para os fundamentos da análise de mercúrio total, ver pag. 35-37 para as Notas de Procedimentos em "3-1-1 Amostras Biológicas (inclusive peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical)".

**Amostras de sedimento/solo
(0,5 g max. de peso úmido)**

Frasco de digestão da amostra

Água destilada, 1 mL
HNO₃-HClO₄ (1+1), 2 mL
H₂SO₄, 5 mL
Aquecer a 200-230°C por 30 min.

Amostras digeridas

Resfriar
Completar a 50 mL c/ água destilada

Solução amostra, um volume fixo (usualmente 5 mL)

Solução de SnCl₂ 10%, 1 mL

CVAAS

Fluxograma 4. Determinação de Mercury Total em Sedimento/Solo

3-1-4 Água¹

Depois da coleta de água, a amostra de água trazida para o laboratório é normalmente filtrada com um filtro de membrana 0,45 µm para preparar uma amostra para análise. É recomendável analisar o mercúrio o mais cedo possível. Por conveniência, a água total pode ser usada como uma amostra.

a. Reagentes

- (1) HNO₃-HClO₄ (1+1): Misturar 100 mL de ácido perclórico (para medida de metais tóxicos) em 100 mL de ácido nítrico (para medida de metais tóxicos). (Armazenar em local escuro refrigerado).
- (2) H₂SO₄: Ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos).
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) HCl: Ácido Clorídrico (grau analítico).
- (5) Solução de SnCl₂ 10%: Dissolver 10 g de cloreto de estanho (II) dihidratado (grau analítico), SnCl₂ · 2H₂O, em 9 mL de HCl e diluir para 100 mL com água destilada. Aerar com gás N₂ (100 mL/min., 20-30 minutos) para expelir qualquer mercúrio da solução.
- (6) NaOH 5N: Dissolver 20 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (7) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 5N 50 vezes com água destilada.
- (8) Solução purificada de ditizona-tolueno² 0,01%: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, C₆H₅N:NCSNHNHC₆H₅, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar rapidamente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase do fundo). Depois disto, transferir a fase do fundo para um recipiente de vidro provido com rolha de vidro. Adicionar HCl 1N gota a gota para

tornar a solução ligeiramente ácida (cristais negro-esverdeados precipitarão). Adicionar 100 mL de tolueno e agitar para obter a solução purificada de ditizona-tolueno 0,01%. Deixar separar as fases, descartar a fase de fundo, e fechar o frasco. Armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova a cada análise).

- (9) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (10) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1,0 μg of Hg.
- (11) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro. Agitar por 3 minutos com um agitador elétrico para extrair metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 μg of Hg.
- (12) H_2SO_4 1N: Adicionar gradualmente 30 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (13) Solução ácida de KMnO_4 1% para coletar mercúrio: Dissolver 1 g de permanganato de potássio (grau analítico) em 100 mL de H_2SO_4 1N.

- (14) Solução de KMnO_4 0,5%: Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (15) H_2SO_4 20N: Transferir cerca de 350 mL de água destilada para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar gradualmente 600 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) agitando em banho de gelo. Após alcançar a temperatura ambiente, adicionar água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (16) NaOH 10N: Dissolver 400 g de hidróxido de sódio (grau analítico) para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (17) Solução de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 10%: Dissolver 10 g de cloridrato de hidroxilamina (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (18) Solução de EDTA a 10%: Dissolver 10 g de etilenodiaminotetraacetato tetrasódico (grau analítico), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (19) Tolueno: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (grau de reagente para análises de pesticida residual).

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Analisador de Mercúrio: Analisador Semi-automático de Mercúrio Modelo Hg-201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd., Tokyo, Japan).
- (2) Chapa Aquecedora: Capaz de atingir uma temperatura de 250°C na superfície.

- (3) Frasco de digestão da amostra: balão volumétrico de 50 mL, de paredes grossas feito de Pyrex (150 mm de altura total, 13 mm de diâmetro de entrada).
- (4) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (5) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (6) Funil de separação de 2 L.
- (7) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (8) Evaporador rotativo.
- (9) Agitador magnético.
- (10) Multi-medidor de fluxo: Medidor de fluxo tipo V4-multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (11) Agitador sentido recíproco.
- (12) Centrífuga.

Nota: Antes do uso, lavar completamente todos os aparatos de vidro do laboratório e recipientes de amostras a serem usados nas análises com uma solução de KMnO_4 0,5%. Enxaguar com água até a cor da solução de KMnO_4 não ser mais visível.

c. Preparação da solução da amostra

Transferir 2 L de uma amostra de água para um funil de separação de 2 L. Adicionar 10 mL de H_2SO_4 20N e 5 ml de solução de KMnO_4 0,5%, misturar por agitação, e deixar descansar durante 5 minutos. Neutralizar com 20 mL de NaOH 10N, adicionar 5 mL de solução de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 10%, e agitar. Deixe descansar por 20 minutos³. Adicionar 5 mL de solução de EDTA 10% à mistura e misturar por agitação. Adicionar precisamente 10 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada seguido por agitação vigorosa durante 1

minuto para extrair o mercúrio na amostra. Deixe descansar por pelo menos 1 hora, evitando luz solar direta. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Transferir a fase de tolueno preferivelmente para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com tampa de vidro e centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos com a tampa de vidro no lugar. (Quando for formada uma emulsão, adicionar 0,5 g de sulfato de sódio anidro e agitar seguido por centrifugação para remover a fase mais baixa). Transferir um volume fixo (normalmente 7 mL) da fase de tolueno para um frasco de digestão de amostra. Com um evaporador rotativo, evaporar até a secura em um banho de água à 60°C. Adicionar 1 mL de água destilada, 2 mL de HNO₃-HClO₄ (1+1), e 5 mL de H₂SO₄ e aquecer em uma chapa elétrica à 200-230°C durante 30 minutos. Deixar esfriar e adicionar água destilada para obter um volume fixo de 50 mL. Misturar bem e usar como uma solução da amostra. Separadamente, escolher uma amostra com um conteúdo mais baixo de mercúrio baseado no tipo de amostra de água. Para cada uma das amostras de água de 2 L escolhidas, adicionar 0 e 0,2 mL da solução de metilmercúrio-cisteína (100 ng Hg/mL; correspondendo a 0 e 20 ng Hg). Seguir os procedimentos anteriores de preparação para soluções de amostra para obter uma solução de branco e solução padrão para a medida de mercúrio total.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Procedimentos de análise

Transferir suavemente um volume fixo V mL (normalmente 10 mL) da solução de branco, da solução padrão, e de solução de amostra no recipiente de reação do analisador de mercúrio e fechá-lo. Adicionar 1 mL de solução de SnCl₂ 10% com o acessório tipo dispenser e apertar o botão INÍCIO (START). A bomba de diafragma será acionada e o vapor de mercúrio

elementar gerado será circulado através da válvula de 4-estágios entre o recipiente de reação e a armadilha do gás ácido durante 30 segundos para homogeneizar a concentração na fase gasosa, enquanto o gás ácido gerado da solução de teste é coletado na solução alcalina. Após 30 segundos, a válvula de 4-estágios girará automaticamente 90°, permitindo a introdução de vapor de mercúrio elementar na célula de foto-absorção através de um banho de gelo para medida da absorbância. A leitura do registrador aumentará nitidamente e diminuirá com um pico preciso. Quando a leitura do registrador começar a diminuir, abrir a torneira na parte mais baixa do reator para descartar a solução contida, fechar novamente, e permitir a aeração até que volte à linha de base. Aperte o botão "RESET" para começar a próxima medida.

Cálculos

As alturas dos picos (mm) obtidos após a medida de volumes fixos V mL (usualmente 10 mL) de cada branco, padrão, e soluções de amostra (ou suas soluções diluídas) são rotulados Pbl, Pstd, e Ps, respectivamente. A concentração de mercúrio total na amostra é calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de mercúrio total na amostra (ng/L)} = 20 \text{ ng} \times (\text{Ps} - \text{Pbl}) / (\text{Pstd} - \text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1 / \text{volume da amostra (L)}$$

Notas de Procedimentos

1. Como as concentrações de mercúrio em amostras de água são extremamente baixas e normalmente ao nível de ng/L, para medida do mercúrio é requerida pré-concentração do mercúrio na amostra. No presente método, é executada pré-concentração quantitativa e eficiente extraindo-se o mercúrio com um pequeno volume de ditizona-tolueno

0,01% após a ionização de todas as espécies de mercúrio na amostra com permanganato de potássio em um meio ácido com ácido sulfúrico. Este usa as propriedades químicas da ditizona: combina facilmente com espécies iônicas de mercúrio para formar um sal complexo que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como o tolueno. Depois da pré-concentração extraindo o mercúrio com ditizona-tolueno 0,01%, o extrato é evaporado à secura sob pressão reduzida. Semelhante ao caso de amostras biológicas e afins, o resíduo é submetido à digestão úmida para preparar uma solução de amostra para a análise de mercúrio total com CVAAS.

2. Ditizona (difeniltiocarbazona) é facilmente oxidada e normalmente contém sua forma oxidada, difeniltiocarbadiazona, como uma impureza. Às vezes, contém também mercúrio ou derivados na forma de complexo do metal, embora a quantidade seja minúscula. Estas impurezas são altamente solúveis em solventes orgânicos, mas insolúvel em soluções alcalinas, ao passo que a ditizona pura tem a propriedade química de ser solúvel não só em solventes orgânicos, mas também é solúvel em soluções alcalinas formando seus sais. Esta propriedade habilita a remoção de impurezas para uso da ditizona purificada.
3. Para amostras que contêm grandes quantidades de íons Cl como água do mar, o tratamento da amostra com uma combinação de permanganato de potássio e ácido sulfúrico causa oxidação de íons Cl para Cl₂ ocorrendo durante o tratamento, e o Cl₂ resultante, uma vez gerado, é difícil reduzir através de tratamento com solução de cloridrato de hidroxilamina. Isto resulta em oxidação da ditizona no subsequente passo de extração da ditizona-tolueno. Então, particularmente para amostras de água do mar, é importante manter o tempo de tratamento de 5 minutos com

permanganato de potássio. Além disso, depois da adição e mistura da solução de cloridrato de hidroxilamina, deixar pelo menos 20 minutos de tempo de reação antes do tratamento com EDTA e procedimentos de extração com ditizona-tolueno.

Para os fundamentos da análise de mercúrio total, ver pag. 35-37 para as Notas de Procedimentos em “3-1-1 Amostras Biológicas (inclusive peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical).”

Amostra, 2 L (funil de separação de 2 L)

Adicionar 10 mL de H₂SO₄ 20N e misturar
Adicionar 5 mL de solução de KMnO₄ 0,5% e misturar
Deixar descansar por 5 min.
Adicionar 20 mL de NaOH 10N e misturar para neutralizar.
Adicionar 5 mL de solução NH₂OH·HCl 10%, misturar e deixar descansar por 20 min.
Adicionar 5 mL de solução de EDTA 10% e misturar
Adicionar 10 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar vigorosamente por 1 min.
Deixar descansar por pelo menos 1 hora.

Fase Orgânica (tubo cônico centrífuga de 10 mL)**Fase Aquosa**

(Qdo. uma emulsão é formada, adicionar 0,5 g de Na₂SO₄ e agitar)
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase orgânica, 7 mL (frasco de digestão da amostra)

Evaporar à secura

Resíduo

Água destilada, 1 mL
HNO₃-HClO₄ (1+1), 2 mL
H₂SO₄, 5 mL
Aquecer a 200-230°C por 30 min.

Amostra digerida

Deixar resfriar
Completar a 50 mL com água destilada

Solução de teste, um volume fixo (usualmente 10 mL)

Solução de SnCl₂ 10%, 1 mL

CVAAS**Fluxograma 5. Determinação de Mercúrio Total em Água**

4. Método Analítico para Metilmercúrio

Para medida de mercúrio orgânico, cromatografia gás-líquido com detecção de captura de elétrons (GLC-ECD) é usado para análise seletiva de metilmercúrio e outros compostos organomercuriais. Devido esta técnica proporcionar boa separação e sensibilidade superior por analisar haletos de organomercuriais, ela tem sido extensamente usada para a determinação de metilmercúrio em vários tipos de amostras biológicas e ambientais.

Resumidamente, o procedimento analítico envolve a extração de metilmercúrio nas amostras como seu haleto em um solvente orgânico após acidificação; a extração de volta em uma solução aquosa de cisteína ou glutatona; a re-extração em um solvente orgânico; e medida de metilmercúrio por GLC-ECD. Como uma alternativa, o metilmercúrio pode ser determinado por CVAAS que mede vapor de mercúrio elementar gerado de uma solução amostra aquecida obtida de procedimentos similares de extração de metilmercúrio. Entretanto, neste procedimento de extração direta com solvente orgânico, uma emulsão sólida é freqüentemente formada durante o processo de extração, particularmente com peixes e outras amostras biológicas. Isto torna complicados os passos seguintes e faz com que a eficiência da extração de metilmercúrio varie com o tipo de amostra. Enquanto são propostos vários métodos de pré-tratamento para superar as desvantagens anteriores, nós descrevemos neste os seguintes dois métodos: determinação pelo método de extração de ditizona/GLC-ECD o qual é satisfatório para metilmercúrio em vários tipos de espécimes biológicos e ambientais; e o método de lixiviação com ácido clorídrico/extração com tolueno/GLC-ECD para a determinação de metilmercúrio em cabelo.

4-1 Determinação pelo método de extração com ditizona/cromatografia gás-líquido com detecção de captura de elétron (GLC-ECD)

Princípio

O método de extração de ditizona/GLC-ECD foi estabelecido como um método analítico para metilmercúrio em várias matrizes biológicas e ambientais. Está baseado nas seguintes duas vantagens da extração por ditizona, o qual foi extensamente usado para colorimetria de espécies inorgânicas e orgânicas de mercúrio antes da introdução da absorção atômica nos recentes 1960s: tem eficiência de extração muito mais alta que o de extração direta do solvente, facilitando as separações por extração de quantidades traço de mercúrio de amostras com uma pequena porção da solução; e ditizonato alquil mercúrico, assim que é injetado no GLC, reage com Cl^- na coluna para gerar sua forma de cloreto para detecção quantitativa.

Resumidamente, este método envolve os seguintes passos: pré-tratamento da amostra, extração por ditizona, extração de volta em sulfeto de sódio alcalino, re-extração por ditizona, e medida por GLC. O pré-tratamento apropriado para acomodar as características da composição de cada amostra habilita a extração eficiente de metilmercúrio com uma porção pequena de solução de ditizona-tolueno. Após a extração por ditizona-tolueno as soluções de teste são preparadas com todos os procedimentos comuns, seguidos por medida com GLC-ECD. Para viabilizar o princípio usado para este método, empacotar vários centímetros de cloreto de sódio no lado de injeção da coluna acima do material de empacotamento para GLC.

4-1-1 Amostras biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)¹

Este método é aplicável a amostras biológicas ricas em proteína como peixe, molusco, sangue humano e tecidos, como cordão umbilical. Para uma amostra sólida, colocar em um frasco, cortar em pedaços pequenos com tesouras de dissecação, e homogeneizar a um estado pastoso para obter uma amostra para análise. Para amostras líquidas como sangue, misturar bem com uma pipeta Pasteur com um bulbo ou outro acessório de forma que a amostra seja homogeneizada para análise.

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau para análises de pesticidas).
- (2) Hexano: $CH_3(CH_2)_4CH_3$ (grau para análises de pesticidas).
- (3) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico).
- (4) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em recipiente de vidro limpo.
- (5) Etanol-KOH 1N: Dissolver 56,11 g de hidróxido de potássio (grau analítico) em etanol para fazer um volume final de 1.000 mL. (Armazenar em local refrigerado escuro).
- (6) HCl 1N: Misturar 90 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (7) Solução EDTA 20%: Dissolver 20 g de etilenodiaminotetraacetato tetra-sódio (grau analítico), $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (8) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (9) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.

- (10) Solução de ditizona 0,01% purificada²: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, $C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar brevemente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase de fundo). Depois de deixar as fases para separar, transferir a fase de fundo em um recipiente de vidro provido com tampa de vidro. Adicionar gota a gota HCl 1N para tornar a solução ligeiramente ácida (cristais negro-verdeados precipitarão). Adicionar 100 mL de tolueno e agitar para obter ditizona-tolueno 0,01% purificada. Deixar as fases para separar, descartar a fase de fundo, e selar. Armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (11) Solução alcalina de sulfeto de sódio: Dissolver 0,15 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (grau analítico) em 10 mL de água destilada em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL, provido com rolha de vidro para fazer a solução estoque de sulfeto de sódio. (Preparar uma solução nova mensalmente. Armazenar em um local escuro refrigerado.) A cada uso, transferir 0,1 mL da solução estoque para um recipiente de vidro de 100 mL provido com rolha de vidro, adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e 50 mL de etanol, e misturar para obter uma solução alcalina de sulfeto de sódio. (Um mL desta solução contém 5 μ g de Na_2S).
- (12) Solução tampão de Walpole: Misturar 200 mL de CH_3COONa 1M e aproximadamente 200 mL de HCl 1N para ajustar a pH 3,0.
- (13) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova a cada análise).
- (14) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico

de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como uma solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter a solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.

(15) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa. Agitar por 3 minutos com um agitador elétrico para extrair o metilmercúrio para a fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 µg of Hg.

(16) Sulfato de sódio anidro: Sulfato de sódio anidro (grau de análise para pesticidas) aquecido a 500°C por 2-3 horas (manter em um dessecador).

(17) Gás N₂.

Nota: Para os reagentes anteriores (6)-(9), (11), e (12), preparar as quantidades exigidas com antecedência, adicionar metade do volume de tolueno, lavar por agitação em um funil de separação. Confirmar de antemão que nenhum pico aparece, pois isto poderia interferir com a medida por GLC-ECD.

b. Instrumentos e equipamento

(1) Cromatógrafo gás-líquido com detector de captura de elétron (GLC-ECD).

(2) Multi-medidor de fluxo: Medidor de fluxo Modelo V4 multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).

- (3) Centrífuga.
- (4) Agitador sentido recíproco.
- (5) Banho térmico (banho-maria).
- (6) Agitador magnético.
- (7) Aspirador.
- (8) Agitador tipo Vortex.
- (9) Medidor de pH.
- (10) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (11) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (12) Pipetas Pasteur.
- (13) Funis de separação: 100, 200, e 1.000 mL.
- (14) Recipiente de vidro com tampa de vidro: 100, 200, e 500 mL.
- (15) Recipiente de vidro com tampa rosqueada: 1.000 mL.
- (16) Tubo cônico de centrífuga de 40 mL com tampa de vidro.
- (17) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16.5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (18) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL
- (19) Tesouras de dissecação.

Nota: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes do uso. Confirmar com antecedência que nenhum pico é registrado, pois isso poderia interferir com a medida por GLC-ECD.

Condições cromatográficas gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com poli-dietileno glicol succinato (DEGS) 5-10% em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação da solução amostra

Extração de metilmercúrio

Pesar precisamente uma amostra homogeneizada (normalmente 0,2-0,5 g em peso úmido, cerca de 0,1 g para uma amostra seca) e colocar no fundo de um tubo cônico de centrífuga de uns 40 mL com tampa rosqueada. (Para uma amostra seca, adicionar 0,5 mL de água destilada para umedecer depois de pesar.) Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N. Fechar firmemente e aquecer em um banho térmico à 100°C por 1 hora e ocasionalmente agitar suavemente.³ Deixar esfriar, adicionar 10 mL de HCl 1N e 5 mL de hexano em sequência, e agitar por 3 minutos com um agitador de sentido recíproco. Centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos. Descartar a fase do hexano (fase superior) para remover materiais gordurosos⁴. Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar bem.⁵ Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada. Agitar por 3

minutos para extrair metilmercúrio como seu ditizonato (complexo) na fase de tolueno. Deixar separar as fases. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 2.500 rpm durante 3 minutos e a seguir descartar o máximo possível da fase aquosa restante (fase mais baixa).

Limpeza

Adicionar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e agitar durante 3 minutos para lavar e remover o excesso de ditizona. (Para uma amostra de sangue, acrescentar 0,5 g de sulfato de sódio anidro à fase de tolueno e agitar por 3 minutos antes deste passo, seguido por lavagem com 3 mL de NaOH 1N).⁶ Deixar separar as fases. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos para obter uma fase clara de tolueno. Transferir um volume fixo (normalmente 3 mL) da fase de tolueno para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com rolha de vidro. Adicionar 2 mL da solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 minutos para extrair de volta o metilmercúrio na fase aquosa⁷. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar cuidadosamente a fase de tolueno (fase superior). Adicionar 2 mL de tolueno à fase aquosa e agitar por 3 minutos para lavar a fase aquosa. Centrifugar novamente a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar HCl 1N (3-5 gotas) para tornar a solução ligeiramente ácida.⁸ Com uma pipeta Pasteur, aerar a solução com gás N₂ através de um medidor de fluxo por 3 minutos (50 mL/min.) para expelir o excesso de íons sulfeto como gás sulfídrico. Subseqüentemente, adicionar 2 mL da solução tampão Walpole lavando a extremidade da pipeta Pasteur. Misturar bem com um misturador de vórtice. Adicionar um volume fixo de ditizona-tolueno 0,01% purificada (0,2-1,0 mL, normalmente 0,5 mL) e agitar para extrair o metilmercúrio. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado

com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Acrescentar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e agitar por 3 minutos para lavar e remover o excesso de ditizona. Deixar separar as fases. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar novamente e descartar o máximo possível da fase aquosa restante (fase mais baixa). Acidificar a solução acrescentando 2 gotas de HCl 1N à fase de tolueno e misture com um misturador de vórtice. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase clorídrica ácida (fase mais baixa). Usar a solução resultante como a solução amostra.

Separadamente, dependendo das concentrações de mercúrio esperadas nas amostras, transferir 0-0,20 mL da solução de metilmercúrio-cisteína (correspondendo a 0-0,020 µg Hg) para tubos cônicos de centrífuga de 40 mL com tampa rosqueada e adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N. Seguir os mesmos passos como indicado acima na preparação da solução amostra para fazer as soluções padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Proteger as soluções de teste da luz após a preparação.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (normalmente 2-5 µl) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), soluções de branco e de padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra (µg/g) comparando a altura do pico da solução amostra com a curva de calibração obtida das soluções de padrão.⁹

Notas de Procedimentos

1. Este método envolve a digestão de proteínas na amostra pelo aquecimento com Etanol-KOH 1N, remoção de materiais gordurosos livres por lavagem com hexano sob condição ligeiramente ácida, e separação de metilmercúrio na amostra por extração quantitativa para a fase de tolueno como seu ditizonato, seguido por limpeza total com uma solução alcalina de sulfeto de sódio e re-extração com uma quantidade pequena de ditizona-tolueno 0,01%.
2. Ditizona (difeniltiocarbazona) é facilmente oxidada, e sua forma oxidada (difeniltiocarbadiazona) é contida como uma impureza que causa interferência nos picos no cromatograma. Então, utilizando a propriedade química única da ditizona pura de formar um sal solúvel em água que dissolve em solução alcalina, preparar uma solução nova de ditizona-tolueno para cada análise.
3. Se não estiver firmemente lacrada, a solução pode ferver durante o aquecimento. Neste caso, remover o recipiente, esfriar bem com água de torneira, fechar a tampa rosqueada novamente de forma que o gás não escoe, e continuar o aquecimento. Se o volume da solução foi reduzido sem qualquer ebulição aparente, repetir o procedimento desde o princípio.
4. Para remover a fase superior ou a fase mais baixa do tubo de teste, usar o Sistema de Sucção-Remoção com uma pipeta Pasteur conectada com um tubo flexível a um coletor de líquido descartado por um aspirador, como mostrado na Figura 2. Resumidamente, para remover a fase superior (fase orgânica), executar a sucção posicionando a ponta da pipeta Pasteur na superfície da fase superior abaixo ao longo da parede interior do tubo de teste para puxar fora o máximo possível da fase superior. Quando somente uma pequena quantidade da fase superior permanecer, manter a ponta da

pipeta Pasteur alguns mm acima da superfície da fase orgânica e continuar aspirando. Com esta técnica, só a fase orgânica que tem uma gravidade específica mais baixa que a fase inferior (fase aquosa) e volatilidade alta, é aspirada junto com o ar, permitindo uma remoção quase completa da fase orgânica. Para descartar a mais baixa das duas fases separadas no tubo de teste, apertar o tubo flexível com os dedos para parar a sucção da pipeta Pasteur. Posicionar a ponta da pipeta Pasteur no fundo do tubo de teste e ajustar a pressão no tubo para aspirar lentamente a fase mais baixa. Quando a fase mais baixa estiver quase completamente removida, apertar o tubo flexível para parar a sucção e remover a pipeta Pasteur. Isto torna possível remover só a fase mais baixa. Devido estes procedimentos requererem alguma habilidade e precisão, praticar cada procedimento anteriormente.

5. Antes da extração da ditizona, adicionar a solução de EDTA e misturar por agitação para mascarar íons de Fe e outros íons de metal contido nas amostras, particularmente amostras de sangue e derivados.
6. Este procedimento permite que o complexo de metilmercúrio-ditizona (ditizonato de metilmercúrio) permaneça na fase do tolueno; entretanto, o excesso de ditizona na fase de tolueno forma sal solúvel em água na solução alcalina que pode ser transferido na fase aquosa. Este procedimento de remoção de ditizona mantém o metilmercúrio-ditizonato na fase de tolueno sem qualquer perda. Tal procedimento de remoção de ditizona por lavagem com álcali é normalmente suficiente. Porém, se não for obtida uma fase clara de tolueno, repetir este procedimento. Para amostras de sangue, material negro suspenso gerado durante a extração de ditizona-tolueno colore a solução de amostra final, resultando freqüentemente no aparecimento de picos que interferem no

cromatograma. Para prevenir isto, adicionar 0,5 g de sulfato de sódio anidro e agitar, antes de proceder a lavagem alcalina.

7. Ditizonato de metilmercúrio na fase de tolueno reage com o excesso de íons sulfeto, formando um complexo solúvel em água que pode ser transferido na fase aquosa. Para executar um procedimento eficiente de uma única extração, usar uma solução de etanol alcalina de sulfeto de sódio.
8. Para confirmar o volume de HCl 1N requerido para ser adicionado para a leve acidificação da solução, transferir 2 mL da solução alcalina de sulfeto de sódio com antecedência em outro tubo de ensaio de 10 mL e adicionar algumas gotas da solução de ditizona 0,01% como um indicador de pH para obter uma cor amarela ou laranja. Acrescentar gotejando HCl 1N a este até que a cor mude para azul. O número de gotas de HCl 1N adicionado é a quantidade de HCl 1N requerida para acidificar ligeiramente a solução.
9. Geralmente, em medida de GLC, a faixa linear da curva de calibração é estreita. Tomar nota disto, particularmente quando tomar medidas, e proceder diluição apropriada de forma que a altura do pico da solução amostra esteja na faixa linear. Quando a linearidade é confirmada pela medida da solução padrão de metilmercúrio para preparação da curva de calibração, a concentração de metilmercúrio na amostra pode ser calculada de acordo com a seguinte equação usando a altura do pico (mm) da solução padrão (Pstd) de, por exemplo, 0,020 µg Hg.

$$\text{Concentração de Metilmercúrio na amostra } (\mu\text{g/g ou mL}) = 0.020 \mu\text{g} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{peso da amostra (g)}$$

Ps: altura do pico (mm) da solução amostra

Pbl: altura do pico (mm) da solução de branco

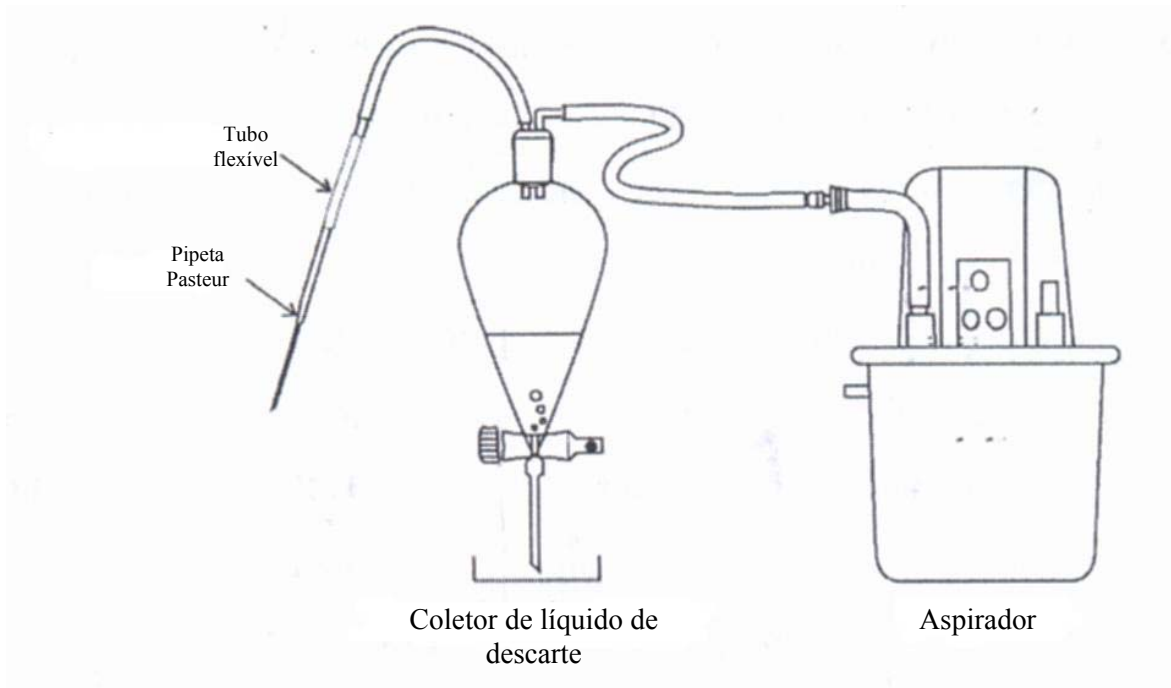


Figura 2. Sistema de Sucção-Remoção para Separação de Fases Líquidas

Amostra, 0,2-0,5 g peso úmido (tubo cônico centrífuga de 40 mL tampa de rosca)

Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N.
Fechar firmemente e aquecer a 100°C por 1 h.
Adicionar 10 mL de HCl 1N e misturar para acidificar levemente.
Adicionar 5 mL de hexano e agitar por 3 min.
Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar.
Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.
Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

(Para sangue, adicionar 0,5 g de Na₂SO₄ e agitar)
Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.
Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Orgânica, 3 mL (tubo cônico de centrífuga de 10 mL)

Fase Aquosa

Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3-5 gotas de HCl 1N para acidificar levemente.
Aerar a amostra com gás N₂ por 3 min. a 50 mL/min.
Adicionar 2 mL de solução tampão de Walpole e misturar.
Adicionar 0,5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.
Deixar descansar por um tempo e descartar a fase inferior.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 2 gotas de HCl 1N e agitar em Vortex.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

ECD-GLC

Fase de ácido clorídrico

Fluxograma 6. Determinação de Metilmercúrio em Amostras Biológicas
(peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)

4-1-2 Amostras biológicas que contêm concentrações relativamente altas de mercúrio, particularmente peixe e molusco (Método simplificado)¹

Como descrito acima, o método analítico para metilmercúrio em amostras biológicas que usa o método de extração de ditizona/ GLC-ECD é extensamente aplicado para determinação quantitativa de quantidades traço de metilmercúrio em amostras de proteínas que incluem peixe, molusco, sangue, e tecidos humanos. Porém, quando a solução amostra é preparada de acordo com este método para peixe, molusco, e as outras amostras biológicas que contêm concentrações relativamente altas de mercúrio, diluição significativa da solução de amostra é inevitável na medida, na maioria dos casos. Para essas amostras, está disponível um método em que o volume coletado da fase de tolueno usado na extração de volta é reduzido no passo da limpeza total. O método seguinte no qual os procedimentos analíticos anteriores são parcialmente simplificados, também pode ser aplicado quando é esperada uma concentração alta de mercúrio da medida de mercúrio total.

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau para análise de pesticida).
- (2) Hexano: $CH_3(CH_2)_4CH_3$ (grau para análise de pesticida).
- (3) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico).
- (4) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (5) Etanol-KOH 1N: Dissolver 56,11 g de hidróxido de potássio (grau analítico) em etanol para obter um volume final de 1.000 mL. (Armazenar em um local escuro refrigerado).

- (6) HCl 1N: Misturar 90 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (7) Solução de EDTA 20%: Dissolver 20 g de tetra-sódio etilenodiaminotetraacetato (grau analítico), $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (8) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (9) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.
- (10) Ditizona-tolueno 0,01% purificada: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, $C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar rapidamente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase de fundo). Depois de deixar as fases para separar, transferir a fase de fundo para um recipiente de vidro provido com uma rolha de vidro. Adicionar gotejando HCl 1N para tornar a solução ligeiramente ácida (cristais negro-esverdeados precipitarão). Adicionar 100 mL de tolueno e agitar para obter ditizona-tolueno 0,01% purificada. Deixar separar as fases, retirar e descartar a fase de fundo, e selar. Armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (11) Solução alcalina de sulfeto de sódio: Dissolver 0,15 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (grau analítico) em 10 mL de água destilada em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL, provido com uma rolha de vidro para fazer a solução estoque de sulfeto de sódio. (Preparar uma solução nova mensalmente. Armazenar em um local escuro refrigerado). A cada uso, transferir 0,1 mL da solução estoque para um recipiente de vidro provido com uma rolha de vidro, adicionar 50 mL de NaOH 0,1 N e 50

mL de etanol, e misturar para obter uma solução alcalina de sulfeto de sódio. (Um mL desta solução contém 5 µg de Na₂S).

- (12) Solução tampão de Walpole: Misturar 200 mL de CH₃COONa 1M e cerca de 200 mL de HCl 1N para ajustar a pH 3,0.
- (13) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, HSCH₂CH(NH₂)COOH·HCl·H₂O, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (14) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH₃HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como uma solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter a solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1,0 µg de Hg.
- (15) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com tampa. Agitar durante 3 minutos em agitador de sentido recíproco para extrair o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, retirar e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 µg de Hg.

- (16) Gás N₂.

Nota: Para os reagentes anteriores (6)-(9), (11), e (12), preparar as quantidades necessárias com antecedência, adicionar metade do volume de tolueno, e lavar por agitação. Confirmar previamente que não aparece nenhum pico, pois isso poderia interferir com a medida por GLC-ECD.

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Cromatógrafo gás-líquido equipado com detector de captura de elétron (ECD-GLC).
- (2) Medidor de fluxo: Medidor de fluxo multi-kit Modelo V4 (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (3) Centrífuga.
- (4) Agitador sentido recíproco.
- (5) Banho térmico.
- (6) Agitador magnético.
- (7) Aspirador.
- (8) Misturador Vórtice.
- (9) Medidor de pH.
- (10) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (11) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (12) Pipetas Pasteur.
- (13) Funis de separação: 100, 200, e 1.000 mL.
- (14) Recipientes de vidro com tampa de vidro: 100, 200, e 500 mL.
- (15) Recipientes de vidro com tampa rosqueada: 1.000 mL.
- (16) Tubo cônico de centrífuga de 40 mL com tampa de vidro.
- (17) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (18) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL.
- (19) Tesouras de dissecação.

Nota: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes do uso. Confirmar com antecedência que não aparece nenhum pico, já que isso poderia interferir com a medida.

Condições Cromatográficas Gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com 5-10% poli-dietileno glicol succinato (DEGS) em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação da solução amostra

Extração de metilmercúrio

Pesar precisamente uma amostra homogeneizada (normalmente 0,2-0,5 g em peso úmido, aproximadamente 0,1 g para uma amostra seca) e colocar no fundo de um tubo cônico de centrífuga de uns 40 mL com tampa rosqueada. (Para uma amostra seca, depois de pesar, adicionar 0,5 mL de água destilada para umedecer.) Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N. Fechar firmemente e aquecer em um banho térmico à 100°C durante 1 hora, agitando suavemente de vez em quando. Deixar esfriar, adicionar 10 mL de HCl 1N e 5

mL de hexano em sequência, e agitar por 3 minutos em agitador de sentido recíproco. Centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos. Retirar e descartar a fase de hexano (fase superior) para remover materiais gordurosos. Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar bem. Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada. Agitar por 3 minutos para extrair metilmercúrio como seu ditizonato (complexo) na fase de tolueno. Deixar as fases para separar. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos para obter uma fase de tolueno clara.

Limpeza

Transferir 1,0 mL da fase de tolueno para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro.² Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 minutos para extrair de volta o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm durante 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar cuidadosamente a fase de tolueno (fase superior). Adicionar 2 mL de tolueno à fase aquosa e agitar por 3 minutos para lavar a fase aquosa. Centrifugar novamente a 1.200 rpm durante 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar HCl 1N (3-5 gotas) para tornar a solução ligeiramente ácida. Com uma pipeta Pasteur, aerar a solução com gás N₂ através de um fluxômetro durante 3 minutos (50 mL/min.) para expelir os íons sulfeto em excesso como gás sulfídrico. Subseqüentemente, adicionar 2 mL de tampão Walpole lavando a ponta da pipeta Pasteur. Misturar bem em um misturador de vórtice. Adicionar 1,0 mL de tolueno e agitar por 3 minutos (para re-extração de metilmercúrio junto com o excesso de ditizona).³ Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Adicionar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e agitar para lavar e remover o excesso de ditizona. Deixar separar as fases.

Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar o máximo possível a fase aquosa restante (fase mais baixa). Acidificar a solução pela adição de 2 gotas de HCl 1N e misturar em um misturador de vórtice. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de ácido clorídrico (fase mais baixa). Usar a solução resultante como a solução amostra.

Separadamente, dependendo das concentrações de mercúrio esperadas nas amostras, transferir 0-1,0 mL de solução de metilmercúrio-cisteína (correspondendo a 0-0,10 µg Hg) para tubos cônicos de centrífuga de 40 mL com tampa rosqueada e adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N. Seguir os mesmos passos como indicado acima na preparação das soluções amostra para obter as soluções padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Proteger as soluções da luz após a preparação.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (normalmente 2-5 µl) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), as soluções de branco e padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra (µg/g) comparando a altura do pico da solução amostra com a curva de calibração obtida das soluções de branco e padrão de metilmercúrio.

Notas de procedimentos

1. Este método é aplicado para determinação de metilmercúrio em amostras biológicas (particularmente peixe e molusco) contendo concentrações relativamente altas de mercúrio (excedendo 0,1 ppm).

Este método difere daquele descrito em 4-1-1 nos seguintes pontos: depois da extração da ditizona-tolueno 0,01%, omitir a lavagem com NaOH 1N e a subsequente separação por centrifugação; no passo de re-extração do metilmercúrio, a extração pode ser executada somente com tolueno em vez de ditizona-tolueno 0,01%. Além disso, este método tem a vantagem que uma mudança óbvia de cor no passo da leve acidificação prontamente indica a necessidade de expelir o excesso de íons sulfeto porque a ditizona, que serve como um indicador de pH, já foi extraída na fase aquosa e coloriu a solução durante o procedimento da extração de volta com a solução alcalina de sulfeto de sódio.

2. Neste processo, o ditizonato de metilmercúrio assim como a ditizona livre em ditizona-tolueno 0,01% são transferidos ao mesmo tempo na solução alcalina de sulfeto de sódio; conseqüentemente, o volume do extrato de ditizona-tolueno 0,01% a ser usado para a extração de volta em sulfeto de sódio alcalino é limitado a 1 mL.
3. Neste procedimento, o metilmercúrio junto com a ditizona que estava na forma livre na fase aquosa é re-extraído no tolueno. Então, conduzir a re-extração com este método usando somente tolueno em um volume de 1 mL, igual ao usado na extração de ditizona-tolueno 0,01%.

Para os fundamentos da análise de metilmercúrio, ver pag. 69-71 para as Notas de Procedimentos em "4-1-1 Amostras biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)".

Amostra, 0,2-0,5 g peso úmido (tubo cônico de centrífuga de 40 mL com tampa rosqueada)

Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N.
Fechar firmemente e aquecer a 100°C por 1 h.
Adicionar 10 mL de HCl 1N e misturar p/ acidificar levemente.
Adicionar 5 mL de hexano e agitar por 3 min.
Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar.
Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.
Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Orgânica, 1 mL (tubo cônico de centrífuga de 10 mL)

Fase Aquosa

Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3-5 gotas de HCl 1N para acidificar levemente.
Aerar a amostra com gás N₂ por 3 min. a 50 mL/min.
Adicionar 2 mL de tampão Walpole e misturar.
Adicionar 1,0 mL de tolueno e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.
Deixar descansar e descartar a fase aquosa.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 2 gotas de HCl 1N e misturar em agitador Vortex.
Centrifugar a 1,200 rpm por 3 min.

GLC-ECD

Fase de ácido clorídrico

Fluxograma 7. Determinação de Metilmercúrio em Amostras Biológicas

Contendo Concentrações de Mercúrio Relativamente Altas,
Particularmente Peixe e Molusco (Método Simplificado)

4-1-3 Urina

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau de análise de pesticida)
- (2) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico)
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) Etanol-KOH 1N: Dissolver 56,11 g de hidróxido de potássio (grau analítico) em etanol para obter um volume final de 1.000 mL. (Armazenar em um local escuro refrigerado).
- (5) HCl 1N: Misturar 90 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (6) Solução de EDTA 20%: Dissolver 20 g de etilenodiaminotetraacetato tetra-sódio (grau analítico), $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (7) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (8) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.
- (9) Ditizona-tolueno 0,01% purificada: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, $C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar rapidamente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase de fundo). Após deixar separar as fases, transferir a fase de fundo para um recipiente de vidro com tampa de vidro. Adicionar HCl 1N gota a gota para tornar a solução levemente ácida (cristais negro-esverdeados precipitarão), adicionar 100 mL de tolueno, e agitar para obter ditizona-tolueno 0,01% purificada. Deixar formar as fases, retirar e descartar a

fase de fundo, e selar. Armazenar em um local refrigerado escuro. (Preparar uma solução nova a cada análise).

- (10) Solução alcalina de sulfeto de sódio: Dissolver 0,15 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (grau analítico) em 10 mL de água destilada em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro para fazer a solução estoque de sulfeto de sódio. (Preparar uma solução nova mensalmente. Armazenar em um local refrigerado escuro). A cada uso, transferir 0,1 mL da solução estoque para um recipiente de vidro com uma tampa de vidro, adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e 50 mL de etanol, e misturar para obter uma solução alcalina de sulfeto de sódio. (Um mL desta solução contém 5 μg de Na_2S).
- (11) Tampão de Walpole: Misturar 200 mL de CH_3COONa 1M e cerca de 200 mL de HCl 1N em 600 mL de água destilada para ajustar a pH 3,0.
- (12) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de Cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova a cada análise).
- (13) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para obter a solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.
- (14) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com tampa. Agitar por 3 minutos em um agitador de sentido recíproco para extrair o

metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, retirar e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 µg de Hg.

(15) Sulfato de sódio anidro: Sulfato de sódio anidro (grau para análise de pesticida) aquecer a 500°C por 2-3 horas (manter em um dessecador).

(16) Gás N₂.

Nota: Para os reagentes anteriores (5)-(8), (10) e (11), preparar a quantidade requerida antes do uso, adicionar metade do volume de tolueno, e lavar por agitação. Confirmar previamente que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida por GLC-ECD.

b. Instrumentos e equipamento

(1) Cromatógrafo gás-líquido equipado com detector de captura de elétron (GLC-ECD).

(2) Medidor de fluxo: Fluxômetro multi-kit Modelo V4 (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).

(3) Centrífuga.

(4) Agitador de sentido recíproco.

(5) Agitador magnético.

(6) Aspirador.

(7) Agitador de vórtice.

(8) Medidor de pH.

(9) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.

(10) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.

(11) Pipetas Pasteur.

- (12) Funis de separação: 100, 200, e 1.000 mL.
- (13) Recipientes de vidro com tampa de vidro: 100, 200, e 500 mL.
- (14) Recipientes de vidro com tampa rosqueada: 1.000 mL.
- (15) Tubo de centrífuga de 50 mL de fundo redondo com tampa de vidro.
- (16) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.

Nota: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes do uso. Confirmar previamente que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida por GLC-ECD.

Condições cromatográficas gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com 5-10% poli-dietileno glicol succinato (DEGS) em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação da solução da amostra

Extração de metilmercúrio

Transferir uma amostra de urina (normalmente 20 mL) para um tubo de centrífuga de 50 mL de fundo redondo provido com uma rolha de vidro. Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N e agitar por 5 minutos. Adicionar 10 mL de HCl e misturar para acidificar ligeiramente a amostra. Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar bem. Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar durante 3 minutos para extrair metilmercúrio na amostra. Centrifugar a 1.200 rpm durante 3 minutos, tampado. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Acrescentar 0,5 g de sulfato de sódio anidro à fase de tolueno e agitar por 5 minutos. Centrifugar novamente a 1.200 rpm durante 3 minutos, tampado. Retirar e descartar o máximo possível da fase aquosa restante (fase mais baixa).

Limpeza

Acrescentar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e agitar por 3 minutos para remover o excesso de ditizona na fase de tolueno. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Repetir a lavagem com 3 mL de NaOH 1N para a limpeza total. Deixar separar as fases. Retirar e descartar a fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos para obter uma fase de tolueno clara. (Se a emulsão ainda permanecer na fase de tolueno, retirar e descartar a fase mais baixa. Adicionar cerca de 0,5 g de sulfato de sódio anidro e agitar. (Executar uma separação centrífuga e descartar a fase mais baixa).

Transferir um volume fixo (normalmente 3 mL) da fase de tolueno em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com uma rolha de vidro. Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 minutos para extrair de volta o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm durante 3

minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar cuidadosamente e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar 2 mL de tolueno à fase aquosa e agitar durante 3 minutos para lavar a fase aquosa. Centrifugar novamente a 1.200 rpm durante 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar HCl 1N (3-5 gotas) para tornar a solução ligeiramente ácida. Com uma pipeta Pasteur, aerar a solução com gás N₂ através de um fluxômetro durante 3 minutos (50 mL/min.) para expelir o excesso de íons sulfeto como gás sulfídrico. Subseqüentemente, adicionar 2 mL de tampão de Walpole lavando a ponta da pipeta Pasteur e misturar bem com um misturador de vórtice. Adicionar um volume fixo de solução de ditizona 0,01% purificada (0,2-1,0 mL, normalmente 0,5 mL) e agitar por 3 minutos para extrair metilmercúrio. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Acrescentar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e agitar por 3 minutos para remover o excesso de ditizona. Deixar separar as fases. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar novamente e descartar o máximo possível da fase aquosa (fase mais baixa). Acidificar a solução acrescentando 2 gotas de HCl 1N à fase de tolueno e misturar com um misturador de vórtice. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase ácida clorídrica (fase mais baixa). Usar a solução resultante como a solução de amostra.

Separadamente, colocar 20 mL de água destilada em cada um de três tubos de centrífuga de 50 mL de fundo redondo com tampa rosqueada. Adicionar 0, 0,050, e 0,10 mL (correspondendo a 0, 5 e 10 ng Hg) de solução de metilmercúrio-cisteína, respectivamente. Submeter estas amostras aos mesmos procedimentos indicados acima na preparação das soluções de

amostras para obter uma solução de branco e soluções padrão de metilmercúrio para calibração. Após a preparação, armazenar estas soluções em um local escuro refrigerado.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (usualmente 2-5 μ l) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), de branco e soluções padrão de metilmercúrio. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra de urina (ng/mL) comparando a altura de pico da solução de amostra com a curva de calibração obtida das soluções de branco e de padrão.

Alternativamente, quando a linearidade for confirmada pela medida das soluções padrão de metilmercúrio na calibração, calcular a concentração de metilmercúrio na amostra com a seguinte equação usando a altura do pico (mm) da solução padrão (Pstd) de, por exemplo, 10 ng Hg.

$$\text{Concentração de metilmercúrio na amostra de urina (ng/mL)} = 10 \text{ ng} \times \frac{(P_s - P_{bl})}{(P_{std} - P_{bl})} \times 1/\text{volume da amostra (mL)}$$

P_s : altura do pico (mm) da solução de amostra

P_{bl} : altura do pico (mm) da solução de branco

Nota: Para os fundamentos da análise de metilmercúrio, ver pag. 69-71 para as Notas de Procedimentos em "4-1-1 Amostras Biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)".

Amostra, 20 mL (tubo de centrífuga de 50 mL de fundo redondo)

Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N e agitar por 5 min.

Adicionar 10 mL de HCl 1N e misturar para acidificar levemente.

Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar.

Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 0,5 g de Na₂SO₄ anidro e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Repetir este passo uma vez.

Fase Orgânica, 3 mL (tubo cônico de centrífuga de 10 mL)

Fase Aquosa

Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3-5 gotas de HCl 1N para acidificar levemente.

Aerar com gás N₂ a 50 mL/min. por 3 min.

Adicionar 2 mL de tampão de Walpole e misturar.

Adicionar 0,5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.

Deixar descansar. Descartar a fase aquosa.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 2 gotas de HCl 1N e misturar em agitador tipo vórtice.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

GLC-ECD

Fase ácida clorídrica

Fluxograma 8. Determinação de Metilmercúrio em Urina

4-1-4 Sedimento/solo

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau para análise de pesticida).
- (2) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico).
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) Etanol-KOH 1N: Dissolver 56,11 g de hidróxido de potássio (grau analítico) em etanol para obter um volume final de 1.000 mL. (Armazenar em um local escuro refrigerado).
- (5) HCl 1N: Misturar 90 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (6) Solução de $NH_2OH \cdot HCl$ 20%: Dissolver 20 g de cloridrato de hidroxilamina em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (7) Solução de EDTA 20%: Dissolver 20 g de etilenodiaminotetraacetato tetra-sódio (grau analítico), $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 4H_2O$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (8) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (9) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.
- (10) Ditizona-tolueno 0,01% purificada: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, $C_6H_5N:NCSNHNHC_6H_5$, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar rapidamente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase de fundo). Após deixar separar as fases, transferir a fase de fundo para um recipiente de vidro com tampa de vidro. Adicionar HCl 1N gota a gota

para tornar a solução levemente ácida (cristais negro-esverdeados precipitarão). Adicionar 100 mL de tolueno e agitar para obter ditizona-tolueno 0,01% purificada. Deixar formar as fases, retirar e descartar a fase de fundo, e selar. Armazenar em um local refrigerado escuro. (Preparar uma solução nova a cada análise).

- (11) Solução alcalina de sulfeto de sódio: Pesar 0,15 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (grau analítico) em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro e dissolver em 10 mL de água destilada para fazer a solução estoque de sulfeto de sódio. (Preparar uma solução nova mensalmente. Armazenar em um local refrigerado escuro). A cada uso, transferir 0,1 mL da solução estoque para um recipiente de vidro com uma tampa de vidro, adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e 50 mL de etanol, e misturar para fazer uma solução alcalina de sulfeto de sódio. (Um mL desta solução contém 5 μg de Na_2S .)
- (12) Tampão de Walpole: Misturar 200 mL de CH_3COONa 1M e cerca de 200 mL de HCl 1N em 600 mL de água destilada para ajustar a pH 3,0.
- (13) Sulfato de sódio anidro: Sulfato de sódio anidro (grau para análise de pesticida) aquecido a 500°C por 2-3 horas (manter em dessecador).
- (14) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de Cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova a cada análise).
- (15) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100

vezes com tolueno para fazer a solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.

- (16) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com tampa. Agitar por 3 minutos com um agitador de sentido recíproco para extrair o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro, retirar e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 0,1 µg de Hg.
- (17) Florisil: Florisil para cromatografia em coluna (60-100 mesh) aquecido a 130°C por 2-3 horas (mantido em um dessecador).
- (18) Coluna de Florisil: Uma coluna de vidro empacotada com 0,5 g de Florisil (60-100 mesh) e 0,5 g de sulfato de sódio anidro em sequência.
- (19) Gás N₂.

Nota: Para os reagentes anteriores (5)-(9), (11), e (12), preparar a quantidade requerida previamente, adicionar meio volume de tolueno, e lavar por agitação. Confirmar previamente que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio por GLC.

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Cromatógrafo gás-líquido equipado com detector de captura de elétron (GLC-ECD).
- (2) Medidor de fluxo: Fluxômetro multi-kit Modelo V4 (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).

- (3) Centrífuga.
- (4) Agitador de sentido recíproco.
- (5) Agitador magnético.
- (6) Aspirador.
- (7) Agitador de Vórtice.
- (8) Medidor de pH
- (9) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (10) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 1,5, e 10 mL.
- (11) Pipetas Pasteur.
- (12) Funis de separação: 100, 200, e 1.000 mL.
- (13) Recipientes de vidro com tampa de vidro: 100, 200, e 500 mL.
- (14) Recipientes de vidro com tampa rosqueada: 1.000 mL.
- (15) Tubo de centrífuga de 50 mL de fundo redondo com tampa rosqueada.
- (16) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.
- (17) Lã de algodão.
- (18) Cadinho de porcelana.

Nota: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes do uso. Confirmar com antecedência que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio no GLC. Se aparecer um pico, executar tratamento de calor à 300°C durante 30 minutos.

Condições cromatográficas gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com 5-10% poli-dietileno glicol succinato (DEGS) em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação da solução amostra

Extração de metilmercúrio

Pesar precisamente uma amostra homogeneizada (normalmente 0,2-0,5 g em peso úmido, cerca de 0,1 g para uma amostra seca) no fundo de um tubo de centrífuga de 50 mL de fundo redondo com tampa rosqueada. (Para uma amostra seca, adicionar 0,5 mL de água destilada para umedecer depois de pesar.) Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N. Agitar e esmagar bem com uma vara de vidro e agitar durante 20 minutos com um agitador de sentido recíproco e adicionar 10 mL de HCl 1N para acidificar ligeiramente a solução amostra. Aerar a solução amostra com gás N₂ a 100 mL/min. durante 5 minutos agitando em agitador magnético. Adicionar 2 mL de uma solução de NH₂OH·HCl 20% e 2 mL de uma solução de EDTA 20% em sequência, e misturar por agitação¹. Adicionar 5 mL de solução de ditizona 0,01%

purificada e agitar por 3 minutos para extrair metilmercúrio na amostra. Centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos. Usando uma pipeta graduada de 5 mL provida com uma pequena quantidade de lã de algodão ao redor da ponta, coletar pelo menos 4 mL da fase de tolueno, sendo cuidadoso para não misturar a fase mais baixa, e passar isto pela coluna de Florisil. Receber o filtrado em um tubo de centrífuga cônico de 10 mL com uma rolha de vidro.

Limpeza

Adicionar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e lavar por agitação por 3 minutos para remover o excesso de ditizona na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar o máximo possível da camada mais baixa. Adicionar outros 3 mL de NaOH 1N. Agitar e lavar da mesma forma anterior. Deixar separar as fases. Descartar a fase mais baixa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Transferir um volume fixo (normalmente 3 mL) da fase de tolueno para outro tubo cônico de centrífuga de 10 mL com uma rolha de vidro. Adicionar 2 mL da solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 minutos para extrair de volta o metilmercúrio na camada aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro, retirar e descartar cuidadosamente a fase de tolueno (fase superior). Então, adicionar 2 mL de tolueno à fase aquosa e agitar por 3 minutos para lavar a fase aquosa. Centrifugar novamente a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar HCl 1N (3-5 gotas) para tornar a solução ligeiramente ácida. Com uma pipeta Pasteur, aerar a solução com gás N₂ através de um fluxômetro a 50 mL/min. durante 3 minutos para expelir o excesso de íons sulfeto como gás sulfídrico. Subseqüentemente, adicionar 2 mL do tampão de Walpole lavando a ponta da

pipeta Pasteur em sequência e misturar bem com um misturador de vórtice. Adicionar um volume fixo de solução de ditizona 0,01% purificada (0,2-1,0 mL, normalmente 0,5 mL) e agitar para extrair metilmercúrio. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Acrescentar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno, agitar, e lavar para remover o excesso de ditizona. Deixar separar as fases. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro, e novamente retirar e descartar o máximo possível da fase aquosa (fase mais baixa). Acidificar a solução acrescentando 2 gotas de HCl 1N à fase de tolueno e agitar com um misturador de vórtice. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase ácida clorídrica (fase mais baixa). Usar a solução resultante como a solução de amostra.

Separadamente, dependendo das concentrações de mercúrio esperadas nas amostras, transferir 0-0,20 mL da solução de metilmercúrio-cisteína (correspondendo a 0-0,020 μg Hg) em pelo menos três tubos de centrífuga de 50 mL de fundo redondo com tampa rosqueada. Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N e seguir os mesmos procedimentos como indicado acima no preparo das soluções de amostras a fim de obter as soluções de branco e de padrões de metilmercúrio para a curva de calibração. Armazenar todas estas soluções em um local escuro refrigerado.

Para amostras úmidas, na coleta das amostras para análise, pesar precisamente cerca de 10-20 g da amostra em um cadinho de porcelana de peso conhecido. Colocar em uma estufa à 105°C e secar durante 2-3 horas. Deixar esfriar em um dessecador, e então pesar para obter a relação de peso úmido/peso seco (WW/DW).

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (usualmente 2-5 μ l) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), de branco e soluções padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra (μ g/g peso úmido) comparando a altura do pico da solução de amostra com a curva de calibração obtida das soluções de branco e de padrões. Converter o resultado para peso seco (μ g/g peso seco) com a relação peso úmido/peso seco determinada para a amostra com o procedimento indicado anteriormente.

Notas de procedimentos

1. Antes da extração de ditizona, adicionar cloridrato de hidroxilamina e solução de EDTA e misturar por agitação para reduzir substâncias oxidantes e mascarar outros íons de metal contidos na amostra. Isto previne o consumo/decomposição desnecessários de ditizona durante o processo de extração de ditizona-tolueno.

Para os fundamentos da análise de metilmercúrio, ver pag. 69-71 para as Notas de Procedimentos em "4-1-1 Amostras Biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)".

Amostra, 0,2-0,5 g peso úmido (tubo centrífuga de 50 mL c/ tampa rosqueada)

Adicionar 10 mL de Etanol-KOH 1N, mexer e esmagar com uma vara de vidro.

Agitar por 20 min.

Adicionar 10 mL de HCl 1N para acidificar levemente.

Aerar com gás N₂ a 100 mL/min. por 5 min.

Adicionar 2 mL de NH₂OH·HCl 20% e misturar.

Adicionar 2 mL de EDTA 20% e misturar.

Adicionar 5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.

Centrifugar a 2.500 rpm por 3 min.

Fase Orgânica (mínimo de 4 mL)

Fase Aquosa

Passar através da coluna de Florisil

Fase Orgânica (tubo cônico de centrífuga de 10 mL)

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica, 3 mL (tubo cônico centrífuga de 10 mL)

Fase Aquosa

Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de toluene e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3-5 gotas de HCl 1N para acidificar levemente.

Aerar com gás N₂ a 50 mL/min. por 3 min.

Adicionar 2 mL de tampão de Walpole e misturar.

Adicionar 0,5 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.

Deixar separar as fases. Descartar a fase aquosa.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 2 gotas de HCl 1N e misturar em agitador de vórtice.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

GLC-ECD

Fase ácida clorídrica

Fluxograma 9. Determinação de Metilmercúrio em Sedimento/Solo

4-1-5 Água

Semelhante ao método para análise de mercúrio total de amostras de água, este método envolve a ionização e liberação de compostos de mercúrio pelo tratamento com permanganato de potássio sob acidificação por ácido sulfúrico; pré-concentração do mercúrio através de extração de ditizona-tolueno; extração de volta do metilmercúrio no extrato em solução alcalina de sulfeto de sódio; re-extração com ditizona-tolueno para limpeza; e medida por GLC-ECD.

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau para análise de pesticida).
- (2) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico).
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) H_2SO_4 20N: Transferir cerca de 350 mL de água destilada para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar gradualmente 600 mL de ácido sulfúrico (para medida de metais tóxicos) mexendo em banho de gelo. Depois que retornar a temperatura ambiente, acrescentar água destilada para um volume final de 1.000 mL.
- (5) NaOH 10N: Dissolver 400 g de hidróxido de sódio (grau analítico) para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (6) Solução de $KMnO_4$ 0,5%: Dissolver 0,5 g de permanganato de potássio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.

- (7) Solução de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 10%: Dissolver 10 g de cloreto de hidroxilamina em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (8) Solução de EDTA 10%: Dissolver 10 g de etilenodiaminotetraacetato tetra-sódio (grau analítico), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em água destilada para fazer um volume final de 100 mL.
- (9) HCl 1N: Misturar 90 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (10) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (11) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.
- (12) Ditizona-tolueno 0,01% purificada¹: Dissolver 0,011 g de difeniltiocarbazona, $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}:\text{NCSNHHC}_6\text{H}_5$, em 100 mL de tolueno em um funil de separação de 200 mL. Adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e agitar brevemente para extrair a ditizona na fase aquosa (fase de fundo). Deixar separar as fases. Transferir a fase de fundo para um recipiente de vidro provido com uma rolha de vidro. Adicionar HCl 1N gota a gota para tornar a solução ligeiramente ácida (cristais negro-verdeados precipitarão), adicionar 100 mL de tolueno, e agitar para obter ditizona-tolueno 0,01% purificada. Deixar separar as fases. Descartar a fase de fundo e selar. Armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova a cada análise).
- (13) Solução alcalina de sulfeto de sódio: Pesar 0,15 g de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (grau analítico) em um tubo cônico de centrífuga de 10 mL, provido com uma rolha de vidro e dissolver em 10 mL de água destilada para fazer uma solução estoque de sulfeto de sódio. (Preparar uma solução nova mensalmente. Armazenar em um local escuro refrigerado). A cada

uso, transferir 0,1 mL da solução estoque em um recipiente de vidro provido com uma rolha de vidro, adicionar 50 mL de NaOH 0,1N e 50 mL de etanol, e misturar para fazer uma solução alcalina de sulfeto de sódio. (Um mL desta solução contém 5 µg de Na₂S).

- (14) Tampão de Walpole: Misturar 200 mL de CH₃COONa 1M e cerca de 200 mL de HCl 1N em 600 mL de água destilada para ajustar a pH 3,0.
- (15) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, HSCH₂CH(NH₂)COOH·HCl·H₂O, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (16) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH₃HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para fazer uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.
- (17) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 0,5 mL da solução padrão de metilmercúrio e 5 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com uma rolha de vidro. Agitar por 3 minutos em agitador de sentido recíproco para extrair o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos tampado com a rolha de vidro, retirar e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar como uma solução estoque em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). A cada uso, diluir a solução estoque 10 vezes com água destilada para fazer uma solução de metilmercúrio-cisteína para preparar as amostras

da calibração para a análise de metilmercúrio em água. Um mL desta solução contém 10 ng de Hg.

- (18) Sulfato de sódio anidro: Sulfato de sódio anidro (grau para análise de pesticida) aquecido a 500°C por 2-3 horas (armazenado em um dessecador).
- (19) Gás N₂.

Note: Para os reagentes anteriores (5), (7)-(11), (13), e (14), preparar as quantidades exigidas com antecedência, adicionar metade do volume de tolueno, e lavar por agitação em um funil de separação. Confirmar anteriormente que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio no GLC .

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Cromatógrafo gás-líquido equipado com detector de captura de elétrons (GLC-ECD).
- (2) Medidor múltiplo de fluxo: Medidor múltiplo de fluxo Modelo V4 multi-kit (Kojima Instruments Inc., Tokyo, Japan).
- (3) Centrífuga.
- (4) Agitador de sentido recíproco.
- (5) Agitador magnético.
- (6) Aspirador.
- (7) Agitador de vórtice.
- (8) Medidor de pH.
- (9) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (10) Pipetas graduadas: 0,2, 0,5, 5, e 10 mL.
- (11) Pipetas Pasteur.
- (12) Funis de separação: 100, 200, 1.000, e 2.000 mL.

- (13) Recipiente de vidro com tampa de vidro: 100, 200, e 500 mL.
- (14) Recipiente de vidro com tampa rosqueada: 1.000 mL.
- (15) Tubo cônico de centrífuga de 35 mL com tampa de vidro.
- (16) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro × 100 mm de comprimento.

Note: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes de uso. Confirmar previamente que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio por GLC-ECD.

Condições cromatográficas gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com 5-10% poli-dietileno glicol succinato (DEGS) em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação das soluções de amostra

Extração de metilmercúrio

Transferir 2 L de uma amostra de água em um funil de separação de 2 L. Adicionar 10 mL de H₂SO₄ 20N e 5 mL de uma solução de KMnO₄ 0,5%. Misturar e deixar descansar por 5 minutos. Adicionar 20 mL de NaOH 10N e misturar agitando para neutralizar. Adicionar 5 mL de uma solução de NH₂OH·HCl 10% e agitar por vários segundos para misturar. Deixar descansar por 20 minutos. Adicionar 5 mL de solução de EDTA 10% e misturar por agitação.² Adicionar 10 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar vigorosamente durante 1 minuto para extrair o metilmercúrio na amostra. Deixar descansar por pelo menos 1 hora longe de luz solar direta. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa).

Limpeza

Transferir o máximo possível da camada de tolueno para um tubo cônico de centrífuga de 35 mL, provido com uma rolha de vidro. Tampar e centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). (Para análise com água não filtrada, se ocorrer emulsificação, remover a fase aquosa mais baixa, adicionar cerca de 0,5 g de sulfato de sódio anidro, e agitar seguida de separação por centrifugação para remover a fase mais baixa fase.) Adicionar 5 mL de NaOH 1N e lavar por agitação por 3 minutos para remover o excesso de ditizona. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Adicionar novamente 5 mL de NaOH 1N e repetir este procedimento de lavagem. Depois de separação centrífuga, retirar e descartar a fase mais baixa. Transferir um volume fixo (normalmente 7 mL) da fase de tolueno para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL com uma rolha de vidro. Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 minutos para extrair o metilmercúrio de volta na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm

por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar cuidadosamente e descartar a camada de tolueno (fase superior). Adicionar 2 mL de tolueno à fase aquosa e agitar por 3 minutos para lavar a fase aquosa. Centrifugar novamente a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase de tolueno (fase superior). Adicionar HCl 1N (3-5 gotas) para tornar a solução ligeiramente ácida. Com uma pipeta Pasteur, aerar a solução de amostra com gás N₂ por meio de um fluxômetro a 50 mL/min. durante 3 minutos para expelir o excesso de íons sulfeto como gás sulfídrico. Subseqüentemente, adicionar 2 mL do tampão de Walpole lavando a ponta da pipeta Pasteur. Misturar bem com um misturador de vórtice. Adicionar um volume fixo de ditizona-tolueno 0,01% purificada (normalmente 0,2 mL) e agitar por 3 minutos para extrair metilmercúrio. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Acrescentar 3 mL de NaOH 1N à fase de tolueno e lavar por agitação por 3 minutos para remover o excesso de ditizona. Deixar descansar para permitir a separação das duas fases. Descartar a fase aquosa (fase mais baixa). Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro, e novamente retirar e descartar o máximo possível da fase aquosa restante (fase mais baixa). Acidificar a solução adicionando 2 gotas de HCl 1N e misturar com um misturador de vórtice. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro. Retirar e descartar a fase ácida clorídrica (fase mais baixa) para fazer uma solução de amostra.

Separadamente, escolher a amostra de água com a concentração de mercúrio mais baixa e transferir 2 L a cada um de três funis de separação de 2 L. Adicionar 0, 0,10, e 0,20 mL de solução de metilmercúrio-cisteína (correspondendo a 0, 1,0 e 2,0 ng Hg), respectivamente. Submeter as amostras aos mesmos procedimentos como indicado acima na preparação das soluções

de amostra para fazer uma solução de branco e soluções padrão de metilmercúrio, respectivamente. Após a preparação, armazenar estas soluções em um local escuro refrigerado.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (normalmente 2-5 µl) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), e as soluções de branco e de padrões de metilmercúrio. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra de água (ng Hg/L) comparando a altura do pico da solução de amostra com a curva de calibração obtida das soluções de branco e padrões. Alternativamente, quando a linearidade for confirmada pela medida das soluções padrão de metilmercúrio pela preparação da curva de calibração, a concentração de metilmercúrio na amostra pode ser calculada de acordo com a seguinte equação que usa a altura do pico da solução padrão (Pstd) de, por exemplo, 2 ng Hg.

$$\text{Concentração de Metilmercúrio em amostras de água (ng/L)} = 2 \text{ ng} \times (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{amostra de água (L)}$$

Ps: altura do pico (mm) da solução amostra

Pbl: altura do pico (mm) da solução de branco

Notas de procedimentos

1. Ditizona (difeniltiocarbazona) é oxidada facilmente e normalmente contém sua forma oxidada (difeniltiocarbadiazona) como uma impureza que causa interferência nos picos no gás-cromatograma. Então, utilizando a propriedade química única da ditizona pura de formar um sal solúvel em água que dissolve em solução alcalina, preparar uma solução nova de ditizona-tolueno para cada análise.

2. Ao preparar soluções de amostra para amostras de água, adicionar cloridrato de hidroxilamina para reduzir o permanganato de potássio restante e adicionar solução de EDTA para mascarar outros íons de metal contidos na amostra. Assim, adicionar ambos para prevenir o consumo desnecessário de ditizona por íons de metal e oxidação durante a extração de ditizona-tolueno.

Para os fundamentos da análise de metilmercúrio, ver pag. 69-71 para as Notas de Procedimentos em "4-1-1 Amostras Biológicas (peixe, molusco, sangue humano, e tecidos como cordão umbilical)".

Amostra, 2 L (funil de separação 2-L)

Adicionar 10 mL de H₂SO₄ 20N e misturar para acidificar.

Adicionar 5 mL de solução de KMnO₄ 0,5%, misturar, e deixar descansar por 5 min.

Adicionar 20 mL de NaOH 10N e misturar para neutralizar.

Adicionar 5 mL de solução de NH₂OH·HCl 10%, misturar, e deixar descansar por 20 min.

Adicionar 5 mL de solução de EDTA 10% e misturar.

Adicionar 10 mL de ditizona-tolueno 0,01% e agitar por 3 min.

Deixar descansar por pelo menos 1 hora.

Fase Orgânica (tubo cônico de centrífuga de 35-mL)

Fase Aquosa

(Qdo. for formada uma emulsão, adic. 0,5 g de Na₂SO₄ anidro e agitar.)

Centrifugar a 1.200 por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 5 mL de NaOH 1 N e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica, 7 mL (cônico tubo de 10-mL)

Fase Aquosa

Adicionar 2 mL de solução alcalina de sulfeto de sódio e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Aquosa

Fase Orgânica

Adicionar 3-5 gotas de HCl 1N para acidificar levemente.

Aerar com gás N₂ a 50 mL/min. por 3 min.

Adicionar 2 mL de tampão de Walpole e misturar.

Adicionar 0,2 mL de ditizona-tolueno 0,01% purificada e agitar por 3 min.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 3 mL de NaOH 1N e agitar por 3 min.

Deixar descansar. Descartar a fase aquosa.

Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase Aquosa

Adicionar 2 gotas de HCl 1N e misturar em agitador vortex.

GLC-ECD

Fase ácida clorídrica

Fluxograma 10. Determinação de Metilmercúrio em Água

4-2 Determinação pelo método de lixiviação de ácido clorídrico/extração com tolueno/cromatografia gás-líquido com detecção de captura de elétron (GLC-ECD)

A análise de metilmercúrio para amostras de cabelo pode ser executada mais simplesmente com um método diferente daquele apresentado anteriormente. Resumidamente, este método envolve imersão da amostra em HCl 2N, aquecimento à 100°C durante 5 minutos para lixiviar metilmercúrio da amostra, extração de metilmercúrio em tolueno, e determinação por GLC-ECD.

4-2-1 Cabelo

Transferir várias dezenas de miligramas da amostra para um béquer. Lavar com detergente neutro (diluído 100 vezes) e água destilada por decantação. Adicionar um pequeno volume de acetona à amostra para remover a água remanescente. Remover a acetona sob pressão reduzida. Transferir a amostra para um frasco de 20 mL e picotar com tesouras de dissecação.

a. Reagentes

- (1) Tolueno: $C_6H_5CH_3$ (grau para análise de pesticida).
- (2) Etanol: C_2H_5OH (grau analítico).
- (3) Água destilada: Destilar água deionizada e armazenar em um recipiente de vidro limpo.
- (4) HCl 2N: Misturar 180 mL de ácido clorídrico (grau analítico) com água destilada para obter um volume final de 1.000 mL.
- (5) NaOH 1N: Dissolver 40 g de hidróxido de sódio (grau analítico) em água destilada para fazer um volume final de 1.000 mL.
- (6) NaOH 0,1N: Diluir NaOH 1N 10 vezes com água destilada.

- (7) Solução de L-cisteína 0,1%: Dissolver 10 mg de cloridrato de L-cisteína, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em 10 mL de NaOH 0,1N. (Preparar uma solução nova para cada análise).
- (8) Solução padrão de metilmercúrio: Pesar 12,5 mg de cloreto de metilmercúrio, CH_3HgCl (padrão primário) em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver em tolueno para fazer um volume final de 100 mL, e armazenar como solução estoque. Diluir a solução estoque 100 vezes com tolueno para fazer uma solução padrão de metilmercúrio. Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.
- (9) Solução de metilmercúrio-cisteína: Transferir 2 mL da solução padrão de metilmercúrio e 2 mL da solução de L-cisteína 0,1% para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com uma rolha de vidro. Agitar por 3 minutos em agitador de sentido recíproco para extrair o metilmercúrio na fase aquosa. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos, tampado com a rolha de vidro, retirar e descartar a fase orgânica (fase superior). Fechar o tubo e armazenar em um local escuro refrigerado. (Preparar uma solução nova mensalmente). Um mL desta solução contém 1.000 ng de Hg.

Nota: Para os reagentes anteriores (5) e (6), preparar as quantidades exigidas com antecedência, adicionar metade do volume de tolueno, e lavar por agitação em um funil de separação. Confirmar com antecedência que não aparece nenhum pico, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio pelo GLC-ECD.

b. Instrumentos e equipamento

- (1) Cromatógrafo gás-líquido equipado com detector de captura de elétrons (GLC-ECD).

- (2) Centrífuga.
- (3) Agitador de sentido recíproco.
- (4) Banho térmico: Usar polietileno glicol 400.
- (5) Aspirador.
- (6) Balões volumétricos: 10, 100, e 1.000 mL.
- (7) Pipetas graduadas: 0,2, 1, 5, e 10 mL.
- (8) Pipetas Pasteur.
- (9) Funis de separação: 1.000 mL.
- (10) Recipiente de vidro com tampa de vidro: 500 mL.
- (11) Béquer: 100 mL.
- (12) Tubo de centrífuga de fundo redondo de 10 mL com tampa rosqueada: 16,5 mm de diâmetro × 105 mm de comprimento.
- (13) Tubo cônico de centrífuga de 10 mL com tampa de vidro: 16,5 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento.
- (14) Frasco: frasco de cintilação de 20 mL.
- (15) Lã de vidro ou lã de algodão.
- (16) Tesouras de dissecação.

Nota: Lavar completamente todos os aparatos de vidro com tolueno antes do uso. Confirmar com antecedência que nenhum pico aparece, pois isso poderia interferir com a medida de metilmercúrio por GLC-ECD. Se um pico aparecer, executar tratamento de calor à 300°C durante 30 minutos.

Condições cromatográficas gás-líquido:

Qualquer uma das seguintes três diferentes colunas, podem ser usadas para a análise:

- i) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com Hg-20A em Uniport HP (AW-DMCS, malha 60-80, GL Science Co., Ltd., Tokyo, Japan).
- ii) Coluna de vidro 3,0 mm × 0,75-1,0 m empacotada com KOCL-Hg 10% em Chromosorb W (AW-DMCS, malha 60-80, J-Science Co., Ltd., Kyoto, Japan).
- iii) Coluna de vidro 3,0 mm × 2,0 m empacotada com 5-10% poli-dietileno glicol succinato (DEGS) em Chromosorb W (AW-DMCS).

Depois de empacotar a coluna, empacotar aproximadamente 2-3 cm de NaCl, previamente aquecido a 500°C durante 2-3 horas, acima do material de empacotamento (no lado de injeção).

Temperatura: Forno: 140-160°C, Injetor: 180°C, Detector: 200°C

Gás carreador: N₂, 30-40 mL/min.

c. Preparação das soluções de amostra

Pesar precisamente uma amostra de cabelo finamente cortado (normalmente ao redor de 10 mg) e transferir para um tubo de centrífuga de fundo redondo de 10 mL com tampa rosqueada. Adicionar 2 gotas de etanol para umedecer a amostra. Com uma vara de vidro, inserir uma pequena quantidade de lã de vidro ou lã de algodão no tubo e apertar levemente sobre a amostra para cobri-la. Colocar suavemente 3 mL de HCl 2N sobre a lã de vidro ou algodão, tomando cuidado para manter a amostra abaixo da superfície. Fechar firmemente e aquecer em um banho térmico à 100°C durante 5 minutos para eluir metilmercúrio da amostra.¹ Deixar esfriar e inverter para misturar. Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos. Transferir 1 mL do sobrenadante para um tubo cônico de centrífuga de 10 mL provido com uma rolha de vidro. Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 minutos para

extrair o metilmercúrio presente na fase de HCl para a fase de tolueno.² Centrifugar a 1.200 rpm por 3 minutos. Retirar e remover a fase mais baixa³ para fazer uma solução de amostra.

Separadamente, transferir 0, 0,050, e 0,10 mL de uma solução de metilmercúrio-cisteína (correspondendo a 0, 50, e 100 ng Hg) para três tubos de centrífuga de 10 mL e fundo redondo com tampa rosqueada, respectivamente, e adicionar HCl 2N para fazer um volume final de 3 mL. Submeter estas soluções aos procedimentos indicados no método para preparar as soluções amostra para fazer as soluções padrão de metilmercúrio para a curva de calibração. Proteger todas as soluções da luz depois da preparação.

d. Procedimentos de análise e cálculos

Com uma micro-seringa, injetar no GLC um volume fixo (normalmente 2-5 μ l) de cada uma das soluções de amostra (ou suas soluções tolueno-diluídas), e o branco e as soluções padrão de metilmercúrio. Calcular a concentração de metilmercúrio na amostra de cabelo (ng/mg) comparando a altura do pico da solução de amostra com a curva de calibração obtida das soluções de branco e das soluções padrão de metilmercúrio.

Alternativamente, quando a linearidade for confirmada pela medida das soluções padrão de metilmercúrio pela preparação da curva de calibração, a concentração de metilmercúrio na amostra pode ser calculada de acordo com a seguinte equação que usa a altura do pico da solução padrão (Pstd) de, por exemplo, 100 ng Hg.

$$\text{Concentração de Metilmercúrio na amostra (ng/mg)} = 100 \text{ ng} \times \\ (\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{peso da amostra (mg)}$$

Ps: Altura do pico (mm) da solução amostra

Pbl: Altura do pico (mm) da solução de branco

Notas de Procedimentos

1. Embora a lixiviação de metilmercúrio em amostras de cabelo com ácido clorídrico diluído se processe gradualmente a temperaturas normais, ela é acelerada por aquecimento. Quando se usa HCl 2N, o aquecimento a 100°C causa a elutriação quase completamente dentro de vários minutos; excedendo 10 minutos causa a elutriação de outras substâncias orgânicas, resultando no aparecimento de picos interferentes no gás-cromatograma. Um tempo de aquecimento de 5 minutos é suficiente sob as condições deste método. Não exceder 10 minutos de tempo de aquecimento.
2. Para transferir quantitativamente o metilmercúrio no elutriado de HCl para a fase de tolueno neste passo de extração, usar um volume de tolueno de pelo menos duas vezes o volume do elutriado de HCl para a extração.
3. Para remover a fase superior ou a fase mais baixa no tubo de teste, usar o Sistema de Sucção-Remoção com uma pipeta Pasteur conectada a um tubo flexível por um coletor de líquido de descarte para um aspirador, como mostrado na Figura 2. Resumidamente, para remover a fase superior (fase orgânica), proceder a sucção posicionando a ponta da pipeta Pasteur na superfície da fase superior abaixo ao longo da parede interior do tubo de teste para puxar fora a maioria da fase superior. Quando restar somente uma pequena porção da fase superior, manter a ponta da pipeta Pasteur alguns mm acima da superfície da fase orgânica e continuar aspirando. Com esta técnica, somente a fase orgânica que tem uma gravidade específica mais baixa que a da fase mais baixa (fase aquosa) e volatilidade alta, é puxado para fora junto com o ar, permitindo a remoção quase completa da fase orgânica. Para retirar e descartar a

mais baixa das duas fases separadas no tubo de teste, apertar o tubo flexível com os dedos para parar a sucção da pipeta Pasteur. Posicionar a ponta da pipeta Pasteur no fundo do tubo de teste e ajustar a pressão no tubo flexível para aspirar lentamente a fase mais baixa. Quando a fase mais baixa estiver quase completamente removida, apertar o tubo flexível para parar a sucção e remover a pipeta Pasteur. Isto torna possível remover somente a fase mais baixa. Devido estes procedimentos requererem alguma habilidade e precisão, praticar cada procedimento previamente.

Amostra, cerca de 10 mg (tubo centrífuga de 10 mL com tampa rosqueada)

Adicionar 2 gotas de etanol.
Cobrir com uma pequena quantidade de lã de vidro ou de algodão.
Adicionar vagarosamente 3 mL de HCl 2N.
Fechar firmemente e aquecer a 100°C por 5 min.
Deixar esfriar e misturar.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase de ácido clorídrico, 1 mL (tubo cônico de centrífuga de 10 mL)

Adicionar 2 mL de tolueno e agitar por 3 min.
Centrifugar a 1.200 rpm por 3 min.

Fase Orgânica

Fase de ácido clorídrico

GLC-ECD

Fluxograma 11. Determinação de Metilmercúrio em Cabelo

Referências

- 1) Kanno, J., Akagi, H., Takabatake, E.: A method for determination of methylmercury in environmental samples, particularly in sediment, *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health (Eisei kagaku)*, **31**, 260-268 (1985). (in Japanese).
- 2) Akagi, H.: Analysis of methylmercury in fish and shellfish by dithizone extraction-gas chromatography, *Japanese Journal of Hygiene*, **40**, 293 (1985). (in Japanese).
- 3) Matsuo, N., Suzuki, T., Akagi, H.: Mercury concentration in organs of contemporary Japanese, *Archives of Environmental Health*, **44**(3), 298-303 (1989).
- 4) The Pharmaceutical Society of Japan ed., Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists, *Commentary*, pp. 626-628 (1990), Kanehara Publishing Co., Ltd. (in Japanese).
- 5) Akagi, H., Nishimura, H.: Speciation of mercury in the environment. In: Suzuki T., Imura, N., Clarkson, T.W. (eds.) *Advances in mercury toxicology*. Preum Press, New York, pp.53-76 (1991).
- 6) Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare ed.: *Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation, Chemistry*, pp. 190-192 (1991), Japan Food Hygiene Association. (in Japanese).
- 7) Akagi, H., Malm, O., Branches, F.J.P., Kinjo, Y., Kashima, Y., Guimaraes, J.R.D., Oliveira, R.B., Haraguchi, K., Pfeiffer, W.C., Takizawa, Y., Kato, H.: Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajos river basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine, *Water, Air and Soil Pollution*, **80**, 85-94 (1995).

- 8) Ikingura, J.R., Akagi, H.: Monitoring of fish and human exposure to mercury due to gold mining in the Lake Victoria goldfields, Tanzania, *The Science of the Total Environment*, **191**, 59-68 (1996).
- 9) Kehrig, H.A., Malm, O., Akagi, H., Guimaraes, J.R.D., Torres, J.P.M.: Methylmercury in fish and hair from Balbina Reservoir, Brazilian Amazon, *Environmental Research, Section A* **77**, 84-90 (1998).
- 10) Akagi, H., Grandjean, P., Takizawa, Y., Weihe, P.: Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease, *Environmental Research, Section A* **77**, 98-103 (1998).
- 11) Akagi, H., Castillio, E.S., Cortes-Maramba, N., Francisco-Rivera, A.T., Timbang, T.D.: Health assessment for mercury exposure among schoolchildren residing near a gold processing and refining plant in Apokon, Tagum, Davao del Norte, Philippines, *The science of the Total Environment*, **259**, 31-43 (2000).
- 12) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., Ando, T., Tomiyasu, T., Fajon, V.: Determination of total mercury and monomethylmercury compounds in water samples from Minamata Bay, Japan: An interlaboratory comparative study of different analytical techniques, *Applied Organometallic Chemistry*, **15**, 515-526 (2001).
- 13) Garty, J.: Biomonitoring atmospheric heavy metals with Lichens: Theory and application, *Critical Reviews in Plant Sciences*, **20**(4), 309-371 (2001).
- 14) Ikingura, J.R., Akagi, H.: Lichens as a good bioindicator of air pollution by mercury in small-scale gold mining areas, Tanzania, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**, 699-704 (2002).