

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Louise Aparecida Mendes

**QUANTIFICAÇÃO DE METILMERCÚRIO EM
SEDIMENTO E ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS:
ESTUDO DO CASO DA ÁREA CONTAMINADA DE
DESCOBERTO – MINAS GERAIS**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1221^a

T. 551^a

Louise Aparecida Mendes

**QUANTIFICAÇÃO DE METILMERCÚRIO EM
SEDIMENTO E ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS:
ESTUDO DO CASO DA ÁREA CONTAMINADA DE
DESCOBERTO – MINAS GERAIS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2017

M538q
2017
T

Mendes, Louise Aparecida

Quantificação de metilmercúrio em sedimento e organismos fitoplanctônicos [manuscrito]: estudo do caso da área contaminada de Descoberto - Minas Gerais / Louise Aparecida Mendes. 2017.
[xi], 125 f.: il.

Orientadora: Cláudia Carvalhinho Windmöller.
Coorientador: Jorge Carvalho de Lena.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Química analítica - Teses 2. Química ambiental - Teses 3. Rios - Análise - Minas Gerais - Teses 4. Mercúrio - Teses 5. Especiação química - Teses 6. Espectroscopia de fluorescência - Teses 7. Fitoplancto - Teses I. Windmöller, Cláudia Carvalhinho, Orientadora II. Lena, Jorge Carvalho de, Coorientador III. Título.

CDU 043

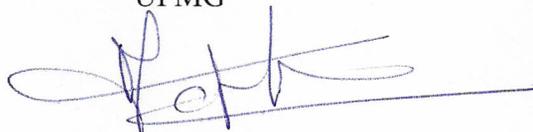
**"Quantificação de Metilmercúrio em Sedimento e Organismos Fitoplanctônicos:
Estudo do Caso da Área Contaminada de Descoberto - Minas Gerais"**

Louise Aparecida Mendes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Cláudia Carvalhinho Windmüller - Orientadora
UFMG



Profa. Anne Helene Fostier
UNICAMP



Prof. Pedro Sérgio Fadini
UFSCar



Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG



Prof. Helvécio Costa Menezes
UFMG

Belo Horizonte, 05 de julho de 2017.

Dedico esse trabalho aos meus amados pais,
Creonilda Costa e Vicente Mendes, pelo amor, compreensão e apoio;
Aos meus irmãos e meus sobrinhos pelo afeto e carinho;
Ao meu noivo César, por estar sempre presente e por me fazer feliz.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto de um trabalho realizado em equipe e, por isso, tenho a imensa satisfação de compartilhar essa vitória com essas pessoas queridas e generosas. Gratidão é o que eu sinto por todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente do início ao fim neste doutorado. Principalmente àqueles que me ajudaram com palavras de incentivo, apoio e carinho.

Agradeço a DEUS por ter me guiado e que não permitiu que eu desistisse dos meus objetivos.

Aos meus AMADOS PAIS pelo amor, compreensão e apoio. Aos meus irmãos pelo afeto e carinho; que me ligavam nos momentos em que me sentia só. Aos meus sobrinhos que trazem muitas alegrias e que me fez uma pessoa melhor. À minha sobrinha Fernanda, que é muito especial em minha vida e à minha afilhada, Sophia, que eu amo tanto! Ao meu noivo, César, por estar presente, por ter compreendido minha ausência e pelos momentos de alegria que vivemos nesses anos. Não poderia deixar de agradecer à minha Tia Lú e meu Tio Wellington pelo carinho e por ter me acolhido em sua residência para que eu pudesse iniciar o doutorado.

À professora Cláudia pela orientação, oportunidade, confiança, carinho e amizade.

Ao professor Jorge Lena pela amizade de anos, pela dedicação e orientação. Você é muito especial!

Ao Peter Fleming do CDTN pelo auxílio na coleta das amostras e pelo bom humor.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

Ao LIMNEA, em especial ao professor Francisco Barbosa e a aluna de pós-doc Maione, pela parceria e colaboração. Essa parceria foi muito importante para a finalização da tese!

Aos alunos de iniciação científica do Lab 249: Thaís, Karina, Hellen, Jéssica, Lucas e Raiane.

Às professoras Clésia e Letícia por compartilhar seus conhecimentos.

Ao LEAQAA que me acolheu e me deu o suporte que necessitei.

Aos professores da Pós-graduação pelos ensinamentos.

Ao professor Guilherme Dias e professora Roberta Froes pelas contribuições.

Às minhas “amigas-irmãs”, presente da UFMG: Roberta Matos, Karen Monique, Liliane Catone, Camila Carriço, Maione Franco e Nathália Paiva.

Aos amigos que fiz na UFMG: Vanessa, Clináscia, Roberta Condé, Deyse, Elizângela, Leandro, Gama, Bruna, Mariana, Gabriela, Cassiano, Andrês, Camila e Luciene.

À Alexandra pela ajuda constante no preparo de uma solução importante do trabalho.

À querida professora Luiza de Marilac pelos momentos de descontração e alegria, por abrir as portas de seu laboratório para realização de parte do meu trabalho.

À Cláudia do Valle pela ajuda no início do projeto e pela amizade.

Sou eternamente grata a todos pela paciência, disponibilidade e amizade!

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Em 2002, Hg metálico foi encontrado enterrado em uma área rural da cidade de Descoberto, Brasil e embora vários estudos tenham sido conduzidos para avaliar a contaminação da área, nenhum deles investigou a presença de Hg metilado no sistema hídrico. Neste trabalho, o CH_3Hg^+ foi determinado utilizando cromatografia gasosa–pirólise–detecção de fluorescência atômica em material sedimentado pela chuva e sedimentos próximos à área contaminada. A quantificação da concentração de Hg total juntamente com a especiação química por termodessorção foram realizadas. A concentração de HgT encontrada no material coletado em uma das caixas de sedimentação foi muito alta, de até $41580 \mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras do Córrego Rico e Ribeirão do Grama mostraram uma faixa de HgT de 5,8 a $266 \mu\text{g kg}^{-1}$. A análise de termodessorção mostrou predominância de Hg^{2+} , com boa correlação positiva com matéria orgânica e enxofre total. A concentração de CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos de rio variou de $<0,07$ a $1,87 \mu\text{g kg}^{-1}$ e nas amostras das caixas de sedimentação as concentrações na estação seca foram de 1,33 e $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estes são valores elevados, mostrando que deve ser tomado cuidado para evitar o transporte deste material para o sistema hídrico.

Os Capítulos 2 e 4 descrevem a validação de dois métodos para quantificação de CH_3Hg^+ por CG-pyro-AFS: amostras de sedimento e cianobactérias. O sedimento é um dos principais locais de produção de CH_3Hg^+ e as cianobactérias participam da biotransformação do mercúrio nessa espécie. Todo o procedimento de validação seguiu os protocolos do guia INMETRO - DOQ-CGCRE-008. Os resultados mostraram que os dois métodos não apresentam efeito de matriz; boa linearidade (0,994) na faixa de 0 a 400 pg de CH_3Hg^+ ; Repetibilidade de 3%; Precisão intermediária de 8%; Ensaio de recuperação em amostras enriquecidas na faixa de 93 a 129%; e limites de detecção de $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sedimento e $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cianobactérias. Os materiais de referência CRM580 e DORM-3 foram utilizados para avaliar a exatidão do método, resultando em recuperações de 95 e 89%, respectivamente. Os métodos foram, portanto, adequados para o objetivo proposto e podem ser usados como ferramentas importantes em análises de rotina e/ou estudos do ciclo biogeoquímico de Hg. O ensaio de metilação de Hg^{2+} mostrou que a microalga *Stichococcus* sp. coletada na área contaminada de Descoberto pode ser a responsável pela produção de CH_3Hg^+ .

Palavras-chave: metilmercúrio, sedimento, fitoplâncton, CG-pyro-AFS, Descoberto

ABSTRACT

In 2002, metallic Hg was found buried in a rural area of Descoberto city, Brazil, and although a number of studies have been conducted in order to assess the contamination of the area, none of them investigated the presence of methylated Hg in the hydric system. In this work methylmercury (CH_3Hg^+) was determined using gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence detection (GC-pyro-AFS) in material from rain sedimentation boxes and stream sediments near the contaminated area. Total Hg (HgT) concentration along with the chemical speciation by thermo-desorption were performed. The HgT concentration in material from the sedimentation boxes was found to be very high, up to $41,580 \mu\text{g kg}^{-1}$. The samples from the Grama and Rico streams show a range of HgT from 5.8 to $266 \mu\text{g kg}^{-1}$. The thermo-desorption analysis showed predominance of Hg^{2+} , with a good positive correlation with organic matter and total sulfur. The CH_3Hg^+ concentration in stream sediment samples ranged from <0.04 to $1.87 \mu\text{g kg}^{-1}$ and in the samples of sedimentation boxes the concentrations were 1.33 and $8.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ during dry season. These are high values show that care should be taken to avoid the transport of this material to the hydrological system.

Chapters 2 and 4 describe the validation of two methods for determination of CH_3Hg^+ by GC-pyro-AFS: sediment samples and cyanobacteria. Sediment is one of the major sites of CH_3Hg^+ production and cyanobacteria are likely responsible for the biotransformation of mercury (Hg) into this species. The whole validation procedure followed the protocols of INMETRO guide – DOQ-CGCRE-008. The results showed that the two methods do not present matrix effect; good linearity (0.994) in the range of 0 to $400 \text{ pg CH}_3\text{Hg}^+$; repeatability of 3%; intermediate precision of 8%. Spiked recovery assays of samples in the range of 93 to 129%; and detection limits of $0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$ of sediment and $1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ of cyanobacteria. Reference materials CRM580 and DORM-3 were used to evaluate the accuracy of the method, resulting in 95 and 89% recoveries, respectively. The methods were, therefore, adequate for the proposed objective and can be used as important tools in routine analyzes and/or studies of the biogeochemical cycle of Hg. The methylation assay of Hg^{2+} showed that the microalgae *Stichococcus* sp. collected in the contaminated area of Descoberto may be responsible for the production of CH_3Hg^+ .

Keywords: methylmercury, sediment, phytoplankton, GC-pyro-AFS, Descoberto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente (modificado de Barkay <i>et al.</i> , 2003)	3
Figura 1.2 – Estrutura da metilcobalamina (http://www.vitamina-b12.net/metilcobalamina).....	9
Figura 2.1a – Frascos reacionais da etapa de derivatização.....	38
Figura 2.1b – Desenho esquemático das etapas de derivatização e trapeamento (EPA 1630, 2001)	38
Figura 2.2 – Módulo de dessorção (TDM – II, MERX)	38
Figura 2.3 – Módulo da CG e coluna pirolítica.....	39
Figura 2.4 – Módulo de detecção do sistema CG-pyro-AFS, MERX.....	40
Figura 2.5 – Sistema CG-pyro-AFS, Merx, <i>Brooks Rand Labs</i> (http://www.brooksrandinc.com/products/automated-mercury-systems/merx-methyl-hg-system-for-epa-1630).....	41
Figura 2.6 – Fluxograma da parte experimental	42
Figura 2.7 – Sistema de destilação do Merx, <i>Brooks Rand Labs</i>	47
Figura 2.8 – Sinais analíticos para as espécies Hg^0 , CH_3Hg^+ e Hg^{2+} e/ou $CH_3CH_2Hg^+$	49
Figura 2.9 – Resultados da otimização dos parâmetros das etapas de derivatização e trapeamento.....	52
Figura 2.10 – Curvas de CH_3Hg^+ obtidas em solução aquosa e na matriz de sedimento.....	55
Figura 2.11 – Gráfico de probabilidade normal para a curva analítica de CH_3Hg^+	57
Figura 2.12 – Gráfico de Durbin-Watson para teste de independência dos resíduos.....	57
Figura 2.13 – Gráfico representando a homoscedasticidade das variâncias para a curva analítica de CH_3Hg^+	58
Figura 2.14 – Curva analítica final de CH_3Hg^+ após exclusão dos outliers	58
Figura 2.15 – Resultados obtidos para material de referência certificado e teste de adição e recuperação	61
Figura 3.1 – Localização do Município de Descoberto –MG/Brasil	64
Figura 3.2 – Fluxograma da parte experimental	69
Figura 3.3 – Caixa de sedimentação	71
Figura 3.4 – Córrego Rico.....	72
Figura 3.5 – Ribeirão do Grama.....	72
Figura 3.6 – Programa de aquecimento para quantificação de Hg_T no DMA-80	75
Figura 3.7 – Programas de aquecimento independentes utilizados para especiação de Hg por termodesorção no DMA-80	76
Figura 3.8 – Concentração de Hg_T em amostras de sedimento do Córrego Rico e Ribeirão do Grama.....	81

Figura 3.9 – Pontos de amostragens e concentração de Hg total (mg kg^{-1}) encontradas ao longo do Córrego Rico e no Ribeirão do Grama pela FEAM (2005)	83
Figura 3.10 – Gráficos da termodessorção dos padrões de Hg (Windmöller <i>et al.</i> 2017).	88
Figura 3.11 – Gráficos da termodessorção de Hg em amostras de sedimentos coletadas em Descoberto – MG na estação seca.....	89
Figura 3.12 – Gráficos da termodessorção de Hg em amostras de sedimento coletadas em Descoberto – MG nas estações seca e chuvosa.....	90
Figura 4.1 – Desenho esquemático dos mecanismos de transformação/transporte do Hg em uma bactéria com genes merA e merB (Dash & Das, 2012)	103
Figura 4.2 – Microalgas obtidas em microscópio óptico: A) <i>Fischerella</i> sp. e B) <i>Stichococcus</i> sp	108
Figura 4.3 – Fotos do cultivo das cianobactérias	109
Figura 4.4 – Curvas analíticas para quantificação de CH_3Hg^+ obtidas em solução aquosa na matriz de cianobactéria.....	111
Figura 4.5 – Resultados obtidos para material de referência e teste de tendência/recuperação	106
Figura 4.6 – Cromatograma obtido para microalga <i>Stichococcus</i> sp.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Espécies de Hg de acordo com suas propriedades (Lindqvist <i>et al.</i> , 1984 modificada por Issaro <i>et al.</i> , 2009).....	2
Tabela 1.2 – Reagentes utilizados para extração de CH ₃ Hg ⁺ e suas finalidades.....	12
Tabela 1.3 – Concentrações de CH ₃ Hg ⁺ presentes em amostras ambientais, alimentos e biológicas	19
Tabela 1.4 – Principais técnicas hifenadas para quantificação de CH ₃ Hg ⁺ com suas principais vantagens e limite de detecção (LD)	21
Tabela 1.5 – Resumo dos principais reagentes e técnicas utilizados para quantificação de CH ₃ Hg ⁺	25
Tabela 2.1 – Parâmetros do sistema cromatográfico e das etapas de derivatização e trapeamento otimizados e as respectivas condições testadas.....	44
Tabela 2.2 – Parâmetros do sistema CG-pyro-AFS que permaneceram constante durante a otimização	44
Tabela 2.3 – Fator de resolução e tempo de retenção obtidos para otimização da fase móvel e temperatura da CG	50
Tabela 2.4 – Resultados obtidos para avaliação do efeito de matriz.....	55
Tabela 2.5 – Parâmetros estatísticos e dados obtidos na avaliação das premissas para utilização do método OLSM.....	59
Tabela 2.6 – Resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas na validação do método..	61
Tabela 3.1 – Identificação, descrição e localização das amostras de sedimento coletadas em Descoberto – MG	73
Tabela 3.2 – Resultados de HgT, CH ₃ Hg ⁺ , MO, C/N, S Total, FRX e porcentagem de espécies de Hg obtidas nas análises por termodesorção nas amostras de sedimento coletadas em Descoberto (MG)	80
Tabela 3.3 – Concentração de CH ₃ Hg ⁺ e porcentagens de CH ₃ Hg ⁺ em relação ao HgT encontrada em sedimentos desse estudo e outras pesquisas.....	94
Tabela 4.1 – Resultados obtidos para avaliação do efeito de matriz entre a curva em solução aquosa e a curva em cianobactéria	110
Tabela 4.2 – Resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas na validação do método	113

ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVS – Ácido Sulfídrico Volátil
CBA – Companhia Brasileira de Alumínio
CCME – Conselho Canadense de Meio Ambiente
CDTN – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CG – Cromatografia Gasosa
CG–ECD– Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Captura de Elétrons
CG–ICP–MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado
CG –MS– Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
CG–pyro–AFS – Cromatografia Gasosa com Sistema de Pirólise Acoplada ao Espectrômetro de Fluorescência Atômica
CHN – Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio
COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais
CRM – Material Certificado de Referência
CVAFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica por Vapor Frio
DMA – Analisador Direto de Mercúrio
EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
CH₃CH₂Hg⁺ – Etil-mercúrio
FEAM – Fundação Estadual do Meio Ambiente
FRX – Fluorescência de Raios-X
HCA – Análise Hierárquica de Cluster
Hg_{org} – Mercúrio Orgânico
HgT – Mercúrio Total
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC–CVAFS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Fluorescência Atômica por Vapor Frio
HPLC–ICP–MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado
IAEA – *International Atomic Energy Agency*
IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas
IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements*
ISO – *International Organization for Standardization*

ISQG – *Interim Sediment Quality Guidelines*
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
MAE – Extração Assistida por Radiação Micro-ondas
MO – Matéria Orgânica
 CH_3Hg^+ – Metil-mercúrio
MO – Matéria Orgânica
 NaBEt_4 – Tetraetilborato de Sódio
 NaBPh_4 – Tetrafenilborato de Sódio
 NaBPr_4 – Tetrapropilborato de Sódio
PCA – Análise de Componentes Principais
PEL – *Probable Effects Level*
TEL – *Threshold Effects Level*
UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto
UNEP – *United Nations Environment Programme*
VRQ – Valor de Referência de Qualidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	1
1.1 PROPRIEDADES DO Hg	1
1.2 TOXICIDADE DO CH ₃ Hg ⁺	4
1.3 CH ₃ Hg ⁺ EM SEDIMENTOS E OS PROCESSOS DE METILAÇÃO E DESMETILAÇÃO	7
1.4 DETERMINAÇÃO DE CH ₃ Hg ⁺	10
1.4.1 Coleta, preservação e estocagem das amostras para quantificação de CH ₃ Hg ⁺	10
1.4.2 Procedimentos ou métodos de extração para quantificação de CH ₃ Hg ⁺ : técnicas analíticas mais utilizadas e estudo de casos	11
1.4.2.1 Reagentes utilizados para extração de CH ₃ Hg ⁺	12
1.4.2.2 Avaliação de formação de artefato	15
1.4.2.3 Técnicas analíticas utilizadas para quantificação de CH ₃ Hg ⁺	18
1.4.2.4 Estudo de casos	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH₃Hg⁺ EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS.....	36
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	36
2.1 ETAPAS DO SISTEMA CG-PYRO-AFS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH ₃ Hg ⁺	36
2.1.1 Derivatização ou Derivação	36
2.1.2 Módulo Purga e Trapeamento	37
2.1.3 Módulo de dessorção.....	38
2.1.4 Módulo CG-pyro	39
2.1.5 Cromatografia Gasosa (CG).....	39
2.1.6 Detector Espectrômetro de Fluorescência Atômica (AFS)	40
2.2 OBJETIVO	41
2.2.1 Objetivos Específicos.....	41
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	41
2.3.1 Materiais, reagentes e soluções	42
2.3.2 Equipamentos utilizados	43
2.3.3 Instrumentação	43
2.3.4 Otimização do sistema cromatográfico e das etapas de derivatização e trapeamento	43
2.3.5 Extração de CH ₃ Hg ⁺ da amostra de sedimento	45
2.3.6 Construção da curva analítica para quantificação de CH ₃ Hg ⁺ em amostras de sedimento	47
2.3.7 Figuras de mérito da validação.....	48
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
2.4.1 Otimização do sistema cromatográfico	49
2.4.2 Otimização das etapas de derivatização e trapeamento.....	51
2.4.3 Validação do método.....	54
2.4.3.1 Efeito de matriz.....	54
2.4.3.2 Linearidade e Regressão	56
2.4.3.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	59

2.4.3.4 Precisão e Exatidão	59
2.5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

CAPÍTULO 3 – QUANTIFICAÇÃO DE CH₃Hg⁺ EM SEDIMENTOS DE DESCOBERTO – MINAS GERAIS 64

3.1 ÁREA DE ESTUDO	64
3.2 OBJETIVOS	68
3.2.1 Objetivos específicos	68
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	68
3.3.1 Materiais, reagentes, soluções e equipamentos	68
3.3.2 Instrumentação	68
3.3.3 Amostragem e preparação das amostras de sedimentos.....	69
3.3.4 Quantificação de Hg Total (HgT)	74
3.3.5 Especiação de Hg por termodesorção utilizando o DMA-80	75
3.3.6 Caracterização química das amostras de sedimento.....	76
3.3.6.1 Determinação da concentração de elementos maiores por FRX.....	76
3.3.6.2 Análise do Teor de Matéria Orgânica (MO)	76
3.3.6.3 Determinação de S total	77
3.3.7 Quantificação de CH ₃ Hg ⁺ utilizando o sistema CG-pyro-AFS.....	77
3.3.7.1 Extração de CH ₃ Hg ⁺ em amostras de sedimento	77
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.4.1 Concentração de Hg total	78
3.4.2 Especiação de Hg	86
3.4.3 Concentração de CH ₃ Hg ⁺	91
3.5 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

CAPÍTULO 4 – VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH₃Hg⁺ EM CIANOBACTÉRIAS..... 100

4.1 INTRODUÇÃO	100
4.2 OBJETIVO.....	103
4.2.1 Objetivos Específicos.....	103
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	104
4.3.1 Materiais, reagentes e soluções	104
4.3.2 Equipamentos utilizados	104
4.3.3 Instrumentação	105
4.3.4 Cultivo e preparação das amostras de cianobactérias	105
4.3.5 Extração de CH ₃ Hg ⁺	105
4.3.6 Construção da curva analítica para quantificação de CH ₃ Hg ⁺ em amostras de cianobactéria	106
4.3.7 Figuras de mérito da validação.....	107
4.3.8 Aplicação do método e estudo de metilação	107
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
4.4.1 Efeito de matriz	110

4.4.2 Linearidade e Regressão	111
4.4.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	111
4.4.4 Precisão e Exatidão	112
4.4.5 Aplicação do método e estudo de metilação	113
4.5 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
Apêndice	122

APRESENTAÇÃO

A área do município de Descoberto, contaminada com Hg devido à exploração de ouro no século XIX, é um caso muito importante de ser estudado ainda na atualidade, não apenas para uma avaliação da situação atual de possíveis impactos para o meio ambiente, como também para ser usado de exemplo para outros casos semelhantes de contaminação no Brasil e no mundo. Diversas matrizes já foram avaliadas nessa região quanto à concentração total do elemento em questão, constatando a presença desse metal em altas concentrações, mas ainda não há qualquer estudo de investigação da presença de CH_3Hg^+ nos sedimentos dos recursos hídricos próximos. Essa espécie do metal é um composto orgânico considerado de alta toxicidade e cuja síntese em meios naturais é um processo chave no ciclo biogeoquímico do metal. Diante disso, o objetivo principal desse trabalho foi quantificar a espécie de CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos da área contaminada no município de Descoberto.

Nessa tese também é apresentada a validação de duas metodologias para determinação de CH_3Hg^+ : uma em amostras de sedimento e outra em organismos fitoplanctônicos utilizando a técnica CG-pyro-AFS. Essas duas matrizes têm grande importância em estudos do ciclo biogeoquímico do Hg. Esse estudo tem como justificativa a importância do desenvolvimento/implementação de metodologias analíticas para determinação de CH_3Hg^+ .

A tese foi dividida em cinco capítulos. O Capítulo 1 foi destinado à revisão bibliográfica, onde são abordados as propriedades do Hg, a toxicidade da espécie CH_3Hg^+ , metilação do Hg em sedimentos e determinação de CH_3Hg^+ . Os Capítulos 2 e 4 descrevem a validação dos dois métodos citados para quantificação de CH_3Hg^+ : amostras de sedimento e fitoplâncton. No Capítulo 4 também é apresentado um estudo de metilação por micro-organismos coletadas na área contaminada. Esse assunto é de extrema importância para averiguar mecanismos de metilação no local estudado. O Capítulo 3 foi dedicado à quantificação de CH_3Hg^+ em sedimentos da área contaminada de Descoberto. Por fim, o Capítulo 5 apresenta as considerações finais da tese, mostrando que esse trabalho contribuirá para o entendimento do impacto ambiental do mercúrio na área estudada e auxiliará estudos em outras regiões vulneráveis à contaminação por Hg.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 PROPRIEDADES DO Hg

O mercúrio (Hg) é um metal altamente tóxico e tem sido constantemente estudado desde a tragédia de Minamata no Japão em 1953, quando várias comunidades foram contaminadas devido ao consumo de peixes provenientes da baía de Minamata contaminados com metilmercúrio (CH_3Hg^+), deixando conseqüências devastadoras para os pescadores, suas famílias e outros consumidores. A contaminação ocorreu pelo despejo indevido de rejeitos de um processo industrial de produção de acetaldeído, o qual produzia o CH_3Hg^+ como subproduto, nas águas da baía (Clarkson, 1992).

Outro desastre ocorreu na zona rural do Iraque em 1972, quando os agricultores e seus familiares foram contaminados por CH_3Hg^+ pela ingestão de pães caseiros preparados com farinha de sementes de trigo tratadas com fungicida à base dessa espécie. Esse episódio registrou 6530 pessoas com intoxicação grave e 459 mortes. Vários incidentes ocorreram também no Paquistão e na Guatemala pelo mesmo motivo (Bakir *et al.*, 1973). Apesar dos casos citados, esse metal tem sido também encontrado em regiões sem nenhuma ou pouca atividade antrópica de contaminação, sendo proveniente, por exemplo, da deposição atmosférica como descrito por Akielaszek & Haines (1981) e pelo relatório da *United Nations Environment Programme* (UNEP, 2013) ou ainda por processos de formação dos solos, como descrito em Valle *et al.* (2005), estudando solos de áreas não impactadas da Amazônia.

O Hg pode ser encontrado em três formas principais: mercúrio elementar (Hg^0), compostos de Hg inorgânico (HgCl_2 , HgS e HgO) e compostos orgânicos de Hg (ATSDR, 1999). Esses compostos orgânicos caracterizam-se pela união do Hg a um ou dois átomos de carbono, por meio de ligação covalente, para formar moléculas do tipo R-Hg-X e $\text{R-Hg-R}'$, em que R e R' representam os grupamentos orgânicos e X íons como OH^- , Cl^- e Br^- . Os organomercuriais ligados aos grupamentos alquila de cadeia curta, como CH_3Hg^+ , causam maior preocupação (WHO, 1989), pois podem penetrar com facilidade na membrana celular, devido ao seu caráter lipofílico do radical alquila

(Micaroni *et al.*, 2000). Uma vez que o CH_3Hg^+ também é solúvel em água e é facilmente absorvido pelos microorganismos (Tomiyasu *et al.*, 2000), ele tende a se bioacumular (Lázaro *et al.*, 2013), principalmente devido à sua afinidade por grupos sulfidrila de proteínas (Micaroni *et al.*, 2000). Como consequência, o Hg se biomagnifica na cadeia alimentar e pode alcançar os organismos vivos do topo da cadeia, como os seres humanos. Carrasco *et al.* (2011) e Bloom (1992) alertam que a grande parte de Hg acumulado em músculo de peixe está na forma de CH_3Hg^+ , representando uma ameaça para os seres humanos e a biota. Um dos efeitos de sua intoxicação são danos irreparáveis no sistema nervoso central (Micaroni *et al.*, 2000).

As espécies de Hg mais importantes no ciclo geoquímico do metal são apresentadas na Tabela 1.1, sendo classificadas de acordo com suas propriedades, tais como compostos voláteis, espécies reativas e não-reativas. Essa classificação foi proposta por Lindqvist *et al.* (1984) e modificada por Issaro *et al.* (2009). As espécies reativas são vistas como formas químicas biodisponíveis e tóxicas. Sabe-se que apenas a determinação de mercúrio total (HgT) não é suficiente para compreender o ciclo biogeoquímico e os possíveis danos que ele pode causar (Marin *et al.*, 1997), porque a reatividade (transformação/conversão), biodisponibilidade e toxicidade variam bastante entre as espécies do metal (NRC, 2003; Issaro *et al.*, 2009; Beceiro-González *et al.*, 2009). Por esse motivo o desenvolvimento de metodologias para especiação de Hg é muito útil e relevante.

Tabela 1.1: Espécies de Hg de acordo com suas propriedades (Lindqvist *et al.* 1984 modificada por Issaro *et al.*, 2009).

Propriedades	Espécie
Compostos voláteis	Hg^0 e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$
Espécies reativas	Hg^{2+} * HgX_2 , HgX_3^- , HgX_4^{2-} HgO em partículas aerossóis CH_3Hg^+ , CH_3HgCl e CH_3HgOH
Espécies não-reativas	$\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgS , e Hg^{2+} ligado em enxofre em fragmentos de matéria húmica.

*X = OH^- , Cl^- ou Br^-

O conhecimento do ciclo biogeoquímico do Hg é muito importante, visto que este pode prever suas rotas no ambiente. Entender esse ciclo é um grande avanço para diagnosticar o impacto causado por esse elemento aos seres humanos e biota. A Figura 1.1 mostra o ciclo de Hg em alguns compartimentos ambientais indicando as interconversões que podem ocorrer.

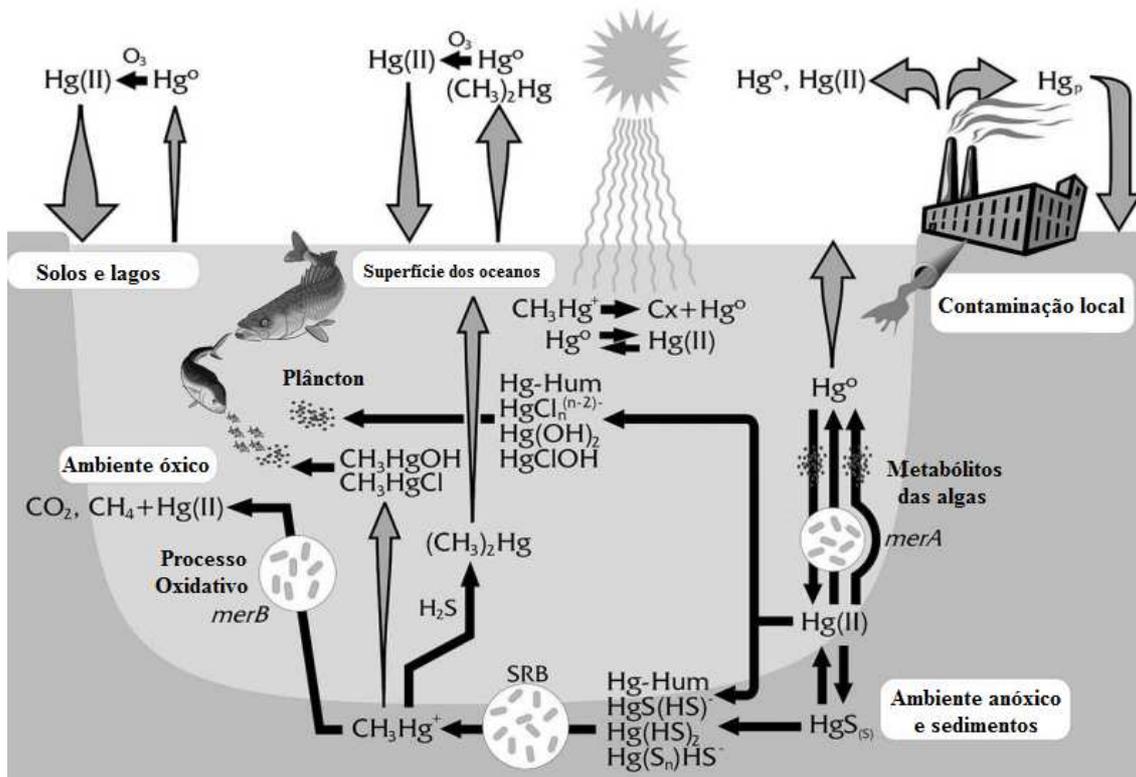


Figura 1.1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente (modificado de Barkay *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que a principal fonte de exposição humana ao Hg, principalmente na forma de CH_3Hg^+ , é através do consumo de peixes e de frutos do mar (ATSDR, 1999). Por outro lado, a forma mais comum de exposição a Hg inorgânico é a inalação de vapor de Hg liberado das amálgamas utilizadas nas atividades de mineração de ouro (ATSDR, 1999).

Segundo relatório da UNEP (2013), as atividades de garimpos de ouro são as que mais contribuíram nos últimos anos para emissão atmosférica de Hg no meio ambiente. O Hg é encontrado na atmosfera principalmente como Hg^0 gasoso, que pode ser transportado a longas distâncias, sendo encontrado em regiões remotas do globo, como o Ártico e a Antártica (Lehnerr, 2014, Ferro *et al.*, 2014), onde não há fontes naturais do metal. Um monitoramento contínuo de Hg no ar está sendo executado há mais de 15 anos na Europa e na América do Norte, especialmente no Ártico, para

avaliar o impacto a nível regional. O fenômeno conhecido como “eventos de depleção” explica como os polos norte e sul do globo podem agir como “sumidouros” do Hg atmosférico: nas épocas do ano com maior incidência solar, reações fotoquímicas promovem a oxidação do Hg⁰ gasoso da atmosfera que se precipita via úmida com mais facilidade para os solos onde fica depositado. Nessas regiões, a taxa de deposição do metal é maior que sua taxa de volatilização, favorecendo então seu acúmulo no solo (Lehnerr, 2014; UNEP, 2003). Andrade *et al.* (2012) realizou um estudo de distribuição e especiação de Hg nos solos da Antártica. O Hg presente no solo variou de 4 a 256 ng g⁻¹, sendo os valores encontrados para os solos ornitogênicos¹ os maiores já encontrados em solos da Antártica.

1.2 TOXICIDADE DO CH₃Hg⁺

O CH₃Hg⁺ tem uma longa história toxicológica na vida humana, com efeitos adversos em vários órgãos, especialmente, efeitos neurotóxicos (Santos *et al.*, 2016; Syversen & Kaur, 2012). As doenças cardiovasculares também têm sido correlacionadas com exposição a essa espécie organomercurial (Wells *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2007).

O CH₃Hg⁺ é facilmente absorvido via inalação e, aproximadamente, 80% é retido após à exposição ao vapor. Se presente num aerossol, a absorção dependerá do tamanho das partículas (Aberg *et al.*, 1969). Quanto à ingestão oral, o intestino absorve cerca de 95% do CH₃Hg⁺ ingerido (Kershaw *et al.*, 1980), mesmo que essa espécie esteja ligado ao grupo SH nos alimentos. A absorção dérmica também é observada para esse composto devido à sua lipossolubilidade (Aberg *et al.*, 1969). Após a absorção, o CH₃Hg⁺ é distribuído de forma ubíqua, penetrando de forma eficaz no sistema nervoso central (SNC) (Zareba *et al.*, 2007). Uma vez absorvido o CH₃Hg⁺ se liga aos grupos SH da proteína do sangue e do tecido e em menor proporção à cisteína e a glutatona (Yin *et al.*, 2008). Essa espécie pode ser distribuída para todas as regiões cerebrais atravessando a barreira hematoencefálica, através do sistema de transporte de aminoácidos como um complexo com cisteína (Aschner & Clarkson, 1988).

¹ Solos formados por influência de acúmulos de excretas de aves marinhas e pinguins.

Aproximadamente 10% do CH_3Hg^+ contido no corpo é encontrado na região do cérebro, pois a absorção nesse organismo é mais lenta que nos outros órgãos. Por outro lado, o cérebro tem uma maior afinidade com essa espécie e a concentração nesse órgão é cerca de 3 a 6 vezes maior que encontrada no sangue. No cérebro, o CH_3Hg^+ é encontrado principalmente como complexo CH_3Hg^+ -glutathiona (Syversen & Kaur, 2012).

As mulheres grávidas expostas ao CH_3Hg^+ transportam esse composto através da placenta, o qual é absorvido pelo feto (Vahter *et al.*, 2000). No equilíbrio, o cérebro fetal pode ter a mesma concentração dessa espécie encontrada no cérebro da mãe. Isso ocorre pela diferença da quantidade de hemoglobina que existe na mãe e no feto, visto que essa é a ligação primária entre os dois indivíduos (Syversen & Kaur, 2012). Outra forma pela qual o CH_3Hg^+ atinge a criança é pela amamentação, visto que essa espécie é excretada pelo leite (Oskarsson *et al.*, 1996; Grandjean *et al.*, 1994). A exposição pré e/ou perinatal prolongada ao CH_3Hg^+ , mesmo em doses moderadas, está relacionada à múltiplos déficits nos neurônios e nas células da glia² (Choi, 1986; Choi *et al.*, 1978). O cérebro em desenvolvimento é extremamente sensível ao envenenamento por CH_3Hg^+ . As crianças expostas a essa espécie organomercurial podem ter uma diminuição do quociente de inteligência (QI), problemas no sistema muscular, na fala e na visão, causando cegueira (Castoldi *et al.*, 2008; Grandjean *et al.*, 1997).

Em adultos, os efeitos tóxicos do CH_3Hg^+ são observados após um longo período de exposição (Clarkson *et al.*, 2003). Os sintomas iniciais incluem visão turva, perda de peso, parestesias nas mãos e nos pés, ataxia e sintomatologia psiquiátrica (Clarkson *et al.*, 2003; Bakir *et al.*, 1973). Além disso, os sinais e os sintomas da intoxicação por essa espécie organomercurial estão associados à perda de células neuronais em regiões específicas do cérebro, como o córtex visual e o cerebelo (Aschner, M.; & Syversen, 2005).

No SNC, o CH_3Hg^+ pode afetar adversamente muitos tipos de células, e um grande número de evidências sugerem que os astrócitos³ representam o local preferencial para sua acumulação, desempenhando um papel crucial na neurotoxicidade (Charleston *et al.*, 1996; Aschner *et al.*, 1993). Essas células coordenam o

² São células não neuronais do SNC que proporcionam suporte e nutrição aos neurônios.

³ São células da glia, são as mais abundantes do SNC e são as que possuem as maiores dimensões.

desenvolvimento e a sobrevivência, desempenham um papel importante na formação de circuitos neuronais e dentre outras funções críticas no cérebro (Booth *et al.*, 2000).

Alguns anos após a primeira síntese do CH_3Hg^+ por Frankland em 1850, dois químicos morreram e um foi envenenado ao manipular e derramar dimetilmercúrio no chão do laboratório (Ceccateli *et al.*, 2010; Clarkson, 1998). Já no século XX, foi descoberto uma aplicação importante do CH_3Hg^+ na área da agricultura como fungicida, e logo, a sua fabricação aumentou, acarretando numa exposição ocupacional. A primeira evidência de contaminação por essa espécie se deu em 1938, quando se observou sintomas neurológicos em alguns trabalhadores. A autópsia de um desses trabalhadores verificou alterações morfológicas no cérebro com perda de células do cerebelo (Ceccateli *et al.*, 2010).

Os primeiros casos mais evidentes de envenenamento por CH_3Hg^+ foi em Minamata e no Iraque, como já relatado nesse Capítulo. Em Minamata, a ingestão de peixes contaminados por mulheres grávidas, envenenou os fetos e, conseqüentemente, muitas crianças nascidas a partir de 1955 apresentaram distúrbios do desenvolvimento neurológico (Santos, *et al.*, 2016; Harada, 1978). Nos adultos, os sintomas mais observados foram: parestesia dos pés e das mãos, ataxia, constrição do campo visual concêntrica bilateral, surdez, comprometimento da fala, tremor, movimentos oculares anormais e ocasionalmente, distúrbios mentais. Em casos de intoxicação aguda, os pacientes ficaram incapacitados e/ou morreram. Esse fenômeno causado pela intoxicação por CH_3Hg^+ ficou conhecido como Doença de Minamata (Ceccateli *et al.*, 2010). Os sintomas observados nas crianças de uma família no Iraque, após ingestão de pães caseiros contaminados por essa espécie, foram deficiência intelectual e na coordenação motora (Engleson & Herner, 1952).

Atualmente, observa-se uma queda na contaminação por CH_3Hg^+ , devido às melhorias nas plantas industriais e no empenho para minimizar sua emissão para o meio ambiente. Entretanto, é importante lembrar que o Hg é um poluente global e está presente em várias regiões do mundo (Ceccateli *et al.*, 2010)..

1.3 CH₃Hg⁺ EM SEDIMENTOS E OS PROCESSOS DE METILAÇÃO E DESMETILAÇÃO

O sedimento é um compartimento ambiental de extrema importância, visto que a sua composição pode influenciar no que diz respeito à concentração, especiação, mobilidade e biodisponibilidade dos metais associados (Zhong & Wang, 2008). Ele pode atuar como um bom indicador da entrada de Hg e outros elementos no meio ambiente. O sedimento no sistema aquático é um importante sumidouro e fonte de Hg, e é considerado como principal local de produção de CH₃Hg⁺ (Canário *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005).

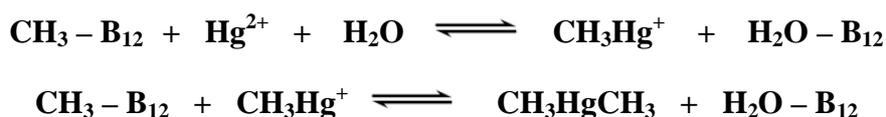
Ao entrar nos ecossistemas aquáticos, o Hg pode reagir com diferentes compostos ou interagir com material particulado presente na água e se precipitar nos sedimentos, principalmente como a forma insolúvel de HgS (Tomiyasu *et al.*, 2000). O sedimento propicia a ocorrência de inúmeras reações químicas (Green-Ruiz *et al.*, 2005). Nessa matriz o Hg pode se inter-converter, com auxílio de micro-organismos, em diversas espécies de diferentes toxicidades (como por exemplo, o CH₃Hg⁺ de alta toxicidade), o que pode comprometer a biota aquática. Alguns estudos mostram que condições específicas são necessárias para favorecer e/ou acelerar a metilação, como: baixo pH, temperatura elevada (Pinedo-Hernandéz *et al.*, 2015); alta concentração de matéria orgânica (Marrugo-Negrete *et al.*, 2015; Eckley *et al.*, 2015, Pinedo-Hernandéz *et al.*, 2015); baixa vazão de água (Marrugo-Negrete *et al.*, 2015); meio oxidante e altas concentrações de sulfato (Eckley *et al.*, 2015). É importante lembrar que esses parâmetros podem atuar junto ou isoladamente, pois cada um contribui de forma diferente para formação de CH₃Hg⁺. As características do meio é que definem, portanto esse processo (Bisinoti & Jardim, 2004).

A partir da espécie Hg²⁺ presente nos sedimentos, o CH₃Hg⁺ é formado no meio ambiente, geralmente, via atividade de bactérias sulfato-redutoras (SRB) (Jonsson *et al.*, 2012; Achá *et al.*, 2011; NRC, 2003; Compeau & Bartha, 1985) e bactérias ferro-redutoras (IRB) presentes nos sedimentos (Jonsson *et al.*, 2012). Entretanto, as bactérias presentes no sedimento podem também desmetilá-lo através de reação reversa (Bisinoti & Jardim, 2004). Em média, o CH₃Hg⁺ representa apenas 1,5% do Hg total nos sedimentos (Horvat *et al.*, 1993). Segundo Leermakers *et al.* (2005) existe um equilíbrio entre as reações de metilação e desmetilação que resulta na baixa porcentagem de CH₃Hg⁺ nos sedimentos e nos solos. É, portanto, muito importante compreender os

processos que controlam a concentração de CH_3Hg^+ em sedimentos, e ainda a produção de CH_3Hg^+ e a degradação do CH_3Hg^+ (Drott *et al.*, 2008).

Bisinoti & Jardim (2004) e Azevedo (2003) citam dois mecanismos distintos para metilação: o biológico, mediado por microorganismos e fungos, e o químico ou abiótico, que ocorre por 3 formas principais: via reação de transmetilação; por meio da radiação ultravioleta na presença de compostos orgânicos doadores de grupo metila e reação com os ácidos fúlvico e húmico.

Quanto ao processo biológico a reação ocorre principalmente com a metilcobalamina também conhecida como vitamina B_{12} . A metilcobalamina está disponível no ambiente de forma significativa, pois ela é uma coenzima produzida pelas bactérias aeróbicas e anaeróbicas. A formação de CH_3Hg^+ no ambiente mediada por esse composto deve-se à transferência de um grupo metila para o íon Hg^{2+} (reação de transmetilação). Observa-se pelas reações ilustrativas propostas por Bisinoti & Jardim (2004) que o íon carbânion é transferido para produzir CH_3Hg^+ e CH_3HgCH_3 tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. A estrutura da metilcobalamina está representada na Figura 1.2. Segundo Bisinoti & Jardim (2004), o processo de metilação ocorre favoravelmente em locais com alta concentração e com elevadas taxas de decomposição da matéria orgânica (MO), sendo, portanto favorecidas em águas ácidas ricas em carbono orgânico dissolvido (COD).



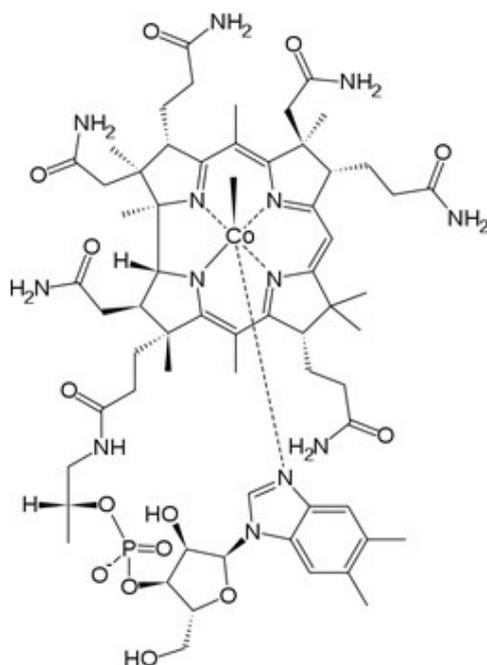
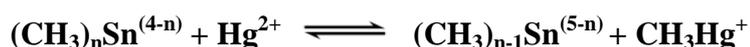


Figura 1.2: Estrutura da metilcobalamina (<http://www.vitamina-b12.net/metilcobalamina>).

A metilação abiótica de Hg ocorre pela transferência de um grupo metila proveniente de ácidos fúlvicos e húmicos (Weber, 1993), ácidos carboxílicos (Falter, 1999b) ou compostos de estanho alquilados utilizados na agricultura como fungicidas Cerrati *et al.*, 1992). A equação representada abaixo mostra a formação de CH_3Hg^+ a partir da reação entre um composto de estanho alquilado e Hg^{2+} .



Drott *et al.* (2008) e Bisinoti & Jardim (2004) mencionam que a desmetilação também pode proceder por mecanismos bióticos ou abióticos. A reação de desmetilação pode ser intercedida pelas bactérias aeróbicas e anaeróbicas assim como na reação inversa. O processo abiótico inclui como principais vias a fotodegradação pela luz solar estudada por Sellers (1997) e degradação via formação de um complexo instável entre CH_3Hg^+ e sulfetos, que se transforma em HgS (Deacon, 1978). É importante ressaltar que Parker & Bloom (2005), estudando método de determinação de CH_3Hg^+ , observaram que não há degradação significativa dessas espécies com a exposição à luz fluorescente, concluindo que não há necessidade de proteger as amostras durante as análises. Entretanto deve-se ter muito cuidado quanto à exposição direta à luz solar. As

principais vias bióticas de degradação de CH_3Hg^+ são a desmetilação oxidativa e degradação redutiva do CH_3Hg^+ . Durante a desmetilação oxidativa, o grupo metil (CH_3^-) é oxidado a CO_2 (Drott *et al.*, 2008).

1.3 DETERMINAÇÃO DE CH_3Hg^+

Antes da apresentação das etapas para quantificação de CH_3Hg^+ é importante abordar os cuidados necessários para evitar a contaminação do manipulador por essa espécie. Como mencionado ao longo do texto, esse composto apresenta alta toxicidade e é facilmente absorvido pelo organismo, causando inúmeros efeitos adversos. Portanto, recomenda-se o uso dos equipamentos de proteção individual (EPI) ao longo de todo trabalho realizado com esse analito. Aconselha-se o uso de jaleco, luvas nitrílicas, óculos de proteção, máscara (quando necessário), capela para exaustão e sapatos fechados. Após o manuseio da solução de CH_3Hg^+ , sugere-se que o jaleco seja lavado separadamente dos demais trajes. Se algum acidente ocorrer ao manusear o CH_3Hg^+ , recorrer à ajuda médica o quanto antes.

A quantificação de espécies de Hg envolve algumas etapas, tais como: coleta de amostras, preservação, estocagem, extração, pré-concentração, separação das espécies e detecção (Leermakers *et al.*, 2005). Na revisão bibliográfica serão abordadas as etapas citadas acima, com ênfase no preparo de amostra de sedimento, formação de artefatos e técnicas analíticas mais comumente utilizadas para quantificação de CH_3Hg^+ , espécie mais importante, como já explicado, devido a sua importância no ciclo biogeoquímico do metal e sua alta toxicidade.

1.4.1 Coleta, preservação e estocagem das amostras para quantificação de CH_3Hg^+

Alguns cuidados devem ser tomados durante e após a coleta de amostras quanto à exposição aos raios solares, para evitar a decomposição da espécie CH_3Hg^+ (Nevado *et al.*, 2011; Drott *et al.*, 2008; Parker & Bloom, 2005). De preferência, devem-se coletar as amostras em frascos âmbar e alocá-los em caixas térmicas que impeçam a passagem da luz solar. Kasper *et al.* (2015), Leopold *et al.* (2010) e Leermakers *et al.* (2005) descrevem metodologias de coleta, preservação e armazenamento de amostras de água para análise de HgT e CH_3Hg^+ . Leermakers *et al.* (2005) ainda, apresentam metodologia de pré-tratamento e estocagem para amostras biológicas.

As amostras de sedimento são geralmente analisadas frescas, ou no caso de longo tempo de estocagem é necessário que as amostras sejam mantidas no escuro em baixas temperaturas ou liofilizadas (Leermakers *et al.*, 2005). Vale destacar que Muhaya *et al.* (1997) avaliaram a influência da quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimento fresco, descongelado e liofilizado. Não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos. Tão pouco foi observado perdas de HgT e CH_3Hg^+ em amostras liofilizadas. Entretanto, as amostras de sedimento fresco apresentaram baixa homogeneidade e baixa reprodutibilidade comparadas às amostras de sedimentos liofilizadas.

Um estudo recente mostrou que, em geral, a melhor maneira de preservar CH_3Hg^+ em amostras de solo e sedimento é congelar as amostras imediatamente após a coleta, seguindo-se subsequentemente por liofilização, moagem, homogeneização e armazenamento do material seco em condições escuras e frias até a análise (Kodamatani *et al.*, 2017), corroborando com os estudos citados acima. Além desse estudo, os autores investigaram a produção de CH_3Hg^+ durante a estocagem dopando amostras com Hg^{2+} . Eles observaram que as concentrações de CH_3Hg^+ em amostras de solo e sedimento podem se alterar durante os processos de secagem e armazenamento, principalmente devido à atividade bacteriana. Os efeitos de determinadas condições de secagem e armazenamento sobre as concentrações de CH_3Hg^+ em amostras de solo e sedimento podem variar e são difíceis de prever (Kodamatani *et al.*, 2017).

1.4.2 Procedimentos ou métodos de extração para quantificação de CH_3Hg^+ : técnicas analíticas mais utilizadas e estudo de casos

Informações mais completas são fornecidas pelo estudo de especiação de Hg, porém as metodologias para isso normalmente envolvem muitas etapas de pré-tratamento da amostra, as quais reduzem a robustez dos processos e os torna mais demorados (Nevado *et al.*, 2011). Geralmente, o preparo da amostra é a etapa mais crítica, uma vez que cada tipo de matriz tem suas características e apresenta um comportamento diferente diante dos reagentes utilizados. Por exemplo, ao se analisar amostras sólidas, como sedimentos e tecidos biológicos, é necessário uma etapa de extração antes da detecção para separar o analito da matriz. Para isso existe uma gama de procedimentos e reagentes que são utilizados para extração e quantificação de

CH_3Hg^+ em amostras ambientais. Dentre os procedimentos mais utilizados estão lixiviação ácida combinada com extração com solvente, digestão alcalina e a destilação.

1.4.2.1 Reagentes utilizados para extração de CH_3Hg^+

O conhecimento de reagentes e fatores que afetam a transformação e a distribuição de CH_3Hg^+ em meios aquosos é importante para melhorar o procedimento e a determinação analítica. Os reagentes mais comumente utilizados para promover a extração de CH_3Hg^+ (Tabela 1.2), principalmente de amostras de sedimento, serão abordados nesse item.

Tabela 1.2: Reagentes utilizados para extração de CH_3Hg^+ e suas finalidades.

Reagentes	Finalidade
CuSO_4	Liga-se aos sulfetos pela sua forte afinidade, facilitando a liberação de CH_3Hg^+ para a solução.
KBr, KCl e KI	Sais fontes de halogênios. Formação de haletos de CH_3Hg^+ , composto capaz de transitar entre a fase orgânica e a fase aquosa durante a extração do analito.
HCl, HNO_3	Utilizados para lixiviação. Porém cuidados são necessários para não decompor o analito.
H_2SO_4	Utilizado para acidificar o meio durante o procedimento de destilação. Atua com sais de halogênios.
Cisteína, 2-mercaptoetanol e tioureia	Agentes extratores utilizados em estudo de especiação de Hg, devido ao Hg ter elevada afinidade com grupos sulfidrilas.
Tolueno, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , n-butanol e n-hexano	Solventes orgânicos capazes de remover de forma seletiva as espécies de Hg orgânico
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou Cisteína	Reagentes de “extração de volta” são complexantes e possuem uma grande afinidade por compostos orgânicos de Hg, devido à presença de grupo tiol.
KOH/metanol e TMAH	Utilizados principalmente em digestão alcalina de amostras biológicas. Porém têm sido utilizados também para sedimentos.

O CuSO_4 tem sido utilizado no procedimento de extração para isolar o CH_3Hg^+ dos ligantes que contêm enxofre. Os íons Cu(II) ligam-se ao enxofre, devido a sua maior afinidade comparada à do Hg e, conseqüentemente, facilita a liberação de CH_3Hg^+ para a solução. Estudos realizados com e sem a presença de Cu(II) demonstraram que há uma grande melhora nas recuperações com adição desse íon (Bowles & Apte, 2000; e Horvat *et al.*, 1993; Cappon & Smith, 1977).

Os sais KBr , KCl e KI têm sido utilizados como fontes de halogênios. O derivado de brometo organomercúrio (RHgBr) tem distribuição mais favorável entre as fases orgânicas e fases aquosas em relação aos outros halogênios, como Cl e I . Além disso, os derivados de RHgBr são menos susceptíveis a decomposição fotoquímica que os derivados de I (Cappon & Smith, 1977, Meuleman *et al.*, 1993). Porém, estudo realizado por Meuleman *et al.* (1993) mostrou que ao se utilizar o sais de Br e I , o pH deve ser rigorosamente monitorado. A influência do pH foi sistematicamente estudada para entender a distribuição das espécies dos haletos (Br , Cl e I) de CH_3Hg^+ na fase de vapor. Os coeficientes de distribuição gás/líquido dos compostos de CH_3Hg^+ numa temperatura entre 25 a 80°C em relação ao pH foram avaliados por esses autores. A volatilidade dos compostos diminuiu na seguinte ordem: $\text{CH}_3\text{HgI} > \text{CH}_3\text{HgBr} > \text{CH}_3\text{HgCl} > \text{CH}_3\text{HgOH}$. Em altos valores de pH, observa-se uma competição entre os íons OH^- e os íons Br^- , Cl^- e I^- , formando CH_3HgOH não-volátil. O CH_3HgCl é formado em pH mais baixo que CH_3HgBr e CH_3HgI de acordo com suas constantes de estabilidade. O haleto menos susceptível a alteração de pH é o íon cloreto (Cl^-), que sofre influência a partir de pH 10,0, devido à formação de CH_3HgOH . O íon iodeto (I^-) se mostrou muito instável na faixa de pH estudado que compreendeu entre 0 a 14 e o íon brometo (Br^-) pode ser utilizado desde que o meio não esteja abaixo de pH 2,0 e acima do pH 10,0. Na presença de iodeto em excesso, CH_3HgI é parcialmente transformado no $\text{CH}_3\text{HgI}_2^-$ iônico, e em meio ácido pode ocorrer a decomposição de CH_3Hg^+ . Essas reações secundárias também foram observadas quando um excesso de Br foi adicionado, porém em menor extensão. Para o Cl esses efeitos não foram observados (Meuleman *et al.* 1993).

Os ácidos HCl , HNO_3 e H_2SO_4 são comumente utilizados para a extração de CH_3Hg^+ de amostras ambientais. Horvat *et al.* (1993) observaram dois efeitos indesejáveis na utilização de lixiviação com HCl : a decomposição de CH_3Hg^+ e a extração incompleta de CH_3Hg^+ da amostra de sedimento principalmente naquelas ricas

em matéria orgânica. Mesmo utilizando concentrações mais elevadas, o HCl não foi eficiente na retirada do CH_3Hg^+ da amostra. Além disso, os autores relatam que a decomposição de CH_3Hg^+ pode ocorrer pelo aumento da concentração de HCl, e por esse motivo o uso desse reagente não é recomendado (Horvat *et al.*, 1993). Fato esse, discordante de estudos realizados por Hempel *et al.* (1992), o qual mostra bons resultados na extração de CH_3Hg^+ com HCl em amostras de solo dopadas.

Liang *et al.* (2004) utilizaram o HNO_3 para lixiviar o CH_3Hg^+ e os resultados de recuperação obtidos variaram de 83 a 100% (Liang *et al.*, 2004). Carrasco & Vassileva (2015) também obtiveram bons resultados utilizando HNO_3 em conjunto com outros reagentes. O H_2SO_4 , juntamente com sais de halogênios, tem sido utilizado principalmente em procedimentos que utilizam a destilação (Horvat *et al.*, 1993, Liang *et al.*, 2004).

Reagentes com grupos sulfidrilas também tem sido utilizados como agentes de extração por alguns trabalhos de especiação, uma vez que o Hg tem elevada afinidade com esses grupos (Jagtap *et al.*, 2015). Dentre eles, a cisteína, 2-mercaptoetanol e tiourea foram empregados em amostras de sedimento e amostras biológicas (Carrasco & Vassileva, 2015; Jagtap *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2007).

Um procedimento comum para a remoção seletiva de espécies de Hg orgânico de amostras de sedimentos e solos é a extração líquida usando solventes orgânicos (Santos *et al.*, 2009). Os solventes orgânicos como tolueno (Trombini *et al.*, 2003; Quevauviller *et al.*, 2000, Caricchia *et al.*, 1997), CH_2Cl_2 (Liang *et al.*, 2004, Trombini *et al.*, 2003, Bloom *et al.*, 1997), CHCl_3 (Falter, 1999a), n-butanol (Santos *et al.*, 2009) e n-hexano (Falter, 1999b) são os mais utilizados para esse fim. Vale ressaltar que na extração com solvente orgânico, a utilização de íons Cl^- , Br^- ou I^- é de suma importância para a formação de um composto capaz de transitar entre a fase orgânica e a fase aquosa (Santos *et al.*, 2009).

Após extração com solvente orgânico, uma alíquota é submetida ao processo de destilação em presença de água (Brooks Rand Labs - Application Note, 2013; Liang *et al.*, 2004) ou “extração de volta” (*back extraction*) com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Carrasco & Vassileva, 2015; Quevauviller, 1999) ou cisteína (Rivaro *et al.*, 2007; Quevauviller *et al.*, 2000; Horvat *et al.*, 1994). A Cisteína, o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou algum outro

reagente contendo grupo tiol são comumente usados para facilitar a transferência de fase (Puk & Weber, 1994).

Extrações de CH_3Hg^+ por reagentes como KOH/metanol (Carrasco & Vassileva, 2014, Spada *et al.*, 2012; Bloom, 1992) e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (Nevado *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 1998) também têm sido utilizados principalmente em amostras biológicas e em alguns trabalhos também em amostras de sedimentos (Pinedo-Hernández *et al.*, 2015; Spada *et al.*, 2012; Horvat *et al.*, 1993). Entretanto, sérios problemas são encontrados nas etapas subsequentes para extração em sedimentos, devido aos altos teores de matéria orgânica, sulfetos e íons Fe co-extraídos com CH_3Hg^+ (Horvat *et al.*, 1993).

Outros reagentes para o procedimento de extração de CH_3Hg^+ podem ser vistos em artigos, tais como, Issaro *et al.* (2009), Leermakers *et al.* (2005) e Quevauviller *et al.* (2000).

1.4.2.2 Avaliação de formação de artefato

A produção indesejada de CH_3Hg^+ (formação de artefato) é responsável por superestimar a concentração do analito nas medições analíticas. Essa produção pode ser causada pela conversão de parte do Hg inorgânico a CH_3Hg^+ , principalmente em sedimentos ricos em matéria orgânica. As técnicas as quais têm como detector o ICP-MS permitem estudos de formação de artefatos que pode ocorrer durante a extração do analito, utilizando diluição isotópica (Jagtap & Maher, 2015; Carrasco & Vassileva 2015; Avramescu *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009; Rahman & Kingston, 2004; Lambertsson *et al.*, 2001). A diluição isotópica faz uso de um balanço de massa ou razão isotópica para atribuir a potencial metilação proveniente da formação de artefato. A formação de artefato durante o procedimento de extração foi evidenciada e/ou estudada por diversos autores (Nevado *et al.*, 2011; Avramescu *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2007; Leermakers *et al.*, 2005; Hintelmann, 1999). Nesse item serão apresentados alguns trabalhos que mostraram em que proporções e em quais procedimentos esse fato pode ocorrer.

Carrasco & Vassileva (2015) avaliaram a formação de artefato por HPLC-ICP-MS com adição de isótopos estáveis de $^{202}\text{Hg}^{2+}$ e $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}^+$ ao material de referência IAEA-405 (sedimento estuarino). A dopagem foi realizada de forma independente: uma

porção de IAEA foi dopada com $^{202}\text{Hg}^{2+}$ e outra porção foi dopada com $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}$. Após 1 hora de repouso, a amostra passou pelo procedimento de extração com $\text{HNO}_3/\text{CuSO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e por fim, realizaram-se as análises. Carrasco & Vassileva (2015) sugeriram que não houve formação de artefato, visto que não se observou diferença significativa entre a soma em unidade de área de $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}^+$ na amostra IAEA sem adição do padrão mais o padrão de $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}^+$ em relação ao sinal da amostra IAEA com spike de $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}^+$. Da mesma forma a amostra IAEA dopada com padrão $^{202}\text{Hg}^{2+}$ foi avaliada em relação a formação de $\text{CH}_3^{202}\text{Hg}^+$. O sinal em unidade de área de $\text{CH}_3^{202}\text{Hg}^+$ na amostra IAEA com spike de $^{202}\text{Hg}^{2+}$ não foi mais elevado que na amostra sem o spike de $^{202}\text{Hg}^{2+}$, confirmando que durante o procedimento de extração não houve produção de CH_3Hg^+ . Os autores ainda, avaliaram a produção de CH_3Hg^+ através de uma equação para calcular o excesso de $\text{CH}_3^{201}\text{Hg}^+$ e $\text{CH}_3^{202}\text{Hg}^+$, levando-se em conta as medidas obtidas por esses analitos e suas respectivas abundâncias. Não foram obtidos excessos, apoiando a hipótese de que não foi gerado CH_3Hg^+ durante o procedimento de preparo de amostra aplicado no estudo desenvolvido (Carrasco & Vassileva, 2015).

Pietilä *et al.* (2015) estudaram a potencial metilação de Hg inorgânico durante o procedimento de destilação de amostras de solo de turfa utilizando um marcador de isótopos enriquecidos de Hg^{2+} e análise em CG-ICP-MS. Duas amostras de solos com concentrações conhecidas de CH_3Hg^+ e HgT foram dopadas com solução de $^{201}\text{Hg}^{2+}$ e colocadas em repouso. Em seguida, realizou-se o procedimento de destilação semelhante ao de Horvat *et al.* (1993), fazendo-se uso dos reagentes $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KCl}$. A etapa de etilação foi necessária preliminarmente à cromatografia. A metilação foi avaliada através do monitoramento dos dados dos isótopos de ^{201}Hg e ^{202}Hg e a razão $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ foi obtida para o pico de CH_3Hg^+ . As proporções de $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ em ambas as amostras corresponderam à proporção natural de isótopos de Hg, indicando que não ocorreu formação significativa de CH_3Hg^+ durante a destilação. Os autores concluem que a destilação pode ser considerada como um método de isolamento confiável para determinação de CH_3Hg^+ em amostras de solo de turfa contendo mais que 1% de HgT como CH_3Hg^+ (Pietilä *et al.*, 2015). Porém, ao se avaliar o material de referência ERM-580 (sedimento de estuário), os autores encontraram concentração ($117 \pm 9 \mu\text{g kg}^{-1}$) mais elevada que o valor certificado ($75 \pm 4 \mu\text{g kg}^{-1}$), mostrando que a formação artificial de CH_3Hg^+ pode ocorrer no procedimento de destilação. Pietilä *et al.* (2015)

realizaram outros experimentos adicionando solução de Hg^{2+} em amostras de solo de turfa para atingir concentrações mais elevadas de HgT. Os resultados obtidos levaram a conclusão que a destilação é propensa a produção acidental de CH_3Hg^+ , mas a magnitude do erro positivo é dependente da concentração de Hg^{2+} presente na amostra.

A formação de artefato foi avaliada por Bowles & Apte (2000) dopando 4 amostras naturais de sedimento e 2 materiais de referências (IAEA-356 e CRM-580) com solução de um sal de Hg^{2+} . Os autores observaram uma pequena taxa de metilação de Hg^{2+} para CH_3Hg^+ em uma amostra de sedimento natural rico em matéria orgânica (0,05%) e nos 2 materiais de referência (0,0007 – 0,006%). Embora o método utilizado por Bowles & Apte (2000) não esteja completamente isento de metilação artificial, a extensão da eventual produção de CH_3Hg^+ é muito baixa. Vale lembrar que os reagentes utilizados na extração foram KCl, H_2SO_4 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

Bloom *et al.* (1997) mostraram que a formação de CH_3Hg^+ em amostras de água deionizada não ocorre, indicando que a formação desse artefato não é devida a destilação ou reagentes adicionados, mas sim à matéria orgânica e a concentração de Hg^{2+} natural da amostra. A metilação de Hg^{2+} em sedimento variou de 0,005 a 0,1%, com as maiores conversões em sedimento de turfa. Nas amostras de água, a produção de artefato não foi significativa, pois a concentração de Hg na água é baixa. Os autores observaram que todos os seis métodos de extração utilizados resultaram na produção de CH_3Hg^+ , sendo o procedimento utilizando $\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ gerando artefato em menor grau. Bloom *et al.* (1997) alegaram que este método possui vantagem sobre a técnica de destilação quanto à baixa formação de artefatos, embora o limite de detecção e recuperações tenham sido semelhantes. O inconveniente do método escolhido por Bloom *et al.* (1997) é a geração de resíduo tóxico (CH_2Cl_2). O procedimento de destilação se apresentou simples, preciso e resultou em limite de detecção muito baixo, porém com potencial formação de artefatos positivos de CH_3Hg^+ . Segundo os autores, o artefato é proveniente da ação da matéria orgânica natural sobre o Hg inorgânico presente na amostra. Os autores recomendam que a escolha do método para extração de CH_3Hg^+ deve ser cuidadosamente adaptada ao tipo de amostra e atender os expectativas do trabalho em particular.

1.4.2.3 Técnicas analíticas utilizadas para quantificação de CH₃Hg⁺

Uma variedade de métodos analíticos para quantificação de Hg inorgânico e espécies organomercuriais (em especial CH₃Hg⁺) em diferentes matrizes têm sido estudados (Souza *et al.*, 2013; Fernández-Martínez & Rucandio, 2013; Jagtap *et al.*, 2011; Maggi *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2007; Bisinoti *et al.*, 2006; Bravo-Sánchez *et al.*, 2004; Ramalhosa *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2000; Bowles & Apte, 2000). Técnicas acopladas de separação (cromatografia gasosa ou líquida) com um detector seletivo de Hg, tais como espectroscopia atômica (absorção e fluorescência) ou espectrometria de massas (ICP-MS) são comumente utilizadas. A cromatografia gasosa tem sido mais utilizada que a cromatografia líquida por ser em geral menos sofisticada e também apresentar uma boa resolução e fácil acoplamento com variados detectores (Beceiro-González *et al.*, 2009).

As técnicas mais comuns para determinação de espécies de Hg nas mais diversas matrizes, com ênfase em CH₃Hg⁺ são: cromatografia gasosa acoplada ao sistema de pirólise com detecção em espectrometria de fluorescência atômica (CG-pyro-AFS) (Carrasco & Vassileva, 2015; Beldowski *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2012; Baldi *et al.*, 2012; Nevado *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2010; Carrasco *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2004; Trombini *et al.*, 2003; e Cai *et al.*, 2000); cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (CG-ICP-MS) (Pietilä *et al.*, 2015, Beck *et al.*, 2014, Nevado *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2008; Armstrong *et al.*, 1999; e Hintelmann *et al.*, 1997); cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) (Nevado *et al.*, 2011; e Cai *et al.*, 2000); cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) (Jagtap *et al.*, 2011; e Santos *et al.*, 2009); e cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons (CG-ECD) (Marrugo-Negrete *et al.*, 2015; Pinedo-Hernández *et al.*, 2015, Tomiyasu *et al.*, 2012; e Trombini *et al.*, 2003). Outras técnicas são citadas por Gao *et al.* (2012) e Quevauviller *et al.* (2000). A CG-pyro-AFS e HPLC-ICP-MS são as técnicas que têm sido mais utilizadas, a grande vantagem da primeira em relação à segunda é principalmente o custo da análise.

Vale ressaltar que o grande desafio da análise das espécies de Hg é a baixa concentração das mesmas encontradas no ambiente. Por isso, várias técnicas têm sido desenvolvidas para melhor atender a faixa de concentração geralmente encontrada no

ambiente. A Tabela 1.3 apresenta a concentração de CH_3Hg^+ que pode ser encontrada em alguns compartimentos ambientais, amostras biológicas e em alimentos.

Tabela 1.3: Concentrações de CH_3Hg^+ presentes em amostras ambientais, alimentos e biológicas.

Matriz	Concentração de CH_3Hg^+
Água	<0,04 – 0,32 ng L ⁻¹ (Eckley <i>et al.</i> , 2015) 0,06 – 0,23 µg kg ⁻¹ (Haris <i>et al.</i> , 2017) 3,06 – 34,1 µg kg ⁻¹ (Jansenn <i>et al.</i> , 2015)
Sedimento	8 – 68 µg kg ⁻¹ (Marrugo-Negrete <i>et al.</i> , 2015) 4,1 – 43,4 µg kg ⁻¹ (Pinedo-Hernandez <i>et al.</i> , 2015) 1 – 40 µg kg ⁻¹ (Spada <i>et al.</i> , 2012)
Solo	0,8 – 18 µg kg ⁻¹ (Pietilä <i>et al.</i> , 2015)
Peixes	190 – 1040 µg kg ⁻¹ (Spada <i>et al.</i> , 2012)
Moluscos	37 – 1321 µg kg ⁻¹ (Spada <i>et al.</i> , 2012)
Arroz	0,11 – 6,45 µg kg ⁻¹ (Brombach <i>et al.</i> , 2017)
Cabelo	1,87 – 10,6 µg g ⁻¹ (Li <i>et al.</i> , 2011)

Nevado *et al.* (2011) realizaram um estudo comparando técnicas cromatográficas hífenadas para determinação de espécies de Hg. As vantagens e desvantagens de três técnicas hífenadas foram avaliadas para especificação de Hg em diversos tipos de matrizes utilizando CG-MS, CG-ICP-MS e CG-pyro-AFS. Esses três sistemas, mais comumente usados atualmente para especificação de Hg, foram avaliados em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Os limites de detecção e quantificação encontrados para determinação de CH_3Hg^+ foram 2 e 6 pg para CG-pyro-AFS, 1 e 4 pg para CG-MS e 0,05 e 0,21 pg para CG-ICP-MS, sendo, portanto, o último com o melhor limite de detecção. Todas as técnicas utilizadas foram suficientemente sensíveis para especificação de Hg em amostras ambientais, com CG-MS e CG-ICP-MS capazes de fornecer análises dos isótopos, e CG-pyro-AFS sendo uma alternativa mais rentável devido à maior simplicidade do detector. O teste de robustez mostrou que as técnicas avaliadas são robustas, sendo possível colocá-las em aplicação de forma rotineira (Nevado *et al.*, 2011). A CG-ICP-MS e CG-pyro-AFS têm um elevado grau de especificidade do elemento, são relativamente livres de interferências e possuem baixos limites de detecção e quantificação, com uma satisfatória faixa linear.

Jagtap *et al.* (2011) compararam as técnicas HPLC-ICP-MS e HPLC-HGAAS para determinação de CH_3Hg^+ em amostras de peixes. Não foram encontradas diferenças significativas entre as técnicas utilizadas por estes autores.

Ramalhosa *et al.* (2001), desenvolveram uma metodologia para determinação de CH_3Hg^+ e Hg inorgânico através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de fluorescência atômica vapor frio (HPLC-CV-AFS). A eficiência da metodologia por eles proposta foi confirmada pela análise de um material certificado de referência de sedimento (CRM 580).

Os trabalhos que utilizaram a técnica CG-ECD para determinação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimento foram: Pinedo-Hernández *et al.* (2015), Marrugo-Negrete *et al.* (2015), Spada *et al.* (2012) e Caricchia *et al.* (1997). O procedimento adotado por todos esses autores faz uso de KOH 25% em metanol, H_2SO_4 , CuSO_4 , KBr, tolueno e cisteína.

Todas as técnicas apresentadas se mostraram úteis para a quantificação de CH_3Hg^+ . Entretanto, as técnicas que possuem MS ou ICP-MS como detectores, apresentam custo de análise mais elevado. Nesse sentido, por se tratar de uma análise menos dispendiosa, a CG-pyro-AFS tem grande vantagem sobre CG-MS, CG-ICP-MS e HPLC-ICP-MS. Além disso, a CG-pyro-AFS possui alta seletividade e limite de detecção inferior à técnica CG-ECD (Tabela 1.4), sendo, portanto, mais atrativa.

Tabela 1.4: Principais técnicas hífenadas para quantificação de CH_3Hg^+ com suas principais vantagens e limite de detecção (LD).

Técnicas analíticas	Principais vantagens	LD da técnica
CG-ECD	Não há necessidade da etapa de derivatização; Alta sensibilidade	14,8 pg (Canário <i>et al.</i> , 2004) 10,0 pg (Liu <i>et al.</i> , 2003)
CG-pyro-AFS	Alta sensibilidade e seletividade; Baixo LD; Baixo Custo; Simplicidade de operação	0,45 pg (Carrasco & Vassileva 2014) 2 – 6 pg (Nevado <i>et al.</i> , 2011) 0,042 – 0,25 pg (Taylor <i>et al.</i> , 2011) 0,25 pg (Armstrong <i>et al.</i> , 1999)
CG-MS	Instrumentação comercialmente disponível Baixo LD; Simplicidade de operação Diluição isotópica	1 – 4 pg (Nevado <i>et al.</i> , 2011) 0,02 pg (Mishra <i>et al.</i> , 2005)
CG-ICP-MS	Baixo LD; Diluição isotópica Avaliação de artefatos Alta sensibilidade Análise simultânea de outros elementos	0,05 – 0,21 pg (Nevado <i>et al.</i> , 2011) 0,030 – 0,060 pg (Taylor <i>et al.</i> , 2011) 0,9 pg (Armstrong <i>et al.</i> , 1999)
HPLC-ICP-MS	Diluição isotópica Avaliação de artefatos Alta sensibilidade e seletividade Análise simultânea de outros elementos Análise direta de compostos não-voláteis	18 pg (Falter, 1999b) 12 pg (Wilken & Falter, 1998)

Fernández-Martínez & Rucandio (2013) estudaram um procedimento de extração para isolar e quantificar a fração orgânica de Hg em amostras de solo, utilizando como técnica analítica o analisador direto de Hg (DMA – 80). O procedimento proposto pelos autores foi baseado em uma única etapa de extração, a qual se utilizou solução de CuBr_2 0,3 mol L^{-1} em HCl 5% v v^{-1} , 10 mL de CH_2Cl_2 , N-acetyl-L-Cisteína (NAC) 1% m v^{-1} e HNO_3 5% v v^{-1} . O procedimento foi otimizado (tipo de agitação, tempo de extração, concentração de CuBr_2 e tempo de evaporação) e validado com material certificado de referência CRM-580 de sedimento estuarino. O limite de detecção determinado para o método foi de 9,6 ng Hg orgânico por g de solo. Teste de adição e recuperação foi estudado com amostras reais obtendo-se 90 a 105% de recuperação. Para o material CRM 580 foram obtidas recuperações acima de 92% da fração orgânica.

Maggi *et al.* (2009) relataram que determinaram CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos marinhos e organismos por analisador direto de Hg (DMA – 80). O

desempenho do método proposto foi avaliado com análises de materiais certificados de referência, tais como, CRM-580, IAEA-405, DORM-2, DOLT-3, SRM-2976 e SRM-2977, exatidão, repetibilidade e limite de quantificação. Os reagentes utilizados foram: HCl 6 mol L⁻¹, tolueno e L-cisteína 1% m v⁻¹. Uma alíquota da solução de L-cisteína, contendo o CH₃Hg⁺ removido do tolueno, foi imediatamente analisada no DMA-80. Recuperação acima de 80% foi obtida para todos os materiais certificados de referência utilizados, exceto para o DOLT-3, o qual se obteve recuperação de 74%. O limite de detecção foi de 0,4 ng de CH₃Hg⁺ que corresponde a 1,5 ng g⁻¹ e o limite de quantificação foi de 0,6 ng de CH₃Hg⁺ que correspondia 2,5 ng g⁻¹. Para análises de amostras reais coletadas na Antártica, a concentração de HgT variou de <LQ a 22,5 ng g⁻¹ e a concentração de CH₃Hg⁺ foi abaixo do LQ para todas as amostras. Segundo os autores, a metodologia aplicada é simples, rápida, reprodutível e resultados precisos foram obtidos para os materiais certificados de referência.

Vale destacar que, nos estudos citados acima, os autores quantificam o Hg orgânico em amostras sedimento e solo utilizando um analisador direto de Hg. Entretanto, esses métodos não substituem a análise cromatográfica para quantificação de CH₃Hg⁺.

1.3.2.4 Estudo de casos

Nesse item serão citados alguns artigos que compararam procedimentos de extração e as técnicas utilizadas para quantificação de CH₃Hg⁺, dando ênfase a amostras de sedimento.

Carrasco & Vassileva (2015) determinaram CH₃Hg⁺ em amostras de sedimentos marinho e realizaram a validação do método de acordo com a ISO 17025 e *Eurachem Guidelines*. Os autores apresentaram um procedimento analítico de baixo custo, que se baseou na etilação, seguido de purga e trapeamento e utilização da técnica CG-pyro-AFS (Carrasco & Vassileva, 2015). Foram comparados 4 procedimentos de extração de CH₃Hg⁺: (1) extração assistida por radiação micro-ondas (MAE) com 0,5% v v⁻¹ de 2-mercaptoetanol e 5% v v⁻¹ de metanol; (2) lixiviação ácida com HNO₃/CuSO₄ extração com CH₂Cl₂ e re-extração em água por evaporação; (3) digestão alcalina com 25% m m⁻¹ KOH em metanol, extração com CH₂Cl₂ e re-extração em água por evaporação; e (4) lixiviação ácida com HNO₃/CuSO₄, extração com CH₂Cl₂ e re-extração em Na₂S₂O₃.

O procedimento de extração utilizando o MAE apresentou a menor recuperação $20 \pm 18\%$ que de acordo com os autores foi devido à presença do grupo tiol que dificultou a reação de etilação. Além disso, outros dois inconvenientes foram observados: o sinal do branco não era negligenciável e um forte efeito de memória foi detectado (Carrasco & Vassileva, 2015). Por outro lado, o procedimento de extração que obteve a maior recuperação (94,3%) foi baseado na lixiviação ácida $\text{HNO}_3/\text{CuSO}_4$ extração com CH_2Cl_2 e re-extração em $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Os autores concluíram que a grande vantagem desse procedimento é realizar a extração de um número maior de amostras em curto período de tempo (95 minutos), pelo fato de se eliminar a etapa de evaporação (destilação).

Beldowski *et al.* (2014) determinaram HgT, Hg orgânico e CH_3Hg^+ em amostras de sedimento do *Southern Baltic*. A extração de Hg orgânico foi realizada colocando o sedimento em contato com clorofórmio e re-extraída com solução aquosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Uma alíquota da fase aquosa foi colocada em contato com HNO_3 65%, HCl 33% e solução de KBrO_3 $0,0033 \text{ mol L}^{-1}$ e KBr $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ para oxidar todas as espécies de mercúrio para Hg^{2+} . A solução resultante foi analisada por espectrometria de fluorescência atômica. Vale destacar que a extração com CHCl_3 tinha o objetivo de extrair não apenas os organomercuriais e sim toda a fração de Hg ligado a complexos orgânicos, o qual se definiu como Hg orgânico. O CH_3Hg^+ foi complexado e extraído da amostra como CH_3HgBr , pesando-se cerca de 300 mg de sedimento úmido e adicionando-se solução de HBr $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e CuSO_4 1 mol L^{-1} . O CH_3Hg^+ foi extraído com diclorometano e posteriormente evaporado em presença de água. Em seguida, foi realizada a etilação e a análise em CG-pyro-AFS. A determinação de HgT foi realizada utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica por queima direta do sedimento em um tubo de combustão/catalisador decompondo a amostra sob ambiente rico em oxigênio e removendo os elementos interferentes (Beldowski *et al.*, 2014). Os materiais certificados de referência NIST 2584 para HgT e CRM-580 para Hg_{org} e CH_3Hg^+ foram utilizados nos estudos de recuperação e precisão. Os autores afirmaram que houve uma dependência linear entre CH_3Hg^+ e Hg_{org} nos sedimentos analisados indicando ser possível estimar a concentração de CH_3Hg^+ usando a concentração de Hg_{org} (Beldowski *et al.*, 2014).

Jagtap *et al.* (2011) apresentaram um procedimento de extração para determinar CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de peixes e sedimentos por HPLC-ICP-MS. Inicialmente

foi realizada uma comparação entre os extratantes: cisteína, tiourea e 2-mercaptoetanol. A melhor recuperação para as espécies de Hg foi obtida com o 2-mercaptoetanol como agente extrator. Posteriormente, alguns parâmetros para o uso deste reagente foram estudados com material certificado de referência CRM-580 (sedimento estuarino): massa da amostra, concentração em % v v⁻¹ de 2-mercaptoetanol, tempo e temperatura de extração. Após a otimização, amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de PTFE, com 2-mercaptoetanol 0,5 % v v⁻¹ e a extração foi realizada em micro-ondas a 120 °C por 15 minutos. Uma recuperação de (92 ± 3)% de CH₃Hg⁺ foi observada para o material CRM-580 ao realizar o procedimento proposto.

Horvat *et al.* (1993) realizaram três tipos de extração de CH₃Hg⁺ em amostras de sedimentos: destilação direta, digestão alcalina e lixiviação com HCl. A destilação direta foi realizada adicionando-se KCl 20% e H₂SO₄ 8 mol L⁻¹ em temperatura de 145 °C. Para a digestão alcalina, adicionou-se solução de KOH 25% em metanol e com o frasco fechado iniciou-se a digestão em temperatura de 90°C por 6 h. Em seguida, amostra digerida foi submetida a duas novas etapas: etilação direta (sem destilação) e a destilação (como mencionado acima). A lixiviação com HCl procedeu da mesma forma que a digestão alcalina, porém com variações nas concentrações do ácido utilizado (2, 4, 6 e 8 mol L⁻¹). A determinação de CH₃Hg⁺ foi realizado em CG-CVAF (Horvat *et al.*, 1993). Os resultados obtidos pela digestão alcalina foram concordantes com os resultados obtidos pela destilação direta. Isso é uma indicação que a digestão alcalina é eficiente na extração de CH₃Hg⁺ da amostra de sedimento. No entanto, quando uma alíquota do extrato obtido pela digestão alcalina foi etilada diretamente, observou-se uma interferência da matriz, tornado-se necessário a realização da destilação após essa digestão. Recuperações acima de 90% foram obtidas utilizando a destilação direta, sem a utilização de digestão alcalina ou lixiviação ácida (Horvat *et al.*, 1993). Segundo Horvat *et al.* (1993), a principal vantagem da destilação direta é ausência de interferências matriciais, principalmente quando as amostras apresentam baixas concentrações de CH₃Hg⁺. Os autores obtiveram resultados mais precisos e menor limite de detecção com o último método mencionado.

Diante dos procedimentos apresentados, recomenda-se o uso da destilação, mesmo que possa ocorrer uma metilação artificial, para evitar a utilização de solventes orgânicos. Os trabalhos recentemente publicados: Mendes *et al.* (2016), Pietilä *et al.* (2015), Janssen *et al.* (2015), Oh *et al.* (2010); fizeram uso do método de destilação

proposto por Horvat *et al.* (1993), obtendo resultados de boa qualidade. Diversos métodos de extração e técnicas analíticas para quantificar espécies de Hg em sedimentos e solos podem ser vistos em Jagtap & Maher (2015). Os trabalhos mencionados são de desenvolvimento de métodos, validação e estudos ambientais. A Tabela 1.5 apresenta de forma resumida os reagentes e técnicas que foram citadas ao longo do texto.

Tabela 1.5: Resumo dos principais reagentes e técnicas utilizados para quantificação de CH_3Hg^+ .

Autores	Tipo de amostra	Reagentes	Técnica analítica
Carrasco & Vassileva (2015)	Sedimento marinho	$\text{HNO}_3/\text{CuSO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Extração de volta em $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	CG-pyro-AFS
Beldowski <i>et al.</i> (2014)	Sedimento marinho	$\text{HBr}/\text{CuSO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Evaporação do solvente em presença de água	CG-pyro-AFS
Brooks Rand Labs (2013)	Sedimento e solo	$\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Evaporação do solvente em presença de água	CG-pyro-AFS
Jagtap <i>et al.</i> (2011)	Peixe e sedimento	2-mercaptoetanol Extração realizada em micro-ondas	HPLC-ICP-MS
Liang <i>et al.</i> (2004)	Sedimento e solo	$\text{CuSO}_4/\text{HNO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ Evaporação do solvente em presença de água	CG-CVAFS
Bowles & Apte (2000)	Sedimento	$\text{KCl}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	CG-AFS
Caricchia <i>et al.</i> (1997)	Sedimento	KOH em metanol, banho ultrassônico $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4/\text{KBr}$, tolueno e cisteína.	CG-ECD
Horvat <i>et al.</i> (1993)	Sedimento	$\text{KCl}/\text{H}_2\text{SO}_4/$ Destilação	CG-CVAF

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERG, B.; EKMAN, L.; FALK, R.; GREITZ, U.; PERSSON, G.; SNIHS, J. O. 1969. Metabolism of methyl mercury (203Hg) compounds in man. *Arch Environ Health*, v. 19, p. 478 – 84.
- ACHÁ, D.; HINTELMANN, H.; YEE, J. 2011. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere*, v. 82, p. 911 – 916.
- AKAGI, H.; & NISHIMURA, H. 1991. In: “*Advances in Mercury toxicology*”: Suzuki, T.; Nobumasa, I.; Clarkson, T. W. eds: Plenum Press: New York.
- AKIELASZEK, J. J. & HAINES, T. A. 1981. Mercury in the muscle tissue of fish from three Northern Maine Lakes. *Bull. Environm. Contam.*, v. 27, p. 201 – 208.

- ANDRADE, R. P.; MICHEL, R. F. M.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SIMAS, F. N. B.; WINDMÖLLER, C. C. 2012. Hg distribution and speciation in Antarctic soils of the Fildes and Ardley peninsulas, King George Island. *Antarctic Science*, v. 24, p. 395 – 407.
- ARMSTRONG, H. E. L.; CORNS, W. T.; STOCKWELL, P.B.; O'CONNOR, G.; EBDON, L.; EVANS, E. H. 1999. Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 390, p. 245 – 253.
- ASCHNER, M. & CLARKSON, T. W. 1988. Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. *Brain Res.* v. 462, p. 31 – 39.
- ASCHNER, M.; DU, Y. L.; GANNON, M.; KIMELBERG, H. K. 1993. Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.*, v. 602, p. 181 – 186.
- ASCHNER, M.; & SYVERSEN, T. 2005. Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Ther. Drug Monit.*, v. 27, p. 278–283.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. Toxicological profile for mercury. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 639 p.
- AVRAMESCU, M. L.; ZHU, J.; YUMVIHOZE, E.; HINTELMANN, H.; FORTIN, D.; LEAN, D. R. S. 2010. Simplified sample preparation procedure for measuring isotope-enriched methylmercury by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, p. 1256 – 1262.
- AZEVEDO, F. A. 2003. *Toxicologia do mercúrio*. RiMa Editora e InterTox, São Paulo, 292 p.
- BAKIR, F.; DAMLUJI, S. F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N. Y.; TIKRITI, S.; DHAHIR, H. I.; CLARKSON, T. W.; SMITH, J. C.; DOHERTY, R. A. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, v. 181, p. 230 – 241.
- BALDI, F.; GALLO, M.; MARCHETTO, D.; FANI, R.; MAIDA, I.; HORVAT, M.; FAJON, V.; ZIZEK, S.; HINES, M. 2012. Seasonal mercury transformations and surficial sediment detoxification by bacteria of Marano and Grado lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 113, p. 105 – 115.
- BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, 355 – 384.
- BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; GUIMARAES, A.; ALPENDURADA, M. F. 2009. Optimisation of a headspace-solid-phase micro-extraction method for simultaneous determination of organometallic compounds of Mercury, lead and tin in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 5563 – 5569.
- BECK, B. F.; & JOHNSON, N. W. 2014. Geochemical factors influencing the production and transport of methylmercury in St. Louis River Estuary sediment. *Applied Geochemistry*, v. 51, p. 44 – 54.

- BELDOWSKI, J.; MIOTK, M.; BELDOWSKA, M.; PEMPKOWIAK, J. 2014. Total, methyl and organic Mercury in sediments of the Southern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 87, 388 – 395.
- BISINOTI, M. C. & JARDIM, W. F. 2004. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Química Nova*, v. 27, Nº 4, p. 593 – 600.
- BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F.; BRITO JÚNIOR, J. L.; MALM, O.; GUIMARÃES, J. R. 2006. Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio. *Química Nova*, v. 29, p. 1169 – 1174.
- BLOOM, N. S. 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 49, p. 1010 – 1017.
- BLOOM, N. S.; COLMAN, J. A.; BARBER, L. 1997. Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative technique for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 358, p. 371 – 377.
- BOOTH, G. E.; KINRADE, E. F.; HIDALGO, A. 2000. Glia maintain follower neuron survival during Drosophila CNS development. *Development*, v. 127, p. 237 – 244.
- BOWLES, K. & APTE, S. C. 2000. Determination of methylmercury in sediments by steam distillation/aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 419, p. 145 – 151.
- BRAVO-SÁNCHEZ, L. R.; ENCINAR, J. R.; MARTÍNEZ, J. I. F.; SANZ-MEDEL, A. 2004. Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction – gas chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 59, p. 59 – 66.
- BROMBACH, C. C.; MANORUT, P.; KOLAMBAGE-DONA, P. P. P.; EZZELDIN, M. F.; CHEN, B.; CORNS, W. T.; FELDMANN, J.; KRUPP, E. M. 2017. Methylmercury varies more than one order of magnitude in commercial European rice. *Food Chemistry*, v. 214, p. 360 – 365.
- BROOKS RAND LABS. 2013. Application Note: Extraction of methylmercury from sediments and soils.
- CAI, Y.; MONSALUD, S.; FURTON, K. G. 2000. Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, v. 52, p. 82 – 86.
- CANÁRIO, J.; VALE, C.; CAETANO, M.; MADUREIRA, M. J. 2003. Mercury in contaminated sediments and pore waters enriched in sulphate (Tagus Estuary, Portugal). *Environmental Pollution*, v. 126, p. 425 – 433.
- CANÁRIO, J.; Antunes, p.; Lavrado, J.; Vale, C. 2004 Simple method for monomethylmercury determination in estuarine sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, p. 10 – 11.

- CAPPON, C. J. & SMITH, J. C. 1977. Gas-Chromatographic Determination of Inorganic Mercury and Organomercurials in Biological Materials. *Analytical Chemistry*, v. 49, p. 365 – 369.
- CARICCHIA, A. M.; MINERVINI, G.; SOLDATI, P.; CHIAVARINI, S.; UBALDI, C.; MORABITO, R. 1997. GC-ECD Determination of Methylmercury in Sediment Samples Using a SPB-608 Capillary Column after Alkaline Digestion. *Microchemical Journal*, v. 55, p. 44 – 55.
- CARRASCO, L.; DÍEZ, S.; BAYONA, J. M. 2009. Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8828 – 9934.
- CARRASCO, L.; BARATA, C.; GARCÍA-BERTHO, E.; TOBIAS, A.; BAYONA, J. M.; DÍEZ, S. 2011. Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). *Chemosphere*, v. 84, p. 1642–1649.
- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2014. Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, v. 122, p. 106 – 114.
- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2015. Determination of methylmercury in marine sediment samples: Method validation and occurrence data. *Analytica Chimica Acta*, v. 853, p. 167 – 178.
- CASTOLDI, A. F.; JOHANSSON, C.; ONISHCHENKO, N. COCCINI, T.; RODA, E.; VAHTER, M.; CECCATELLI, S.; MANZO, L. 2008. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 51, p. 201 – 214.
- CERRATI, G.; BERNHARD, M.; WEBER, J. H. 1992. Model reactions for abiotic mercury(II) methylation: kinetics of methylation of mercury(II) by mono-, di-, and tri-methylation in seawater. *Appl. Organomet. Chem.*, v. 6, p. 587 – 595.
- CHARLESTON, J. S.; BODY, R. L.; BOLENDER, R. P.; MOTTET, N. K.; VAHTER, M. E.; BURBACHER, T. M. 1996. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. *Neurotoxicology*, v. 17, p. 127–138.
- CHOI, B. H.; LAPHAM, L. W.; AMIN-ZAKI, L.; SALEEM, T. 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 37, p. 719 – 733.
- CHOI, B. H. 1986. Methylmercury poisoning of the developing nervous system: I. Pattern of neuronal migration in the cerebral cortex. *Neurotoxicology*, v. 7, p. 591 – 600.
- CLARKSON, T. W. 1992. Mercury: Major issues in environmental health. *Environmental Health Perspectives*, v. 100, p. 31 – 38.
- CLARKSON, T. W. 1998. Human toxicology of mercury, *J. Trace Elements Exp. Med.*, v. 11, p. 303–317.

- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. 2003. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.*, v. 349, p. 1731–1737.
- COMPEAU, G. & BARTHA, R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 50, p. 498 – 502.
- DEACON, G. B. 1978. Volatilisation of methyl-mercuric chloride by hydrogen sulphide. *Nature*, v. 275, p. 344.
- DELGADO, A.; PRIETO, A.; ZULOAGA, O.; DIEGO, A.; MADARIAGA, J. M. 2007. Production on artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments: use of ionic exchange in the sample treatment step to minimize the problem. *Analytica Chimica Acta*, v. 582, p. 109 – 115.
- DROTT, A.; LAMBERTSSON, L., BJÖRN, E.; SKYLLBERG, U. 2008. Potencial demethylation rate determinations in relation to concentrations of MeHg, Hg and pore water speciation of MeHg in contaminated sediments. *Marine Chemistry*, v. 112, p. 93 – 101.
- ECKLEY, C. S.; LUXTON, T. P.; MCKERAN, J. L.; GOETZ, J.; GOULET, J. 2015. Influence of reservoir water level fluctuations on sediment methylmercury concentrations downstream of the historical Black Butte mercury mine, OR. *Applied Geochemistry*, v. 61, p. 284 – 293.
- ENGLESON, G. & HERNER, T. 1952. Alkyl mercury poisoning. *Acta Paediatr.*, v. 41 p. 289 – 294.
- FALTER, R. 1999a. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: Part 2: Controlled laboratory experiments to elucidate the mechanism and critical discussion of the species specific isotope addition correction method. *Chemosphere*, v. 39, p. 1075 – 1091.
- FALTER, R. 1999b. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: Part 1: Localisation of the compounds effecting the abiotic mercury methylation. *Chemosphere*, v. 39, p. 1051 – 1073.
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. & RUCANDIO, I. 2013. A simplified method for determination of organic Mercury in soils. *Analytical Methods*, v. 5, p. 4131.
- FERRO, A. M.; MOTA, A. M.; CANÁRIO, J. 2014. Pathways and speciation of Mercury in the environmental compartments of Deception Island, Antarctica. *Chemosphere*, v. 95, p. 227 – 233.
- GAO, Y.; SHI, Z.; LONG, Z.; WU, P.; ZHENG, C.; HOU, X. 2012. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 103, p. 1 – 14.
- GRANDJEAN, P.; JORGENSEN, P. J.; WEIHE, P. 1994. Human milk as a source of methylmercury exposure in infants. *Environ. Health Perspect.* v. 102, p. 74 –
- GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P. J. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury, *Neurotoxicol. Teratol.*, v.19, p. 417 – 428.

- GREEN-RUIZ, C.; RUELAS-INZUNZA, J.; PÁEZ-OSUNA, F. 2005. Mercury in surface sediments and benthic organisms from Guaymas Bay, east coast of the Gulf of California. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 27, p. 321 – 329.
- HAMMERSCHMIDT, C. R. & FITZGERALD, W. F. 2004. Geochemical Controls on the Production and Distribution of Methylmercury in Near-Shore Marine Sediments. *Environ. Sci. Technol.* v. 38, p. 1487 – 1495.
- HARADA, M. 1978. Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology*, v. 18, p. 285 – 288.
- HARIS, H.; ARIS, A. Z.; MOKHTAR, M. B. 2017. Mercury and methylmercury distribution in the intertidal surface sediment of a heavily anthropogenically impacted saltwater-mangrove-sediment interplay zone. *Chemosphere*, v. 166, p. 323 – 333.
- HEMPEL, M.; Hintelmann, H.; WILKEN, R. D. 1992. Determination of organic mercury species in soils by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Analyst*, v. 117, p. 669 – 672.
- HINTELMANN, H.; FALTER, R.; ILGEN, G.; EVANS, R. D. 1997. Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH_3Hg^+) in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species isotope addition. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 358, p. 363 – 370.
- HINTELMANN, H. 1999. Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*, v. 7, p. 1093 – 1105.
- HORVAT, M.; BLOOM, N. S.; LIANG, L. 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 281, p. 135 – 152.
- HORVAT, M.; MANDIĆ, V.; LIANG, L.; BLOOM, N. S.; PADBERG, C. S.; LEE, Y. H.; HINTELMANN, H.; BENOIT, J. 1994. Certification of Methylmercury Compounds Concentration in Marine Sediment Reference Material, IAEA-356. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 8, p. 533 – 540.
- ISSARO, N.; ABI-GHANEM, C.; BERMOND, A. 2009. Fractionation studies of Mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for Mercury extraction. *Analytica Chimica Acta*, v. 631, p. 1 – 12.
- JAGTAP, R.; KRIKOWA, F.; MAHER, W.; FOSTER, S; ELLWOOD, M. 2011. Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICP-MS and HPLC-HGAAS. *Talanta*, v. 85, p. 49 – 55.
- JAGTAP, R. & MAHER, W. 2015. Measurement species in sediment and soils by HPLC-ICPMS. *Microchemical Journal*, v. 121, p. 65 – 98.
- JANSSEN, S. E.; JOHNSON, M. W.; BLUM, J. D.; BARKAY, T.; REINFELDER, J. R. 2015. Separation of monomethylmercury from estuarine sediments for mercury isotope analysis. *Chemical Geology*, v. 411, p. 19 – 25.
- JONSSON, S.; SKYLBERG, U.; NILSSON, M. B.; WESTLUND, P.; SHCHUKAREV, E. L.; BJÖRN, E. 2012. Mercury methylation rates for geochemically relevant $\text{Hg}(\text{II})$ species in sediments. *Environ. Sci. Technol.* v. 46, p. 11653 – 11659.

- KASPER, D.; FORSBERG, B. R.; ALMEIDA, R.; BASTOS, W. R.; MALM, O. 2015. Metodologias de coleta, preservação e armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio – uma revisão. *Química Nova*, v. 38 , p. 410 – 418.
- KERSHAW, T. G.; CLARKSON, T. W.; DHAHIR, P. H. 1980. The relationship between bloodlevels and dose of methylmercury in man, *Arch. Environ. Health*, v. 35, p. 28 – 36.
- KODAMATANI, H.; MAEDA, C.; BALOGH, S. J.; NOLLET, Y. H.; KANZAKI, R.; TOMIYASU, T. 2017. The influence of sample drying and storage conditions on methylmercury determination in soils and sediments. *Chemosphere*, v. 173, p. 380 – 386.
- LAMBERTSSON, L.; LUNDBERG, E.; NILSSON, M.; FRECH, W. 2001. Applications of enriched stable isotope tracers in combination with isotope dilution GC–ICP-MS to study mercury species transformation in sea sediments during in situ ethylation and determination. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 16, p. 1296–1301.
- LÁZARO, W. L.; GUIMARÃES, J. R. D.; IGNÁCIO, A. R. A.; SILVA, C. J.; DÍEZ, S. 2013. Cyanobacteria enhance methylmercury production: A hypothesis tested in the periphyton of two lakes in the Pantanal floodplain, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 456 – 457, p. 231 – 238.
- LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; QUEVAUVILLER, P.; HORVAT, M. 2005. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 383 – 393.
- LEHNHERR, I. 2014. Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Artic aquatic ecosystems. *Environmental Reviews*, v. 22, p. 229 – 243.
- LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. 2010. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 663, p.127 – 138.
- LI, P.; FENG, X.; SHANG, L.; QIU, G.; MENG, B.; ZHANG, H.; GUO, Y.; LIANG, P. 2011. Human co-exposure to mercury vapor and methylmercury in artisanal mercury mining areas, Guizhou, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 473 – 479.
- LIANG, L.; HORVAT, M.; FENG, X.; SHANG, L.; LI, H.; PANG, P. 2004. Re-evaluation of distillation and comparison with HNO₃ leaching/solvent extraction for isolation of methylmercury compounds from sediment/soils samples. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 18, p. 264 – 270.
- LINDQVIST, O.; JERNELOV, A.; HOHANSSON, K.; RODHE, H. 1984. *Mercury in the Swedish environment: Global and local sources*, National Swedish Protection Board, Solna, Sweden.
- LIU, R.; WANG, Q.; LU, X.; FANG, F.; WANG, Y. 2003. Distribution and speciation of mercury in the peat bog of Xiaoxing'an Moutain, northeastern China. *Environmental Pollution*, v. 124, p. 39 – 46.
- MAGGI, C.; BERDUCCI, M. T.; BIANCHI, J.; GIANI, M.; CAMPANELLA, L. 2009. Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, v. 641, p. 32 – 36.

- MARIN, B.; VALLADON, M.; POLVE, M.; MONACO, A. 1997. Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 342, p. 91 –112.
- MARRUGO-NEGRETE, J.; PINEDO-HERNÁNDEZ, J.; DÍEZ, S. 2015. Geochemistry of mercury in tropical swamps impacted by gold mining. *Chemosphere*, v. 134, p. 44 – 51.
- MAO, Y.; LIU, G.; MEICHEL, G.; CAI, Y.; JIANG, G. 2008. Simultaneous speciation of monomethylmercury and monoethylmercury by aqueous phenylation and purge-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection. *Anal. Chem*, v. 80, p. 7163–7168.
- MENDES, L. A.; LENA, J. C.; VALLE, C. M.; FLEMING, P. M.; WINDMÖLLER, C. C. 2016. Quantification of methylmercury and geochemistry of mercury in sediments from a contaminated area of Descoberto (MG), Brazil. *Applied Geochemistry*, v. 75, p. 32 – 43.
- MENG, W.; WEIYUE, F.; JUNWEN, S.; FANG, Z.; BING, W.; MOTAO, Z.; BAI, L.; YULIANG, Z.; ZHIFANG, C. 2007. Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC–ICP-MS. *Talanta* v. 71, p. 2034 – 2039.
- MEULEMAN, C.; LAIÑO, C. C.; LANSSENS, P.; BAEYENS, W. 1993. A study of the behavior of methylmercury compounds in aqueous solutions, and of gas/liquid distribution coefficients, using head space analysis, *Wat. Res.*, v. 27, p. 1431 – 1446.
- MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. 2000. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamentos e descarte. *Química Nova*, v. 23, p. 487 – 495.
- MISHRA, S.; TRIPATHI, R. M.; BHALKE, S.; SHUKLA, V. K.; PURANIK, V. D. 2005. Determination of methylmercury and mercury (II) in a marine ecosystem using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 551, p. 192 – 198.
- MUHAYA, B. B. M.; LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W. 1997. Influence of sediment preservation on total mercury and methylmercury analyses. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 107, p. 277 – 288.
- NEVADO, J. J. B.; MARTIN - DOIMEADIOS, R. C. R.; KRUPP, E. M.; BERNARDO, F. J. G.; FARIÑAS, N. R.; MORENO, M. J.; WALLACE, D.; ROPERO, M. J. P. 2011. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 4545 – 4551.
- NRC (National Research Council). 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, Tools and Applications. The National Academies Press, Washington, D.C.
- OH, S.; KIM, M. K.; YI, S. M; ZOH, K. D. 2010. Distributions of total mercury and methylmercury in surface sediments and fishes in Lake Shihwa, Korea. *Science of the Total Environment*, v. 408, 1059 – 1068.

- OSKARSSON, A.; SCHULTZ, A.; SKERFVING, S.; HALLEN, I. P.; OHLIN, B.; LAGERKVIST, B. J. 1996. Total and inorganic mercury in breast milk in relation to fish consumption and amalgam in lactating women, *Arch. Environ. Health*, v. 51, p. 234 – 241.
- PARKER, J. L. & BLOOM, N. S. 2005. Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation. *Science of the Total Environment*, v. 337, p. 253– 263.
- PIETILÄ, H.; PERÄMÄKI, P.; PIISPANEN, J.; STARR, M.; NIEMINEN, T.; KANTOLA, M.; UKONMAANAHO, L. 2015. Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods. *Chemosphere*, v. 124, p. 47 – 53.
- PINEDO-HERNÁNDEZ, J.; MARRUGO-NEGRETE, J.; DÍEZ, S. 2015. Speciation and bioavailability of Mercury in sediments impacted by gold mining in Colombia. *Chemosphere*, v. 119, p. 1289 – 1295.
- PUK, R. & WEBER, J. H. 1994. Critical Review of Analytical Methods for Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury Compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 8, p. 298 – 302.
- QUEVAUVILLER, P. 1999. Certification of methylmercury in sediment: from controversial facts to scientific evidence. *Chemosphere*, v. 39, p. 1153 – 1165.
- QUEVAUVILLER, P.; FILIPPELI, M.; HORVAT, M. 2000. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 19, p. 157 – 166.
- QIU, G.; FENG, X.; MENG, B.; SOMMAR, J.; GU, C. 2012. Environmental geochemistry of an active Hg mine in Xunyang, Shaanxi Province, China. *Applied Geochemistry*, v. 27, p. 2280 – 2288.
- RAHMAN, G.M.M. & KINGSTON, H. M. 2004. Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments. *Anal. Chem.* v. 76, 3548 – 3555.
- RAMALHOSA, E.; SEGADE, S. R.; PEREIRA, E.; VALE, C.; DUARTE, A. 2001. Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography–cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 448 p. 135 –143.
- RIVARO, P.; IANNI, C.; SOGGIA, F.; FRACHE, R. 2007. Mercury speciation in environmental samples by cold vapour atomic absorption spectrometry with in situ preconcentration on a gold trap. *Microchim Acta*, v. 158, p. 345 – 352.
- RODRIGUES, J. L.; SOUZA, S. S.; SOUZA, V. C. O.; BARBOSA Jr., F. 2010. Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. *Talanta*, v. 80, p. 1158 – 1163.
- SANTOS, A. A.; HORT, M. A.; CULBRETH, M.; LÓPEZ-GRANERO, C.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. 2016. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 38, p. 99 – 107.

- SANTOS, J. S.; GUARDIA, M.; PASTOR, A.; SANTOS, M. L. P. 2009. Determination of organic and inorganic Mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. *Talanta*, v. 80, p. 207 – 211.
- SELLERS, P. 1997. *Sediment flux and photodegradation of methylmercury in two boreal drainage lakes*. Department of Microbiology The University of Manitoba Wiunipeg, Manitoba. Thesis of Doctor.
- SHI, J.; LIANG, L.; JIANG, G.; JIN, X. 2005. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environment International*, v. 31, p. 357 – 365.
- SOUZA, S. S.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA JR., F. 2013. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography – cold –vapor – inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 761, p. 11 – 17.
- SPADA, L.; ANNICCHIARICO, C.; CARDELLICCHIO, N.; GIANDOMENICO, S.; LEO, A. D. 2012. Mercury and methylmercury concentrations in Mediterranean seafood and surface sediments, intake evaluation and risk for consumers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 215, p. 418 – 426.
- SYVERSEN, T. & KAUR, P. 2012. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 26, p. 215 – 226
- TAYLOR, V. F.; CARTER, A.; DAVIES, C.; JACKSON, B. P. 2011. Trace-Level Automated Mercury Speciation Analysis. *Anal Methods*. v. 3, p. 1143 – 1148.
- TSENG, C. M.; DIEGO, A.; PINALY, H.; AMOUROUX, D.; DONARD, F. X. 1998. Cryofocusing coupled to atomic absorption spectrometry for rapid and simple mercury speciation in environmental matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 13, p. 755 – 764.
- TOMIYASU, T.; NAGANO, A.; YONEHARA, N.; SAKAMOTO, H.; OKI, R. K.; AKAGI, H. 2000. Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediment. *The Science of the Total Environment*, v. 257, p. 121 – 132.
- TOMIYASU, T.; MATSUYAMA, A.; IMURA, R.; KODAMATANI, H.; MIYAMOTO, J.; KONO, Y.; KOCMAN, D.; KOTNIK, J.; FAJON, V.; HORVAT, M. 2012. The distribution of total and methylmercury concentrations in soils near the Idrija mercury mine, Slovenia, and the dependence of the mercury concentrations on the chemical composition and organic carbon levels of the soil. *Environ Earth Sci*, v. 65, p. 1309 – 1322.
- TROMBINI, C.; FABBRI, D.; LOMBARDO, M.; VASSURA, I.; ZAVOLI, E.; HORVAT, M. 2003. Mercury and methylmercury contamination in surficial sediments and clams of a coastal lagoon (Pialassa Baiona, Ravenna, Italy). *Continental Shelf Research*, v. 23, p. 1821 – 1831.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 2013. Global Mercury Assessment: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. *UNEP Chemicals Branch*, Geneva, Switzerland.
- VAHTER, M.; AKESSON, A.; LIND, B.; BJORS, U.; SCHUTZ, A.; BERGLUND, M. 2000. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and

- urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ. Res.*, v. 84, p. 186 – 194.
- VALLE, C. M.; SANTANA, G. P.; AUGUSTI, R.; EGREJA FILHO, F. B.; WINDMÖLLER, C. C. 2005. Speciation and quantification of Mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). *Chemosphere*, v. 58, p. 779 – 792.
- VIRTANEN, J. K., RISSANAN, T. H.; VOUTILAINEN, S.; TUOMAINEN, T. P. 2007. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Nutr. Biochem.*, v.18, p. 75 – 85
- WEBER, J. H. 1993. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere*, v. 26, p. 2063 – 2077.
- WELLS, E. M.; HERBSTMAN, J. B.; LIN, Y. H.; HIBBELN, J. R.; HALDEN, R. U.; WITTER, F. R.; GOLDMAN, L. R. 2017. Methyl mercury, but not inorganic mercury, associated with higher blood pressure during pregnancy. *Environmental Research*, v. 154, p. 247 – 252.
- WHO (World Health Organization). 1989. *Environmental health criteria for mercury – Environmental aspects*. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc086.htm>. Acesso 30/04/2015.
- WILKEN, R. D. & FALTER, R. 1998. Determination of Methylmercury by the Species-specific Isotope Addition Method Using a Newly Developed HPLC-ICP MS Coupling Technique with Ultrasonic Nebulization. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 12, p. 551 – 557.
- YAN, H.; FENG, X.; SHANG, L.; QIU, G.; DAI, Q.; WANG, S.; HOU, Y. 2008. The variations of mercury in sediment profiles from a historically mercury-contaminated reservoir, Guizhou province, China. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 497 – 506.
- YIN, Z.; JIANG, H.; SYVERSEN, T.; ROCHA, J. B.; FARINA, M.; ASCHNER, M. 2008. The methylmercuryl-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem*, v. 107, p. 1083–90.
- ZAREBA, G.; CERNICHIARI, E.; HOJO, R.; NITT, S. M.; WEIS, B.; MUMTAZ, M. M.; JONES, D. E.; CLARKSON, T. W. 2007. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury, *J. Appl. Toxicol.*, v. 27, p. 511 – 518.
- ZHONG, H. & WANG, W. X. 2008. Effects of sediment composition on inorganic mercury partitioning, speciation and bioavailability in oxic surficial sediments. *Environmental Pollution*, v. 151, p. 222 – 230.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH_3Hg^+ EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A otimização é utilizada para melhorar o desempenho do método, como diminuir o tempo de execução da análise, reduzir o consumo de reagentes, melhorar o rendimento de um produto, etc. (Bruns *et al.*, 2010). Diante disso, foi realizada a otimização de alguns parâmetros para quantificação de CH_3Hg^+ por CG-pyro-AFS.

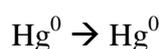
2.1 ETAPAS DO SISTEMA CG-pyro-AFS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH_3Hg^+

Como mencionado acima, a quantificação de CH_3Hg^+ realizada nesse trabalho foi conduzida em um sistema CG-pyro-AFS, também conhecido como MERX (Brooks Rand Labs, USA). O modelo utilizado é manual e possui etapas de extração de CH_3Hg^+ da amostra, derivatização, purga e trapeamento em Tenax®, dessorção, separação das espécies em CG, decomposição térmica em coluna pirolítica no final da coluna cromatográfica e detecção por AFS. As funções de cada etapa do sistema CG-pyro-AFS estão descritas mais detalhadamente abaixo.

2.1.1 Derivatização ou Derivação

Quando o analito não é volátil e termicamente estável a CG se torna inviável para análise (Collins *et al.*, 2006). Geralmente isso ocorre no caso de substâncias com alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, fazendo-se necessário uma etapa de derivatização ou derivação. Essa etapa consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para análise em CG utilizando reagentes alquilantes (Collins *et al.*, 2006), como compostos de Grignard (que proporcionam diferentes grupos alquilas para formar espécies alquiladas) (Cai *et*

al., 2000), tetraetilborato de sódio (NaBEt₄), tetrapropilborato de sódio (NaBPr₄) e tetrafenilborato de sódio (NaBPh₄). Neste trabalho a etapa de derivatização foi imprescindível, visto que a espécie de interesse, CH₃Hg⁺, se trata de um composto iônico e não volátil. Por ser mais usual, o reagente derivatizante NaBEt₄ foi escolhido para esse fim. Em amostras com mistura de espécies de Hg, a derivatização com esse reagente gera os compostos descritos abaixo:



Observa-se que o Hg elementar presente na amostra permanece como Hg⁰, ou seja, não reage com NaBEt₄. O Hg²⁺, assim como o CH₃CH₂Hg⁺, produz o mesmo composto, CH₃CH₂HgCH₂CH₃. Essas duas últimas não podem ser diferenciadas na análise, a não ser que se usem outros derivatizantes como citado no texto acima.

2.1.2 Módulo Purga e Trapeamento

As etapas de purga e trapeamento permitem que as espécies de Hg derivatizadas em fase aquosa sejam removidas por purga de nitrogênio (N₂) e fixadas em um trap de Tenax®. O trap de Tenax® é um material polimérico, composto por óxido de 2,6-difenileno, que tem como função adsorver as espécies voláteis de Hg produzidas na etapa de derivatização. Após o trapeamento é feita uma secagem do trap em fluxo de N₂ e este é encaminhado para o módulo de dessorção. As Figuras 2.1a e 2.1b mostram uma fotografia dos frascos reacionais da etapa de derivatização e um desenho esquemático dessa etapa e o trapeamento (frasco reacional e trapeamento), respectivamente.

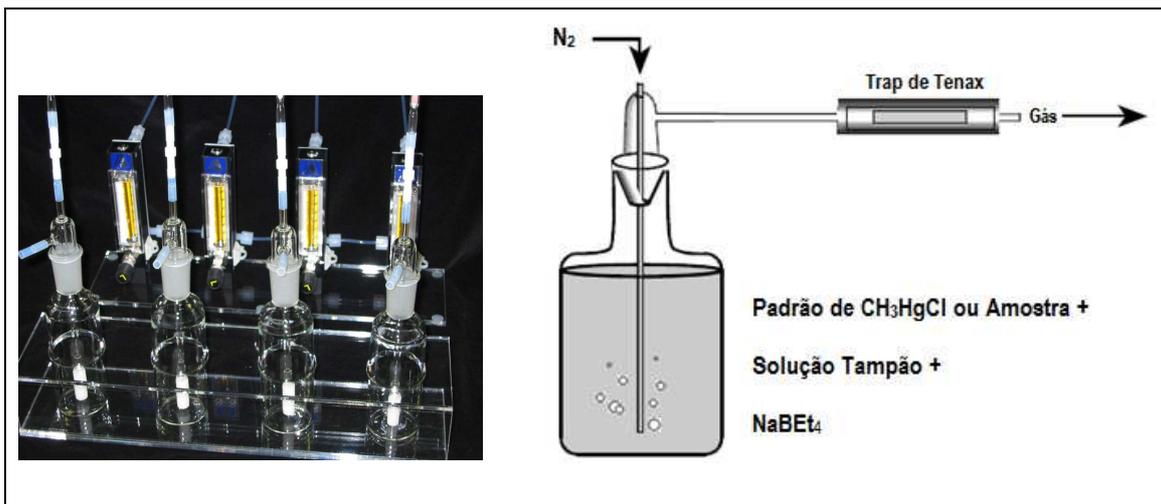


Figura 2.1a: Frascos reacionais da etapa de derivatização.

Figura 2.1b: Desenho esquemático das etapas de derivatização e trapeamento (EPA 1630, 2001).

2.1.3 Módulo de Dessorção

O módulo de dessorção (TDM – II, MERX) controla o aquecimento e resfriamento do trap de Tenax® e o fluxo de gás argônio (Ar). A vazão do gás é controlada por uma válvula de medição de alta precisão. Com o aquecimento da bobina, o Tenax® dessorve as espécies de Hg, que em seguida, são arrastadas pelo fluxo contínuo de Ar para o sistema de cromatografia gasosa (CG). A voltagem da bobina foi ajustada para 10,6 V de acordo com o manual do fabricante. A Figura 2.2 apresenta o módulo de dessorção.

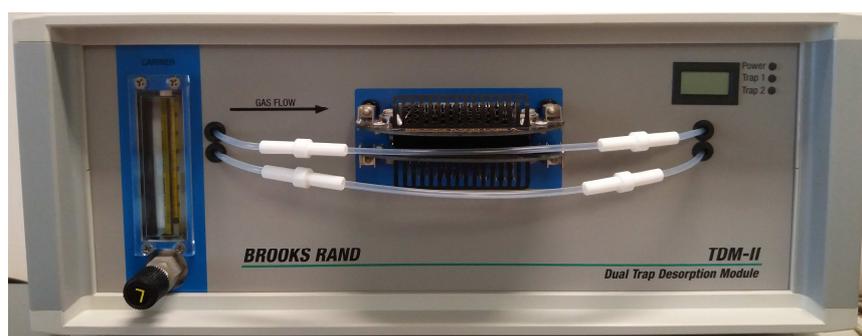


Figura 2.2: Módulo de dessorção (TDM – II, MERX).

2.1.4 Módulo CG-Pyro

O módulo de CG e pirólise incluem os componentes do sistema que permitem a separação das espécies de mercúrio devido à diferença de tempo de retenção (coluna cromatográfica), e posterior decomposição térmica imediatamente antes da sua detecção por espectrometria de fluorescência atômica gerador de vapor frio (CVAFS). A decomposição térmica ocorre numa coluna pirolítica aquecida a uma temperatura de 750 °C, nessa etapa ocorre à decomposição e redução das espécies de mercúrio a Hg elementar (Hg⁰). A Figura 2.3 apresenta o módulo da cromatografia gasosa e coluna pirolítica.



Figura 2.3: Módulo da CG e coluna pirolítica.

2.1.5 Cromatografia Gasosa (CG)

No caso do sistema CG-pyro-AFS, a temperatura é mantida constante durante toda análise (isotérmica). Para avaliar o desempenho da coluna cromatográfica é necessário o cálculo do fator de resolução (R_s) e verificar o menor tempo de retenção do analito de interesse sem comprometer a qualidade dos dados obtidos. O R_s (Eq. 1) é um parâmetro de extrema importância, visto que com ele obtêm-se informações sobre a resolução e separação dos picos.

$$R_s = \frac{2(dr_2 - dr_1)}{(wb_2 + wb_1)} \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

dr_1 dr_2 são os tempos de retenção de cada componente;

wb1 e wb2 são as medidas das larguras das bases.

O fator de resolução é utilizado para medida da separação de dois componentes consecutivos. Esse fator depende da distância que separa os pontos máximos dos picos e da medida das larguras de suas respectivas bases (wb). Os valores de $R_s > 1,5$ fornecem uma separação completa entre os picos dos componentes. Porém, com $R_s = 1,0$ os picos são razoavelmente separados, enquanto valores de resolução inferiores a 1,0 não se observa a separação (Skoog *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2006). Assim, quanto maior o valor de resolução, melhor a separação.

2.1.6 Detector Espectrômetro de Fluorescência Atômica (AFS)

Após a decomposição térmica, Hg^0 é detectado por um espectrômetro de fluorescência atômica de vapor frio (*Model III*) e os sinais gerados são tratados pelo *software Mercury Guru®*. A AFS é um processo de emissão óptica, no qual o átomo é excitado pela absorção de um feixe de radiação eletromagnética. Em seguida, a espécie excitada relaxa para o estado fundamental fornecendo seu excesso de energia como fótons. Os átomos gasosos florescem quando são expostos à radiação que tem um comprimento de onda específica das linhas de absorção do próprio átomo.

A sensibilidade do detector é ajustada através do tubo fotomultiplicador. A Figura 2.4 mostra uma fotografia do módulo de detecção e a Figura 2.5 apresenta um desenho esquemático completo do sistema CG-pyro-AFS do MERX.

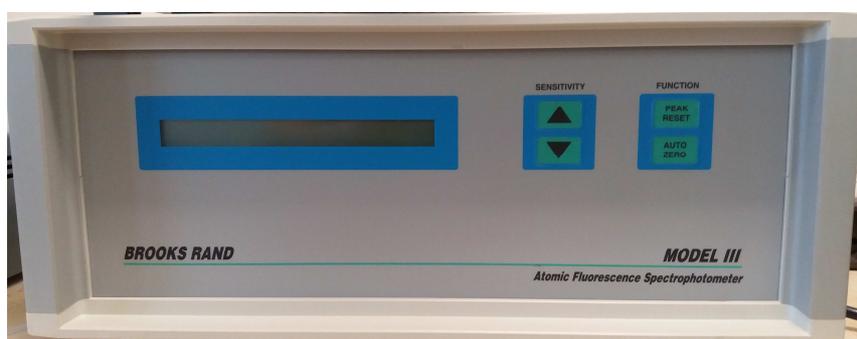


Figura 2.4: Módulo de detecção do sistema CG-pyro-AFS, Merx, Brooks Rand Labs.

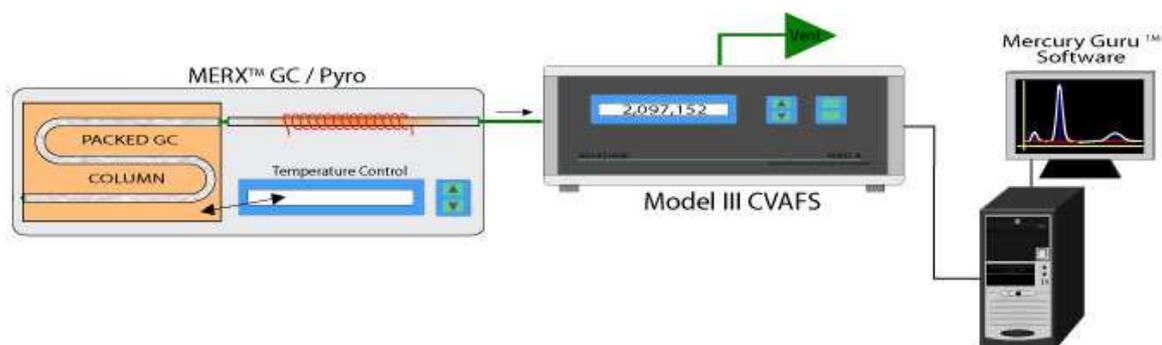


Figura 2.5: Sistema CG-pyro-AFS, Merx, Brooks Rand Labs
 (<http://www.brooksrandinc.com/products/automated-mercury-systems/merx-methyl-hg-system-for-epa-1630>).

2.2 OBJETIVO

Otimizar e validar uma metodologia para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos utilizando a cromatografia gasosa acoplada à detecção por fluorescência atômica (sistema CG-pyro-AFS).

2.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar parâmetros da cromatografia gasosa;
- ✓ Otimizar parâmetros da etapa de derivatização e trapeamento;
- ✓ Validar um método para quantificação de CH_3Hg^+ em sedimentos através da técnica CG-pyro-AFS.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

Como mencionado no Capítulo 1, o CH_3Hg^+ é uma espécie altamente tóxica e, por isso, esse trabalho foi realizado com toda precaução que o experimento exige. A execução da parte experimental foi realizada com o uso de EPIs e com o máximo de atenção possível, para que não houvesse acidente. A segurança pessoal nesse trabalho é fundamental quando se manipula esse tipo de substância, visto que os efeitos causados por ele pode ser fatal.

A Figura 2.6 apresenta o fluxograma das etapas realizadas para otimização e validação do método.

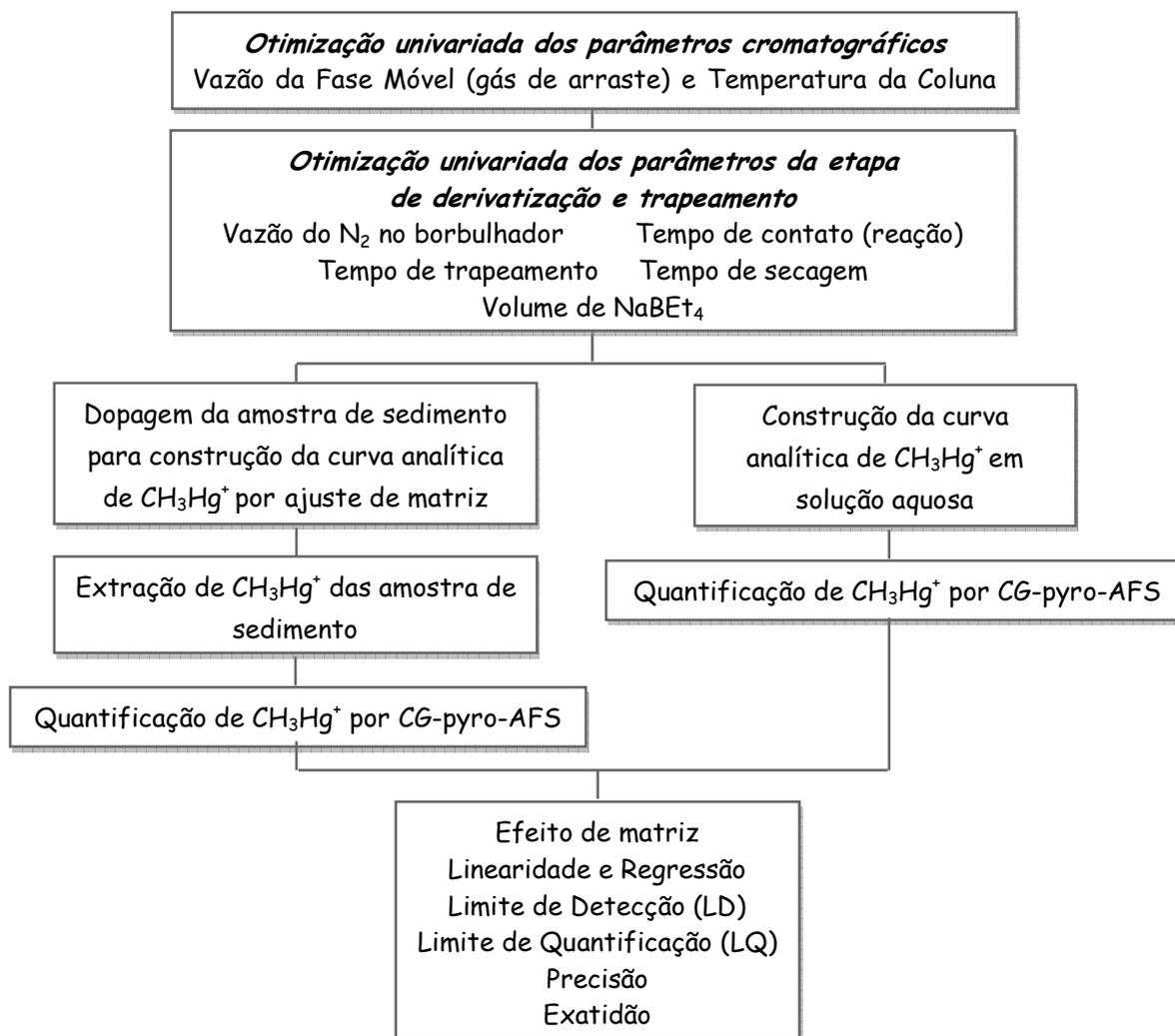


Figura 2.6: Fluxograma da parte experimental.

2.3.1 Materiais, reagentes e soluções

Os recipientes, vidrarias e materiais para armazenagem e manipulações de amostras e soluções foram devidamente descontaminados em banho de ácido nítrico 10% v v⁻¹ por 24 horas e, em seguida, lavados com água ultrapura. Os reagentes utilizados foram de grau analítico e para o seu preparo utilizou-se água ultrapura (sistema milli-Q -Millipore – Bedford, MA, EUA) com resistividade 18,2 MΩ cm.

Os reagentes, soluções e gases utilizados na parte experimental desse trabalho foram: solução padrão de CH₃HgCl 1000 µg L⁻¹ acidificada com 0,5% v v⁻¹ de CH₃COOH e 0,2% v v⁻¹ HCl (Brooks Rand Labs Instruments, USA); solução tampão de acetato de sódio e ácido acético (2 mol L⁻¹ – Brooks Rand Labs Instruments, USA); kit com ampola de NaBEt₄ e KOH (Brooks Rand Labs Instruments, USA); tetraetilborato

de sódio (NaBEt_4 , 97% – Sigma Aldrich); HCl (ACS ISO, Reag. Ph Eur., 37% v v⁻¹); CH_3COOH (grau HPLC, 99,7% – J.T.Baker, USA); H_2SO_4 (ISO, 95 – 97% v v⁻¹ – Merck, Alemanha); KCl (P.A., 99,5% – Merck, Alemanha); gás Nitrogênio (grau de alta pureza; 99,997 – Oxichama, Contagem, Brasil); gás Argônio (> 99,9992 – Air Products, São Paulo, Brasil).

O sal de tetraetilborato de sódio da Sigma Aldrich foi utilizado para o preparo da solução de NaBEt_4 . Misturou-se 2 mL de solução 1,33 mol L⁻¹ NaBEt_4 em Tetraidrofurano (THF) com 38 mL de solução 2% de KOH . O preparo dessa solução exige cuidados como a utilização de uma câmara de gás inerte.

2.3.2 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento desse trabalho foram: Sistema de destilação (*Brooks Rand Labs*), liofilizador, balanças analítica e semi-analítica.

2.3.3 Instrumentação

Sistema CG-pyro-AFS, MERX (*Brooks Rand Labs*, USA), modelo manual: utilizado na quantificação de CH_3Hg^+ nas amostras de sedimento.

2.3.4 Otimização do sistema cromatográfico e das etapas de derivatização e trapeamento

Preliminarmente à validação do método, alguns parâmetros do sistema cromatográfico e das etapas de derivatização e trapeamento foram otimizados a fim de se obter um melhor sinal analítico de CH_3Hg^+ . A Tabela 2.1 apresenta os parâmetros que foram otimizados com as condições que foram testadas. Todas as condições dos parâmetros otimizados foram escolhidos em função dos dados encontrados na literatura, o qual se avaliou níveis inferiores e superiores aos descritos nos artigos e no método EPA 1630 (2001). No caso da vazão do N_2 no borbulhador, avaliou-se a escala do rotâmetro em uma unidade de 5 em 5, da vazão mínima até a vazão máxima.

Tabela 2.1: Parâmetros do sistema cromatográfico e das etapas de derivatização e trapeamento otimizados e as respectivas condições testadas.

Parâmetros	Condições testadas
Vazão de argônio (fase móvel da CG) (mL min ⁻¹)	10,0; 14,0; 16,0; 17,0; 19,0; 25,0 e 31,0
Temperatura CG (°C)	30,0; 33,0; 35,0; 36,0; 38,0 e 40,0
Vazão de N ₂ no borbulhador do trapeamento (mL min ⁻¹)	68; 91; 127; 160; 203; 247; 297; 344 e 394
Tempo de reação entre CH ₃ Hg ⁺ e NaBEt ₄ (min)	0; 2; 5; 8; 11; 14; 17; 20; 23 e 26
Tempo de trapeamento (min)	5; 10; 15; 20; 25 e 30
Tempo de secagem do trap (min)	0; 3; 6; 9 e 12
Volume de NaBEt ₄ (μL)	25; 50; 75; 100 e 125

O nível de 400 pg de CH₃Hg⁺ e o tempo da análise na CG-pyro-AFS de 12 min foram fixados durante toda a otimização. Na Tabela 2.2 estão dispostos os parâmetros que permaneceram constantes, como por exemplo, o comprimento da coluna cromatográfica, o qual existe apenas uma coluna comercial de 31,75 centímetros, empacotada com OV-3 (Brooks Rand Labs, USA), composta por fenilmetilsiloxano.

Tabela 2.2: Parâmetros do sistema CG-pyro-AFS que permaneceram constante durante a otimização.

Parâmetros	
Voltagem da bobina para termodessorção das espécies de Hg	10,6 V
Sensibilidade (tubo fotomultiplicador - PMT)	600,0 V
Temperatura da coluna pirolítica	750° C
Preenchimento da coluna cromatográfica	OV-3
Comprimento da coluna cromatográfica	31,75 cm
Diâmetro interno na coluna cromatográfica	2,1 mm

Inicialmente, o procedimento de derivatização e trapeamento para otimização dos parâmetros cromatográficos foi realizada da forma descrita abaixo. Transferiu-se para o frasco de reação 50,0 mL de água ultrapura, 300 μL de solução tampão de CH₃COONa/CH₃COOH para ajustar o pH em torno de 4,9 e 50 μL da solução de CH₃HgCl 8,0 μg L⁻¹, correspondendo à massa de 400 pg de CH₃Hg⁺. Em seguida, adicionou-se 50 μL da solução de NaBEt₄, gerando a seguinte reação:



(Puk & Weber, 1994)

Após a adição do NaBEt₄, aguardou-se 5 min para o contato dos reagentes (tempo de reação), e posteriormente iniciou-se o processo de purga com N₂ por 20 min. Ao término do borbulhamento da solução e trapeamento das espécies voláteis de Hg em Tenax®, secaram-se os traps por 5,5 min para eliminar a umidade dos mesmos. Por fim, os traps foram encaminhados para análise em CG-pyro-AFS. Vale ressaltar que essas não foram as condições otimizadas para as etapas de derivatização e trapeamento, pois primeiramente foram otimizados os parâmetros cromatográficos.

Todos os parâmetros mencionados na Tabela 2.1 seguiram o procedimento de derivatização e trapeamento descrito acima, porém a variável otimizada era utilizada para otimização do parâmetro seguinte, sucessivamente até o último.

2.3.5 Extração de CH₃Hg⁺ da amostra de sedimento

Antes de iniciar a validação, três métodos de extração de CH₃Hg⁺ para sedimento foram testados. Foram avaliados o procedimento sugerido pelo fabricante do Merx (Brooks Rand Labs, Application Note, 2013), e os descritos por Carrasco & Vassileva (2015) e por Horvat *et al.* (1993). O procedimento sugerido pelo fabricante se mostrou o mais problemático, pois houve projeção da amostra na etapa de extração. Além de realizar algumas modificações para evitar perdas da amostra ao longo da extração, não foi obtido repetibilidade dos resultados. Baixas recuperações (55 - 70%) e baixa repetibilidade também foram obtidas para o procedimento proposto por Carrasco & Vassileva (2015). O procedimento de extração utilizado nesse trabalho está descrito em Horvat *et al.* (1993), com algumas alterações, o qual mostrou os melhores resultados. Vale ressaltar que os dois primeiros métodos citados fazem uso de solvente orgânico, enquanto o método utilizado nesse trabalho não o faz, sendo essa uma vantagem adicional.

A amostra de sedimento utilizada na validação do método foi coletada em uma área contaminada por Hg proveniente de exploração de ouro em Descoberto-MG, Brasil. A amostragem e o preparo da amostra estão descritas no Capítulo 3. A amostra foi escolhida intencionalmente com baixa concentração de HgT de forma a garantir

também baixa concentração de CH_3Hg^+ . Dessa forma, uma baixa concentração CH_3Hg^+ presente na amostra não influenciaria na dopagem com essa mesma espécie necessária para os testes de validação.

A amostra de sedimento liofilizada, dopada com CH_3Hg^+ , foi submetida a um sistema de destilação (Figura 2.7), utilizando o procedimento modificado de Horvat *et al.* (1993). Pesou-se exatamente cerca de $(0,5000 \pm 0,0001)$ g de amostra de sedimento em tubos de teflon, adicionou-se 30 mL de água ultrapura, 500 μL de H_2SO_4 8 mol L^{-1} e 200 μL de KCl 20% m v^{-1} . Os tubos de teflon para recolhimento do destilado continham 5,0 mL de água ultrapura e foram colocados em banho de gelo. A amostra foi destilada em temperatura de 125 °C sob fluxo de nitrogênio a 61 mL min^{-1} , até que 75% do volume do destilado fossem coletados.

Então, o destilado foi diluído para 50,00 mL, e em seguida, transferido para o frasco de reação do sistema de derivatização e trapeamento. Adicionou-se 300 μL de solução tampão de $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ e 50 μL de solução de NaBEt_4 . Aguardou-se 17 min para o contato dos reagentes (tempo de reação), em seguida, purgou-se com gás N_2 a 91 mL min^{-1} por 25 min. Os traps foram secos com gás N_2 por 6 min e analisados individualmente no sistema CG-pyro-AFS. A temperatura da CG foi mantida em 35 °C e a vazão do gás Ar (fase móvel) foi de 17 mL min^{-1} .

Vale ressaltar que o branco do procedimento analítico foi submetido ao mesmo procedimento que as amostras de sedimento, ou seja, realizando todo procedimento de extração sem a presença da matriz.

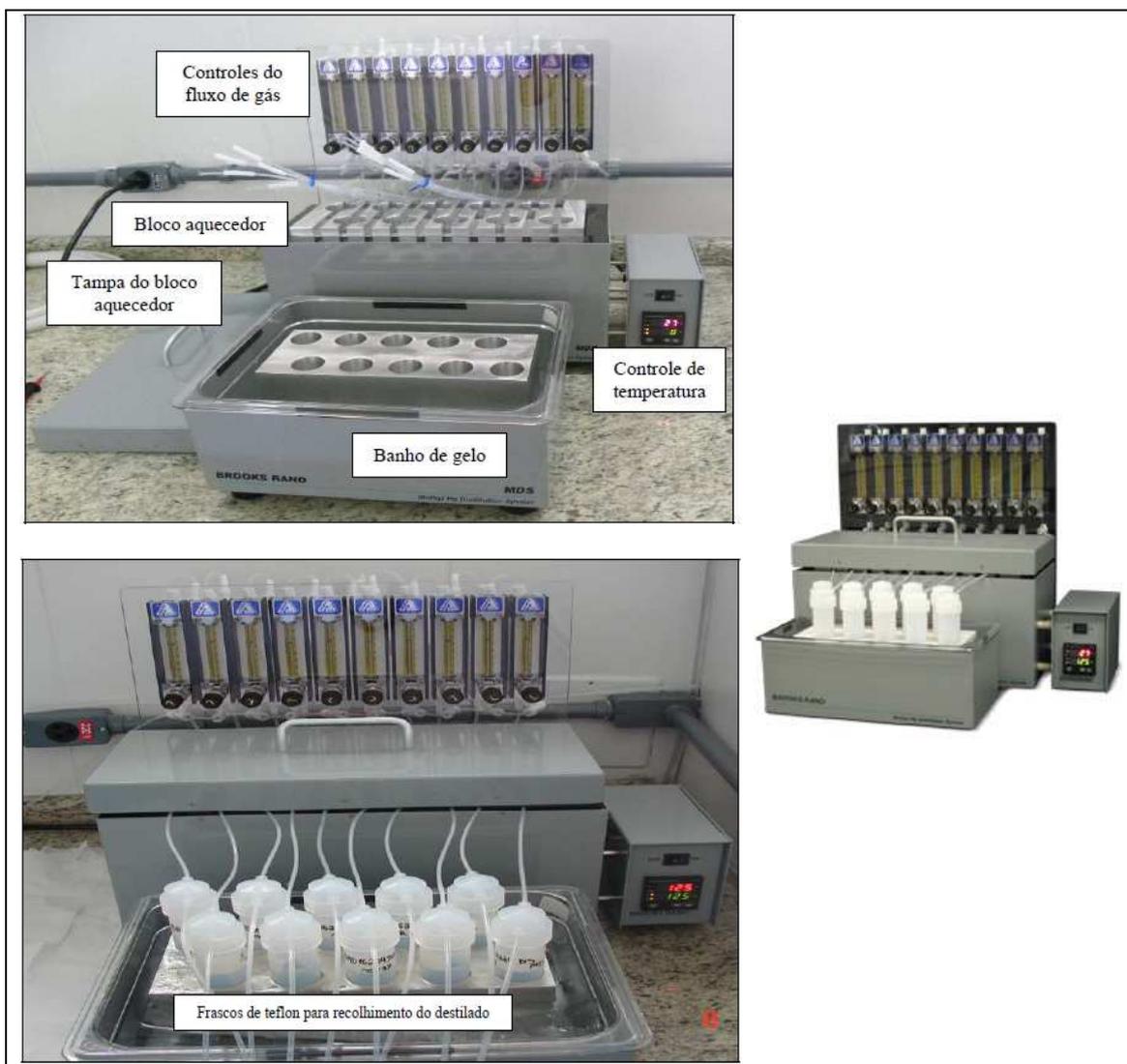


Figura 2.7: Sistema de destilação do Merx, *Brooks Rand Labs*.

2.3.6 Construção da curva analítica para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimento

As curvas analíticas foram construídas em triplicata em solução aquosa e utilizando o método por ajuste de matriz, dopando a amostra de sedimento. Elas foram preparadas a partir da solução padrão de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3HgCl acidificadas com $0,5\% \text{ v v}^{-1}$ de CH_3COOH e $0,2\% \text{ v v}^{-1}$ HCl . Um volume de $50,0 \mu\text{L}$ de soluções de CH_3HgCl de concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram adicionadas a 0,5000g de amostra de sedimento, correspondendo às massas de: 100; 200; 300; 400 e 500 pg de CH_3Hg^+ , respectivamente. Em seguida, foi realizada a extração do analito da matriz (item 2.3.5), a derivatização, o trapeamento e a análise na CG-pyro-AFS.

A curva em solução aquosa foi construída sem a presença da matriz, transferindo para o frasco de reação 50,0 mL de água ultrapura, 300 µL de solução tampão de CH₃COONa/CH₃COOH para ajustar o pH em torno de 4,9 e 50 µL da solução de CH₃HgCl de concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg L⁻¹, correspondendo às massas de: 100; 200; 300; 400 e 500 pg de CH₃Hg⁺, respectivamente. A diferença entre a construção da curva analítica em solução aquosa e pelo método de ajuste de matriz é a etapa de extração do analito, necessária apenas para a segunda curva.

O branco da curva em solução aquosa foi preparado com 0,5% v v⁻¹ de CH₃COOH e 0,2% v v⁻¹ HCl e, em seguida, foi derivatizado para posterior análise. Os brancos das curvas pelo método por ajuste de matriz foram preparados na presença da matriz sedimento, submetendo aos mesmos procedimentos de extração utilizados (item 2.3.5) sem adição de padrão de CH₃HgCl, em seguida, foram derivatizados para posterior análise.

2.3.7 Figuras de mérito da validação

O guia de validação utilizado para avaliar os parâmetros de mérito dos métodos foi o DOQ-CGCRE-008 INMETRO (2016). Os parâmetros de validação estudados foram: efeito de matriz, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Os tratamentos estatísticos dos dados foram realizados no programa Excel versão 2007, seguindo as orientações de Souza *et al.* (2007) e Souza (2007) na avaliação da linearidade da curva analítica. A análise de 8 replicatas independentes dos brancos do procedimento analítico foram utilizados para cálculo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (8 replicatas independentes analisadas no mesmo dia) e precisão intermediária (16 replicatas no total; conjuntos 8 replicatas independentes analisadas em dias diferentes) com massa de 250 pg de CH₃Hg⁺ em solução aquosa, cujo nível está localizado próximo ao ponto central da curva analítica. Foi calculado o desvio padrão relativo. O material de referência CRM-580 de sedimento de estuário, cuja concentração de CH₃Hg⁺ é (75 ± 4) µg kg⁻¹, e as amostras dopadas (*Spike*) com solução de CH₃HgCl foram utilizadas para avaliação da exatidão do método. O método de extração do CH₃Hg⁺ do material de

referência certificado está descrito no item 2.3.5, com pequena alteração na massa da amostra (0,1000 g) e realização de diluição.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Otimização do sistema cromatográfico

As variáveis relacionadas ao sistema cromatográfico, vazão da fase móvel e temperatura da CG, foram avaliadas em termos de fator de resolução (R_s) e tempo de retenção a fim de se obter um tempo menor de análise com boas resoluções nos sinais analíticos da espécie CH_3Hg^+ . O cálculo do R_s foi realizado a partir dos cromatogramas obtidos. A sequência de liberação das espécies no cromatógrafo é: Hg^0 , CH_3Hg^+ (representado por $\text{CH}_3\text{HgCH}_2\text{CH}_3$), e um terceiro sinal que a derivatização não diferencia entre Hg^{2+} e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ (representados por $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCH}_2\text{CH}_3$) (Figura 2.8), mas como a espécie mais abundante certamente é Hg^{2+} , considerou-se neste texto daqui pra frente somente como Hg^{2+} .

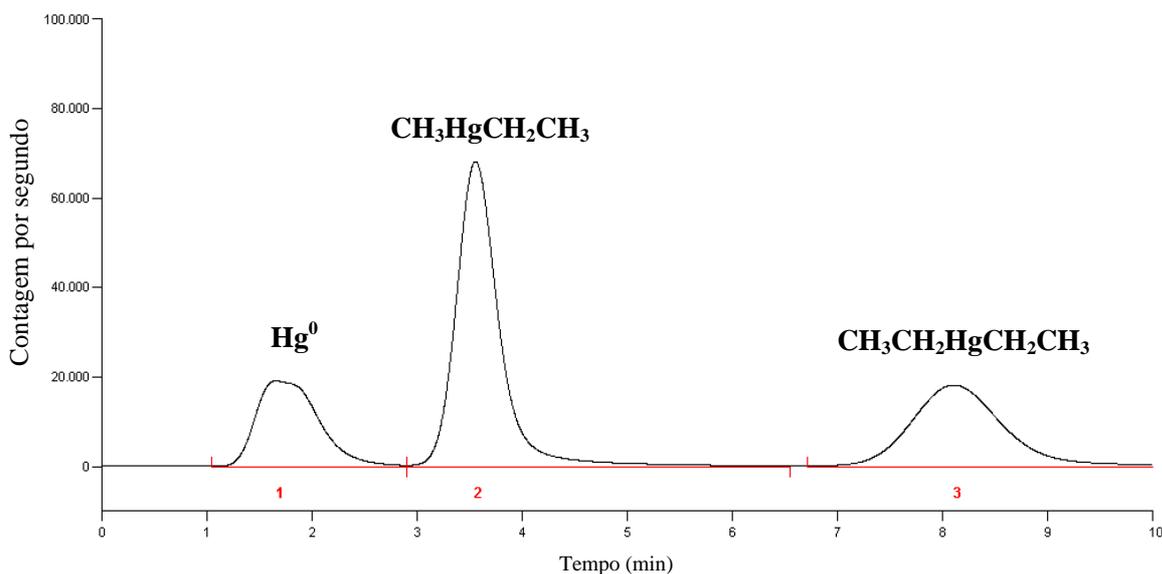


Figura 2.8: Sinais analíticos obtidos para as espécies Hg^0 , $\text{CH}_3\text{HgCH}_2\text{CH}_3$ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCH}_2\text{CH}_3$.

Como o objetivo foi a determinação quantitativa da espécie CH_3Hg^+ , buscou-se obter um bom fator de resolução (R_s) entre essa espécie e as duas adjacentes a ela. Os picos de Hg^0 e CH_3Hg^+ saem sempre mais próximos que os picos de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , ou

seja, os sinais desses últimos são sempre mais separados. Por essa razão, apenas o R_s dos componentes Hg^0/CH_3Hg^+ serão apresentados e discutidos. A Tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos para os testes de vazão da fase móvel e temperatura da CG.

Tabela 2.3: Fator de resolução e tempo de retenção obtidos para otimização da fase móvel e temperatura da CG.

Vazão da fase móvel		
Vazão (mL min ⁻¹)	R_s (Hg^0/CH_3Hg^+)	Tempo de retenção do CH_3Hg^+ (min)
10,0	2,62	4,74
14,0	2,12	3,77
16,0	2,24	3,56
17,0	2,64	3,43
19,0	2,14	3,16
25,0	1,54	2,64
31,0	1,26	2,25
Temperatura da CG		
Temperatura (°C)	R_s (Hg^0/CH_3Hg^+)	Tempo de retenção (min)
30,0	3,24	3,98
33,0	2,38	3,78
35,0	2,00	3,42
36,0	2,06	3,38
38,0	1,94	3,22
40,0	1,86	3,02

Observa-se que o valor de R_s é maior que 1,5 em todas as condições testadas da vazão da fase móvel (exceto para a vazão de 31,0 mL min⁻¹, $R_s = 1,26$) e da coluna cromatográfica, mostrando que há uma separação completa entre os picos de Hg^0 e CH_3Hg^+ . Os melhores valores de R_s são encontrados nas vazões de 10,0 e 17,0 mL min⁻¹ e nas temperaturas de 30,0 e 33,0 °C. No entanto, na vazão de 10 mL min⁻¹ não se obtém o pico completo de Hg^{2+} fixando o tempo total de análise em 10 min, visto que o tempo de retenção é de 4,74 min para CH_3Hg^+ , considerado longo. Observou-se também, uma instabilidade nessa vazão, visto que correspondia a vazão mínima do rotâmetro, cujo uso não é aconselhável.

Nas vazões 17,0 e 19,0 mL min⁻¹, o tempo total de análise pode ser reduzido para 10 min obtendo-se os três principais picos completos (Hg⁰, CH₃Hg⁺ e Hg²⁺). Optou-se utilizar a vazão de 17,0 mL min⁻¹, devido essa apresentar melhor resolução em relação à vazão de 19,0 mL min⁻¹ e uma redução do tempo total de análise e tempo de retenção do CH₃Hg⁺ comparado às vazões de 10,0; 14,0 e 16,0 mL min⁻¹.

Embora a vazão da fase móvel recomendada pelo método EPA 1630 (2001) seja de 30,0 mL min⁻¹, o melhor sinal se deu com menores vazões de gás argônio. A vazão sugerida pela EPA 1630 (2001) tem a vantagem da redução do tempo de análise para 7 min, porém não garante uma boa separação dos picos de Hg⁰ e CH₃Hg⁺, visto que Rs < 1,5 como observado na vazão de 31,0 mL min⁻¹ (Tabela 2.3). Carrasco & Vassileva (2015, 2014) utilizaram a vazão de 17,3 mL min⁻¹, que se assemelha com esse trabalho.

Quanto à temperatura da CG, ainda que nas temperaturas de 30,0 e 33,0 °C se tenha o maior valor de Rs em relação às demais temperaturas, nelas não foi possível obter o sinal completo de Hg²⁺ em 10 min de análise. Isso ocorre devido ao aumento do tempo de retenção quando a temperatura da CG é diminuída. Embora o sinal utilizado para análise seja apenas o de CH₃Hg⁺ considerou-se importante o registro da saída de todas as espécies de Hg como garantia da limpeza da coluna cromatográfica e ainda para se obter alguma informação qualitativa sobre a presença dessa espécie. Por esse motivo, essas temperaturas não foram escolhidas para dar sequência às análises de CH₃Hg⁺. Nas temperaturas de 35,0 a 40,0 °C foram observados os sinais completos de todos os componentes (Hg⁰, CH₃Hg⁺ e Hg²⁺) no tempo de 10 min com tempos de retenção de CH₃Hg⁺ menores que nas temperaturas de 30,0 e 33,0 °C. Os valores de Rs foram melhores nas temperaturas de 35,0 e 36,0 °C (Tabela 2.3). Segundo o fabricante do Merx, recomenda-se que a temperatura da CG seja de 36,0 °C, podendo ser ajustada ou não. Os trabalhos de Carrasco & Vassileva (2015, 2014) a temperatura da CG foi de 36,0 °C. Porém, nesse trabalho como não havia diferença significativa (p > 0,05) entre os fatores avaliados entre as temperaturas de 35,0 e 36,0 °C optou-se em fixar a temperatura em 35,0 °C.

2.4.2 Otimização das etapas de derivatização e trapeamento

Os parâmetros otimizados na etapa de derivatização e trapeamento foram: vazão de gás N₂ no borbulhador do trapeamento; tempo de reação entre CH₃Hg⁺ e NaBEt₄;

tempo de trapeamento; tempo de secagem do trap; e o volume de NaBEt_4 . Essas variáveis foram avaliadas quanto sinal analítico mais intenso. A otimização foi feita de forma univariada. Os resultados obtidos na otimização estão apresentados na Figura 2.9.

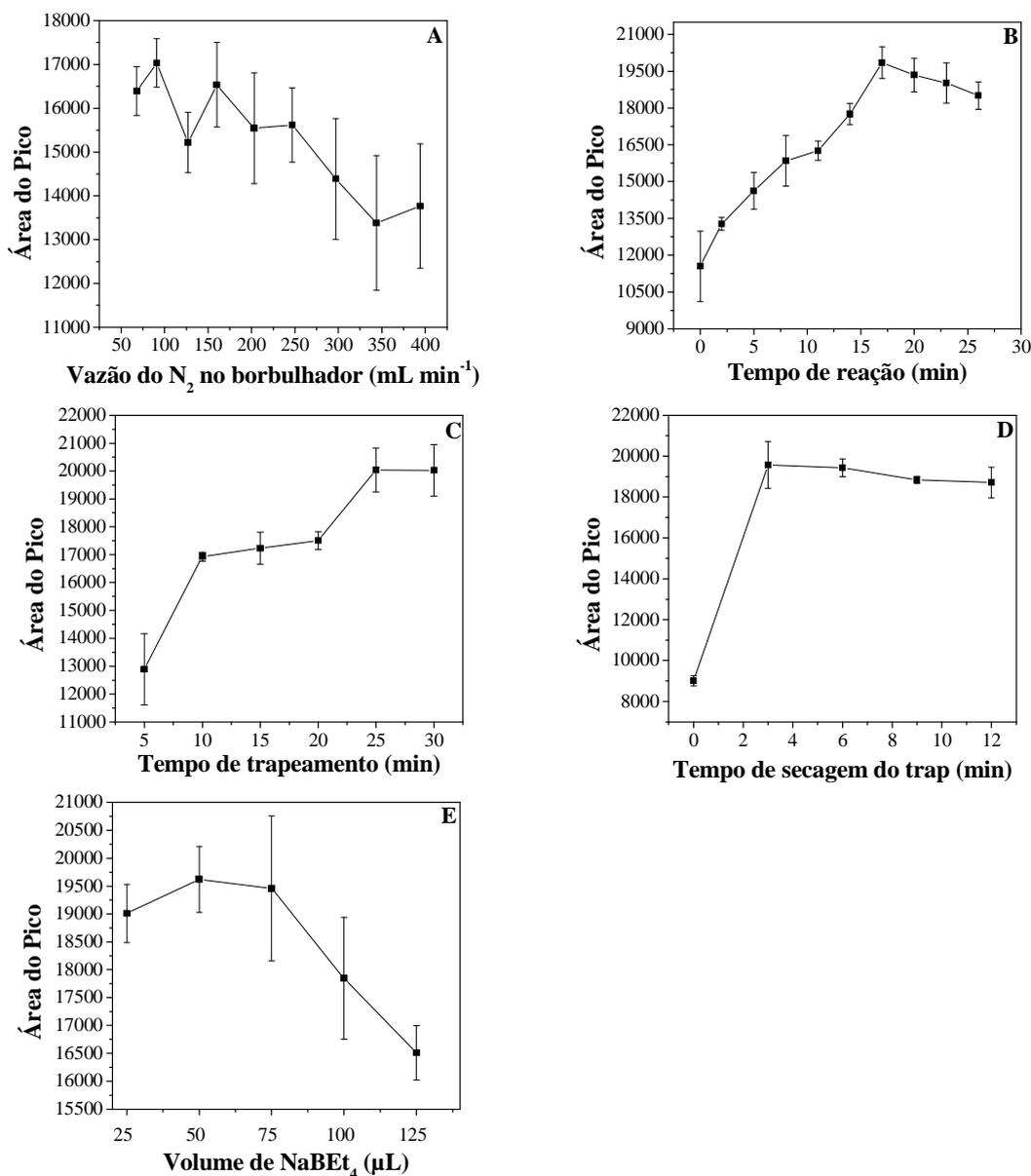


Figura 2.9: Resultados da otimização dos parâmetros das etapas de derivatização e trapeamento.

Observa-se na Figura 2.9A, que com o aumento da vazão do gás N_2 no borbulhador, que tem como função o arraste do CH_3Hg^+ para o trap de Tenax®, diminuiu-se o sinal analítico e também aumentou-se o desvio padrão da análise. Sugere-se que existem 2 formas de perdas do sinal do CH_3Hg^+ devido a um borbulhamento intenso: uma pode ser causada pelas gotas de água que são arrastadas para o trap,

dificultando a adsorção das espécies do Hg ou a força com que gás arrasta o analito não favorece o tempo de contato necessário para sua adsorção. O melhor sinal analítico foi obtido na vazão de 91 mL min⁻¹, valor este inferior ao recomendado pelo método EPA 1630 (2001), que sugere vazão de N₂ de 350 ± 50 mL min⁻¹. Por essa razão, a vazão de N₂ da etapa de trapeamento selecionada para dar sequência às análises de CH₃Hg⁺ foi de 91 mL min⁻¹. Houve uma diferença de 21% entre o maior sinal analítico de CH₃Hg⁺ obtida na vazão de N₂ em 91 mL min⁻¹ e o menor sinal analítico obtido na vazão próxima ao valor recomendado pela EPA 1630 (2001), de 344 mL min⁻¹. Uma vantagem de se utilizar uma vazão mais baixa é a redução do consumo de gás.

O tempo de reação foi otimizado a fim de se garantir a reação completa entre o derivatizante e o CH₃Hg⁺. A Figura 2.9B mostra o resultado obtido para o tempo de reação *versus* sinal analítico em área de pico. Verifica-se que com o aumento do tempo de reação, aumenta-se o sinal analítico, ou seja, quanto maior o tempo de reação, maior é a conversão de CH₃Hg⁺ em CH₃HgCH₂CH₃. No tempo de 17 min observa-se o maior sinal analítico, após esse tempo, o sinal analítico decresce levemente. A diferença entre o sinal analítico de CH₃Hg⁺ entre os tempos de 0 a 17 min foi de 42%, enquanto entre 17 e 26 min a diferença foi de apenas 7%. Assim, o tempo de reação foi fixado em 17 min, corroborando a recomendação do método EPA 1630 (2001).

O tempo de trapeamento é o tempo necessário para retirar o analito do frasco reacional e adsorvê-lo no trap. A Figura 2.9C mostra que à medida que se aumenta o tempo de trapeamento, maior é o sinal analítico do CH₃Hg⁺ e esse estabiliza em 25 min. O método EPA 1630 (2001) recomenda um tempo de trapeamento de 17 min e nos trabalhos de Carrasco & Vassileva (2015, 2014) o tempo utilizado foi de 15 min, porém o tempo selecionado para dar prosseguimento às análises de CH₃Hg⁺ foi de 25 min.

A secagem do trap é necessária, uma vez que a umidade presente nele afeta a dessorção das espécies de Hg e, portanto, o sinal analítico. Ela é realizada após a etapa de derivatização e trapeamento, passando-se gás N₂ na parte interna do trap. Observa-se na Figura 2.9D, que há uma diferença de 54% entre o sinal de CH₃Hg⁺ entre os tempos de 0 e 3 min. Ou seja, a área do pico reduz drasticamente sem a secagem do trap, o que confirma a ineficiência da dessorção. A partir de 3 min, o sinal analítico tem pouca variação, com uma diferença de apenas 4% entre 3 e 12 min. Nesse caso, qualquer tempo poderia ser escolhido acima de 3 min para secagem do trap. Selecionou-se o

tempo de 6 min, pois nesse ponto observou-se um desvio padrão menor que em 3 min e também para garantir a secagem total do trap. O método EPA 1630 (2001) recomenda um tempo de 7 min para secagem do trap.

O volume de NaBEt₄ também tem influência no sinal analítico como observado na Figura 2.9E. Conforme o volume de NaBEt₄ aumenta, o sinal analítico de CH₃Hg⁺ sofre um declínio. Atinge-se a maior área do pico no volume de 50,0 µL. Uma diferença de 3% é observado entre o sinal obtido no volume de NaBEt₄ entre 25,0 e 50,0 µL e 16% entre 50,0 e 125,0 µL. Segundo o método EPA 1630 (2001), o volume de NaBEt₄ sugerido é de 40,0 µL. O volume de NaBEt₄ selecionado para dar sequência às análises de CH₃Hg⁺ foi de 50,0 µL, assim como nos trabalhos de Carrasco & Vassileva (2015, 2014).

2.4.3 Validação do método

De acordo com o guia de validação INMETRO (2016) - DOQ-CGCRE-008, a validação possui as seguintes definições: (i) é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos; (ii) é a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido. Neste trabalho, os principais parâmetros para validar um método foram sistematicamente estudados, visando sua aplicação em estudos futuros sobre o ciclo biogeoquímico do Hg. O processo de validação foi conduzido utilizando ensaios com soluções padrão, brancos, *Spike* de amostras e material de referência certificado.

2.4.3.1 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas na ausência e na presença da matriz. Os coeficientes angulares foram comparados utilizando o teste de Fisher, para avaliar eventuais diferenças entre a variância dos coeficientes angulares, e o teste t-Student, visando determinar se havia diferença significativa entre aqueles valores, o que é um indicativo da ocorrência de efeito de matriz. Os testes de hipótese foram realizados com nível de significância de 0,05 utilizando software Excel 2007.

A Tabela 2.4 apresenta os coeficientes angulares com seus respectivos desvios padrão obtidos pelas curvas. Observa-se diferença significativa entre os desvios-padrão da curva obtida com matriz de sedimento e a curva com solução aquosa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$). Isto tem influência no cálculo dos valores de t-Student para comparação das médias dos coeficientes angulares (Sanders & Smidt, 2000). Os resultados mostram que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares das curvas preparadas com soluções de sedimento e as curvas preparadas com soluções aquosas. Isto mostra que não há efeito de matriz significativo entre a curva de CH_3Hg^+ em solução aquosa e a curva por ajuste de matriz para sedimento, mostrando que a curva em solução aquosa pode ser utilizada. Sendo assim, todos os testes seguintes, foram realizados com a curva analítica de CH_3Hg^+ em solução aquosa. A Figura 2.10, mostra as curvas de CH_3Hg^+ obtida em solução aquosa e por ajuste de matriz no sedimento.

Tabela 2.4: Resultados obtidos para avaliação do efeito de matriz.

	Curva em solução aquosa	Curva por ajuste de matriz (em sedimento)
Média do coeficiente angular \pm DP	$29,5 \pm 0,6$	$29,4 \pm 0,1$
$F_{\text{calculado}}$		22,68
$F_{\text{crítico}}$		19,00
$t_{\text{calculado}}$		0,07
$t_{\text{crítico}}$		4,30

*média \pm DP (n = 3)

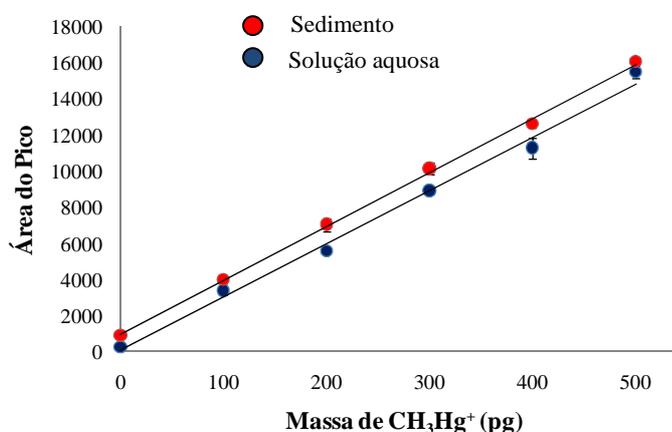


Figura 2.10: Curvas de CH_3Hg^+ obtidas em solução aquosa e na matriz de sedimento.

2.4.3.2 Linearidade e Regressão

Testes estatísticos foram utilizados para avaliar se a curva analítica de CH_3Hg^+ em solução aquosa atende às premissas para a utilização do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (OLSM). A linearidade foi avaliada de acordo com o INMETRO (2016) e orientações propostas por Souza *et al.*, (2007) e Souza (2007). Para isso os parâmetros de: inspeção visual da curva; método dos resíduos padronizados Jackknife (*outliers*); teste de Ryan & Joiner (1976) para normalidade; teste de Durbin & Watson (1951) para independência de resíduos; homoscedasticidade pelo teste de Brown & Forsythe (1974) e Levene (1960); e significância de regressão e desvio de linearidade pela ANOVA (Draper & Smith, 1998) foram analisados. A Tabela 2.5 apresenta todos os resultados obtidos para avaliação da linearidade. Vale ressaltar que cada um dos seis níveis em massa da curva foi determinado em triplicata e de forma independente, totalizando 18 pontos.

Aparentemente, pela inspeção visual, o gráfico é linear e apresenta o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,989. Porém, somente o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2) não foram suficientes para o teste de linearidade. Portanto, outros parâmetros foram sistematicamente analisados.

A presença de valores discrepantes foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife, calculado para cada ponto da curva de calibração. Após exclusão dos *outliers*, cujos valores de resíduos maiores que o valor de $t_{\text{crítico}}$, o teste foi aplicado novamente até que não houvesse *outlier*, seguindo o protocolo de eliminação de até 2/9 dos dados. Ao todo 4 dados foram removidos pelo teste Jackknife, dentre eles o nível de 500 pg e uma replicata da massa de 400 pg.

A normalidade foi confirmada pela realização do teste de Ryan-Joiner, indicando que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, quando os desvios da normalidade não são significativos ($p > 0,10$) e o coeficiente de correlação ($R = 0,9818$) obtido é superior ao $R_{\text{crítico}}$ (0,9481) para curva analítica de CH_3Hg^+ (Tabela 2.5). O gráfico de probabilidade normal pode ser observado na Figura 2.11.

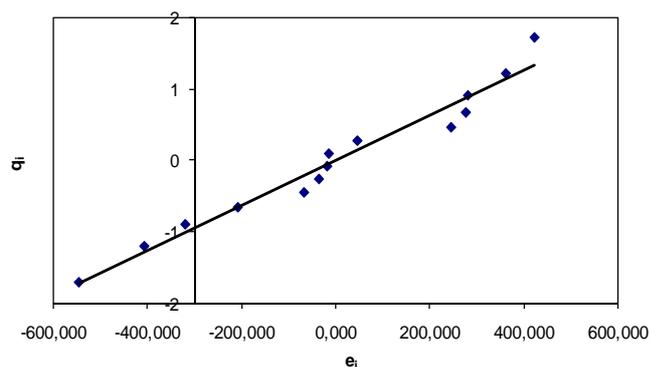


Figura 2.11: Gráfico de probabilidade normal para a curva analítica de CH_3Hg^+ .

O teste de Durbin-Watson (d) foi aplicado para avaliar a independência dos resíduos, cujo valor de d foi de 1,672 (Tabela 2.5). No gráfico do teste de independência (Figura 2.12), os pontos estão bem distribuídos nos quadrantes, concluindo que não há correlação ($p > 0,05$).

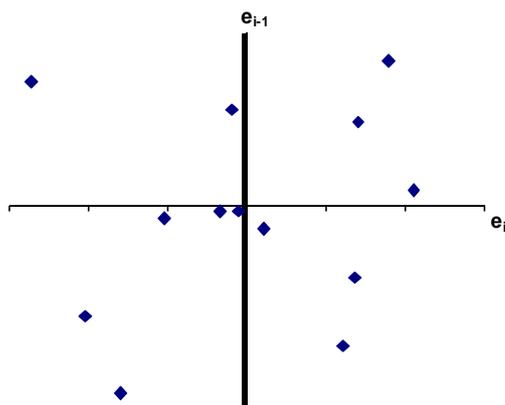


Figura 2.12: Gráfico de Durbin-Watson para teste de independência dos resíduos.

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão pode ser estimada pelo cálculo de t_L ($6,91 \times 10^{-1}$) empregando-se o Teste de Brown-Forsythe e Levene para verificar se as variâncias são independentes da concentração (Souza *et al.* 2007; Souza, 2007). Não houve diferença significativa entre as variâncias estudadas nos grupos 1 e 2 ($p > 0,05$). O grupo 1 corresponde às massas de 0, 100 e 200 pg de CH_3Hg^+ e o grupo 2 corresponde às massas de 300 e 400 pg de CH_3Hg^+ . Conclui-se, portanto que, há homoscedasticidade. A Figura 2.13 representa o gráfico do teste de Teste de Brown-Forsythe e Levene.

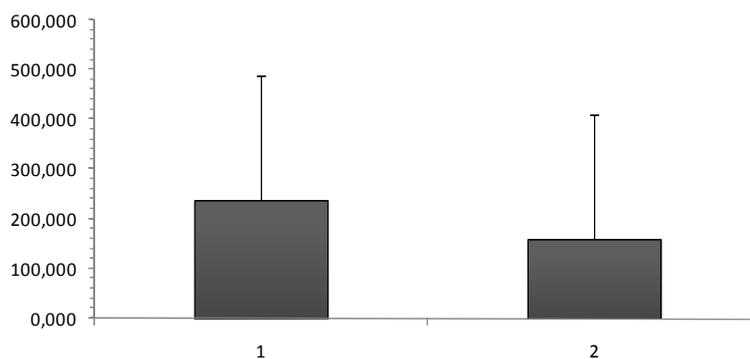


Figura 2.13: Gráfico representando a homoscedasticidade das variâncias para a curva analítica de CH_3Hg^+ .

A faixa de 100 a 500 pg para construção da curva analítica de CH_3Hg^+ na CG-pyro-AFS proposta inicialmente, mostrou um desvio de linearidade pela ANOVA. Após a exclusão do nível de 500 pg e uma replicata do nível de 400 pg, a linearidade foi obtida para faixa de 100 a 400 pg, ao nível de 99% de confiança. A regressão foi significativa ($p < 0,05$), indicando que a faixa proposta atende as premissas para o uso do OLSM. Os dados da curva analítica obtida encontram-se na Tabela 2.5. A curva analítica do CH_3Hg^+ final está representada na Figura 2.14. Os cromatogramas obtidos para os pontos da curva analítica em solução aquosa se encontram no Apêndice.

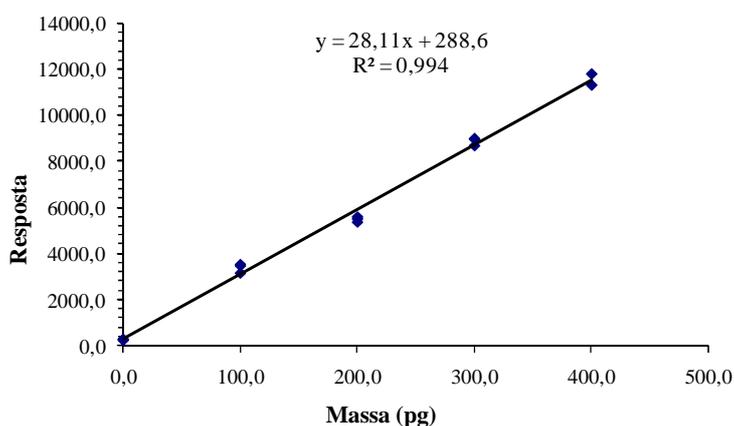


Figura 2.14: Curva analítica final de CH_3Hg^+ após exclusão dos *outliers*.

Tabela 2.5: Parâmetros estatísticos e dados obtidos na avaliação das premissas para utilização do método OLSM.

Parâmetros estatísticos	Curva Analítica	Parâmetros estatísticos	Curva Analítica
Coefficiente angular	28,11	Homoscedasticidade	
Intercepto	288,6	t_L	$6,91 \times 10^{-1}$
Faixa linear	100 – 400 pg	p	0,5029
R^2	0,994		
Número de observações	14	Desvio de Linearidade (para $\alpha = 0,01$)	
		$F_{\text{calculado}}$	5,96
		$F_{\text{crítico}}$	7,00
Normalidade (para $p > 0,10$)		Regressão (para $\alpha = 0,05$)	
R	0,9818	$F_{\text{calculado}}$	2134
$R_{\text{crítico}}$	0,9481	$F_{\text{crítico}}$	4,74
Independência (para $p > 0,05$)			
d	1,672		
Não existe correlação	$1,349 < d < 2,650$		

2.4.3.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados utilizando o sinal analítico de 8 brancos independentes. Para estes cálculos, o desvio padrão do sinal analítico dos brancos (s) e a inclinação da curva analítica (b) foram considerados nas seguintes expressões:

$$LD = \frac{3,3s}{b} \quad LQ = \frac{10s}{b}$$

As diluições de cada matriz foram também consideradas para o cálculo dos valores finais. O LD e LQ do método para quantificação de CH_3Hg^+ em sedimento foi de 0,04 e $0,13 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

2.4.3.4 Precisão e Exatidão

Não havendo efeito de matriz, os testes de repetibilidade e precisão intermediária foram realizados em solução aquosa com a massa de 250 pg de CH_3Hg^+ . A recuperação foi de 103% para o teste de repetibilidade com desvio padrão relativo (RSD) de 3%. Para a precisão intermediária obteve-se recuperação de 102% com RSD de 8%. Os resultados obtidos encontram-se dentro dos critérios estabelecidos pelo guia do INMETRO (2016) e EPA (1992), cuja recuperação deve estar entre valores de 80 e 120% e o RSD não deve ultrapassar 15%.

A exatidão foi realizada com testes de tendência/recuperação com uso de dopagem da amostra (*Spike* da amostra) e pelo uso de material de referência certificado de sedimento de estuário, CRM-580 (Cromatograma no Apêndice). O sedimento foi dopado com solução de CH_3HgCl correspondendo às massas de 80; 175; 275; 375 pg. Todas as dopagens (*Spike*) foram feitas em triplicata. Os resultados da exatidão estão dispostos na Figura 2.15.

A concentração de CH_3Hg^+ obtida para o CRM-580 foi de $(71,1 \pm 2,1) \mu\text{g kg}^{-1}$, cuja recuperação representa 95%. A recuperação do analito obtida nas amostras enriquecidas variou de 93 a 129%. De acordo com os critérios de aceitação estabelecida pelo guia INMETRO (2016), que estabelecem recuperações satisfatórias entre 80% e 120% (Green, 1996; EPA, 1992) o método proposto apresenta exatidão, em termos de porcentagem de recuperação, dentro do aceitável. O método EPA 1630 (2001) ainda, recomenda recuperações entre 67 a 133% para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de água utilizado a técnica CG-pyro-AFS, pois a concentração desse analito está na ordem de parte por trilhão.

Somente o nível 1, correspondendo à 80 pg de CH_3Hg^+ , ultrapassou o valor de 120% (Figura 2.15), sugerindo uma possível formação de artefato. Esse evento tem sido discutido na literatura como mencionado no Capítulo 1. Porém, a confirmação da metilação acidental não pôde ser feita nesse trabalho, devido à falta de acessibilidade a um instrumento capaz de realizar ensaios de diluição isotópica. Considerando-se que não foi observado o erro positivo no material de referência certificado, o qual apresenta alta concentração de HgT, e também nos outros níveis avaliados, não parece provável a produção de artefato. Sabendo-se que a superestimação do teor de CH_3Hg^+ foi observada no nível para o qual apresentava concentração próxima do limite de quantificação da técnica, é justificável o alto desvio padrão e o erro positivo. Os resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas estão apresentadas na Tabela 2.6.

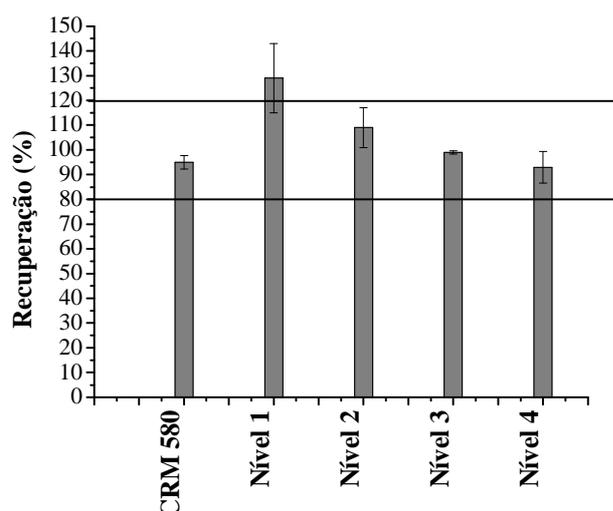


Figura 2.15: Resultados obtidos para material de referência certificado e teste de tendência/recuperação.

Tabela 2.6: Resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas na validação do método.

Figuras de Mérito		
Limite de Detecção	0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Limite de Quantificação	0,13 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Precisão		
Repetibilidade	RSD: 3%	Recuperação: 103%
Precisão Intermediária	RSD: 8%	Recuperação: 102%
Exatidão		
Material de referência Certificado	Recuperação: 95%	
Amostras enriquecidas com CH_3Hg^+	Recuperações: 93 – 129%	

2.5 CONCLUSÕES

A otimização e a validação do método CG-pyro-AFS para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimento foi realizada a fim de garantir um método confiável para que possa ser usado para monitoramento de concentrações de Hg em sedimento e/ou estudos do ciclo biogeoquímico do Hg.

A otimização do método permitiu alterações no aumento do tempo e redução da vazão de gás N₂ na etapa de trapeamento, condições com as quais se obtiveram os melhores sinais analíticos.

Com relação à validação: efeito de matriz não foi observado para o método aplicado na matriz de sedimento, sendo possível o uso da curva analítica de CH₃Hg⁺ em solução aquosa sem danos na confiabilidade dos resultados obtidos. A linearidade, precisão e exatidão foram adequadas para o método proposto. Foram encontrados valores baixos LD e LQ. Apesar de não existir uma legislação brasileira consolidada quanto à concentração de CH₃Hg⁺ em sedimentos, os valores de LD e LQ são apropriados para uma possível comparação e discussão sobre contaminação de CH₃Hg⁺ em amostras ambientais. Esse trabalho poderá colaborar com estudos de sedimentos em áreas vulneráveis à contaminação ambiental pelo Hg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDI, F.; GALLO, M.; MARCHETTO, D.; FANI, R.; MAIDA, I.; HORVAT, M.; FAJON, V.; ZIZEK, S.; HINES, M. 2012. Seasonal mercury transformations and surficial sediment detoxification by bacteria of Marano and Grado lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 113, p. 105 – 115.
- BOWLES, K. & APTE, S. C. 2000. Determination of methylmercury in sediments by steam distillation/aqueous-phase ethylation and atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 419, p. 145 – 151
- BROOKS RAND LABS. 2013. Application Note: Extraction of methylmercury from sediments and soils.
- BROWN, M. B. & FORSYTHE, A. B. 1974. Robust tests for the equality of variances. *J. Am. Stat. Assoc.*, v. 69, p. 364 – 367.
- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. 2010. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4^a ed. Porto Alegre: Bookman, 414 p.
- CAI, Y.; MONSALUD, S.; FURTON, K. G. 2000. Determination of methyl and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, v. 52, p. 82 – 86.
- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2014. Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, v. 122, p. 106 – 114.
- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2015. Determination of methylmercury in marine sediment samples: Method validation and occurrence data. *Analytica Chimica Acta*, v. 853, p. 167 – 178.

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. 2006. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 456 p.
- DRAPER, N. R. & SMITH, H. 1998. Applied regression analysis. New York: Wiley. 706 p.
- DURBIN, J. & WATSON, G. S. 1951. Testing for serial correlation in least squares regression II. *Biometrika*, v. 38, p. 159 – 178.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1992. Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program SW-846 Methods, U.S., Washington D. C. 32p.
- EPA 1630. 2001. Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS, U. S. Environmental Protection Agency, Washington D. C. 49p.
- GREEN, J. M. 1996. Doing a thorough method validation can be tedious, but the consequences of not doing it right are wasted time, money, and resources: A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem.*, v. 68, p. 305 – 309.
- HINTELMANN, H. 1999. Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*, v. 7, p. 1093 – 1105.
- HORVAT, M.; BLOOM, N. S.; LIANG, L. 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 281, p. 135 – 152.
- INMETRO (DOQ-CGCRE-008). 2016. Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 05, 31 p.
- LEVENE, H. 1960. Robusts tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W. G.; MANN, H. B. 1960. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford University Press, p. 278 – 292.
- PUK, R. & WEBER, J. H. 1994. Critical Review of Analytical Methods for Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury Compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 8, p. 298 – 302.
- RYAN, T. A.; JOINER, B. L. 1976. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University, 15 p.
- SANDERS, D. H. & SMIDT, R. K. 2000. Statistics: A First Course. Editora: McGraw-Hill, Ed. 6, 664 p.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. 2014. Fundamentos de Química Analítica. 9 ed.; São Paulo: CENGAGE Learning, 950 p.
- SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. 2007. In-house method Validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 241 – 247.
- SOUZA, S. V. C. 2007. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Tese de Doutorado, 297 p.

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO DE CH_3Hg^+ EM SEDIMENTOS DE DESCOBERTO – MINAS GERAIS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo, no interior do município de Descoberto – MG, localiza-se a 370 km da capital Belo Horizonte e a 52 km de Juiz de Fora – MG. A Figura 3.1 mostra a localização do Município de Descoberto (MG), bem como os pontos de amostragem.

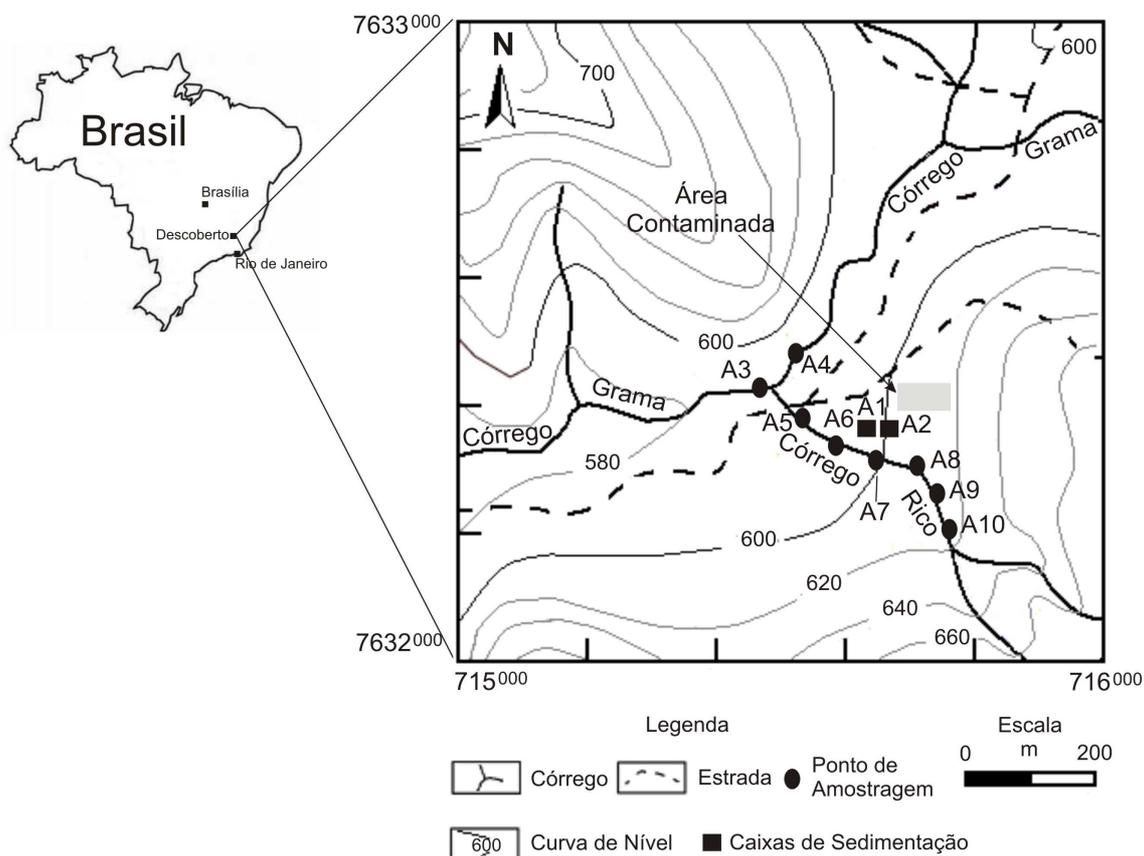


Figura 3.1: Localização do município de Descoberto – MG/Brasil (à esquerda). Localização dos pontos de amostragem no Ribeirão do Grama e no Córrego Rico (à direita). As coordenadas são dadas em UTM, zona de grade 23K, datum WGS 84. As linhas de contorno são dadas em metros acima do nível do mar.

Em dezembro de 2002, foi encontrado mercúrio líquido (Hg^0) enterrado no solo de uma área rural desse município. O afloramento desse elemento ocorreu durante a abertura de uma estrada, num terreno em declive próximo ao tributário (Córrego Rico) da bacia do Ribeirão da Gramma, afluente do rio Novo, pertencente à bacia do rio Paraíba do Sul. Ficou provada que a procedência desse metal foi devida à atividade de exploração de ouro utilizada pelos ingleses desde o século XIX nessa região (FEAM e CDTN, 2006). Nesse período, o procedimento de amalgamação foi muito usado para aumentar a eficiência de retirada do ouro (“procedimento de pátio”). Conseqüentemente, parte do mercúrio foi perdida para atmosfera como Hg gasoso no processo de queima da amálgama, parte foi despejada nos rios no momento do uso da amálgama para retirar o ouro do minério e parte acabou sendo deixado e soterrado com o tempo pela erosão da área.

Após a confirmação da contaminação dessa área por mercúrio, a Prefeitura de Descoberto, juntamente com apoio de três agências governamentais estaduais, a FEAM (Agência Estadual de Meio Ambiente de Minas Gerais), a COPASA (Companhia de Abastecimento de Água do Estado de Minas Gerais) e o IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas) e a colaboração do CDTN (Centro de Desenvolvimento da Energia Nuclear), adotaram algumas estratégias de forma a isolar a área. Construíram barragens de contenção do material sólido, canais de drenagem para desviar o fluxo de águas de chuvas da área contaminada, instalação de câmaras e tanques com chicanas para tratamento físico das águas que passavam pelas caixas de sedimentação (FEAM e CDTN, 2006).

Vários estudos foram realizados na área a fim de se avaliar o grau de contaminação por Hg nos compartimentos ambientais. Em 2003 foram coletadas 190 amostras de solo em diversas profundidades pela FEAM e Companhia Brasileira de Alumínio (CBA). A concentração de Hg nessas amostras atingiu 8826 mg kg^{-1} . Sendo esse valor muito discrepante em relação à Resolução CONAMA N° 420/2009, o qual estabelece o maior valor guia de 70 mg kg^{-1} para investigação industrial.

A FEAM e CDTN (2006) coletaram amostras de água no rio que abastecia o município de Descoberto, que apresentou concentrações de $2,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Uma vez que o permitido pelas legislações do CONAMA N° 357/2005 e CONAMA N° 430/2011 é de

2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para águas Classe 3, a interrupção da captação de água nesse manancial foi mantida (FEAM e CDTN, 2006).

Alexandre (2006) avaliou o grau de contaminação por Hg Descoberto. A pesquisadora encontrou em 14 amostras de água das 41 coletadas, concentrações de Hg acima do valor máximo permitido pela Resolução CONAMA N° 357 (2005) e CONAMA N° 430 (2011) para Classe 1 e 2, de 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Das 14 amostras, 8 apresentaram teores superiores ao limite recomendado para o consumo humano, cujo valor é de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, segundo a Portaria 2914 do Ministério da Saúde (2011). A avaliação das amostras de solo e de sedimento da área mostrou que há presença de Hg em concentrações superiores ao Valor de Referência de Qualidade (VRQ) proposto pela CETESB 45/2014 (0,05 mg kg^{-1}) para solos agrícolas, porém inferior do Valor de Prevenção (0,5 mg kg^{-1}) pela mesma legislação.

Em 2008, pesquisadores do CDTN avaliaram a distribuição geoquímica do Hg em águas, sedimentos, peixes e briófitas no Córrego Rico e parte da bacia do Ribeirão da Grama após seis anos de constatação da contaminação da área. As amostras de água apresentaram concentrações de Hg inferiores ao limite máximo permitido, cujo valor é de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde. As amostras de sedimento avaliadas apresentaram concentrações de Hg abaixo do valor estipulado pelo CONAMA 454/2012 para material a ser dragado em águas doces, cujo valor do Nível 2 é de 0,486 mg kg^{-1} . A concentração máxima de Hg encontrada nas amostras de sedimentos foi de 0,31 mg kg^{-1} . Nas amostras de briófitas as concentrações variaram de 0,08 a 0,25 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo que os maiores teores de Hg foram encontrados em amostras coletadas próximas à área contaminada. Das 70 amostras de peixes, apenas três apresentaram concentrações de Hg acima do limite de 0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso fresco) para consumo de peixes não predadores e produtos de pesca de acordo com a Portaria da ANVISA 42/2013 (Palmieri *et al.*, 2009).

Tinôco (2008) também avaliou a contaminação por Hg em Descoberto – MG em amostras de água, peixe, solo e sedimento provenientes de outras áreas, nas proximidades da área já conhecida, potencialmente contaminadas. As concentrações de Hg encontradas em solos variaram de 0,26 a 0,55 mg kg^{-1} , em sedimentos 0,13 a 0,61 mg kg^{-1} e em água <0,2 a 5,40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os teores encontrados nas amostras de solos e sedimentos foram considerados altos, pois ultrapassaram o limite recomendado pela

CETESB 45/2014 e pelo CONAMA N° 454/2012, respectivamente. Nas amostras de peixes não foram detectados concentrações acima do permitido pela legislação brasileira (ANVISA 42/2013).

Durão Júnior (2010) e Durão Júnior *et al.* (2009) realizaram um trabalho de especiação, quantificação, distribuição e transporte de Hg em solos da área contaminada. Observaram ainda a presença de Hg nos solos dessa área, com concentração de até 90 mg kg⁻¹. Os autores mostraram ainda que grande parte do Hg⁰ havia sido oxidado a Hg²⁺ e que essa espécie estava ligada principalmente a óxidos-hidróxidos de ferro, manganês e alumínio e também à matéria orgânica (MO).

Os trabalhos já realizados mostraram que o material fino contaminado com concentrações mais altas de Hg é arrastado para os tanques e caixas. Em casos de ocorrência de altas quantidades de chuva fica claro que esses tanques e caixas não conseguem reter toda a água e seguramente ela é transportada para o Córrego. Os sedimentos do local foram analisados há mais de cinco anos e não existe um programa de monitoramento dos solos e sedimentos da área. É importante ressaltar que os trabalhos citados acima não avaliaram a concentração da espécie CH₃Hg⁺, sua presença e quantidade, assim como condições de metilação do metal nesse ambiente específico, o que é essencial para avaliação do impacto ambiental na área de Descoberto. Essa espécie do metal é um composto orgânico considerado de alta toxicidade, cuja síntese em meios naturais é um processo chave no ciclo biogeoquímico do metal.

A área do município de Descoberto é um caso muito importante de ser estudado ainda na atualidade, não apenas para uma avaliação da situação atual de possíveis impactos para o meio ambiente como também para ser usado de exemplo para outros casos semelhantes de contaminação no Brasil e no mundo. Diversas matrizes já foram avaliadas nessa região quanto à concentração total do elemento em questão, constatando sua presença em altas quantidades, mas ainda não há qualquer estudo de investigação da presença de CH₃Hg⁺ nos sedimentos dos recursos hídricos próximos.

Esse estudo tem como justificativa a importância da quantificação de CH₃Hg⁺ em sedimentos dessa área a fim de avaliar o grau de contaminação. Esse trabalho contribuirá para o entendimento do impacto ambiental por Hg e também para estudos de novas propostas de controle ou mitigação do local contaminado.

3.2 OBJETIVO

Quantificar a espécie CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos da área contaminada no município de Descoberto – MG utilizando o sistema CG-pyro-AFS.

3.2.1 *Objetivos específicos*

- Quantificar a espécie CH_3Hg^+ em amostras de sedimento da área de Descoberto – MG;
- Determinar o Hg total (HgT) nas amostras de sedimentos da área de Descoberto – MG;
- Realizar a caracterização química das amostras de sedimentos da área de Descoberto – MG;
- Realizar especiação do Hg por termodessorção no DMA-80;
- Analisar estatisticamente os dados obtidos.

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 *Materiais, reagentes, soluções e equipamentos*

Todos os materiais e equipamentos mencionados no item 2.3.1 e 2.3.2 do Capítulo 2 foram utilizados nos experimentos desse capítulo. A solução padrão de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ acidificada com HNO_3 – Merck Darmstadt, Alemanha) foi utilizada para construção da curva analítica no analisador direto de Hg (DMA-80).

3.3.2 *Instrumentação*

Os instrumentos de análise utilizados neste capítulo foram:

Analisador direto de mercúrio (DMA -80, Milestone, Itália); CG -pyro-AFS (MERX, *Brooks Rand Labs*, USA); Fluorescência de Raios-X – FRX (Philips – PANalytical, Modelo MagiX com amostrador automático PW 2540 e tubo de Rh 2,4 kW); Analisador Elemental CHNS/O (Perkin Elmer, PE2400, Série II); Analisador de carbono e enxofre (Leco, SC632).

A Figura 3.2 apresenta o fluxograma do procedimento experimental de forma simplificada empregada nesse trabalho.

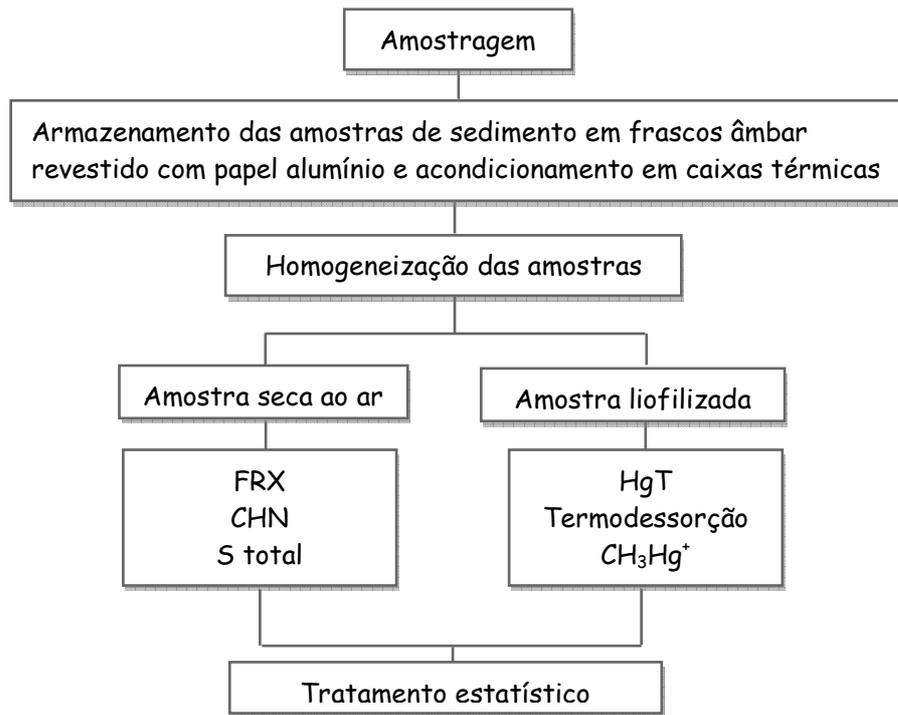


Figura 3.2: Fluxograma da parte experimental.

3.3.3 Amostragem e preparação das amostras de sedimentos

Considerando que a área contaminada está localizada em declive na direção do Córrego Rico (Figura 3.1), as autoridades brasileiras o interditaram e construíram canais e caixas de sedimentação na parte inferior da área para reter a água da chuva e evitar, na medida do possível, o transporte de material particulado da área contaminada para o Córrego Rico. Na estação chuvosa, a precipitação pluviométrica é tão intensa que parte da água dessas caixas transborda e atinge o Córrego. As amostras foram coletadas nas duas caixas de sedimentação (A1 e A2 – Figuras 3.1 e 3.3) e em 6 pontos do Córrego Rico (A5 a A10 – Figuras 3.1 e 3.4) escolhidas de forma a avaliar o possível impacto do transporte de Hg das caixas de sedimentação, que estão em um nível topográfico mais elevado. A amostra A3 está localizada fora da área interdita (Figuras 3.1 e 3.5), após o encontro do Córrego Rico e Ribeirão do Grama (a jusante). A amostra A4 foi tomada como controle, porque não recebe águas do Córrego Rico.

A coleta das amostras foi realizada com a colaboração de pesquisadores do CDTN e da UFOP, em agosto de 2014 (estação seca) e em dezembro de 2015 (estação chuvosa) para avaliar as concentrações nos mesmos pontos em diferentes condições de

precipitação pluviométrica. Foram coletadas 18 amostras de sedimentos; 14 nos rios (8 na estação seca e 6 na estação chuvosa) e 4 (2 em cada estação) foram retirados das duas caixas de sedimentação. A coleta das amostras A9 e A10 na estação chuvosa não foi realizada, devido às dificuldades de acesso a esses pontos na estação chuvosa de 2015.

As amostras foram coletadas utilizando um trado de aço inox e uma pá de plástico, em seguida peneiradas com peneira de 2 mm para descartar o cascalho e depois transferidas para frascos de vidro âmbar revestidos externamente com papel alumínio, a fim de evitar a fotodegradação do CH_3Hg^+ . Imediatamente os frascos contendo as amostras foram armazenados em caixas contendo gelo até a chegada ao laboratório. No laboratório, parte das amostras foi liofilizada e armazenada em freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das determinações de HgT, especiação de Hg utilizando termodessorção e CH_3Hg^+ . Para análise química (CHN, S Total e FRX), as amostras foram secas ao ar. A Tabela 3.1 apresenta a identificação, descrição e localização das amostras coletadas.



Figura 3.3: Caixa de Sedimentação



Figura 3.4: Córrego Rico.



Figura 3.5: Ribeirão do Gramma.

Tabela 3.1: Identificação, descrição e localização das amostras de sedimento coletadas em Descoberto – MG.

Amostra	Descrição	Característica	Localização zona de grade 23K
A1	Caixa de sedimentação. Sedimento arenoso de coloração ocre retirada de uma caixa seca com vegetação rasteira por cima. Caixa seca (Figura 3.3).	Sedimento arenoso	7632360/715634
A2	Caixa de sedimentação. Sedimento arenoso de coloração ocre retirada de uma caixa seca com vegetação rasteira por cima. Caixa seca (Figura 3.3).	Sedimento arenoso	7632360/715669
A3	Sedimento coletado no Ribeirão do Grama após recebimento das águas de Córrego proveniente do terreno do Lote (Figura 3.4).	Sedimento arenoso.	7632425/715472
A4	Sedimento coletado no Ribeirão do Grama antes do recebimento das águas de Córrego proveniente do terreno do Lote.	Sedimento arenoso	7632488/715524
A5	Amostra retirada com trado em área de remanso ao longo do Córrego Rico. Material muito duro. A fração acima de 2 mm é um cascalho que consiste essencialmente de quartzo (Figura 3.5).	Sedimento arenoso	7632374/715535
A6	Sedimento menos consolidado com maior quantidade de finos. Não foi necessário o uso de trado. Retirado do Córrego Rico.	Sedimento fino	7632331/715594
A7	Ponto nas mesmas condições do ponto A5. Sedimento solto com muito cascalho. Retirado do Córrego Rico.	Sedimento arenoso	7632315/715640
A8	Retirada em ponto localizado acima do ponto que recebe água das caixas de contenção. Amostra com maior quantidade de finos, coletada na superfície com pás. Não foi necessário “afundar” o trado. Retirado do Córrego Rico.	Sedimento fino	7632299/715717
A9	Ponto nas mesmas condições do ponto A8. Retirado do Córrego Rico.	Sedimento fino	7632256/715742
A10	Ponto nas mesmas condições do ponto A8. Retirado do Córrego Rico.	Sedimento fino	7632205/715764

3.3.4 Quantificação de Hg total (HgT)

A quantificação de HgT nas amostras de sedimento coletadas em Descoberto-MG foi feita na fração total (menor que 2 mm). A quantificação de HgT na fração mais fina das amostras não foi realizada, porque o processo de peneiramento certamente alteraria as concentrações de organomercuriais, cuja avaliação é o principal objetivo deste projeto. Vale ressaltar que não foi necessário pré-tratamento químico da amostra para introdução no DMA – 80. Esse instrumento utiliza o princípio da decomposição térmica, amalgamação, termodessorção e absorção atômica. Após ser introduzida no DMA-80, a amostra é decomposta termicamente sob fluxo de oxigênio. Os produtos da combustão (Hg e outros) são liberados da amostra e transportados para o catalisador (750 °C). Nessa etapa todos os compostos de óxidos de nitrogênio e enxofre, bem como os halogênios e outros compostos são eliminados. O vapor de Hg gerado é, então, coletado no amalgamador contendo ouro e, subsequentemente, é dessorvido para quantificação em absorção atômica no comprimento de onda de 253,65 nm.

A massa da amostra utilizada para análise foi exatamente cerca de $(0,3000 \pm 0,0001)$ g e a análise foi realizada em triplicata. A curva analítica do instrumento foi preparada utilizando injeções de diferentes volumes de soluções de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 1mg L^{-1} preparadas a partir de uma solução padrão 1000mg L^{-1} de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ e acidificadas com 2% HNO_3 . O instrumento divide essa calibração em três faixas: cela 0, de 0 a 10 ng; a cela 1, de 0 a 20 ng e cela 2, de 40 a 100 ng. O material certificado de referência GBW 08301 *sediment river*, cuja concentração de HgT é de $(220 \pm 40) \mu\text{g kg}^{-1}$, foi avaliado para validação do método. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando os sinais analíticos de 10 brancos, o qual se utilizou solução de HNO_3 2% (v v⁻¹). O programa de aquecimento utilizado para quantificação de HgT nas amostras de sedimentos está apresentado na Figura 3.6.

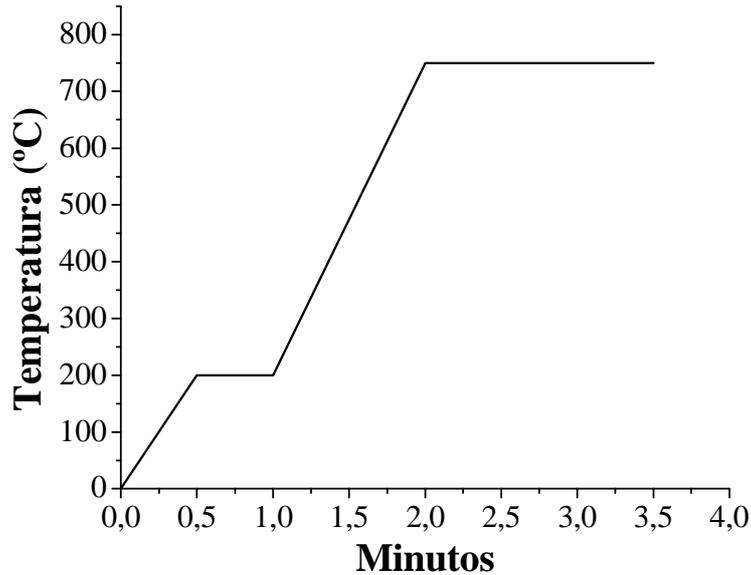


Figura 3.6: Programa de aquecimento para quantificação de HgT no DMA-80.

3.3.5 Especificação de Hg por termodessorção utilizando o DMA-80

A especificação por termodessorção tem como princípio que as diferentes espécies de Hg (mais especificamente diferentes estados de oxidação) termodessorvem de uma matriz sólida pela ação do calor em diferentes faixas de temperatura (Windmöller, 1996). Essa análise foi realizada no DMA – 80 estabelecendo programas de temperatura nos seguintes patamares: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 e 700 °C por 3 minutos e seguido de quantificação em cada patamar. Pesou-se exatamente cerca de $(0,3000 \pm 0,0001)$ g de amostra de sedimento e a submeteu a diferentes programas sequenciais de aquecimento como mostrado na Figura 3.7. Os resultados encontrados foram comparados com padrões de espécies de Hg diferentes, tais como Hg^0 , $HgCl_2$, Hg_2Cl_2 , $HgSO_4$ e HgS analisados no mesmo equipamento e condições aqui apresentadas. Esses padrões foram preparados e analisados por Windmöller *et al.* (2017) usando a diluição sólida. Como não há material de referência que registre os teores de Hg em diferentes estados de oxidação, foi realizada a análise do mesmo material de referência usado para validar a quantificação HgT (GBW 08301) e comparou-se a soma dos resultados quantificados em cada patamar (de 50 a 700 °C) com o valor certificado para HgT.

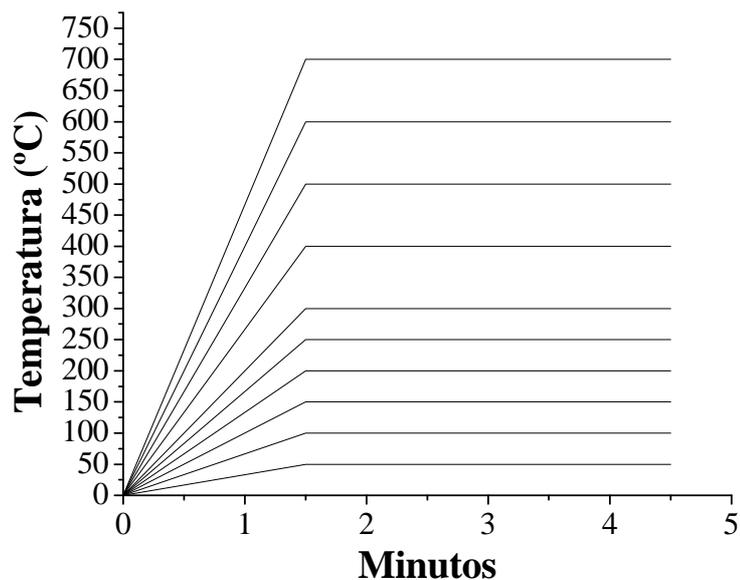


Figura 3.7: Programas de aquecimento independentes utilizados para especiação de Hg por termodesorção no DMA-80.

3.3.6 Caracterização química das amostras de sedimento

3.3.6.1 Determinação da Concentração de Elementos Maiores por FRX

As amostras de sedimento na fração menor que 2 mm secas ao ar foram maceradas e encaminhadas para o laboratório de fluorescência de raios-x do Departamento de Geologia, Escola de Minas da Universidade Federal de Ouro Preto. Para a preparação das pastilhas utilizou-se 1 g da amostra, 6 g do fundente (tetraborato de lítio e metaborato de lítio 1:1) e 0,090 g de brometo de lítio. Foi determinado o teor de SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂, MnO, MgO, CaO, Na₂O, K₂O, P₂O₅.

3.3.6.2 Análise do Teor de Matéria Orgânica (MO)

As amostras de sedimento na fração menor que 2 mm secas ao ar foram maceradas e encaminhadas para análise do carbono orgânico, hidrogênio e nitrogênio, o qual foi realizado pelo instrumento analisador elementar de CHN. A amostra de sedimento foi oxidada com O₂ em alta temperatura, sendo o CO₂, H₂O e N₂ separados por uma coluna composta de CuO/vanadato de Ag e assim determinados. O cálculo da

porcentagem de matéria orgânica foi obtido pela multiplicação do teor de C orgânico por um fator de 1,72, que considera que o carbono participa com 58% da composição da fração húmica (Radojević & Bashkin, 1999). Para avaliação do grau de humificação, foi calculada a razão C/N (Radojević & Bashkin, 1999).

3.3.6.3 Determinação de S total

A análise de S total foi realizada no instrumento Leco SC632 na Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os padrões certificados foram utilizados para calibração do instrumento: padrão 502-309 lote 1006 Soil; padrão 502-318 lote 1009 Ore Tailings Calibration Material; padrão 502-319 lote 1014 Ore Tailings Calibration Material; e padrão KZK Acid Base Accounting Material CANMET.

3.3.7 Quantificação de CH_3Hg^+ utilizando o sistema CG-pyro-AFS

A quantificação de CH_3Hg^+ foi realizada no sistema CG-pyro-AFS. Todos os parâmetros otimizados da coluna cromatográfica e da etapa de derivatização e trapeamento descritos no capítulo 2 foram utilizados nessa etapa.

3.3.7.1 Extração de CH_3Hg^+ em amostras de sedimento

As amostras de sedimento coletadas em Descoberto-MG foram submetidas a um sistema de destilação mencionado no item 2.7 (Capítulo 2) utilizando o procedimento modificado de Horvat *et al.* (1993). Pesaram-se massas de aproximadamente cerca de $(0,1000 \pm 0,0001)$ a $(0,5000 \pm 0,0001)$ g de amostras de sedimentos em tubos de teflon, adicionou-se 30 mL de água ultrapura, 500 μL de H_2SO_4 8,0 mol L^{-1} e 200 μL de KCl 20% m v^{-1} . Os tubos de teflon para recolhimento do destilado continham 5 mL de água ultrapura e foram colocados em banho de gelo. As amostras foram destiladas em temperatura de 125 °C sob fluxo de nitrogênio a 61 mL min^{-1} , até que 75% do volume do destilado fossem coletados.

Então, o destilado foi diluído para 50 mL, e em seguida, transferido para o frasco de reação do sistema de derivatização e trapeamento. Adicionou-se 300 μL de

solução tampão de $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ e 50 μL de solução de NaBEt_4 . Aguardou-se 17 minutos para o contato dos reagentes (tempo de reação), em seguida, purgou-se com gás N_2 a 91 mL min^{-1} por 25 minutos. Os traps foram secos com gás N_2 por 6 minutos e analisados individualmente no sistema CG-pyro-AFS. A temperatura da CG foi mantida em 35 $^\circ\text{C}$ e a vazão do gás Ar (fase móvel) foi de 17 mL min^{-1} .

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Concentração de Hg total

A concentração de HgT encontrada para o material de referência certificado (GBW 08311) foi $(227 \pm 10) \mu\text{g kg}^{-1}$. Esse valor corresponde à 103% de recuperação, mostrando assim uma boa exatidão do método. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para esta técnica foram de 0,97 e 1,07 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (para massa de amostra 0,3000 g), respectivamente.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados de HgT, CH_3Hg^+ , porcentagem de CH_3Hg^+ , MO, C/N, S total, FRX e porcentagem de espécies de Hg obtidas pelos registros por termodesorção de todas as amostras de sedimentos coletadas nas estações de seca e chuva.

A concentração de HgT nas amostras de sedimentos variou de 44 a 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação seca e de 5,8 a 183 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação chuvosa, em amostras coletadas ao longo do Córrego Rico e do Ribeirão do Grama, mostrando claramente uma diminuição nas concentrações na estação chuvosa. Sabe-se que a diferença de precipitação pluviométrica entre as duas estações é bastante grande. Possivelmente uma precipitação pluviométrica maior arraste material particulado contaminado com Hg. As amostras de sedimentos retiradas da caixa de sedimentação, A1 e A2, apresentaram concentrações discrepantes em comparação às outras coletadas nos rios Rico e Grama. A caixa A1 apresentou HgT de 41580 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação seca e 3581 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação chuvosa. Na caixa de sedimentação A2, as concentrações de Hg durante a estação seca e durante a estação chuvosa foram 3835 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 2312 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Presume-se, portanto, que na estação seca o material particulado contendo Hg é retido nos tanques de sedimentação por mais tempo, como também observado por Durão Júnior *et al.*, (2009). Durante a estação chuvosa, este material é arrastado para o rio e as partículas mais finas do sedimento se espalham e dilui o Hg no sistema hídrico.

Tabela 3.2: Resultados de HgT, CH₃Hg⁺, MO, C/N, S total, FRX e porcentagem de espécies de Hg obtidas nas análises por termodesorção nas amostras de sedimento coletadas em Descoberto (MG).

	Amostras	*HgT (µg kg ⁻¹)	*CH ₃ Hg ⁺ (µg kg ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)	*MO (%)	*C/N	*S Total (%)	Al ₂ O ₃ (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	MnO (%)	(Hg ⁰ + Hg ²⁺) (Até 150° C) (%)	Hg ²⁺ (lábil) (200 a 300° C) (%)	Hg ²⁺ (> 300 °C) (%)
Estação seca	A1 CS	41580 ± 5	8,0 ± 0,9	0,02	6,4 ± 0,4	8,4 ± 1,1	0,034 ± 0,007	8,25	4,32	0,036	6,1	84,4	9,4
	A2 CS	3835 ± 7	1,33 ± 0,07	0,04	8,1 ± 0,2	8,4 ± 0,8	0,047 ± 0,002	8,47	4,38	0,059	2,2	97,6	0,2
	A3 RG	45 ± 10	<0,04	0,19	0,61 ± 0,01	1,42 ± 0,16	0,011 ± 0,004	9,54	10,04	0,071	4,5	50,3	45,2
	A4 RG	44 ± 5	0,21 ± 0,04	0,48	0,61 ± 0,01	1,54 ± 0,38	<0,01	8,55	9,96	0,063	7,5	43,1	49,4
	A5 CR	44 ± 2	0,139 ± 0,009	0,32	1,16 ± 0,04	1,55 ± 0,14	<0,01	8,16	7,30	0,095	3,7	38,6	57,7
	A6 CR	266 ± 2	1,87 ± 0,33	0,70	7,7 ± 0,2	7,3 ± 1,0	0,039 ± 0,004	19,34	14,67	0,125	2,2	92	5,8
	A7 CR	74 ± 3	0,29 ± 0,01	0,39	1,5 ± 0,1	2,09 ± 0,67	0,0107 ± 0,0008	10,12	7,52	0,094	4,4	52,4	43,2
	A8 CR	74 ± 1	0,23 ± 0,06	0,31	1,56 ± 0,06	2,21 ± 0,32	0,0121 ± 0,0003	12,43	9,81	0,141	1,7	30,9	67,4
	A9 CR	175 ± 1	0,63 ± 0,09	0,36	3,8 ± 0,2	3,48 ± 0,23	0,025 ± 0,002	16,86	12,45	0,136	1,4	60,1	38,5
	A10 CR	141 ± 5	0,51 ± 0,11	0,36	3,7 ± 0,1	3,38 ± 0,13	0,020 ± 0,004	16,53	11,50	0,131	2,1	55,0	42,9
Estação chuvosa	A1 CS	3581 ± 235	0,77 ± 0,12	0,02	11,7 ± 0,2	6,8 ± 1,1	0,096 ± 0,021	16,8	5,7	0,10	0,2	99,5	0,3
	A2 CS	2312 ± 87	1,01 ± 0,13	0,04	4,31 ± 0,04	2,5 ± 0,4	<0,01	27,7	7,2	0,022	0,3	85,2	14,5
	A3 RG	73 ± 3	< 0,04	-	0,44 ± 0,01	0,25 ± 0,07	<0,01	15,1	12,6	0,093	9,7	28,3	62,0
	A4 RG	41 ± 4	< 0,04	-	0,60 ± 0,05	0,35 ± 0,09	<0,01	18,0	10,6	0,041	3,4	62,8	33,9
	A5 CR	183 ± 5	0,35 ± 0,03	0,19	6,8 ± 0,5	4 ± 1	0,066 ± 0,0006	33,0	9,8	0,25	2,3	82,5	15,2
	A6 CR	36 ± 1	< 0,04	-	0,8 ± 0,2	0,48 ± 0,09	<0,01	18,5	7,7	0,18	11	30	59
	A7 CR	26 ± 1	< 0,04	-	0,53 ± 0,02	0,31 ± 0,07	<0,01	26,5	8,8	0,10	9,9	20,8	69,3
	A8 CR	5,8 ± 0,9	< 0,04	-	0,43 ± 0,02	0,25 ± 0,01	<0,01	17,5	8,0	0,20	16,2	25,2	58,5

Legenda: CS: caixa de sedimentação; RG: Ribeirão do Grama; CR: Córrego Rico.

*concentração média ± desvio padrão (n = 3)

**concentrações em mg kg⁻¹

Embora apenas as informações de HgT não sejam suficientes para prever possíveis efeitos biológicos do Hg nos sedimentos, os resultados foram comparados com os valores guias estabelecidos pelo *Canada Council of Ministers of the Environment* (CCME, 2001) denominados TEL (*Threshold effects level*) e PEL (*Probable effects level*) que são os mesmos para a legislação brasileira, CONAMA 454 (2012). As concentrações abaixo do valor de TEL representam baixa probabilidade de efeitos adversos à biota e concentrações acima do valor de PEL representam um provável efeito adverso à biota. Entre os valores PEL e TEL não é possível especular sobre a probabilidade de um efeito adverso. Os valores de TEL e PEL para o Hg no sedimento são 170 e 486 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A Figura 3.8 mostra as concentrações de HgT nas amostras de sedimentos e o valor TEL, exceto para A1 e A2 que possuem valores de HgT muito discrepantes.

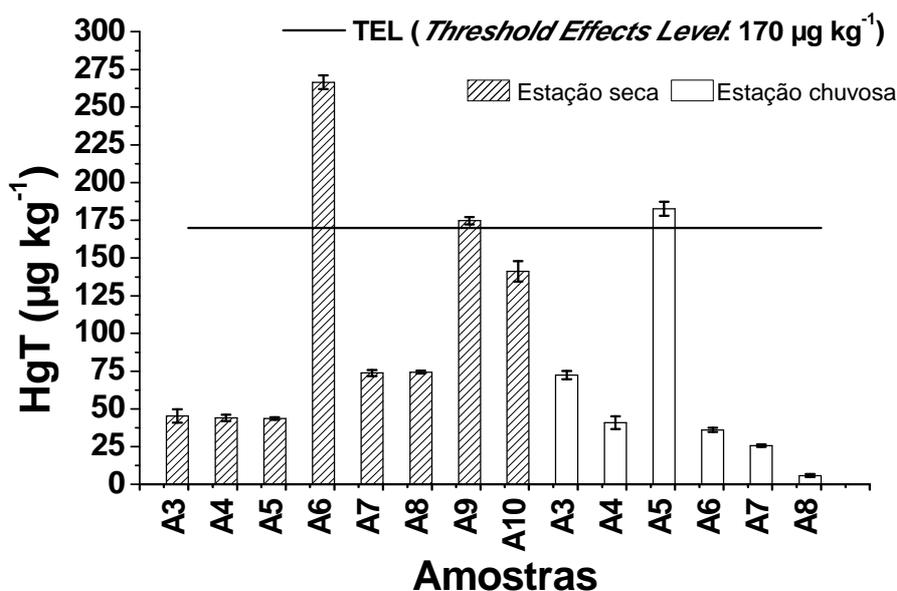


Figura 3.8: Concentração de HgT em amostras de sedimento do Córrego Rico e Ribeirão do Grama.

Observa-se que 11 das 14 amostras coletadas nos rios Rico e Grama, em ambas as estações, apresentaram concentrações abaixo dos valores de TEL. As amostras A6, A9 (ambas na estação seca) e A5 (estação chuvosa) mostraram concentrações de Hg entre os valores TEL e PEL, 266; 175 e 183 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, indicando a possibilidade de eventual ocorrência de efeitos adversos à biota. As amostras das caixas

de sedimentação (A1 e A2) mostraram concentração de HgT cerca de 85 e 8 vezes maior que a PEL durante a estação seca, respectivamente. Na estação chuvosa, também foi observado concentrações superiores ao estabelecido pelo guia. Isto indica um problema sério, dado que os valores acima do PEL representam um potencial efeito adverso à biota e o material destas amostras pode eventualmente ser transportado para o Córrego Rico durante a estação chuvosa.

É interessante observar na Figura 3.8 que a amostra A5 apresentou maior teor de HgT na estação chuvosa em comparação com a estação seca. Isto sugere que a água da chuva pode realmente transbordar da caixa de sedimentação e transportar as partículas mais finas presentes na área contaminada a partir do ponto A8 na direção do ponto A5 e assim serem acumuladas. Observa-se também que o Hg atingiu o ponto A3 (Ribeirão do Grama), uma vez que o teor de HgT também é maior na estação chuvosa. Existe uma diferença significativa ao nível de 95% entre a concentração de HgT para a amostra A3 coletados em diferentes estações, mostrando que o Hg está sendo transportado da área contaminada e atingindo o sistema hídrico. Isso representa um risco para a população local, considerando que o Ribeirão do Grama, geralmente, abastece a comunidade da cidade de Descoberto.

A FEAM (2005) realizou uma campanha de coleta de amostras de sedimento ao longo do Córrego Rico e Ribeirão do Grama em 2003. Ao todo 13 amostras foram coletadas, sendo 7 no Córrego Rico e 6 no Ribeirão do Grama. A Figura 3.9 apresenta as concentrações de HgT em mg kg^{-1} encontradas no sedimento nesses pontos de coleta (FEAM, 2005).

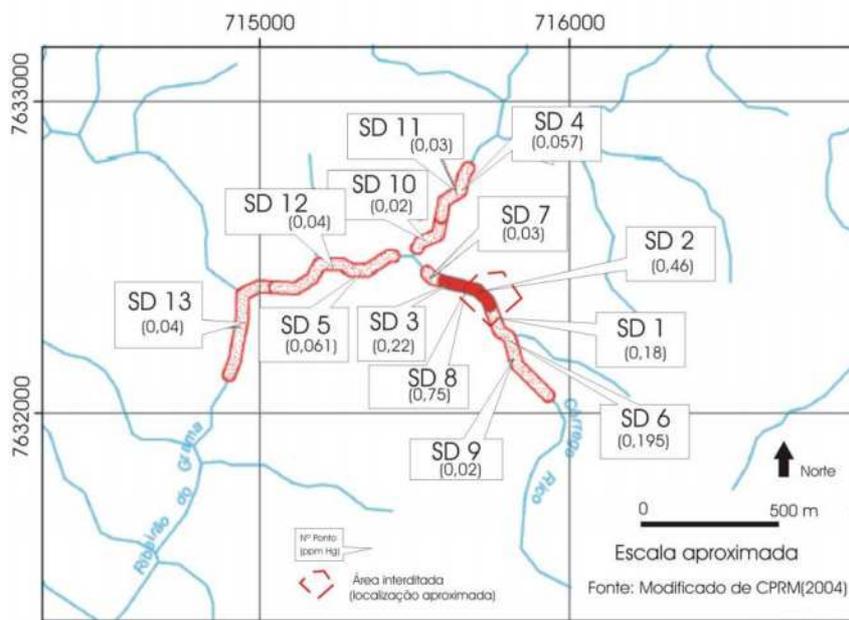


Figura 3.9: Pontos de amostragem e concentrações de Hg total (mg kg^{-1}) encontradas ao longo do Córrego Rico e no Ribeirão do Gramma pela FEAM (2005).

A FEAM encontrou, em 2005, concentração de HgT no Córrego Rico na faixa de 20 e $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ e no Ribeirão do Gramma na faixa de 20 e $61 \mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações encontradas neste trabalho ao longo do Córrego Rico variaram de 5,8 a $266 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 3.2) e as quatro amostras do Ribeirão do Gramma mostraram uma faixa de concentração de Hg de 41 a $73 \mu\text{g kg}^{-1}$. Embora os resultados obtidos 12 anos após o relatório da FEAM sejam semelhantes, isso mostra que Hg ainda está presente no local, em concentrações acima dos padrões de qualidade permitidos para as amostras A6, A9 e A5, conforme ilustrado na Fig. 3.8. Tinoco (2008) encontrou uma faixa de concentração HgT em sedimentos na mesma área deste trabalho ligeiramente superior, entre 130 e $610 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Durão Júnior (2010) encontrou concentrações de HgT em solo da área numa faixa de 0,0371 a 161mg kg^{-1} . Nos materiais das caixas e dos taques de retenção de águas de chuva as concentrações de Hg variaram de 3,30 a $79,0 \text{mg kg}^{-1}$ e 40,3 a $90,1 \text{mg kg}^{-1}$, respectivamente. Os teores encontrados por Durão Júnior (2010) são considerados muito elevados, visto que o valor orientado pela CETESB 45/2014, como área que deve sofrer intervenção, é de 12mg kg^{-1} .

Windmöller *et al.* (2007) realizaram um estudo sobre a distribuição e especiação de Hg em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG),

próximos dos municípios de Ouro Preto (MG) e Mariana (MG), regiões tradicionalmente caracterizados pela extração de minérios e de ouro. O local de coleta das amostras foi nos distritos: Bandeirantes, Furquim e Monsenhor Horta pertencentes à Mariana (MG) e Antônio Pereira pertencente à Ouro Preto. Nesses locais o Hg foi muito utilizado para atividade de garimpo de ouro. A concentração de HgT nas amostras variou de 40 a 1100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que em Antônio Pereira foi encontrado o maior teor. Esse local era o mais impactado em relação aos outros locais de coleta e era o único garimpo legalizado. As menores concentrações de Hg foram detectadas nas amostras coletadas em Bandeirantes, local onde o garimpo já estava desativado há anos. A espécie de Hg predominante nas amostras foi Hg^{2+} , o qual foi determinado por TDAAS (termodesorção acoplada à absorção atômica). De acordo com os tratamentos estatísticos, o HgT e Mn mostraram forte correlação nas amostras de sedimento.

Rhodes (2010) estudou os sedimentos do rio Gualaxo do Norte localizado nas proximidades do distrito de Antônio Pereira e Bento Rodrigues, região sudeste do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. A área avaliada foi fortemente afetada por atividades de exploração mineral de ferro e garimpo de ouro. As concentrações de HgT encontradas nos sedimentos do rio variaram de 140 a 530 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mostrando que apesar da atividade garimpeira ter diminuído na região, ainda havia teores de Hg consideráveis. Uma amostra ultrapassou o valor de PEL e às demais amostras apresentaram concentrações compreendidas entre TEL e PEL, exceto as amostras coletadas nos tributários que apresentaram valores abaixo de TEL. Na comparação do *background* para Hg proposto por Costa *et al.* (2003), de 190 $\mu\text{g kg}^{-1}$, apenas 3 amostras estavam com concentrações de Hg inferior a este valor, constatando ação antrópica nessa área.

É interessante comparar os níveis de Hg nos sedimentos de Descoberto com os observados em áreas onde a atividade de exploração de ouro ainda é generalizada, como no Quadrilátero de Ferro (MG) próximo aos municípios de Ouro Preto (MG) e Mariana (MG). Observa-se que a concentração de HgT encontrada no sedimento do Córrego Rico (5,8 e 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$) é menor do que a observada por Rhodes (2010) e Windmüller *et al.* (2007). Isso pode ser explicado pelo fato de que nessas áreas, a prospecção de ouro ainda é realizada, embora ilegal, o que não é o caso do Descoberto, onde essas atividades foram encerradas a por quase um século.

Estudos em outros países afetados pela mineração de ouro usando amalgamação com Hg ainda mostram atualmente, em geral, teor de HgT em sedimentos maiores que os encontrados neste trabalho. Pinedo-Hernández *et al.* (2015), por exemplo, encontraram HgT no intervalo de 196 e 1187 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de sedimento impactadas pela extração de ouro na Colômbia. Segundo os autores, a região de estudo, Mojana, recebe uma grande parte dos resíduos da maior mineração de ouro do país por meio de processos de alagamento que ocorrem durante a estação chuvosa. Güiza e Aristizábal (2013) afirmam que o aumento dos níveis de HgT na região de Mojana na última década deve estar relacionado com a proliferação de minas de ouro na Colômbia. De acordo com esses autores, o número de minas nesse país aumentou de 2000 para 4000 entre os anos 2002 e 2011. O estudo Reichelt-Brushett *et al.* (2016) em Buru Island, Indonésia, mostrou HgT variando de 4,23 a 82 mg kg^{-1} em sedimentos de vários locais a jusante de uma pequena mineração artesanal de ouro. Deve-se ressaltar que nesses estudos as atividades de mineração de ouro são recentes, o que não é o caso de Descoberto.

Uma tentativa de comparação pode ser feita também entre o caso de contaminação por Hg em Descoberto e os casos de outros locais contaminados, por exemplo, a oeste dos Estados Unidos (Bacia de Drenagem do Rio Carson, Nevada) (Bonzongo *et al.*, 1996) e norte da Geórgia (Leigh, 1997). Nesses locais a exploração de ouro empregava o Hg e mineração hidráulica, em que a alta densidade de Hg permite que o amálgama de ouro e Hg afundasse, enquanto a areia e o cascalho passavam sobre o Hg e através de uma comporta com água como forma de arrastar os materiais sólidos. Grandes volumes de água que fluíam através da calha e faziam com que muitas das partículas de ouro e Hg mais finas pudessem ser transportadas e podia espalhadas em uma grande área. No caso de Descoberto o Hg foi deixado pelos garimpeiros e soterrado com o tempo. A consequência é que o Hg não está espalhado em uma área grande o que torna possível a mitigação deste impacto ambiental.

3.4.2 Especiação de Hg

A Figura 3.10 apresenta os registros obtidos por Windmüller *et al.* (2017) para a análise de compostos de Hg padrão (preparados por diluição sólida dos compostos de Hg em matriz inerte), utilizando um programa de aquecimento no DMA por níveis de temperatura, idêntico ao das condições utilizadas neste trabalho. A liberação de Hg^0 ocorre principalmente a 50 °C e Hg_2^{2+} entre 100 e 150 °C. Portanto, a faixa de temperatura entre 50 e 150 °C corresponde à liberação de espécies reduzidas (Hg^0 e Hg_2^{2+}). As espécies oxidadas (Hg^{2+}) são liberadas acima de 200 °C e acima de 300 °C são as que interagem mais fortemente com a matriz.

A Figura 3.11 apresenta os registros obtidos para as análises das amostras deste estudo e a Tabela 3.2 mostra as porcentagens para cada espécie Hg, considerando a soma das concentrações de Hg correspondentes às espécies reduzidas (até 150 °C) e espécies oxidadas (temperaturas acima de 200 °C). As porcentagens de espécies oxidadas foram separadas em duas faixas de temperatura, de 200 a 300 °C e acima de 300 °C, a fim de enfatizar a porcentagem de Hg^{2+} mais lábil (de 200 a 300 °C) e o Hg^{2+} com maior interação com a matriz (acima de 300 °C).

A soma da concentração de Hg liberado nos patamares analisados foi comparada com a concentração de Hg total obtido na amostra. A recuperação obtida para as amostras variou de 83 a 300%. Em apenas quatro amostras das 18 avaliadas, o balanço de massa excedeu 100%, principalmente naquela que foi necessário a diluição sólida da amostra. Embora tenha observado uma recuperação alta nas quatro amostras, esse método contribuiu para discussão dos resultados, mostrando sua importância na avaliação qualitativa e quantitativa do estado de oxidação do Hg.

Observa-se que em todas as amostras há predominância de Hg^{2+} , isto é, Hg liberado em temperaturas acima de 200 °C (Tabela 3.2 e Figura 3.11). As porcentagens de Hg reduzido foram baixas, variando de 1,4 a 7,5 na estação seca e 0,2 a 16,2 na estação das chuvas (Tabela 3.2). A fonte de contaminação dessas amostras é Hg^0 e sabe-se que a oxidação ocorre no solo dessa área (Durão *et al.*, 2009; Windmüller *et al.*, 2015). Durão Júnior *et al.* (2009) também analisaram amostras dos tanques de retenção e uma amostra do *hotspot*⁴, observando-se a presença de Hg^0 apenas nas amostras com

⁴ Local dentro da área contaminada onde se encontram elevadas concentrações de Hg.

concentração de HgT muito alta. Esses autores mostraram que a amostra do *hotspot* (analisada sem homogeneização) mostra seções com Hg⁰, seções com uma mistura dos três estados de oxidação (Hg⁰, Hg₂²⁺ e Hg²⁺) e seções com Hg totalmente oxidado (Durão Júnior *et al.*, 2009). Portanto, não é surpresa que uma mistura de Hg⁰ e Hg₂²⁺ esteja presente como espécie reduzida em amostras das caixas de sedimentação no presente estudo.

A espécie Hg₂²⁺ é uma espécie menos estável em comparação com Hg²⁺ e, por isso, não é considerada na maior parte da análise de especiação. No entanto, é bem aceito que a espécie pode ser encontrada em solos e/ou sedimentos, como discutido principalmente em artigos sobre processos de oxidação e redução de Hg, utilizando análise de termodessorção onde a transição de Hg⁰ para Hg²⁺ e de Hg²⁺ para Hg⁰ mostrou um pico bem formado entre os picos de Hg⁰ e Hg²⁺ atribuídos a Hg₂²⁺ (Soares *et al.*, 2015; Windmüller *et al.*, 2015; Valle *et al.*, 2006; Windmüller *et al.*, 1996). O ambiente oxidante pode estar contribuindo para a oxidação do Hg e sua adsorção em partículas finas, aumentando, portanto, sua mobilidade.

Um comportamento semelhante foi observado por Windmüller *et al.* (2007), trabalhando com amostras de sedimentos do Quadrilátero de Ferro (MG). Este trabalho também mostrou a predominância de Hg oxidado, essa espécie e Mn foram agrupados por análise de cluster, indicando correlação entre esses parâmetros. A MO e o mineral argila atuam estabilizando o Hg²⁺ formado e facilitam o equilíbrio para a oxidação de Hg. A oxidação mediada por bactérias também é considerada uma via importante (Barkay *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1998).

A comparação dos vários gráficos da Figura 3.11 evidencia que as amostras A2 e A6 são as que não apresentaram picos de Hg em temperaturas mais altas (acima de 300 °C). Isto sugere que o Hg tem uma menor interação com a matriz, sendo possível sua disponibilização para o ambiente pelo processo de solubilização e/ou volatilização. Nas amostras A4, A5 e A8, observa-se uma predominância de Hg²⁺ liberada acima de 300 °C com porcentagens de 49,4; 57,7 e 67,4% (Tabela 3.2), respectivamente. Nesse caso, o Hg tem interações mais fortes com a matriz, pois necessita de uma maior temperatura para ser liberado. Essas amostras apresentam baixas concentrações de HgT.

Para comparação dos gráficos da termodessorção obtidos para as estações seca e chuvosa foram selecionadas as amostras A1, A5 e A7 (Figura 3.12). A amostra A1, de

uma das caixas de sedimentação, mostra que grande parte do Hg^{2+} é liberada até 300 °C. Deve-se ressaltar que a inexistência dos picos de Hg nas temperaturas mais altas (600 °C e 700 °C) não implica na ausência de espécies de Hg fortemente ligadas a matriz, uma vez que, nessas amostras, os teores de HgT são mais elevados. Por isso, não foi possível observar a presença dessas espécies. Quando a concentração de Hg é muito baixa, como no caso das amostras A5 (estação seca) e A7 (estação chuvosa), é possível observar com mais facilidade que existem espécies de Hg fortemente ligadas à matriz, visto que os picos de concentração ficam ampliados nas temperaturas mais altas (600 °C e 700 °C).

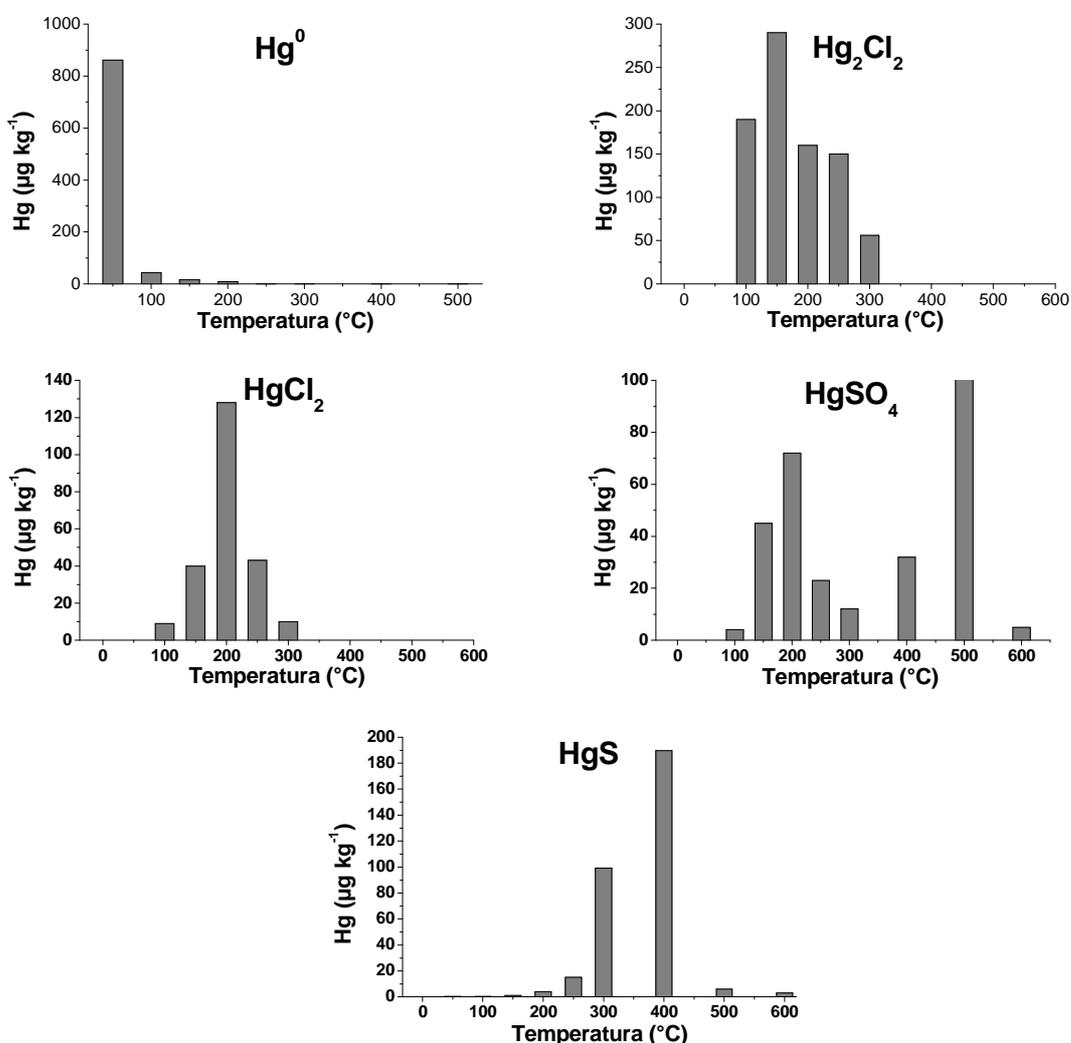


Figura 3.10: Gráficos da termodesorção dos padrões de Hg (Windmüller *et al.* 2017).

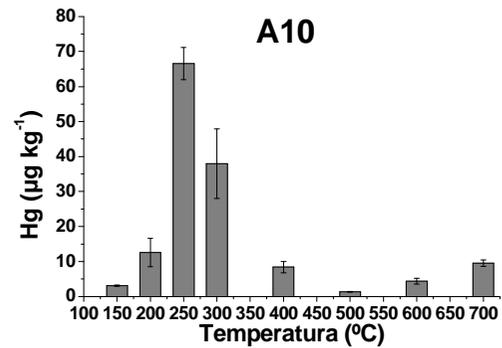
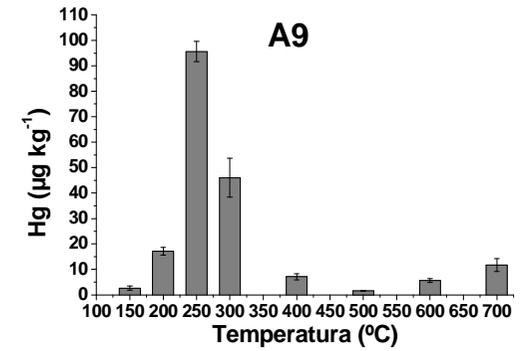
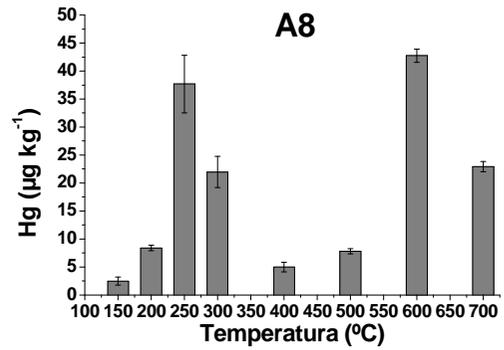
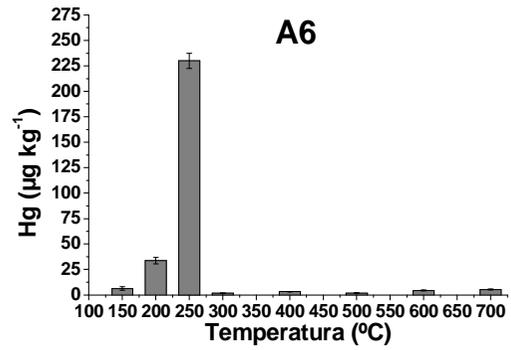
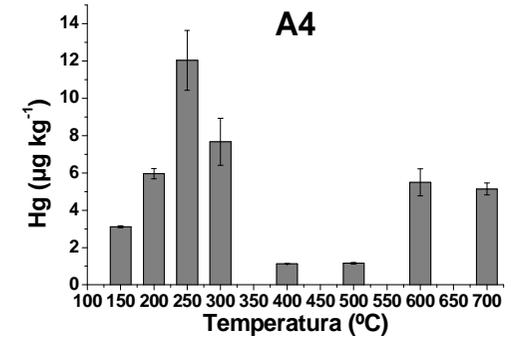
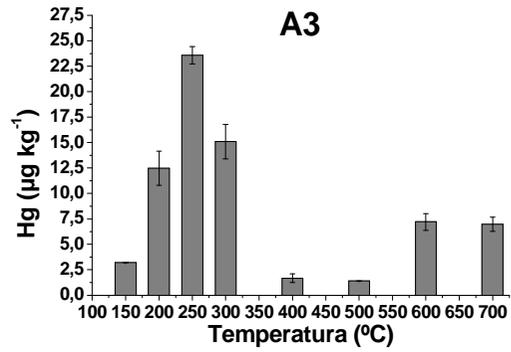
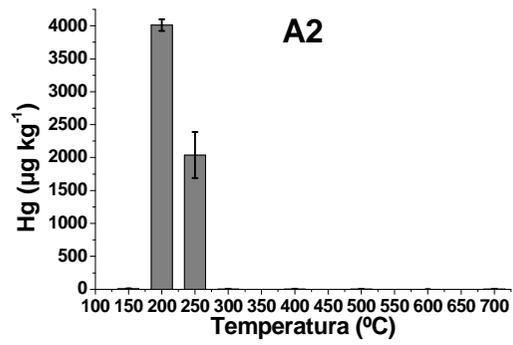


Figura 3.11: Gráficos da termodesorção de Hg em amostras de sedimentos coletadas em Descoberto-MG na estação seca.

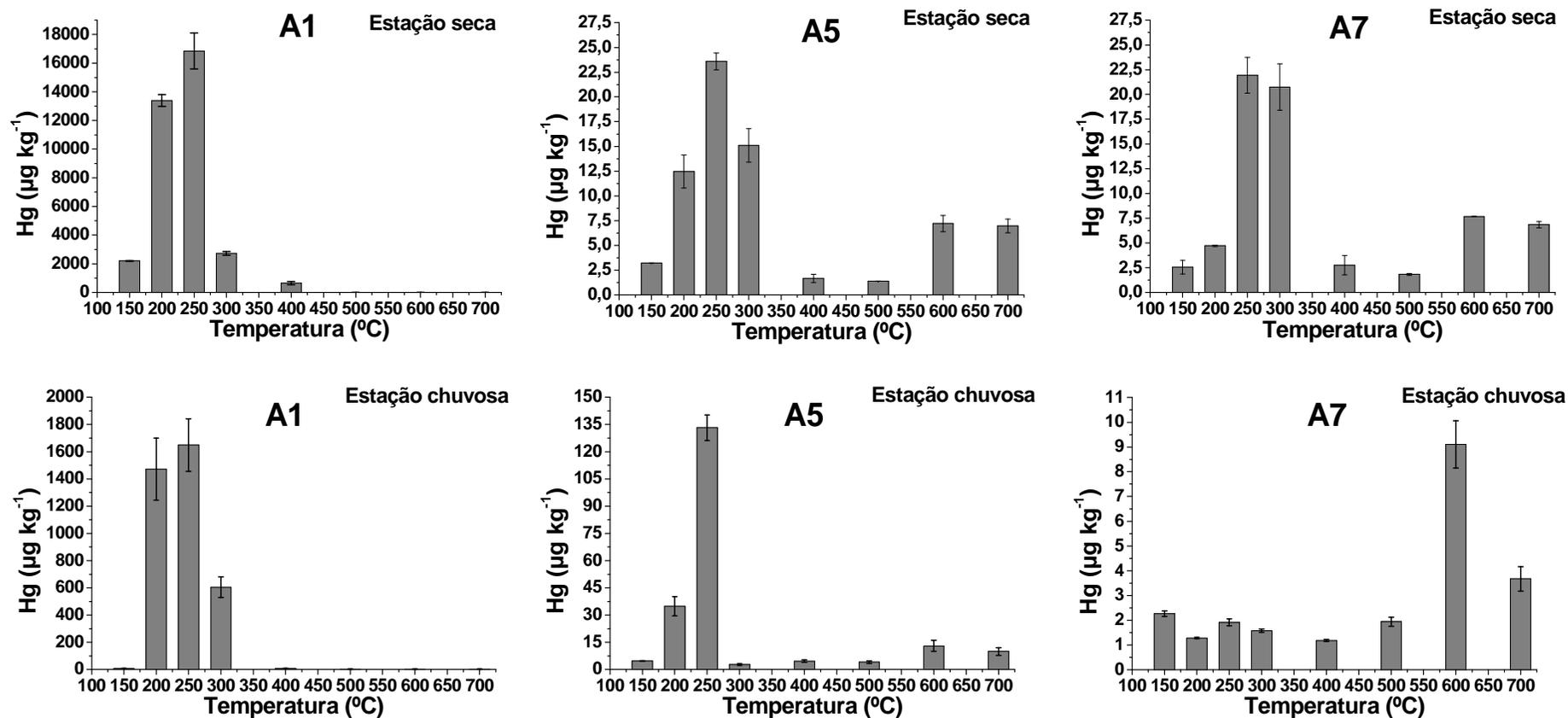


Figura 3.12: Gráficos da termodesorção de Hg em amostras de sedimentos coletadas em Descoberto-MG nas estações seca e chuvosa.

A amostra A8 mostra um comportamento atípico, isto é, única amostra que apresentou a concentração de Hg mais elevada à temperatura de 600 °C, indicando a presença de um composto de Hg altamente estável (Figura 3.11). O gráfico desta amostra é semelhante ao padrão HgSO₄ (Figura 3.10), sugerindo uma possível presença desta espécie.

A predominância dos processos de oxidação sobre a redução do Hg nos solos tem sido observada em outros trabalhos, como por exemplo, em solos da Amazônia e Minas Gerais (Valle, 2005; Valle *et al.*, 2006). Windmöller *et al.* (2015) investigaram o processo redox de Hg em amostras de solo da mesma área contaminada deste estudo. Os estudos cinéticos da conversão de Hg⁰/Hg²⁺ nas amostras de Descoberto mostraram que o mecanismo de oxidação ocorreu mais rapidamente e em maior extensão que a redução. Os autores afirmam que a composição dos solos desta área favorece a oxidação do Hg no local. Segundo Windmöller *et al.* (2015), a oxidação facilita a interação do metal com as finas partículas do solo que podem ser lixiviadas pela chuva. A forma oxidada torna possível a sua metilação (Windmöller *et al.* (2015).

A análise estatística de Pearson mostrou boas correlações de Hg²⁺ com MO (r = 0,850; p <0,05), C/N (r = 0,827; p <0,05) e S total (r = 0,789; p <0,05). A forte interação de Hg²⁺ com S (compostos inorgânicos e orgânicos) já é bem conhecida, o que justifica as correlações observadas. A Tabela com os resultados da análise estatística de Pearson encontra-se no Apêndice.

O grau de humificação do MO no solo e nos sedimentos pode ser avaliado pela razão C/N. De acordo com Jordão *et al.* (2000) os valores de C/N abaixo de 20 indicam a decomposição total da MO no ambiente e acima de 30 a decomposição é muito baixa. Todas as amostras de sedimentos mostraram valores de C/N abaixo de 20 (Tabela 3.2), sugerindo que há um alto grau de decomposição da MO no local de coleta, condição que, entre outras, poderia favorecer o transporte de Hg²⁺ e eventualmente a metilação de Hg.

3.4.3 Concentração de CH₃Hg⁺

A concentração de CH₃Hg⁺ em amostras de sedimento coletadas Córrego Rico e no Ribeirão do Grama variou de <0,04 a 1,87 µg kg⁻¹ durante a estação seca (Tabela 3.2). Na estação chuvosa, apenas uma amostra apresentou concentração de CH₃Hg⁺ acima do LD,

amostra A5, com $0,35 \mu\text{g kg}^{-1}$ de CH_3Hg^+ . Vale ressaltar que esta amostra foi a única com maior concentração HgT na estação chuvosa. Para as amostras A1 e A2, coletadas nas caixas de sedimentação, a concentração de CH_3Hg^+ foi maior durante a estação seca, $8,0$ e $1,33 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Na estação chuvosa a concentração de CH_3Hg^+ nestas amostras foi de $0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1,01 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O cromatograma obtido para a amostra A1 (estação seca) está apresentado no Apêndice.

As porcentagens de CH_3Hg^+ variaram de $0,02$ a $0,7\%$, sendo que o valor mais baixo corresponde à amostra com maior concentração de HgT (amostra de uma das caixas) e o maior valor corresponde à amostra do Córrego Rico com maior concentração de HgT (A6). Marrugo-Negrete *et al.* (2015) estudaram amostras de sedimentos de pântanos tropicais na Colômbia (Great Achi e Ayapel) impactadas pela mineração de ouro. Os autores encontraram menor porcentagem de CH_3Hg^+ na amostra com a maior concentração de HgT. A concentração de HgT nos sedimentos de Great Achi variou de 543 a $1021 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a porcentagem de CH_3Hg^+ variou entre 3 e 7% , enquanto que para amostras de Ayapel o teor de HgT variou de 145 a $313 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a porcentagem de CH_3Hg^+ variou de 5 a 11% . Estas são, em geral, porcentagens mais elevadas em comparação com este trabalho. Esta diferença é esperada porque as condições de pântanos em termos de maior conteúdo de matéria orgânica e menores taxas de fluxo de água favorecem a metilação do Hg.

Outro estudo de pesquisa do mesmo grupo, Pinedo-Hernandez *et al.* (2015), estudaram os sedimentos superficiais afetados pela mineração de ouro artesanal de pequena escala na região de Mojana, na Colômbia. Os pesquisadores encontraram concentração de HgT entre $196,2$ e $1187,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ e concentração de CH_3Hg^+ significativamente correlacionadas com HgT e MO, representando entre $1,7\%$ e $3,6\%$ da HgT, ou seja, também superior aos resultados aqui obtidos. Segundo os autores, a temperatura foi o parâmetro que favoreceu a metilação devido ao aumento da atividade biológica em temperaturas mais altas na estação seca (Pinedo-Hernandez *et al.* 2015).

A correlação de Pearson (Tabela em Apêndice) entre HgT e CH_3Hg^+ encontrada neste trabalho, exceto as amostras da caixa, foi positiva e muito alta ($r = 0,878$; $p < 0,05$). Esta informação sugere que a metilação aumenta com o aumento da HgT, mas deve haver uma concentração de Hg a partir da qual a metilação é inibida. As concentrações de CH_3Hg^+ também se correlacionaram positivamente com MO ($r = 0,824$; $p < 0,05$), C/N ($r = 0,931$; $p < 0,05$), Hg^{2+} lábil ($r = 0,727$; $p < 0,05$) e Fe_2O_3 ($r = 0,693$; $p < 0,05$). Os resultados

sugerem que os sedimentos da área de Descoberto apresentam características apropriadas para ocorrência da metilação, visto que esses parâmetros que foram correlacionadas são importantes nesse processo. Vale ressaltar que outras variáveis também contribuem para formação de CH_3Hg^+ no ambiente como: pH, temperatura e condições redox.

Embora as porcentagens de CH_3Hg^+ sejam baixas durante a estação seca (0,02 e 0,04%, respectivamente), os resultados mostraram que as concentrações deste poluente podem ser elevadas (até $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Observa-se que as concentrações de CH_3Hg^+ nas caixas podem atingir 8 vezes os valores encontrados nos sedimentos do Córrego Rico e no Ribeirão do Grama e, portanto, os resultados indicam que deve-se ter cuidado para evitar o transporte deste material para o sistema hídrico.

A amostra A1 na estação seca mostrou que apenas 6,1% do HgT está nas formas Hg^0 e Hg_2^{2+} e apresentou a menor porcentagem de CH_3Hg^+ (0,02%, Tabela 3.2) em comparação com as outras amostras. Por outro lado, a porcentagem de Hg^{2+} lábil, correlacionou-se fortemente com a concentração de CH_3Hg^+ ($r = 0,727$; $p < 0,05$), ambos sugerindo que o Hg oxidado favorece a metilação do metal.

O estudo de Feng *et al.* (2011) mostrou que as condições redox são muito importantes para a metilação do Hg e que isso diminui com a profundidade da água e do sedimento, ou seja, das condições óxicas para anóxicas. Um trabalho realizado por Eckley *et al.* (2015), nos sedimentos de Cottage Grove Reservoir, a oeste de Oregon, EUA, mostrou que nos sedimentos das zonas inundadas, as concentrações de CH_3Hg^+ das camadas mais superficiais 0 e 2 cm são claramente mais elevadas quando comparadas com camadas mais profundas (até aproximadamente $2,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ que corresponde à 0,9% de CH_3Hg^+). Os autores também observaram concentrações e porcentagens aumentadas de CH_3Hg^+ em sedimento de água de inundação quando comparadas com áreas permanentemente inundadas, isto é, meio redox favorece a metilação do metal. Estas camadas também tinham concentrações de carbono orgânico e sulfato mais elevadas (Eckley *et al.*, 2015).

A Tabela 3.3 mostra a comparação dos resultados das concentrações de CH_3Hg^+ obtidos neste estudo com outros trabalhos. Eles são comparáveis às concentrações de CH_3Hg^+ em sedimentos marinhos conforme estudado por Beldoswisk *et al.* (2014) e Carrasco & Vassileva (2015), mas os valores são menores que os sedimentos dos rios estudados por Pinedo-Hernández *et al.* (2015), sedimentos de pântanos estudados por

Marrugo-Negrete *et al.* (2015) e solo de turfa por Pietila *et al.* (2015). Embora apresente uma faixa de concentração menor, o resultado deste trabalho mostrou que a concentração pode ser tão elevada quanto $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, o que significa que a possibilidade de biocumulação e biomagnificação não pode ser desconsiderada.

Tabela 3.3: Concentração de CH_3Hg^+ e porcentagens de CH_3Hg^+ em relação ao HgT encontrada em sedimentos desse estudo e outras pesquisas.

	¹ Presente estudo	² Marrugo-Negrete <i>et al.</i> (2015)	³ Beldowski <i>et al.</i> (2014)	³ Carrasco & Vassileva (2015)	⁴ Pietilä <i>et al.</i> (2015)
CH_3Hg^+ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	<0,07 – 8,03	8 – 68	0,061 – 0,94	~0,89 – ~7,5	0,8 – 18
CH_3Hg^+ (%)	0,02 – 0,7	3 – 11	0,12 – 1,05	<0,4	1,2 – 12

¹ Sedimento de rio/caixa de sedimentação

² Sedimento de pântano

³ Sedimento marinho

⁴ Solo de turfa

No local investigado, a metilação ocorre principalmente por um processo aeróbio, uma vez que as amostras coletadas são sedimentos superficiais. Realizando-se análise microscópica da água coletada na caixa de sedimentação, onde a concentração de CH_3Hg^+ foi maior ($8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$), verificou-se a presença de microalgas e cianobactérias. Diante dessa observação, sugere-se que a metilação na caixa de sedimentação possa ser mediada por esses micro-organismos. Alguns experimentos foram realizados com as microalgas e cianobactérias coletadas nessa caixa de sedimentação a fim de avaliar a metilação do Hg^{2+} . Os resultados serão abordados no capítulo 4.

Sabe-se que processo biológico de metilação mediado por micro-organismos e fungos pode ocorrer via reação de transmetilação. A metilcobalamina, conhecida também como vitamina B12, é uma coenzima produzida pelas bactérias aeróbicas e anaeróbicas. A formação de CH_3Hg^+ no ambiente através desse composto, deve-se à transferência de um grupo metila para o Hg na forma oxidada, ou seja, Hg^{2+} (Barkay *et al.*, 2003; Bisinoti & Jardim, 2004). Vale ressaltar que a metilcobalamina está amplamente distribuída no ambiente (Bisinoti & Jardim, 2004), e que possivelmente, essa coenzima também é

produzida no local investigado. Sabe-se que outros parâmetros como pH, temperatura, concentração de MO, concentração de sulfeto, condições redox também influenciam o processo de metilação (Achá *et al.*, 2011), atuando juntos ou separadamente (Bisinoti & Jardim, 2004), pois cada um contribui diferentemente para formar CH_3Hg^+ . A metilação abiótica também não pode ser descartada e seria necessário um estudo sistemático para entender melhor as condições e mecanismos que esta reação poderia estar ocorrendo.

3.5 CONCLUSÃO

Após 15 anos da descoberta da contaminação por Hg em uma área rural de Descoberto, Brasil, o presente trabalho mostrou a presença de Hg em sedimentos próximos à área em concentrações que excedem o valor de qualidade estabelecido pelo Conselho Canadense de Meio Ambiente ($170 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $490 \mu\text{g kg}^{-1}$). Concentrações elevadas de HgT foram encontradas nos sedimentos das caixas de sedimentação, mesmo na estação chuvosa, quando em geral a concentração de HgT foi muito menor que na estação seca.

Um dos pontos de coleta no Córrego Rico apresentou maior concentração de HgT na estação chuvosa, indicando o transporte e a possibilidade de acumulação de Hg dependendo do fenômeno de transporte de partículas. Esse ponto situa-se próximo do Ribeirão do Grama, no qual também foi encontrado em uma das amostras um teor de HgT maior na estação chuvosa, confirmando a lixiviação desse metal da área contaminada para o sistema hídrico. Considerando que o Ribeirão do Grama abastece a comunidade da cidade de Descoberto, esse transporte de Hg pode representar um risco para a população local.

A análise de termodesorção mostrou predominância de Hg^{2+} , embora a fonte de contaminação de Hg na área de estudo seja Hg^0 . A oxidação do Hg, observada nos estudos de termodesorção, é um passo essencial antes da metilação e os resultados deste estudo apóiam outros resultados de autores que mostraram a facilidade de oxidação do Hg em solos tropicais. A análise de termodesorção também mostrou que na estação chuvosa, durante a qual a concentração de HgT foi, em geral, menor que na estação seca, o Hg foi liberado a temperaturas mais altas, o que significa que o Hg que permanece no sedimento é mais fortemente ligado a esta matriz.

A concentração de CH_3Hg^+ nas amostras de sedimentos no Córrego Rico e no Ribeirão do Grama variou de $<0,04$ a $1,87 \mu\text{g kg}^{-1}$ e nas amostras de caixas de sedimentação as concentrações foram de $1,33$ e $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação seca. A concentração de CH_3Hg^+ apresentou bons coeficientes de correlação de Pearson com HgT ($r = 0,878$, $p < 0,05$), Hg^{2+} (lábil) ($r = 0,727$, $p < 0,05$), MO ($r = 0,824$, $p < 0,05$), C/N ($r = 0,931$, $p < 0,05$) e Fe_2O_3 ($r = 0,693$, $p < 0,05$). A amostra com a maior porcentagem de HgT como Hg^{2+} (98%) também apresentou a maior porcentagem de CH_3Hg^+ (0,7%), corroborando a tese de que onde a oxidação está acontecendo, a metilação pode ser favorecida. Os sedimentos da área de Descoberto apresentaram características apropriadas para ocorrência da metilação, visto que os parâmetros correlacionados são importantes nesse processo.

Estes valores são muito preocupantes, mostrando que deve ser tomado cuidado para evitar o transporte deste material para os Córregos e mais estudos sobre a transferência do Hg na cadeia alimentar seriam muito importantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHÁ, D.; HINTELMANN, H.; YEE, J. 2011. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere*, v. 82, p. 911 – 916.
- ALEXANDRE, S. C. 2006. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto – Minas Gerais. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Dissertação de Mestrado, pp. 53.
- ANVISA N° 42/2013. <http://www.abic.com.br/publique/media/RDC42-2013-ContaminantesInorganicos.pdf> (acessado em julho de 2017).
- BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Rev.* 27, 355 – 384.
- BELDOWSKI, J.; MIOTK, M.; BELDOWSKA, M.; PEMPKOWIAK, J. 2014. Total, methyl and organic Mercury in sediments of the Southern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 87, 388 – 395.
- BISINOTI, M. C. & JARDIM, W. F. 2004. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Química Nova* 27, 593 – 600.
- BONZONGO, J. C.; HEIM, K. J.; WARWICK, J. J.; LYONS, W. B. 1996. Mercury levels in surface waters of the Carson river-Lahontan reservoir system, Nevada: influence of historic mining activities. *Environmental Pollution* 92, 193 – 201.

- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2015. Determination of methylmercury in marine sediment samples: Method validation and occurrence data. *Analytica Chimica Acta* 853, 167 – 178.
- CCME (Canadian Environmental Quality Guidelines). 2001. http://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/index.html (acessado em dezembro de 2015).
- CETESB N° 45/2014. <http://www.promatecambiental.com.br/downloads-legislacao/valores-orientadores-2014.pdf> (acessado em julho de 2017).
- CONAMA N° 357/2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama> (acessado em março de 2017).
- CONAMA N° 420/2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama> (acessado em julho de 2017).
- CONAMA N° 454/2012. <http://www.mma.gov.br/p0ort/conama> (acessado em julho de 2016).
- COSTA, A. T.; NALINI, JR., H. A.; LENA, J. C.; FRIESE, K.; MAGES, M. 2003. Surface water quality and sediment geochemistry in the Gualaxo do Norte basin, eastern Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Environmental Geology*, v. 45, p. 226 – 235.
- DURÃO JÚNIOR, W. A.; PALMIERI, H. E. L.; TRINDADE, M. C.; BRANCO, O. E. A.; CARVALHO FILHO, C. A.; FLEMING, P. M.; da SILVA, J. B. B.; WINDMÖLLER, C. C. 2009. Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Environmental Monitor* 11, 1056 – 1063.
- DURÃO JÚNIOR, W. A. 2010. Especificação, quantificação, distribuição e transporte de mercúrio em solos contaminados do município de Descoberto, Minas Gerais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, pp. 142.
- ECKLEY, C.S.; LUXTON, T.P.; MCKERNAN, J.L.; GOETZ, J.; GOULET, J. 2015. Influence of reservoir water level fluctuations on sediment methylmercury concentrations downstream of the historical Black Butte Mercury mine, OR, *Applied Geochemistry* 61, 284-293.
- FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente). 2005. Diagnóstico da contaminação ambiental em Descoberto, Minas Gerais, em decorrência do afloramento de mercúrio em dezembro de 2002. Publicação FEAM-RT-DIMOG-001/2005, publicação CDTN-945/2005, Belo Horizonte-MG, pp. 166.
- FEAM & CDTN. 2006. Diagnóstico da contaminação ambiental em Descoberto, Minas Gerais, em decorrência do afloramento de mercúrio em dezembro de 2002. Relatório final, Belo Horizonte, pp. 199.
- FENG, X.; BAI, W.; SHANG, I.; HE, T.; QIU, G.; YAN, H. 2011. Mercury speciation and distribution in Aha Reservoir which was contaminated by coal mining activities in Guiyang, Guizhou, China, *Applied Geochemistry* 26, 213-221.
- GÜIZA, L. & ARISTIZÁBAL, J. D. 2013. Mercury and gold mining in Colombia: a failed state. *Univ. Sci.* 18, 33 – 49.

- HORVAT, M.; BLOOM, N. S.; LIANG, L. 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 281, 135 – 152.
- JORDÃO, C. P.; ALVES, N. M.; PEREIRA, J. L.; BELLATO, C. R.; ALVAREZ, V. H. V. 2000. Adsorção de íons Cu^{2+} em latossolos vermelho-amarelo húmico. *Química Nova*, 23, 5 – 11.
- LEIGH, D. S. 1997. Mercury-tainted overbank sediment from past gold mining in north Georgia, USA. *Environmental Geology* 30, 244 – 251.
- MARRUGO-NEGRETE, J.; PINEDO-HERNÁNDEZ, J.; DÍEZ, S. 2015. Geochemistry of Mercury in tropical swamps impacted by gold mining. *Chemosphere* 134, 44 – 51.
- PALMIERI, H.E.L.; FLEMING, P. M.; BRANCO, O. E. A.; MENDES, L. A.; CARVALHO FILHO, C. A.; CINTRA, M. O. C.; FAGUNDES, O. R.; FORTES, F. A. 2009. Avaliação Ambiental após Seis Anos do Afloramento de Mercúrio na Zona Rural do Município de Descoberto, MG. In: XII Congresso Brasileiro de Geoquímica/VIII International Symposium on Environmental Geochemistry, Ouro Preto.
- PIETILÄ, H.; PERÄMÄKI, P.; PIISPANEN, J.; STARR, M.; NIEMINEN, T.; KANTOLA, M.; UKONMAANAHO, L. 2015. Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods. *Chemosphere* 124, 47-53.
- PINEDO-HERNÁNDEZ, J.; MARRUGO-NEGRETE, J.; DÍEZ, S. 2015. Speciation and bioavailability of Mercury in sediments impacted by gold mining in Colombia. *Chemosphere* 119, 1289-1295.
- PORTARIA Nº 2914/2011 (Ministério da Saúde). http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf. (acessado em julho de 2017).
- RADOJEVIĆ, M. & BASHKIN, V. N. 1999. *Practical Environmental Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Chapter 5, pp. 274 – 377.
- REICHELDT-BRUSHETT, A. J.; STONE, J.; HOWE, P.; THOMAS, B.; CLARK, M.; MALE, Y.; NANLOHY, A.; BUTCHER, P. 2016. Geochemistry and mercury contamination in receiving environments of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environmental Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.007>. In press.
- RHODES, V. P. 2010. Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos de área afetada por garimpo de ouro – Rio Gualaxo do Norte, Mariana – MG. Programa de Pós Graduação em Evolução Crustal e Recursos Naturais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Dissertação de mestrado, pp. 113.
- SMITH, T.; PITTS, K.; MCGARVEY, J. A.; SUMMERS, A. O. 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, $\text{Hg}(0)$. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1328 – 1332.
- SOARES, L. C.; EGREJA FILHO, F. B.; LINHARES, L. A.; WINDMÖLLER, C. C.; YOSHIDA, M. I. 2015. Accumulation and oxidation of elemental mercury in tropical soils. *Chemosphere* 134, 181 – 191.

- TINÔCO, A. A. P. 2008. Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto – MG. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Dissertação de mestrado, pp. 89.
- VALLE, C. M. 2005. Especificação, quantificação, distribuição e comportamento redox do mercúrio em alguns solos da região de Manaus, AM. Programa de Pós Graduação em Ciências – Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Tese de doutorado, pp. 139.
- VALLE, C. M.; SANTANA, G. P.; WINDMÖLLER, C.C. 2006. Mercury conversion processes in Amazon soils evaluated by thermodesorption analysis. *Chemosphere* 65, 1966 – 1975.
- WINDMÖLLER, C. C. 1996. Especificação de mercúrio em solos contaminados por análise de termodesorção acoplada à absorção atômica. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, tese de doutorado, pp. 118.
- WINDMÖLLER, C. C.; SANTOS, R. C.; ATHAYDE, M.; PALMIERI, H. E. L. 2007. Distribuição e especificação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). *Química Nova* 30, 1088 – 1094.
- WINDMÖLLER, C. C.; Durão Júnior, W. A.; Oliveira, A.; Valle, C. M. 2015. The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): implications for the mercury cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 112, 201 – 211.
- WINDMÖLLER, C. C.; SILVA, N. C.; ANDRADE, P. H. M.; MENDES, L. A.; VALLE, C. M. 2017. Use of a direct mercury analyzer® for mercury speciation in different matrices without sample preparation. *Analytical Methods (Print)* 9, 2159 – 2167.

CAPÍTULO 4

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CH_3Hg^+ EM ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS

4.1 INTRODUÇÃO

O CH_3Hg^+ é uma espécie tóxica, possui alta mobilidade no meio ambiente, facilidade de se bioacumular em organismos vivos e se biomagnifica na cadeia trófica (Lázaro *et al.*, 2013; Carrasco *et al.*, 2011). Como já mencionado no Capítulo 1, a formação dessa espécie no meio ambiente se dá pela metilação do Hg^{2+} . Esta ocorre pela transferência de um grupo metila de compostos orgânicos, reação que necessita de ser catalisada por micro-organismos ou mediada por um processo fotoquímico (Morel *et al.*, 1998).

Em um ensaio simultâneo onde foram avaliadas a metilação do Hg e a redução do sulfato nos sedimentos de mangue por consórcio de micro-organismos (bactérias sulfato-redutoras (SRB), bactérias ferro-redutoras (IRB), metanogênicas e fungos) realizado por Correia & Guimarães (2017), observou-se que as SRB são metiladoras importantes de Hg. No entanto, os autores sugerem que a atividade SRB não poderia explicar toda formação de CH_3Hg^+ no local estudado. Segundo Correia & Guimarães (2017), isso implica na participação direta ou indireta de outros micro-organismos como o IRB e os metanogênicas, devido uma relação complexa entre esses grupos. O uso de Cicloheximida (um inibidor eucariótico) não afetou significativamente a metilação do Hg ou a taxa de redução do sulfato, sugerindo que os eucariotos, como fungos, provavelmente não estão envolvidos nesses processos nos sedimentos de mangue (Correia & Guimarães, 2017).

Em geral, espécies organomercuriais de cadeia curta, como o CH_3Hg^+ , podem atravessar com facilidade a membrana celular. O radical alquila confere à molécula o caráter lipofílico (Micaroni *et al.*, 2000). Uma vez que o CH_3Hg^+ também é solúvel em água e é facilmente absorvido pelos microorganismos (Tomiyasu *et al.*, 2000), ele tende a se bioacumular, principalmente devido à sua afinidade por grupos sulfidríla de

proteínas presentes dentro das células (Micaroni *et al.*, 2000). Essa ligação Hg-S desestabiliza a estrutura protéica e diminui a atividade enzimática, resultando numa diminuição do desempenho dos organismos (Boyd & Barkay, 2012; Nies, 2003). Como consequência da bioacumulação, o Hg se biomagnifica na cadeia alimentar e pode alcançar os seres humanos. Um dos efeitos de sua intoxicação aguda e crônica são danos irreparáveis no sistema nervoso central (Micaroni *et al.*, 2000), que foi evidenciado por alguns desastres ambientais envolvendo contaminação por Hg, como o famoso caso de Minamata ocorrido na década de 60.

As cianobactérias são um grupo de organismos procariontes fotossintetizantes capazes de colonizar diversos habitats (Kosek *et al.*, 2016; Vicent, 2002), sendo encontradas na coluna d'água (pelágicas) ou sedimentos (bentônicas) que recebem radiação luminosa, e também em solos úmidos (Hoffmann, 1999). Sua parede celular se assemelha às das bactérias Gram-negativas: externamente à membrana celular está presente uma camada de peptidoglicano, envolvida por uma membrana externa. Possuem como pigmentos a clorofila *a*, ficobiliproteínas e glicogênio como carboidrato de reserva. Algumas espécies possuem uma camada de mucilagem externa formada por polissacarídeos (Lee, 2008). As cianobactérias fazem parte da comunidade fitoplanctônica (Pelechata *et al.*, 2016), exercendo o papel de produtores primários, e são uma das portas de entrada do CH_3Hg^+ na cadeia alimentar aquática (Lázaro *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que nessa complexa comunidade, constituída de microalgas (micro-organismos eucariontes fotossintetizantes), protozoários, bactérias, fungos e outros organismos, as cianobactérias se destacam por sua presença em uma ampla variedade de ambientes (Carey *et al.*, 2012). Além disso, as cianobactérias exercem grande importância na estruturação de biofilmes devido à produção de abundante camada de exopolissacarídeos, base para a instalação de uma complexa comunidade microbiana (Rossi & Philippis, 2015; Noffke *et al.*, 2003). O estudo realizado por Lázaro *et al.* (2013) no Pantanal, Brasil, mostrou que a metilação do Hg foi correlacionada com a comunidade fitoplanctônica e que a variação sazonal também influencia nesse processo. A maior taxa de produção de CH_3Hg^+ foi associada com as comunidades que cresceram na estação de inundação do Pantanal, indicando que as características ambientais deste período são as mais favoráveis para a formação de CH_3Hg^+ nos lagos da planície de inundação. Logo, as cianobactérias desempenham

importantes papéis ecológicos que dão suporte às fases de bioacumulação e a biotransformação do Hg, influenciando de forma muito importante na biogeoquímica desse elemento. No estudo de Coelho-Souza *et al.* (2006) foi observada uma ligeira produção de CH_3Hg^+ por culturas de cianobactérias após 2 dias de incubação, porém os autores ponderam que estudos são necessários para comprovar se todas as cianobactérias possuem a capacidade de metilação.

Por outro lado, Camacho *et al.* (2015), mostraram em seus estudos com biofilmes microbianos polares dominados por cianobactérias, que em períodos de curto prazo (48 h), esses biofilmes não são capazes de transformar o Hg^{2+} em CH_3Hg^+ em condições de campo. Os resultados indicaram que essas comunidades biológicas são capazes de acumular Hg, podendo atuar como “armadilhas” desse metal.

É importante salientar que além das cianobactérias estarem associadas à produção de CH_3Hg^+ , algumas bactérias aeróbicas e arquea⁵ possuem mecanismos de resistência que funcionam degradando compostos organomercuriais e reduzindo a concentração de Hg^{2+} , por sua transformação em Hg^0 gasoso, permitindo o crescimento microbiano (Lin *et al.*, 2012; Barkay *et al.*, 2003). As bactérias resistentes ao Hg abrigam o operon mer em seu genoma que inclui certos genes funcionais, sendo o mais comum *merA*, que codifica a redutase de íons mercúricos, e *merB*, responsável pela liase organomercurial (Figura 4.1). Entre as bactérias resistentes ao Hg, as que possuem o gene *merB* são mais valiosas, pois podem desintoxicar uma gama de formas tóxicas de Hg, ou seja, CH_3Hg^+ e outros compostos organomercuriais, juntamente com Hg inorgânico, para o Hg menos tóxico e volátil. Assim, as bactérias que abrigam esses genes podem ser utilizadas na biorremediação de Hg em locais contaminados por esse metal (Dash & Das, 2012; Boyd & Barkay, 2012). Segundo Boyd & Barkay (2012) esse processo pode ser um mecanismo de desintoxicação das bactérias. Outra forma de desintoxicação foi relatada por Gilmour *et al.* (2011) que mostraram que o CH_3Hg^+ é produzido dentro da célula, mas logo é expelido.

Estudos de especiação química do Hg trazem relevantes informações para o entendimento de toxicidade, mobilidade e disponibilidade do metal (Leermakers, *et al.*, 2005; NRC, 2003). Nesse caso, estudar a espécie CH_3Hg^+ nas cianobactérias se torna muito importante por ser possivelmente uma das primeiras matrizes onde o processo de

⁵ É a designação de um dos domínios de seres vivos.

metilação ocorre. Além de produzir essa espécie, as cianobactérias também podem bioacumulá-la. Vale ressaltar que existem poucos estudos sobre a metilação do Hg e quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de fitoplâncton ou culturas de cianobactérias em laboratório.

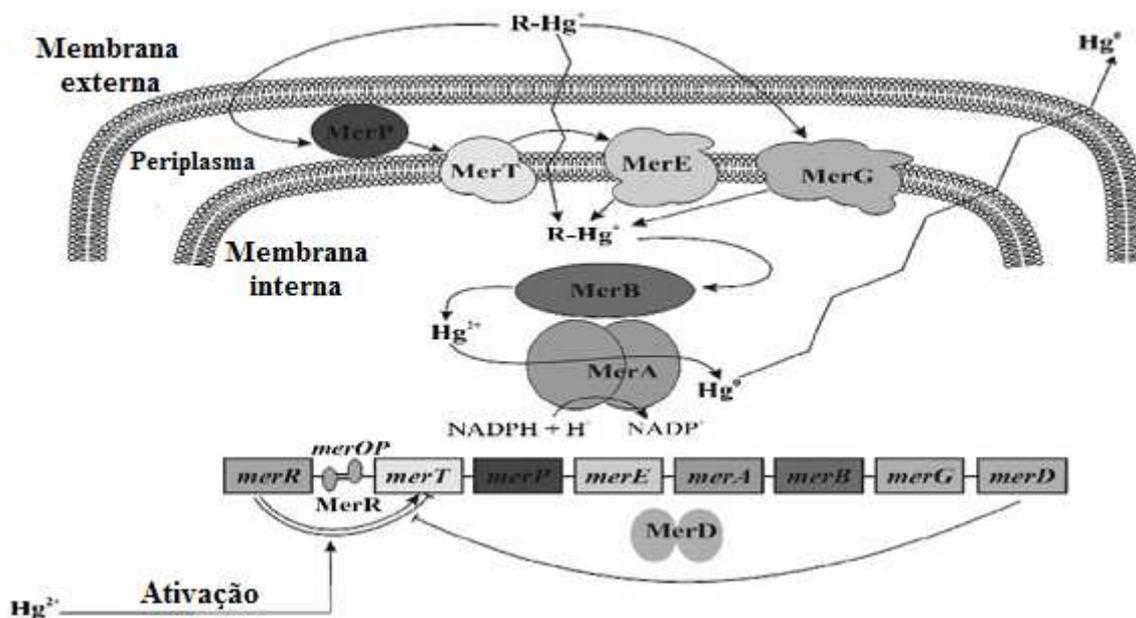


Figura 4.1: Desenho esquemático dos mecanismos de transformação/transporte do Hg em uma bactéria com genes *merA* e *merB* (modificado de Dash & Das, 2012).

4.2 OBJETIVO

Validar e aplicar o método para quantificação de CH_3Hg^+ pela técnica CG-pyro-AFS em organismos fitoplanctônicos que poderá ser utilizada como ferramenta importante para o estudo do ciclo biogeoquímico do Hg no ambiente, especificamente estudos de metilação.

4.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Validar um método para quantificação de CH_3Hg^+ em amostra de cianobactéria e microalga;
- ✓ Coletar e isolar a cianobactéria e a microalga provenientes da caixa de sedimentação da área contaminada de Descoberto e do córrego Rico;

- ✓ Realizar ensaios de estudo de metilação por cianobactéria e microalga coletadas da área de Descoberto – MG.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais, reagentes e soluções

Os recipientes, vidrarias e materiais para armazenagem e manipulações de amostras e soluções foram devidamente descontaminados em banho de ácido nítrico 10% v v⁻¹ por 24 horas e, em seguida, lavados com água ultrapura. Os reagentes utilizados foram de grau analítico e para o seu preparo utilizou-se água ultrapura (sistema milli-Q -Millipore – Bedford, MA, EUA) com resistividade 18,2 MΩ cm.

Os reagentes, soluções e gases utilizados na parte experimental desse trabalho foram: Solução padrão de CH₃HgCl 1000 µg L⁻¹ acidificada com 0,5% v v⁻¹ de CH₃COOH e 0,2% v v⁻¹ HCl (Brooks Rand Labs Instruments, USA); KOH (Macron Fine Chemicals, México); Metanol (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha); Solução tampão de acetato de sódio e ácido acético (2 mol L⁻¹, Brooks Rand Labs Instruments, USA); Solução de Tetraetilborato de sódio (NaBEt₄, Brooks Rand Labs Instruments, USA); Tetraetilborato de sódio (NaBEt₄, 97%) (Sigma Aldrich, USA); HCl (ACS ISO, Reag. Ph Eur., 37% v v⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha); CH₃COOH (grau HPLC, 99,7%, J.T.Baker, USA); gás Nitrogênio (grau de alta pureza; 99,997, Oxichama, Contagem, Brasil); gás Argônio (>99,9992, Air Products, São Paulo, Brasil).

4.3.2 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados nessa etapa do trabalho foram: balança analítica (Shimadzu, AUY 220); balança semi-analítica (Sartorius, BP3100S); banho termostático (QUIMIS, Q226M2), centrífuga (QUIMIS, Q222E24), liofilizador (Thermo Fisher Cientific, MODULYOD-230); vortex (Marconi, MA-162) e microscópio (AXIO, Scope.A1).

4.3.3 Instrumentação

Os instrumentos de análise utilizados neste trabalho foram: MERX, Sistema CG-pyro-AFS (*Brooks Rand Labs*, USA) e analisador direto de mercúrio (DMA -80, Milestone, Itália).

4.3.4 Cultivo e preparação das amostras de cianobactérias

A biomassa de cianobactéria utilizada na validação do método foi obtida de culturas da cepa de *Nostoc paludosum* BA033 (GenBank: KX423684) isolada de um curso de água em região de mineração em Minas Gerais no trabalho realizado por Franco (2014). Atualmente essa cepa está sendo mantida no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática - Banco de cultura de algas do LIMNEA no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram cultivadas em erlenmeyers com capacidade para 5 L, em meio de cultivo BG-11 (composição: Na₂Mg EDTA, Citrato férrico de amônia, Ácido cítrico.H₂O, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, K₂HPO₄.3H₂O, Na₂CO₃, H₃BO₃, MnCl₂.4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CuSO₄.5 H₂O, CoCl₂.6 H₂O, NaMoO₄.2 H₂O, NaNO₃) em condições de luz controlada (27 μmol cm⁻²) e temperatura (20 ± 1 °C). Após 40 dias de cultivo, a cultura foi centrifugada e liofilizada.

4.3.5 Extração de CH₃Hg⁺

Antes da construção da curva analítica foi testada a extração de CH₃Hg⁺ em amostras de cianobactéria utilizado os procedimentos propostos por Carrasco & Vassileva (2014) e Brooks Rand (2013) com algumas alterações. Pesou-se exatamente cerca de (0,1000 ± 0,0001)g de amostra de cianobactéria em tubo de teflon, adicionou-se 2 mL de solução 25% m m⁻¹ KOH/metanol e fechou-se o tubo conduzindo-o para um banho termostático a 75 °C por 3 horas. O extrato obtido foi avolumado para 10,00 mL. Agitou-se em vortex por 2 minutos e centrifugou-se a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 100,0 μL do extrato foram pipetados e adicionados em 50,0 mL de água ultrapura no frasco de reação da etapa de derivatização e trapeamento. Vale ressaltar que o volume do extrato para etapa de derivatização foi otimizado a fim de diminuir o limite de detecção. Os volumes testados foram: 20; 30; 50; 100; 200 e 500 μL.

4.3.6 Construção da curva analítica para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de cianobactéria

As curvas analíticas foram construídas em triplicata em solução aquosa e utilizando o método de ajuste de matriz, dopando a amostra de cianobactéria. As soluções foram preparadas a partir da solução padrão de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3HgCl , acidificadas com $0,5\% \text{ v v}^{-1}$ de CH_3COOH e $0,2\% \text{ v v}^{-1}$ HCl . Um volume de $1000 \mu\text{L}$ de soluções de CH_3HgCl de concentrações de $10,0$; $20,0$; $30,0$; $40,0$ e $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram adicionadas a exatamente cerca de $(0,1000 \pm 0,0001)\text{g}$ de amostra de cianobactéria liofilizada, correspondendo na alíquota final massas de: 100 ; 200 ; 300 ; 400 e 500 pg de CH_3Hg^+ , respectivamente. Em seguida, foi realizada a extração do analito da matriz (item 4.3.5), a derivatização, o trapeamento e a análise na CG-pyro-AFS.

A curva em solução aquosa foi construída sem a presença da matriz, transferindo para o frasco de reação $50,0 \text{ mL}$ de água ultrapura, $300 \mu\text{L}$ de solução tampão de $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ para ajustar o pH em torno de $4,9$ e $50 \mu\text{L}$ da solução de CH_3HgCl de concentrações de $2,0$; $4,0$; $6,0$; $8,0$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, correspondendo às massas de: 100 ; 200 ; 300 ; 400 e 500 pg de CH_3Hg^+ , respectivamente.

Adicionou-se $50 \mu\text{L}$ de solução de NaBEt_4 para o início da derivatização, aguardou-se 17 minutos para o contato dos reagentes, em seguida, purgou-se com gás N_2 a 91 mL min^{-1} por 25 minutos. Os traps foram secos com gás N_2 por 6 minutos e analisados individualmente no sistema CG-pyro-AFS. A temperatura da CG foi mantida em $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e a vazão do gás Ar (fase móvel) foi de 17 mL min^{-1} . A diferença entre a construção da curva analítica em solução aquosa e pelo método de ajuste de matriz é a etapa de extração do analito, necessária apenas para a segunda curva.

O branco da curva em solução aquosa foi preparado com $0,5\% \text{ v v}^{-1}$ de CH_3COOH e $0,2\% \text{ v v}^{-1}$ HCl e, em seguida, foi derivatizado para posterior análise. O branco da curva pelo método por ajuste de matriz foi preparado na presença da matriz cianobactéria, submetendo ao mesmo procedimento de extração utilizados (item 4.3.6) sem adição de padrão de CH_3HgCl , em seguida, foi derivatizado para posterior análise.

4.3.7 Figuras de mérito da validação

O guia de validação utilizado para avaliar os parâmetros de mérito dos métodos foi o DOQ-CGCRE-008 INMETRO (2016). Os parâmetros de validação estudados foram: efeito de matriz, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, recuperação e veracidade.

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (8 replicatas independentes analisadas no mesmo dia) e precisão intermediária (16 replicatas no total; conjuntos 8 replicatas independentes analisadas em dias diferentes) utilizando a massa de 250 pg de CH_3Hg^+ em solução aquosa, cujo nível está localizado próximo ao ponto central da curva analítica. Foi calculado o desvio padrão relativo e a recuperação. O material de referência DORM-3 (Proteína de peixe), cujo teor de CH_3Hg^+ é $(355 \pm 56) \mu\text{g kg}^{-1}$, e as amostras fortificadas (Spike) com solução de CH_3HgCl foram utilizadas para avaliação da exatidão do método. O procedimento de extração do CH_3Hg^+ do material de referência foi o mesmo utilizado para as amostras de cianobactéria com realização de diluição. A análise de 8 replicatas independentes dos brancos do procedimentos analítico (procedimento utilizado para as amostras somente com a presença dos reagentes) foram utilizados para cálculo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Assim como para as amostras de sedimento, os tratamentos estatísticos dos dados foram realizados no programa Excel versão 2007, seguindo as orientações de Souza *et al.* (2007) e Souza (2007) na avaliação da linearidade da curva analítica.

4.3.8 Aplicação do método e estudo de metilação

As amostras de cianobactéria e microalga obtidas para o estudo de metilação foram coletadas na área contaminada em Descoberto-MG. Foram coletadas 2 amostras de água: uma na caixa de sedimentação (A1) e outra no córrego Rico (Ponto A6). Através de análise microscópica verificou-se a presença de espécies de cianobactérias, microalga e diatomácea nas duas amostras. Posteriormente, realizou-se o isolamento dessas espécies de micro-organismos. Esses micro-organismos foram cultivados nas mesmas condições descritas no item 4.3.1. Uma espécie de cianobactéria e a microalga foram selecionadas para esse estudo, devido à maior taxa de crescimento dessas duas, obtendo uma maior quantidade de biomassa. A Figura 4.2 apresenta as micrografias

obtidas em microscópio óptico da cianobactéria e da microalga de gêneros, *Fischerella* sp. e *Stichococcus* sp., respectivamente. O isolamento, cultivo e identificação foram realizados pelos pesquisadores do laboratório LIMNEA.

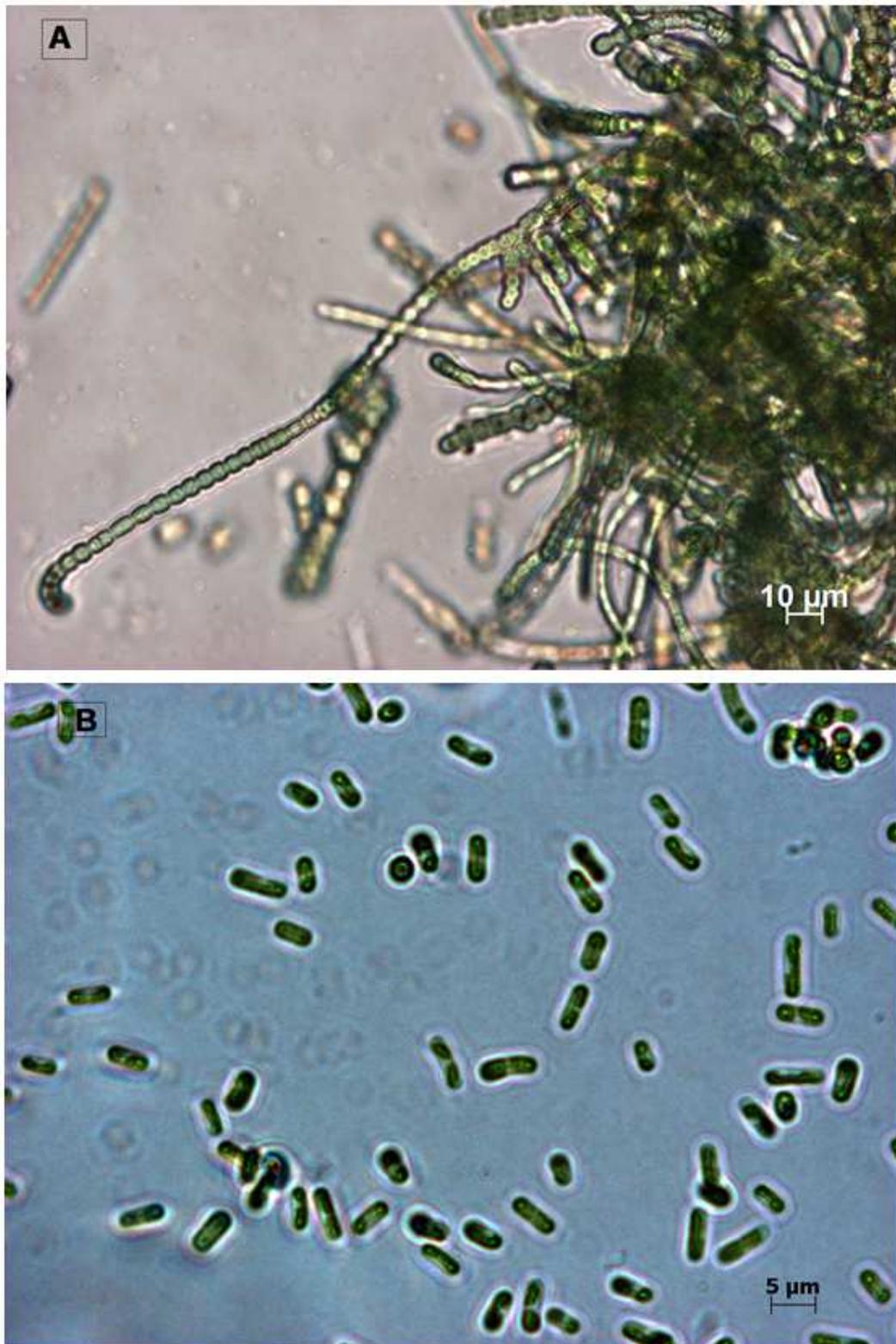


Figura 4.2: Micrografias obtidas em microscópio óptico: A) *Fischerella* sp. e B) *Stichococcus* sp.

A microalga e a cianobactéria, após o crescimento, foram dopadas separadamente com solução de HgCl_2 obtendo-se uma concentração final nas culturas de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A concentração utilizada foi baseada em testes de sobrevivência em concentrações crescentes de Hg com cianobactérias da espécie *Nostoc paludosum* BA033. Esse teste visa observar a inibição do crescimento da cianobactéria na presença de Hg, ou seja, a concentração de Hg que inibe 50% do crescimento do microorganismo.

Após 7 dias de exposição ao Hg essas amostras foram centrifugadas e lavadas por 3 vezes com água ultrapura para retirar qualquer resquício da solução-mãe que as envolviam. Em seguida, essas amostras foram congeladas e liofilizadas para posterior extração e quantificação de CH_3Hg^+ . A Figura 4.3 mostra uma foto do cultivo das cianobactérias.



Figura 4.3: Fotos do cultivo das cianobactérias.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os parâmetros da CG e da etapa de derivatização e trapeamento otimizados no Capítulo 2 foram usados para essa etapa do trabalho. Ressalta-se que as curvas, tanto nos sedimentos, quanto das cianobactérias foram feitas no mesmo período e que os dados da solução aquosa comparada com a curva em sedimentos, são os mesmos para comparação da curva em cianobactéria.

4.4.1 Efeito de matriz

Assim como na validação do método para quantificação de CH_3Hg^+ em sedimento, o efeito de matriz foi avaliado através da comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas do analito na ausência e na presença da matriz, utilizando o teste de Fisher e o t-Student, para avaliar eventuais diferenças entre os valores de variância dos coeficientes angulares e determinar se havia diferença significativa entre aqueles valores, respectivamente.

Os resultados obtidos para avaliar essa figura de mérito estão apresentados na Tabela 4.1. Os testes de hipótese foram realizados com nível de significância de 0,05 utilizando software Excel 2007.

Tabela 4.1: Resultados obtidos para avaliação do efeito de matriz entre a curva em solução aquosa e a curva em cianobactéria.

	Curva em solução aquosa	Curva por ajuste de matriz (cianobactéria)
*Média do Coeficiente angular \pm **DP	29,5 \pm 0,6	28,3 \pm 0,9
$F_{\text{calculado}}$		2,10
$F_{\text{crítico}}$		19,00
$T_{\text{calculado}}$		1,77
$T_{\text{crítico}}$		2,76

*média \pm DP (n = 3) **DP = desvio padrão

O teste F mostra que não há diferença significativa entre os desvios-padrão das inclinações da curva obtida em cianobactérias e a curva com solução aquosa. Os resultados mostram que também não há diferença significativa entre os valores dos coeficientes angulares das duas curvas. Portanto, não há efeito significativo da matriz e que a curva em solução aquosa pode ser usada para fins analíticos. Assim, como no caso da validação do método para sedimentos, todos os testes subsequentes foram realizados com a curva analítica de CH_3Hg^+ em solução aquosa. A Figura 4.4 mostra as curvas analíticas para quantificação de CH_3Hg^+ obtida em solução aquosa e por ajuste de matriz de cianobactéria.

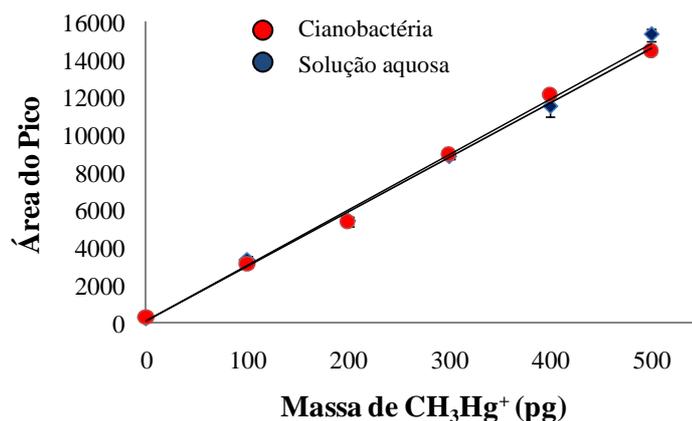


Figura 4.4: Curvas analíticas para quantificação de CH₃Hg⁺ obtidas em solução aquosa e na matriz de cianobactéria.

4.4.2 Linearidade e Regressão

Como não houve efeito de matriz, a linearidade e regressão foram avaliadas utilizando a solução aquosa. Por se tratar da mesma curva em solução aquosa na comparação da curva em sedimento, o tratamento dos dados foram os mesmos que apresentados no Capítulo 2 no item 2.4.4. Portanto, não serão apresentados novamente.

Observou-se que houve linearidade entre 100 a 400 pg, ao nível de 99% de confiança. A regressão foi significativa ($p < 0,05$), indicando que a faixa proposta atende as premissas para o uso do OLSM. Os dados da curva analítica obtida encontram-se na Tabela 2.6 e a curva analítica do CH₃Hg⁺ final está representada na Figura 2.14 apresentados no Capítulo 2.

4.4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD e o LQ foram calculados utilizando o sinal analítico de 8 brancos independentes. Para estes cálculos, o desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (b) foram considerados nas seguintes expressões:

$$LD = \frac{3,3s}{b} \quad LQ = \frac{10s}{b}$$

A diluição da matriz foi também considerada para o cálculo dos valores finais. O LD e LQ do método para quantificação de CH₃Hg⁺ em cianobactéria foi de 1,3 e 3,9 µg kg⁻¹,

respectivamente. Não há na literatura descrição de validação de metodologia para quantificação de CH_3Hg^+ em cianobactéria para que fosse possível comparar os valores aqui obtidos com os de outros autores, porém Faucheur *et al.* (2014) relatam que o fitoplâncton acumula entre 2 e 30 μg de CH_3Hg^+ por kg de algas marinhas em peso seco. Portanto, estes valores LD e LQ, permitem que o método seja aplicado para estudo de bioacumulação e metilação do Hg em cianobactérias.

4.4.4 Precisão e Exatidão

O efeito de matriz não sendo observado, os testes de repetibilidade e precisão intermediária foram realizados em solução aquosa com massa de 250 pg de CH_3Hg^+ . Esse teste foi discutido no Capítulo 2 no item 2.4.6 obtendo-se os mesmos resultados.

A exatidão foi realizada com testes de tendência/recuperação com uso de dopagem da amostra (*Spike* da amostra) e pelo uso de material de referência certificado de proteína de peixe, DORM-3. A cianobactéria foi dopada com solução de CH_3HgCl com massas de 50, 250 e 350 pg. Todas as dopagens (*Spike*) foram feitas em triplicata. Os resultados da exatidão estão dispostos na Figura 4.5.

A concentração de CH_3Hg^+ obtida para o DORM-3 (316 ± 5) $\mu\text{g kg}^{-1}$, cuja recuperação representa 89%. A recuperação do analito obtida nas amostras enriquecidas variou de 93 a 98%. De acordo com os critérios de aceitação estabelecida pelo guia INMETRO (2016), que estabelecem recuperações satisfatórias entre 80 % e 120 % (Green, 1996; EPA, 1992) o método proposto apresenta exatidão, em termos de porcentagem de recuperação, dentro do aceitável. Os resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas estão apresentadas na Tabela 4.2.

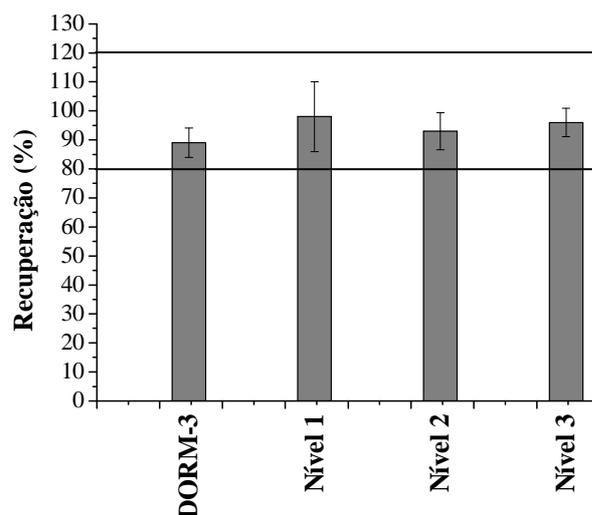


Figura 4.5: Resultados obtidos para material de referência e teste de tendência/recuperação.

Tabela 4.2: Resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas na validação do método.

Figuras de Mérito		
Limite de Detecção	1,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Limite de Quantificação	3,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Precisão		
Repetibilidade	RSD: 3%	Recuperação: 103%
Precisão Intermediária	RSD: 8%	Recuperação: 102%
Exatidão		
Material de referência Certificado	Recuperação: 89%	
Amostras enriquecidas com CH_3Hg^+	Recuperações: 93 – 98%	

4.4.5 Aplicação do método e estudo de metilação

O intuito deste teste foi avaliar a produção de CH_3Hg^+ nos micro-organismos encontrados na área contaminada de Descoberto-MG. Duas espécies diferentes foram selecionadas para este estudo, uma cianobactéria e uma microalga. Como descrito na metodologia, as culturas de células vivas foram cultivadas por 40 dias com temperatura e luminosidade controladas e em seguida, foram dopadas com uma solução de Hg^{2+} obtendo-se a concentração final de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ nas culturas. Após período de exposição, as duas culturas do ensaio foram retiradas e preparadas para a quantificação de CH_3Hg^+ .

A cianobactéria *Fischerella* sp. apresentou, após o ensaio, concentração de CH_3Hg^+ abaixo do LD do método ($1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$), que corresponde menos que 0,003% do HgT (peso seco), cuja concentração foi determinado pelo DMA-80. Já a microalga *Stichococcus* sp. apresentou uma produção dessa espécie organomercurial, com concentração de $(25 \pm 2) \mu\text{g kg}^{-1}$ após o ensaio, correspondendo à 0,23% do HgT (peso seco). Esses dados sugerem que a *Stichococcus* sp. pode ser um dos micro-organismos responsáveis pela metilação de Hg^{2+} no local estudado, visto que concentração de até $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi encontrada na amostra de sedimento da caixa.

Observou-se nos cromatogramas obtidos que o maior pico registrado corresponde ao Hg^{2+} , mostrando que essa espécie de Hg pode ter sido absorvida pela célula ou adsorvida na parede celular dos micro-organismos. A Figura 4.6 apresenta um cromatograma obtido para amostra de microalga, onde o pico do Hg^{2+} ultrapassa a escala do gráfico. Embora fique claro que houve metilação, essa proporção de CH_3Hg^+ foi muito baixa e torna-se importante que outros experimentos sejam realizados para se entender melhor em que condições esse micro-organismo promove a metilação do Hg e se outros micro-organismos presentes no local contaminado também estão contribuindo para esse importante processo do ciclo do Hg.

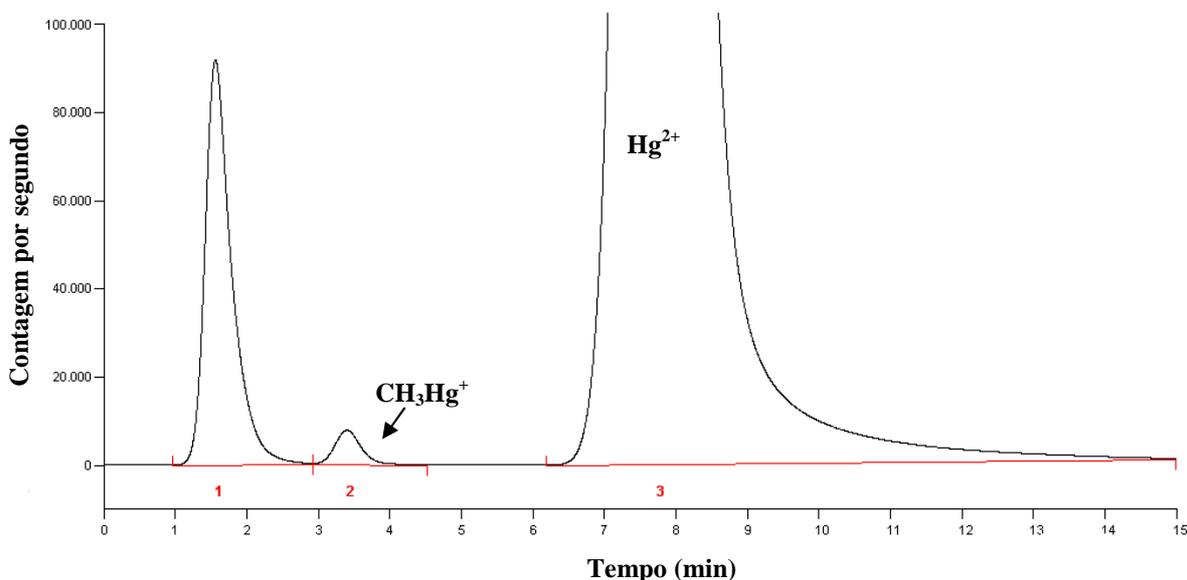


Figure 4.6: Cromatograma obtido para a microalga *Stichococcus* sp.

4.5 CONCLUSÕES

A validação de um método para quantificação de CH_3Hg^+ em amostras de cianobactéria usando CG-pyro-AFS foi sistematicamente estudada, visando sua aplicação em estudos futuros. A importância dessa matriz em estudos de áreas contaminadas por Hg é conhecida, pois as cianobactérias participam da biotransformação do Hg em CH_3Hg^+ . Não foi observado efeito de matriz, ou seja, a análise pode ser realizada construindo a curva em solução aquosa sem perda da confiabilidade dos resultados. O teste de tendência e recuperação mostrou-se adequados dentro dos critérios de aceitação de acordo com o guia de validação INMETRO. Foram obtidos baixos valores de LD e LQ que mostram a viabilidade de aplicação do método em estudos envolvendo cianobactérias. A metodologia descrita nesse capítulo é uma importante ferramenta para estudos de bioacumulação e metilação de Hg no ambiente, trazendo informações sobre o ciclo biogeoquímico do Hg.

O estudo da metilação pelos micro-organismos encontrados na área contaminada em Descoberto mostrou que a cianobactéria *Fischerella* sp. não apresentou capacidade de produzir CH_3Hg^+ nas condições estudadas, já a microalga *Stichococcus* sp. apresentou uma leve capacidade de metilação. Entretanto, mais ensaios devem ser realizados para comprovar tal reação. Vale ressaltar que esses são os primeiros estudos de metilação do Hg em organismos vivos provenientes dessa área contaminada, e, portanto, fazem-se necessários outros estudos de metilação com organismos fitoplanctônicos alterando alguns parâmetros considerados importantes para a biotransformação do Hg, tais como: pH, concentração de matéria orgânica, temperatura, concentração de sulfeto, dentre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOYD, E. S. & BARKAY, T. 2012. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Frontiers in Microbiology*. v. 3, p. 1 – 3.
- BROOKS RAND LABS. 2013. Application Note: Alkaline digestion of biological tissue for methylmercury analysis.

- CAMACHO, A.; ROCHERA, C.; HENNEBELLE, R.; FERRARI, C.; QUESADA, A. 2015. Total mercury and methyl-mercury contents and accumulation in polar microbial mats. *Science of the Total Environment*, v. 509 – 510, p. 145–153.
- CAREY, C. C.; IBELINGS, B. W.; HOFFMANN, E. P.; HAMILTON, D. P.; BROOKES, J. D. 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*. v. 46, p. 1394 – 1407.
- CARRASCO, L.; BARATA, C.; GARCÍA-BERTHOU, E.; TOBIAS, A.; BAYONA, J. M.; DÍEZ, S. 2011. Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). *Chemosphere*, v. 84, p. 1642–1649.
- CARRASCO, L. & VASSILEVA, E. 2014. Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, v. 122, p. 106 – 114.
- COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; MAURO, J. B. N.; MIRANDA, M. R.; AZEVEDO, S. M. F. O. 2006. Mercury methylation and bacterial activity associated to tropical phytoplankton. *Science of the Total Environment*, v. 364, p. 188 – 199.
- CORREIA, R. R. S. & GUIMARÃES, J. R. D. 2017. Mercury methylation and sulfate reduction rates in mangrove sediments, Rio de Janeiro, Brazil: The role of different microorganism consortia. *Chemosphere*, v. 167, p. 438 – 443.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1992. Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program SW-846 Methods, U.S., Washington D. C. 32p.
- FRANCO, M. W. 2014. Avaliação da qualidade ambiental no entorno de áreas de mineração e análise da exposição da cianobactéria *Synechococcus nidulans* a oxidações de arsênio. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Tese de doutorado, pp. 111.
- GREEN, J. M. 1996. Doing a thorough method validation can be tedious, but the consequences of not doing it right are wasted time, money, and resources: A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem.*, v. 68, p. 305 – 309.
- DASH, H. R. & DAS, S. 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 75, p. 207 – 213.
- HOFFMANN, L. 1999. Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *European Journal of Phycology*, v. 34, p. 371 – 379.
- INMETRO (DOQ-CGCRE-008). 2016. Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 05, 19 p.
- KOSEK, K.; POLKOWSKA, Z.; ZYSZKA, B.; LIPOK, J. 2016. Phytoplankton communities of polar regionse – Diversity depending on environmental conditions and chemical anthropopressure. *Journal of Environmental Management*, v. 171, p. 243 – 259.
- LÁZARO, W. L.; GUIMARÃES, J. R. D.; IGNÁCIO, A. R. A.; SILVA, C. J.; DÍEZ, S. 2013. Cyanobacteria enhance methylmercury production: A hypothesis tested in

- the periphyton of two lakes in the Pantanal floodplain, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 456 – 457, p. 231 – 238.
- LEE, R. E. 2008. Phycology. fourth ed. Cambridge University Press, Colorado, USA.
- LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; QUEVAUVILLER, P.; HORVAT, M. 2005. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 383 – 393.
- LIN, C. C.; YEE, N.; BARKAY, T. 2012. Microbial transformations in the mercury cycle In: *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*. Edited by: LIU, G.; CAI, Y.; O'DRISCOLL, N. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 155–191.
- MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. 2000. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamentos e descarte. *Química Nova*, v. 23, p. 487 – 495.
- MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 29, p. 543 – 566.
- NIES, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol.Rev.* v. 27, p. 313 – 339.
- NOFFKE, N.; GERDES, G.; KLENKE, T. 2003. Benthic cyanobacteria and their influence on the sedimentary dynamics of peritidal depositional systems (siliciclastic, evaporitic salty, and evaporitic carbonatic). *Earth-Science Reviews*. v. 62, p. 163 – 176.
- NRC (National Research Council). 2003. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, Tools and Applications. The National Academies Press, Washington, D.C.
- PELECHATA, A.; PELECHATY, M.; PUKACZ, A. 2016. Factors influencing cyanobacteria community structure in *Chara*-lakes. *Ecological Indicators*, v. 71, p. 477 – 490.
- ROSSI, F.; PHILIPPS, R. 2015. Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats. *Life*. v. 5, p. 1218 – 1238.
- SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. 2007. In-house method Validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 241 – 247.
- SOUZA, S. V. C. 2007. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Tese de Doutorado, 297 p.
- TOMIYASU, T.; NAGANO, A.; YONEHARA, N.; SAKAMOTO, H.; OKI, R. K.; AKAGI, H. 2000. Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediment. *The Science of the Total Environment*, v. 257, p. 121 – 132.

VICENT, W. F. 2002. Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions. In: The Ecology of Cyanobacteria. Whitton B.A, Potts M, editors. Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, p. 321 – 340.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse trabalho, foi possível concluir que após 15 anos do afloramento do Hg na área rural de Descoberto, a concentração desse metal em sedimentos ainda excede o valor de qualidade estabelecido pelo CONAMA 454/2011 ($170 - 486 \mu\text{g kg}^{-1}$), principalmente nas caixas de sedimentação que tem como objetivo reter o material carregado pela chuva. Porém, observou-se que na estação chuvosa, onde o nível de água é mais alto, essas caixas não são capazes de reter o material e este é transportado para os corpos hídricos próximos, possibilitando seu transporte como observado nos resultados obtidos em algumas amostras a jusante das caixas de sedimentação. Esse resultado mostra que mais estudos de monitoramento no local contaminado e nos seus arredores são imprescindíveis, a fim de evitar essa disseminação de Hg para comunidade próxima.

A principal fonte de Hg na área de estudo é o Hg^0 , porém a presença de Hg oxidado foi observada pela técnica de termodessorção, fato este importante para a interpretação dos resultados obtidos para a análise de CH_3Hg^+ . Sabe-se que a oxidação do Hg é um passo essencial antes da metilação. Os resultados de correlação sugerem que os sedimentos da área de Descoberto apresentam características apropriadas para ocorrência da metilação, embora outros parâmetros importantes nesse processo não tenham sido avaliados como: pH, temperatura e condições redox. A amostra com a maior porcentagem de HgT como Hg^{2+} (98%) também apresentou a maior porcentagem de CH_3Hg^+ (0,7%), esse fato pode estar associado com a metilação. Vale ressaltar que a técnica de termodessorção muito contribuiu para a discussão dos resultados, mostrando sua importância na avaliação quantitativa do estado de oxidação do Hg no ambiente.

O CH_3Hg^+ foi encontrado principalmente nas amostras retiradas das caixas de sedimentação, onde as maiores concentrações de HgT foram detectadas. Em uma das caixas de sedimentação, a concentrações de CH_3Hg^+ foi de até $8,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante a estação seca, valor esse preocupante, mostrando que maiores cuidados devem ser tomados para evitar o transporte desse material para os córregos. Uma vez disponibilizado, o CH_3Hg^+ pode ser absorvido por peixes presentes no Ribeirão do

Grama, bioacumulando e biomagnificando, podendo atingir a população local, visto que há consumo desses peixes pela comunidade da cidade de Descoberto. Diante disso, fazem-se necessários mais estudos sobre a transferência dessa espécie através da cadeia alimentar e estudos em conjunto com pesquisadores da área da medicina sobre o grau de contaminação da população na região.

Este trabalho também apresentou a validação de duas metodologias para a determinação de CH_3Hg^+ em amostras de sedimentos e organismos fitoplanctônicos utilizando a técnica CG-pyro-AFS. Essas duas matrizes têm grande importância em estudos do ciclo biogeoquímico do Hg em áreas contaminadas por esse metal. A descrição de métodos para determinar o CH_3Hg^+ na matriz de sedimentos é mais frequentemente apresentada na literatura, mas não é o caso da matriz de fitoplâncton. Portanto, a principal contribuição deste trabalho é a validação da metodologia para determinação do CH_3Hg^+ em amostras de organismos fitoplanctônicos.

Entre os parâmetros avaliados na otimização, destacam-se o aumento do tempo e a redução da vazão de gás N_2 na etapa de trapeamento, condições com as quais foram obtidos os melhores sinais analíticos. O efeito da matriz não foi observado para a metodologia aplicada em ambas as matrizes, possibilitando o uso da curva analítica de CH_3Hg^+ em solução aquosa sem prejuízo na confiabilidade dos resultados obtidos. Os testes de linearidade, precisão e tendência/recuperação foram adequados para o método proposto. Baixos LD e LQ foram obtidos tanto para as análises de organismos fitoplanctônicos, quanto para sedimentos. Embora não haja uma legislação brasileira consolidada sobre a concentração de CH_3Hg^+ nessas matrizes, os valores LD e LQ são adequados para uma possível comparação e discussão da contaminação por CH_3Hg^+ em amostras ambientais descritos na literatura. Essas metodologias são ferramentas importantes para serem utilizadas em análises de rotina, estudos de metilação de Hg por fitoplâncton e estudos de sedimentos em áreas vulneráveis à contaminação ambiental por Hg.

O estudo de metilação na cianobactéria *Fischerella* sp. e na microalga *Stichococcus* sp. encontradas na área de estudo mostrou que a última apresenta um maior potencial de metilação em relação à primeira. Embora, o resultado tenha apresentado uma ligeira metilação pela microalga, estudos variando alguns parâmetros

(pH, temperatura, MO, etc.), devem ser realizados para avaliar quais variáveis contribuem de forma mais significativamente nesse processo.

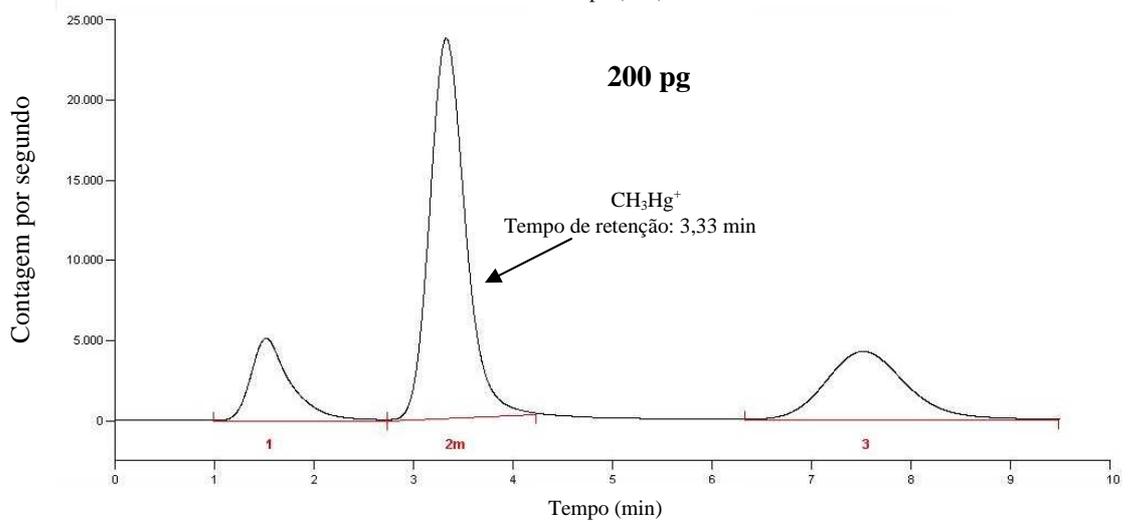
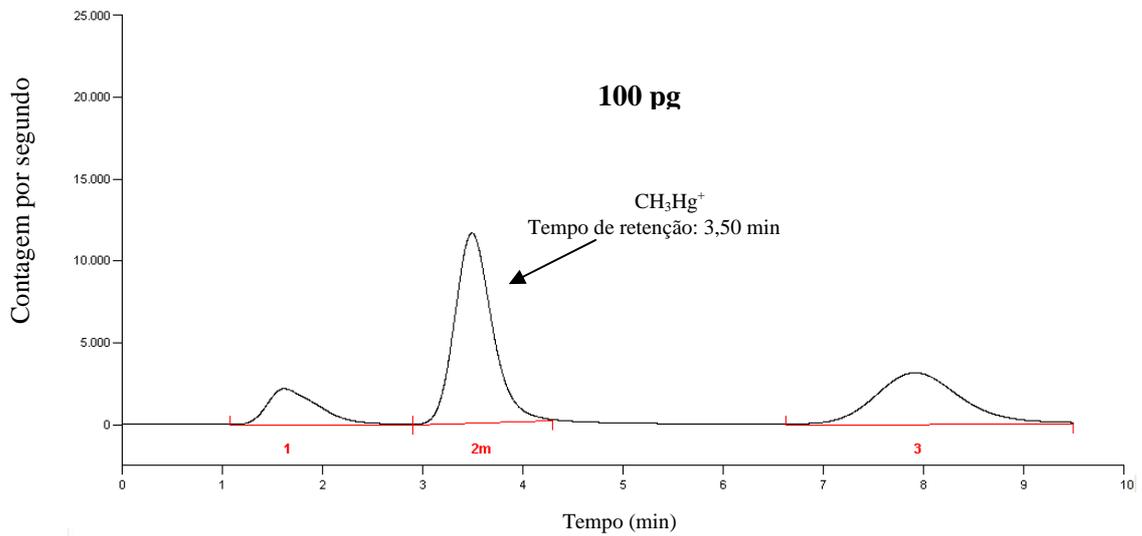
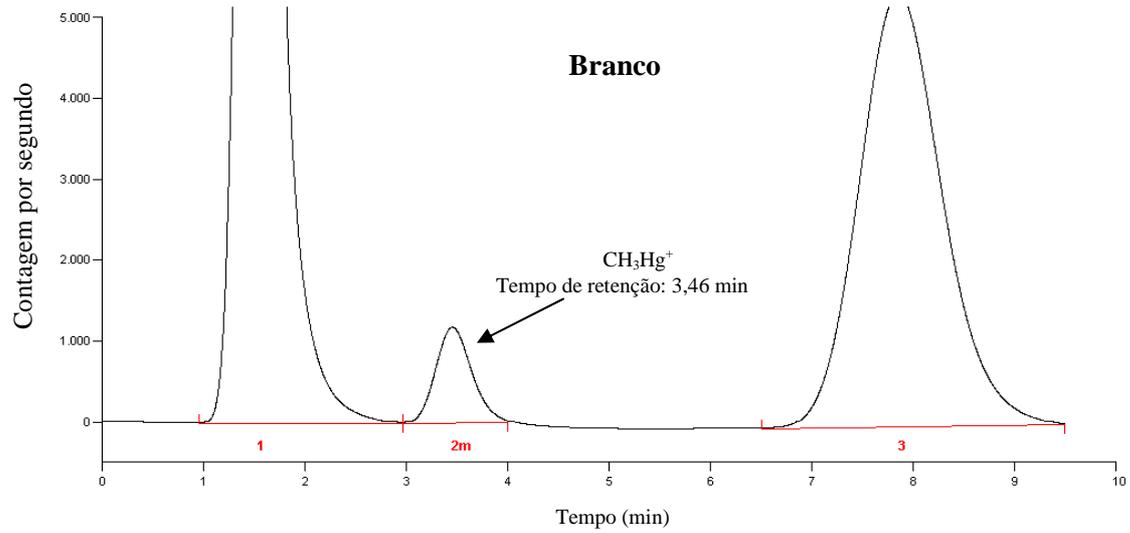
Por fim, esse trabalho fornecerá subsídio para estudos mais aprofundados de mecanismo de metilação realizados por micro-organismos. A técnica analítica utilizada, CG-pyro-AFS, se mostrou bastante eficiente para quantificar o CH_3Hg^+ em baixas concentrações. Tendo-se em posse essa técnica analítica validada, estudos da capacidade de metilação por diferentes espécies de cianobactérias, microalga e diatomácea se tornam uma excelente proposta.

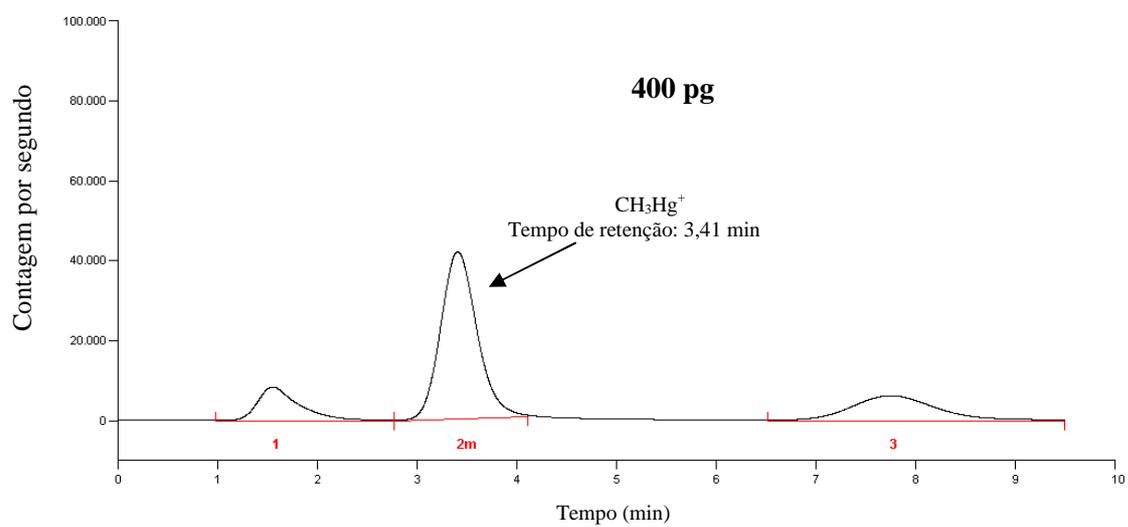
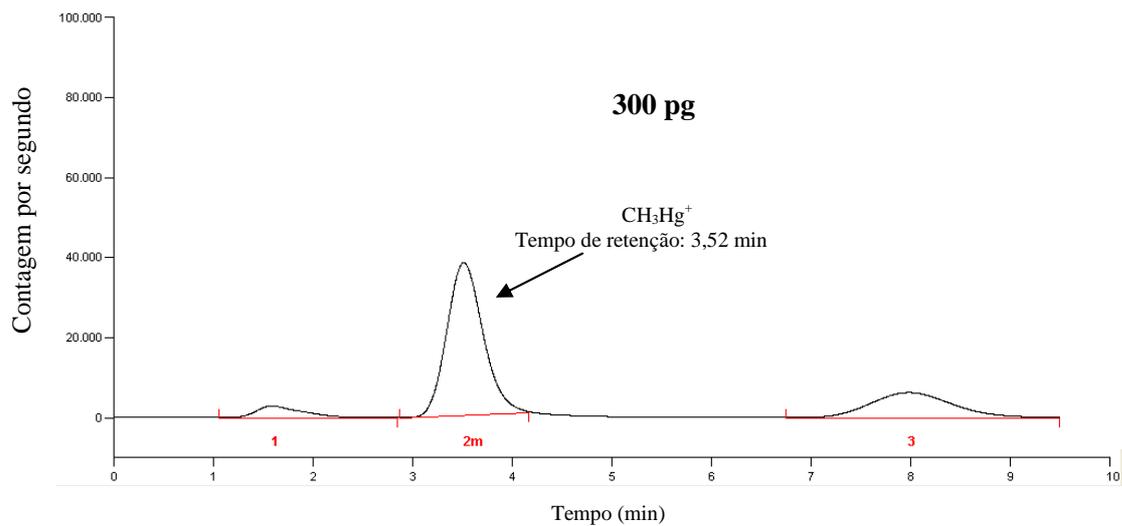
APÊNDICE

Tabela dos dados da análise estatística de Pearson.

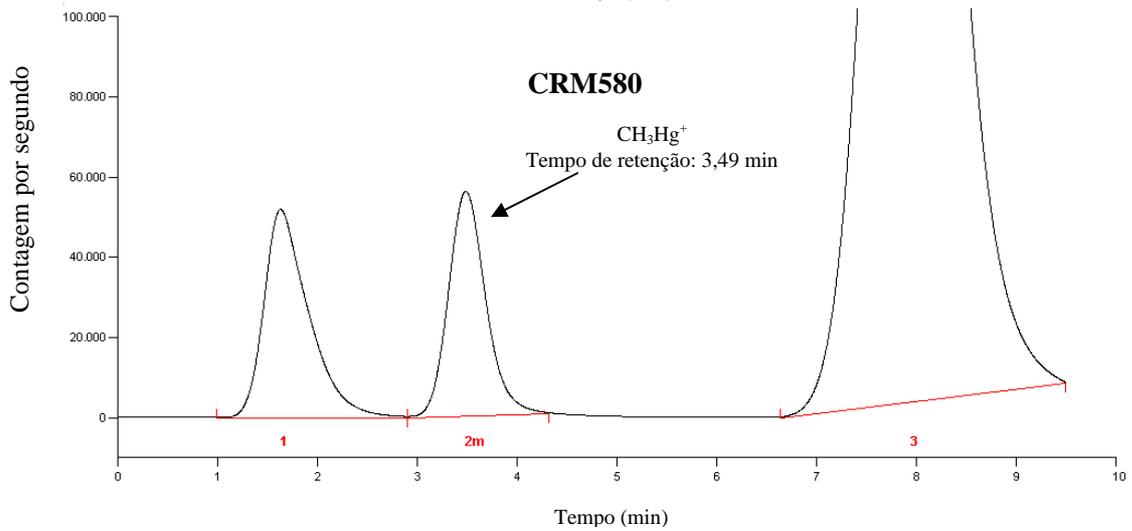
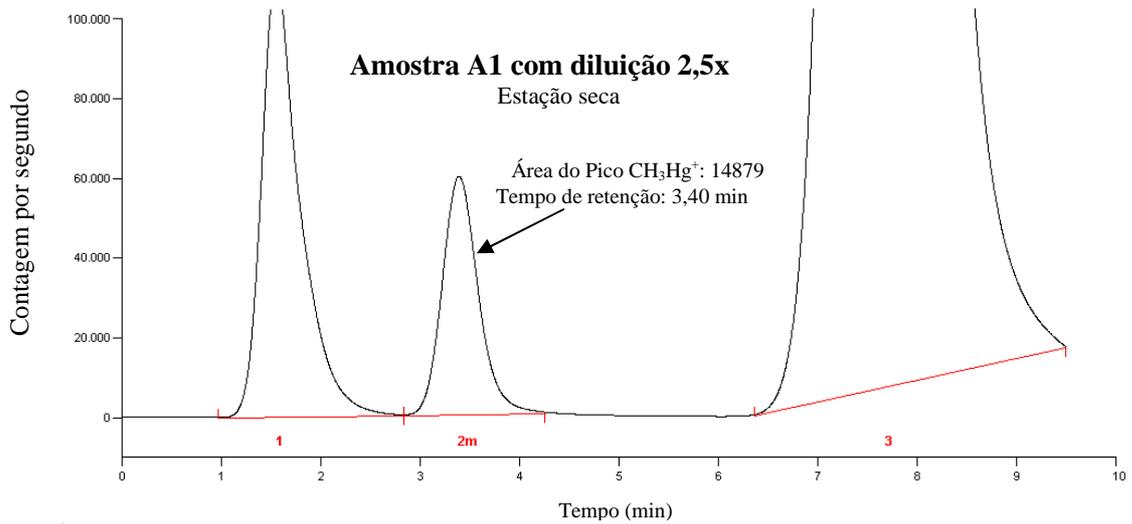
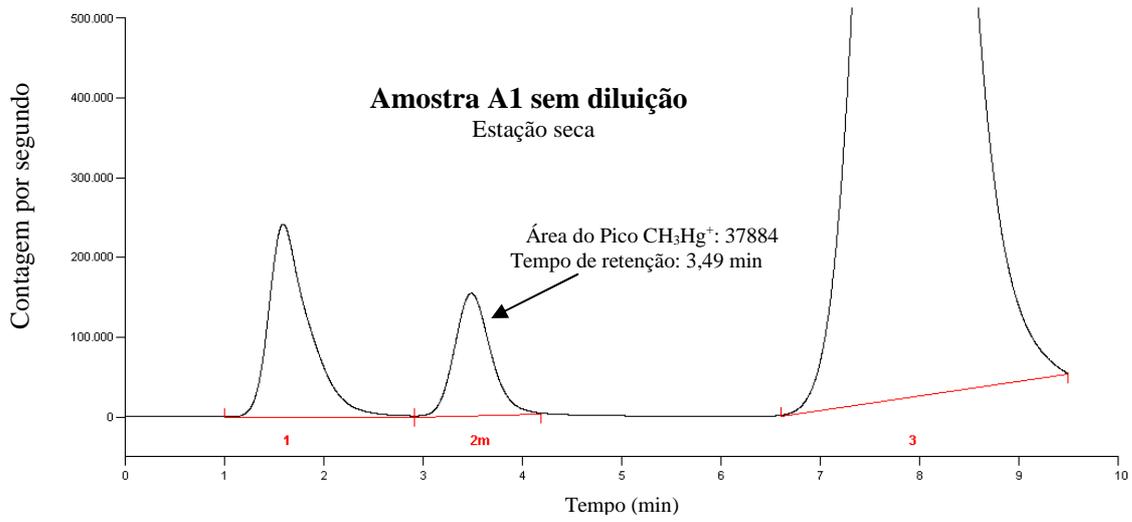
	HgT	CH ₃ Hg ⁺	OM	C/N	Total S	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	(Hg ⁰ + Hg ₂ ²⁺)	Hg ²⁺ (entre 200 e 300 °C)
CH ₃ Hg ⁺	0,878 0,000									
OM	0,958 0,000	0,824 0,000								
C/N	0,950 0,000	0,931 0,000	0,935 0,000							
Total S	0,815 0,000	0,552 0,041	0,916 0,000	0,759 0,002						
Al ₂ O ₃	0,370 0,193	0,138 0,637	0,503 0,067	0,207 0,479	0,636 0,014					
Fe ₂ O ₃	0,703 0,005	0,693 0,006	0,566 0,035	0,616 0,019	0,391 0,166	0,146 0,617				
MnO	0,271 0,348	0,104 0,722	0,474 0,087	0,254 0,380	0,604 0,022	0,618 0,019	-0,132 0,652			
(Hg ⁰ + Hg ₂ ²⁺)	-0,674 0,008	-0,456 0,101	-0,560 0,037	-0,641 0,014	-0,500 0,069	0,054 0,855	-0,409 0,147	0,162 0,579		
Hg ²⁺ (entre 200 e 300 °C)	0,886 0,000	0,727 0,003	0,850 0,000	0,827 0,000	0,789 0,001	0,290 0,314	0,553 0,040	0,121 0,681	-0,678 0,008	
Hg ²⁺ (>300 °C)	-0,854 0,000	-0,725 0,003	-0,841 0,000	-0,795 0,001	-0,785 0,001	-0,346 0,226	-0,536 0,048	-0,179 0,541	0,537 0,048	-0,984 0,000

Cromatogramas obtidos para padrões de CH_3HgCl na construção da curva analítica em solução aquosa.





Cromatogramas obtidos para amostra de sedimento coletada em Descoberto –MG e para o material de referência CRM580.



ARTIGO PUBLICADO



Quantification of methylmercury and geochemistry of mercury in sediments from a contaminated area of Descoberto (MG), Brazil



Louise Aparecida Mendes^{a,*}, Jorge Carvalho de Lena^b, Cláudia Magalhães do Valle^c, Peter Marshall Fleming^d, Cláudia Carvalhinho Windmöller^a

^a Departamento de Química, ICEX, UFGM, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Geologia, DEGEO, UFOP, Morro do Cruzeiro, Escola de Minas s/n, 354000-000, Ouro Preto, MG, Brazil

^c Instituto Federal do Amazonas, IFAM, Av. Sete de setembro, 1975, 69020-120, Manaus, Amazonas, Brazil

^d Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN), Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2016

Received in revised form

19 September 2016

Accepted 10 October 2016

Available online 11 October 2016

Keywords:

Methylmercury

Speciation

Sediment contamination

Descoberto city– Brazil

Hg Geochemistry

ABSTRACT

In 2002, metallic Hg was found buried in a rural area of Descoberto city, Brazil. The origin of the Hg was a gold mining exploitation plant established nearly one century ago. Although a number of studies have been conducted in order to assess the contamination of the area, none of them investigated the presence of methylated Hg in the hydric system. In this work methylmercury (CH_3Hg^+) was determined using gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence detection (CG-pyro-AFS) in material from rain sedimentation boxes and stream sediments near the contaminated area. Total Hg concentration (HgT) along with the chemical speciation by thermo-desorption were performed. HgT in material from the sedimentation boxes was found to be very high, up to $41,580 \mu\text{g kg}^{-1}$, even in the rainy season, when in general HgT were much lower than in dry season. The samples from the Grama and Rico streams show a range of HgT from 5.8 to $266 \mu\text{g kg}^{-1}$. The thermo-desorption analysis showed predominance of Hg^{2+} , possibly linked to organic sulfur, suggested by a good positive correlation between Hg^{2+} , HgT, organic matter (OM) and total S. The CH_3Hg^+ concentration in stream sediment samples ranged from <0.07 to $1.87 \mu\text{g kg}^{-1}$ and in the samples of sedimentation boxes the concentrations were 1.33 and $8.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ during dry season. The sample with the highest percentage of HgT as Hg^{2+} (98%) presented also the highest percentage of CH_3Hg^+ (0.7%). These are high values, showing that care should be taken to avoid the transport of this material to the hydrological system. Further studies on the transfer through the food chain would be very important.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The most common forms of Hg found in the environment are: Hg^0 , Hg^{2+} (inorganic) and organic mercury, mostly as methylmercury (CH_3Hg^+). It is well known that the latter form is easily bioaccumulated and biomagnified in the food chain (Jenne and Luoma, 1977; Lázaro et al., 2013) and this is why this species is relevant in the cycle of this metal. Understanding the biogeochemical cycling of Hg is an important contribution to diagnose the impact of this element to humans and biota. In the atmosphere Hg can be found primarily as Hg^0 (Amouroux et al., 1999) and small amounts of CH_3HgCH_3 which

are the most volatile species of this element. The Hg^0 can be photo-oxidized to Hg^{2+} in the presence of O_3 and the CH_3HgCH_3 can be converted to Hg^{2+} by the UV radiation (Barkay et al., 2003).

After deposition on the water and on the sediments, the Hg^{2+} undergoes methylation to CH_3Hg^+ , which can be re-methylated to form CH_3HgCH_3 (Barkay et al., 2003; Leopold et al., 2010). Upon entering the aquatic ecosystems, Hg can further react with various compounds in water, and therefore a portion of it precipitates on the sediment where numerous organic and inorganic reactions occur (Green-Ruiz et al., 2005). It binds primarily to organic matter and to oxides and hydroxides of Fe and Mn present in sediments (Canário et al., 2003). In this compartment, Hg^{2+} can also undergo reactions leading to the formation of HgS , CH_3Hg^+ and $(\text{CH}_3)_2\text{SHg}$ (Leopold et al., 2010). Therefore, several species with varying degrees of toxicity of this element will be in equilibrium in the environment. It is noteworthy to point out that the methylation and demethylation reactions are mainly mediated by bacteria (Barkay

* Corresponding author.

E-mail addresses: louisemendes@ufmg.br (L.A. Mendes), jorge.delena@degeo.ufop.br (J.C. de Lena), claudiavalle.ifam@gmail.com (C.M. do Valle), pmf@cdtn.br (P.M. Fleming), claucw@netuno.lcc.ufmg.br (C.C. Windmöller).

et al., 2003; Gosnell et al., 2016; Mauro et al., 1999), but information on mercury methylators in many compartments are still uncertain (Achá et al., 2011). In the Amazon, for instance, the macrophyte banks are considered an important site of mercury methylation (Achá et al., 2011; Mauro et al., 1999).

The sediment in the water system is a major sink and source of Hg, and is considered a relevant production site of CH_3Hg^+ (Canário et al., 2003; Shi et al., 2005), mainly mediated by the sulfate reducing bacteria (Achá et al., 2011). The assessment of this environmental compartment is interesting, since it can act as a good indicator of Hg input and other elements in the environment.

Hyphenated techniques are commonly used to determine CH_3Hg^+ in soil and sediment samples (Carrasco and Vassileva, 2015). Generally, they are based on separation techniques coupled with selective detector for Hg, such as gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry (GC-pyro-AFS) (Beldowski et al., 2014; Carrasco and Vassileva, 2015; Nevado et al., 2011; Oh et al., 2010); gas chromatography-inductively coupled to plasma mass spectrometry (GC-ICP-MS) (Nevado et al., 2011; Pietilä et al., 2015); and high performance liquid chromatography-inductively coupled to plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The detection by ICP-MS usually uses the isotopic dilution method, which makes possible the investigation of formation of artifacts during the extraction of the analyte (Avramescu et al., 2010; Carrasco and Vassileva, 2015; Jagtap and Maher, 2015; Rahman and Kingston, 2004; Santos et al., 2009).

The study area, in the countryside of the municipality of Descoberto - MG, Brazil, was heavily affected by the exploitation of gold in the nineteenth century. For unclear historical reasons Hg was buried by prospectors at that time. In December 2002, the owner of the area, performing soil relocation, noticed the presence of liquid Hg (Hg^0) (FEAM and CDTN, 2006). At the time of exploitation, the amalgamation procedure was widely used to improve the gold removal efficiency (patio procedure). Consequently, part of the Hg was lost to the atmosphere as gaseous Hg in the amalgam burning process, some was dumped in rivers and some eventually left and buried there.

Confirmation of the presence of Hg in the soil of the municipality was found by three governmental state agencies (FEAM - Minas Gerais State Environmental Agency, COPASA- Minas Gerais State Water Supply Company and IGAM - Minas Gerais State Water Mangemnet Agency) and CDTN (Brazilian Nuclear Technology Company), which carried out an on-site inspection and interdicted it. Since then, various studies have been conducted in the area in order to assess the degree of contamination of the environmental compartments by HgT (Alexandre, 2006; Durão Júnior, 2010; Durão Júnior et al., 2009; FEAM, 2005; Tinóco, 2008), which observed the presence of this metal above the recommended concentration limits, i.e., 12 mg kg^{-1} (CONAMA 420/2009), for land use for agricultural purposes. This area is a very important case to be studied even today, not only for an assessment of the current situation and possible impacts to the environment but also to be used as an example for other similar cases of contamination from gold mining in Brazil and world.

The main objective of this work was to evaluate the possibility of Hg methylation in sedimentation boxes and in sediment from hydrological system around the area, and search for parameters that could be influencing this processes, as HgT, seasonality, oxidation state of the metal and chemical characterization of the sediments.

2. Methodology

2.1. Sampling and sample preparation

Fig. 1 shows the location of the Municipality of Descoberto (MG)

as well as the sampling stations. Considering that the contaminated area is located on a declivity in the direction of the Rico stream, Brazilian authorities interdicted it and built channels and sedimentation boxes in the lower part of the area in order to retain the rain water and to avoid, as far as possible, the transport of particulated material from the contaminated area into the Rico stream. In the rainy season the pluviometric precipitation is so high that part of the water of these boxes overflows and reaches the stream. Samples were taken from the two sedimentation boxes (A1 and A2) and in 6 points at the Rico stream (A5 to A10) chosen in order to assess the possible impact of the Hg transport from the sedimentation boxes which are, as stated above, in a higher topographic level. Sample A3 is located outside the interdicted area, after the junction of Rico and Grama streams (downstream). Sample A4 was taken as control, because it does not receive waters from the Rico stream.

The collection of samples was performed in August 2014 (dry season) and in December 2015 (rainy season) in order to assess the methylation in different climate conditions. A total of 18 sediment samples were collected; 14 in the streams (8 in the dry season and 6 in the rainy season) and 4 (2 in each season) were taken from the two sedimentation boxes. Collection of samples A9 and A10 in the rainy season was not carried out because of difficulties to access these stations in the rainy season 2015.

Samples were collected using an auger steel and a plastic scoop, then sieved through 2 mm sieve to discard the gravel upper size fractions and then transferred to amber glass flasks which were stored in boxes containing ice until arrival at the laboratory where they were stored at -20°C . In the laboratory, part of the samples were lyophilized and sent for HgT determination, Hg speciation using thermo-desorption and determination CH_3Hg^+ . For chemical analysis (CHN, Total S and X-ray fluorescence), the samples were air dried.

2.2. Chemical characterization of the samples

The sediment samples were ground and sent for CHN analysis, total S and XRF. Determination of organic carbon to obtain the organic matter content in the samples was carried out in the elemental analyzer CHNS/O, Perkin Elmer, PE2400, Series II. It is noteworthy to mention that the data obtained from CHN were converted into OM and ratio of C/N (Radojević and Bashkin, 1999). The total S analysis was performed on the instrument Leco SC632. Certified standards were used for instrument calibration: Standard 502-309/1006 Soil; standard 502-318/1009 Ore Tailings Material Calibration; standard 502-319/1014 Ore Tailings Material Calibration; and standard KZK Acid Base Accounting Material CANMET.

The quantification of the concentration of metals was performed with an X-ray fluorescence spectrometer, Philips - PANalytical, Magix model PW 2540 autosampler equipped with Rh 2.4 kW tube.

2.3. HgT determination and speciation by thermo-desorption/atomic absorption

The determination of HgT and its speciation by thermo-desorption were performed in a direct mercury analyzer (DMA-80, brand Milestone, Italy). The DMA-80 uses the principle of thermal decomposition, amalgamation, amalgam thermo-desorption and determination of Hg by atomic absorption at a wavelength of 253.65 nm. The analytical curve was set up with injections of different volumes of solutions of 10 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ prepared from a standard solution of $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ HgCl}_2$. The absolute Hg concentration ranged from 0 to 100 ng. The certified reference material GBW 08301 river sediment, with an HgT value of $(220 \pm 40) \mu\text{g kg}^{-1}$ was used to assess the accuracy of the method.

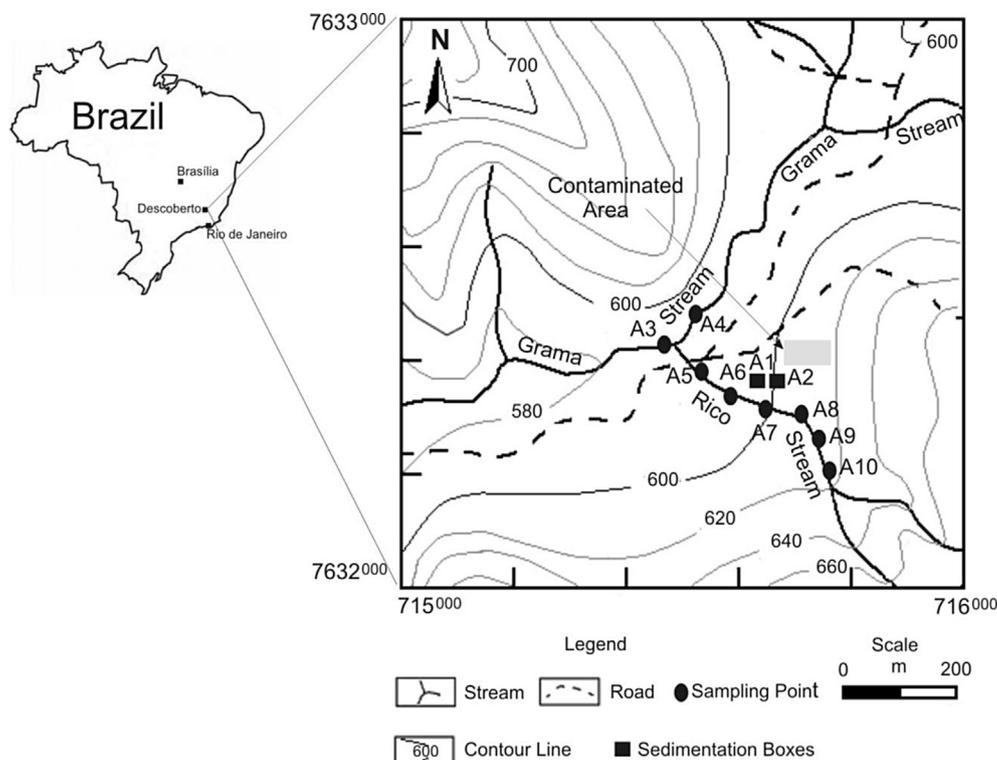


Fig. 1. Location of the Municipality of Descoberto – MG/Brazil (left). Location of the sampling stations at Grama and Rico streams (right). Coordinates are given in UTM, grid zone 23 K, datum WGS 84. Contour lines are given in meters above the sea level.

The HgT found in the certified reference material, analyzed by DMA, was $(227 \pm 10) \mu\text{g kg}^{-1}$. This value corresponds to 103% recovery, showing therefore a good accuracy of the method. The detection limit (LOD) and quantitation limit (LOQ) for this technique were 0.97 and $1.07 \mu\text{g kg}^{-1}$ (for sample weight 0.3000 g), respectively.

Speciation by thermo-desorption is based on the principle that different species of Hg are released from a solid matrix by the action of heat at different temperature ranges (Windmüller, 1996). Approximately 0.3000 g of sample was weighed and subjected to different temperature levels: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 and 700 °C for 3 min heating at each level. The results were compared with patterns of Hg species analyzed under the same conditions of the samples, such as Hg^0 , HgCl_2 , Hg_2Cl_2 , HgSO_4 and HgS . These standards were prepared and analyzed by Windmüller et al. 2013, using solid dilution (Windmüller et al., 2013). As there is no reference material registering mercury contents in different oxidation states, we decided to make analysis of the same reference material used to validate the total Hg determination, i. e., GBW 08301 (river sediment) and compared the sum of the results of all quantification steps (from 50 to 700 °C) with the certified value for total Hg. The obtained result $(224 \pm 19) \mu\text{g kg}^{-1}$ was in good agreement compared to the reference value $(220 \pm 40) \mu\text{g kg}^{-1}$.

2.4. Determination of CH_3Hg^+

The determination of (CH_3Hg^+) was performed on a gas chromatographer coupled to a pyrolysis system with an atomic fluorescence detection system (CG-pyro-AFS), MERX, Mark Brooks Rand Labs, USA. The analytical curve for absolute concentration from 0 to 500 pg was prepared from CH_3HgCl standard solution of

$1000 \mu\text{g L}^{-1}$, Brooks Rand Labs, USA. The sediment samples were subjected to a distillation system (Brooks Rand Labs) modified Horvat et al. (1993). Samples of 0.1000–0.5000 g were weighed in a teflon tube to which 30 mL of ultrapure water was added together with 500 $\mu\text{L H}_2\text{SO}_4$ 8 mol L^{-1} and 200 $\mu\text{L KCl}$ 20% w v^{-1} . Teflon tubes for collection of the distillate containing 5 mL of ultrapure water were placed in an ice bath. The samples were distilled at 125 °C under a nitrogen flow of 61 mL min^{-1} during approximately 3 h after which 75% of the distillate had been collected. Then, the distillate was diluted to 50 mL and transferred to a glass jar derivatization system. To this system it was added 300 μL of sodium acetate buffer and 50 μL of sodium tetraethylborate solution (NaBEt_4). The set was left to stand for 17 min for the contact of the reactants (reaction time), and then purged with nitrogen gas at 91 mL min^{-1} for 25 min. Traps were dried with nitrogen gas for 6 min and analyzed individually by the thermo-desorption system coupled to a chromatographic column filled with OV-3. The GC temperature was maintained at 35 °C. Argon gas was used as mobile phase and flow rate used was 17 mL min^{-1} .

It is noteworthy to point out that the parameters of the chromatographic column (temperature GC and mobile phase flow rate) and derivatization (flow of the bubbler, trapping time, volume of sodium tetraethylborate, trap drying time, reaction time) were optimized preliminarily to analysis. For quality assurance of CH_3Hg^+ analysis in sediments, certified reference material ERM[®]-CC580 (estuary sediment) was used, whose concentration of CH_3Hg^+ is $(75 \pm 4) \mu\text{g kg}^{-1}$. The CH_3Hg^+ concentration determined in the CC580-ERM[®] CRM reference material was $(71.1 \pm 2.1) \mu\text{g kg}^{-1}$. This value corresponds to 95% recovery and it is within the certified range. The calculated LOD and LOQ for the method for samples with mass weight of 0.5000 g were 0.11 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 0.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Table 1
Location of the samples and results of HgT, CH₃Hg⁺, percentage of CH₃Hg⁺, OM, C/N, total S, XRF and percentage of species of Hg obtained from the analysis of records by thermo-desorption with temperature levels in sediment samples collected at Descoberto (MG).

	Samples	Location Grid zone 23 K	*HgT (µg kg ⁻¹)	*CH ₃ Hg ⁺ (µg kg ⁻¹)	CH ₃ Hg ⁺ (%)	*OM (%)	*C/N	*Total S (%)	Al ₂ O ₃ (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	MnO (%)	(Hg ⁰ + Hg ²⁺) (Up to 150° C) (%)	Hg ²⁺ (labile) (200–300 °C) (%)	Hg ²⁺ (>300 °C) (%)
Dry season	A1 SB	7632360/715634	41580 ± 5	8.0 ± 0.9	0.02	6.4 ± 0.4	8.4 ± 1.1	0.034 ± 0.007	8.25	4.32	0.036	6.1	84.4	9.4
	A2 SB	7632360/715669	3835 ± 7	1.33 ± 0.07	0.04	8.1 ± 0.2	8.4 ± 0.8	0.047 ± 0.002	8.47	4.38	0.059	2.2	97.6	0.2
	A3 GS	7632425/715472	45 ± 10	<0.11	0.19	0.61 ± 0.01	1.42 ± 0.16	0.011 ± 0.004	9.54	10.04	0.071	4.5	50.3	45.2
	A4 GS	7632488/715524	44 ± 5	0.21 ± 0.04	0.48	0.61 ± 0.01	1.54 ± 0.38	<0.01	8.55	9.96	0.063	7.5	43.1	49.4
	A5 RS	7632374/715535	44 ± 2	0.139 ± 0.009	0.32	1.16 ± 0.04	1.55 ± 0.14	<0.01	8.16	7.30	0.095	3.7	38.6	57.7
	A6 RS	7632331/715594	266 ± 2	1.87 ± 0.33	0.70	7.7 ± 0.2	7.3 ± 1.0	0.039 ± 0.004	19.34	14.67	0.125	2.2	92	5.8
	A7 RS	7632315/715640	74 ± 3	0.29 ± 0.01	0.39	1.5 ± 0.1	2.09 ± 0.67	0.0107 ± 0.0008	10.12	7.52	0.094	4.4	52.4	43.2
	A8 RS	7632299/715717	74 ± 1	0.23 ± 0.06	0.31	1.56 ± 0.06	2.21 ± 0.32	0.0121 ± 0.0003	12.43	9.81	0.141	1.7	30.9	67.4
	A9 RS	7632256/715742	175 ± 1	0.63 ± 0.09	0.36	3.8 ± 0.2	3.48 ± 0.23	0.025 ± 0.002	16.86	12.45	0.136	1.4	60.1	38.5
Rainy season	A10 RS	7632205/715764	141 ± 5	0.51 ± 0.11	0.36	3.7 ± 0.1	3.38 ± 0.13	0.020 ± 0.004	16.53	11.50	0.131	2.1	55.0	42.9
	A1 SB	7632360/715634	3581 ± 235	0.77 ± 0.12	0.02	11.7 ± 0.2	6.8 ± 1.1	0.096 ± 0.021	16.8	5.7	0.10	0.2	99.5	0.3
	A2 SB	7632360/715669	2312 ± 87	1.01 ± 0.13	0.04	4.31 ± 0.04	2.5 ± 0.4	<0.01	27.7	7.2	0.022	0.3	85.2	14.5
	A3 GS	7632425/715472	73 ± 3	<0.11	–	0.44 ± 0.01	0.25 ± 0.07	<0.01	15.1	12.6	0.093	9.7	28.3	62.0
	A4 GS	7632488/715524	41 ± 4	<0.11	–	0.60 ± 0.05	0.35 ± 0.09	<0.01	18.0	10.6	0.041	3.4	62.8	33.9
	A5 RS	7632374/715535	183 ± 5	0.35 ± 0.03	0.19	6.8 ± 0.5	4 ± 1	0.066 ± 0.0006	33.0	9.8	0.25	2.3	82.5	15.2
	A6 RS	7632331/715594	36 ± 1	<0.11	–	0.8 ± 0.2	0.48 ± 0.09	<0.01	18.5	7.7	0.18	11	30	59
	A7 RS	7632315/715640	26 ± 1	<0.11	–	0.53 ± 0.02	0.31 ± 0.07	<0.01	26.5	8.8	0.10	9.9	20.8	69.3
	A8 RS	7632299/715717	5.8 ± 0.9	<0.11	–	0.43 ± 0.02	0.25 ± 0.01	<0.01	17.5	8.0	0.20	16.2	25.2	58.5

SB: sedimentation boxes; GS: stream Grama; RS: stream Rico.

*mean concentration ± standard deviation (n = 3).

3. Results and discussion

3.1. HgT concentrations

Table 1 shows location of the samples and the results of HgT, CH_3Hg^+ , percentage of CH_3Hg^+ , organic matter (OM), C/N, total S, XRF and percentage of species of Hg obtained from the analysis of records by thermo-desorption with temperature levels for all samples collected in Grama and Rico streams, along with the ones from sedimentation boxes, in dry and rainy seasons.

The HgT in sediment samples ranged from 44 to 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ during the dry season, and from 5.8 to 183 $\mu\text{g kg}^{-1}$ during the rainy season, in samples collected along the Rico and Grama streams, showing clearly a decrease in the concentrations in the rainy season. It is worth mentioning that the rainfall difference between the two stations is quite large. The sediment samples taken from local sedimentation box, A1 and A2, presented discrepant concentrations compared to other samples in the Rico and Grama streams. The A1 box presented HgT of 41,580 $\mu\text{g kg}^{-1}$ during the dry season and 3581 $\mu\text{g kg}^{-1}$ during the rainy season. In the sedimentation box of the A2 sediment sample, the Hg concentrations during the dry season and during the rainy season were 3835 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 2312 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

It is presumed, therefore, that in the dry season Hg-containing particulate material is retained in sedimentation tanks for a longer time, as also noted by Durão Júnior et al. (2009). During the rainy season, this material is somewhat drawn to the stream and the finer particles of the sediment there spreads and dilutes the Hg into the hydric environment.

Although only the information of HgT is not enough to predict possible biological effects of Hg in sediments the results were compared with the guide values established by the Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME, 2001) called TEL (Threshold Effects Level) and PEL (Probable Effects Level) that are the same for the Brazilian legislation, CONAMA 454. The concentrations below the TEL value represent low probability of adverse effects to biota and concentrations above the PEL value represent a likely adverse effect on biota. Between the PEL values and TEL it is not possible to speculate about the likelihood of an effect. The TEL and PEL values for Hg in the sediment are 170 and 490 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Fig. 2 shows the HgT in sediment samples and their corresponding TEL value, except for A1 and A2 samples that have very different values.

It is observed that 11 of 14 samples collected in the Rico and Grama streams, in both seasons, showed concentrations below the TEL values. The A6, A9 (both in the dry season) and A5 (rainy

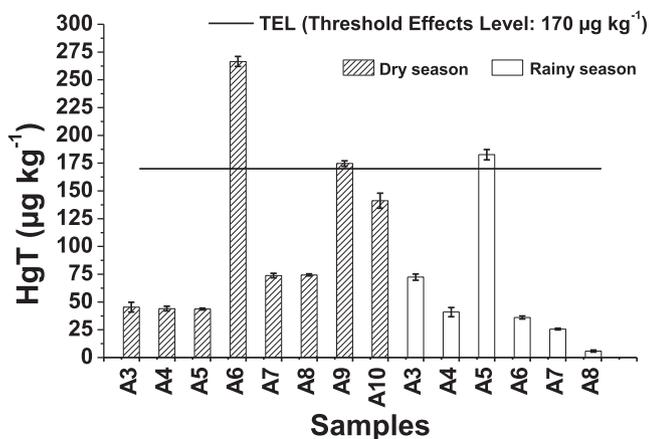


Fig. 2. HgT in sediment samples collected along the Rico and Grama streams.

season) samples showed Hg concentrations between TEL and PEL values, 266; 175 and 183 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, indicating the possibility of occasional occurrence of adverse effects to biota.

Samples of the sedimentation boxes (A1 and A2) showed HgT of about 85 and 8 times higher than PEL during dry season, respectively. This points to a serious problem, given that values above the PEL represent a potential adverse effect on the biota and the material of these samples may possibly be carried to Rico stream during the rainy season.

It is interesting to observe in Fig. 2 that sample A5 showed higher HgT content in the rainy season compared with the content in the dry season. This suggests that the rain water can be really overflowing the sedimentation box and transporting the finer particulate matter present in the contaminated area from the point A8 in the direction of the point A5 and being accumulated there. It is also observed that Hg reached the point A3 (Grama stream), since the HgT content is also larger in the rainy season. There is a significant difference at the level of 95% between the HgT for sample A3 collected in different seasons, showing that mercury is being transported from the contaminated area and reaching the water system. This poses hazard to the local population, considering that the Grama stream supplies water to the community of the city of Descoberto.

FEAM found, in 2005, HgT at Rico stream in the range of 20–750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and in the Grama stream in the range of 20–61 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Concentrations found in this work along the Rico stream ranged from 5.8 to 266 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 1) and the four samples from the Grama stream show a range of Hg concentration from 41 to 73 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Although the results obtained 13 years after the report of FEAM are similar, this shows that Hg is still present on the site, in concentrations above the allowed for quality standards for samples A6, A9 and A5, as shown in Fig. 2. Tinoco (2008) found a range of HgT in sediments from the same area of this work slightly higher, between 130 and 610 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

It is interesting to compare the levels of Hg in sediments from Descoberto with those observed in areas where the gold exploitation activity is still widespread like in the Iron Quadrangle (MG) close to Ouro Preto (MG) and Mariana (MG) municipalities. It is observed that the HgT found in the sediment of Rico stream (5.8–266 $\mu\text{g kg}^{-1}$) is lower than that observed by Rhodes (2010) and Windmüller et al. (2007), who found concentrations ranging 40–530 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 40–1100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. This can be explained by the fact that in these areas, gold prospecting is still carried out, although illegal, which is not the case of Descoberto where these activities have been closed for nearly one century.

Studies in other countries affected by gold mining using mercury amalgamation still nowadays show, in general, HgT content in sediments larger than found in this work. Pinedo-Hernández et al. (2015), for example, found HgT in the range of 196–1187 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in sediment samples impacted by gold mining in Colombia. According to these authors, the region of study, Mojana, receives most of the waste from the largest gold mining of the country through flooding processes occurring during the rainy season. Güiza and Aristizábal (2013) claim that the increase in HgT levels in Mojana region in the last decade should be related to the gold mining proliferation in Colombia. According to these authors, the number of mines in that country raised from 2000 to 4000 between the years 2002–2011. The study Reichelt-Brushett et al. (2016) in Buru Island Indonesia showed HgT ranging from 4.23 to 82 mg kg^{-1} in sediments from several locations downstream of a small-scale artisanal gold mining. It must be pointed out that in these studies gold mining activities are recent, which is not the case of Descoberto.

The similarity between Descoberto mercury contamination case and the ancient cases in other contaminated sites, for example, west of United States (Carson River Drainage Basin, Nevada)

(Bonzongo et al., 1996) and north of Georgia (Leigh, 1997), is that the gold exploitation employing mercury uses hydraulic mining, in which the high density of mercury allowed gold and gold-mercury amalgam to sink, while sand and gravel passed over the mercury and through a sluice using water as a way to drag the solid materials. Large volumes of water flowing through the sluice caused many of the finer gold and mercury particles to wash through and out of the sluice before they could settle in the mercury-laden riffles. In this way mercury can be transported and spilled all over a large area. In the case of Descoberto there is little historical information about what exactly happened in the past, i.e., in the 19th century. As stated before, for unclear historical reasons Hg was buried by prospectors at that time. The consequence is that Hg is not spread over a large area what makes possible the mitigation of this contamination.

The few data about Hg in fish and human biological matrices from the contaminated area of Descoberto did not show Hg contamination. According FEAM (2005), the HgT in fish samples were below the values established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) Ordinance No. 685/1998 ANVISA. (FEAM, 2005). In 2008, Palmieri et al. (2009) collected 70 specimens of fish and only 3 samples showed concentrations exceeding the permitted value, but they concluded that there was no indication of Hg contamination. The Hg concentration in biological materials (hair, urine, blood) were considered normal in 47 people living near the site of upwelling (FEAM, 2005).

3.2. Hg speciation by thermo-desorption and chemical characterization

Fig. 3 shows records obtained by Windmüller et al. (2013) for the analysis of standard Hg compounds (prepared by solid dilution of the Hg compounds in an inert matrix), using a DMA heating program by temperature levels, identical to the conditions used in this work. The release of Hg⁰ occurs mainly at 50 °C and Hg₂²⁺ at 100 and 150 °C. Therefore, the temperature range of 50–150 °C corresponds to the release of reduced species (Hg⁰ and Hg₂²⁺). Oxidized species (Hg²⁺) are released above 200 °C, and above 300 °C are the ones which interact more strongly with the matrix.

Fig. 4 and Fig. 5 display the records obtained for the analyses of the samples of this study and Table 1 shows the percentages for each Hg species, considering the sum of Hg concentrations corresponding to reduced species (up to 150 °C) and oxidized species (temperatures above 200 °C). The percentages of oxidized species were separated in two temperature ranges, from 200 to 300 °C and above 300 °C, in order to emphasize the percentage of more labile Hg²⁺ (from 200 to 300 °C) and the Hg²⁺ with stronger interaction with the matrix (above 300 °C).

It is observed from Table 1 and Figs. 4 and 5 in all samples the predominance of Hg²⁺, i.e., Hg released in temperatures above 200 °C. The percentages of reduced Hg were low, ranged from 1.4 to 7.5 in dry season and 0.2 to 16.2 in rainy season (Table 1). The source of contamination of these samples is Hg⁰ and it is known that the oxidation occurs in soil from this area (Durão Júnior et al., 2009; Windmüller et al., 2015). Durão Júnior et al. (2009) also analyzed samples from the retention tanks and a sample from the Hg hotspot, observing the presence of Hg⁰ only in the samples with very high HgT. These authors showed that the sample from the hotspot (analyzed without homogenization) shows sections with Hg⁰, sections with a mixture of the three oxidation states (Hg⁰, Hg₂²⁺ and Hg²⁺) and sections with Hg totally oxidized (Durão Júnior et al., 2009). Therefore, it is not surprising that a mixture of Hg⁰ and Hg₂²⁺ is present as reduced species in samples from the sedimentation boxes in the present study. Hg₂²⁺ is a less stable species compared to Hg²⁺ and, because of this, it is not considered in the

majority of the speciation analysis. Nevertheless, it is well accepted that the species can be found in soils and/or sediments, as it is discussed mainly in articles about mercury oxidation and reduction processes, using thermo-desorption analysis where the transition of Hg⁰ to Hg²⁺ and from Hg₂²⁺ to Hg⁰ showed a well shaped peak between the peaks of Hg⁰ and Hg₂²⁺ that were attributed to Hg₂²⁺ (Soares et al., 2015; Valle et al., 2006; Windmüller et al., 2015; Windmüller et al., 1996). The oxidizing environment may be contributing to the Hg oxidation and its adsorption on fine particles and therefore increasing their mobility.

Similar behavior was observed by Windmüller et al. (2007), working with sediment samples from the Iron Quadrangle (MG). This work also showed the predominance of oxidized Hg, the contents of this element and Mn were grouped by cluster analysis, indicating correlation between these parameters. The OM and clay minerals act stabilizing the Hg²⁺ formed and facilitate the balance toward the oxidation of Hg. The oxidation mediated by bacteria is also considered an important route (Barkay et al., 2003; Smith et al., 1998).

The comparison of the several graphics of Fig. 4 evidences that samples A2 and A6 are the ones that did not show Hg peaks at higher temperatures in spite of presenting higher HgT contents. This suggests that part of the Hg from the contamination is probably released from the sample by solubilization and/or volatilization and the amount that remains forms stronger interactions with the matrix. This is confirmed by data of Table 1, according to which the percentage of species Hg²⁺ released above 300 °C is more prevalent in the samples A4, A5 and A8, with 49.4; 57.7 and 67.4% respectively. These samples are the ones with low HgT. For comparison, Fig. 5 displays the thermo-desorption graphics for selected samples (A1, A5 and A7) collected both in dry and rainy seasons. Sample A1, from one of the boxes, shows that the majority of Hg²⁺ is released up to 300 °C; sample A5 and A7 graphics show clearly that the season with lower HgT displays higher peaks at very high temperatures (600 °C and 700 °C), which means that Hg species are stronger bound in these samples.

Sample A8 shows an atypical behavior, i.e., it is the only sample that presented the highest Hg concentration at the temperature of 600 °C, indicating the presence of a highly stable Hg compound (Fig. 4). The graphic of this sample is similar to the HgSO₄ standard (Fig. 3), suggesting a possible presence of this species.

All samples from the sedimentation boxes (dry and rainy seasons) show Hg mainly as labile Hg²⁺, 84.4–99.5% (Table 1, sample A1) and Fig. 5.

The predominance of oxidation processes over the Hg reduction in soils has been observed in other works, e. g., in soils of the Amazon and Minas Gerais (Brazil) (Valle, 2005; Valle et al., 2006). Windmüller et al. (2015) investigated the redox process of Hg in soil samples from the same contaminated area of this study. The results showed that the oxidation kinetics occurs to a greater extent and more quickly in relation to the Hg reduction process. This means that the composition of the soils from this area favors the oxidation of mercury in place. According to the authors, the oxidation facilitates the metal interaction with the fine particles of soil that can be lixiviated by the rain. The oxidized form makes possible their methylation (Windmüller et al., 2015).

The Pearson statistics analysis showed good correlations of Hg²⁺ with OM ($r = 0.850$, $p < 0.05$), C/N ($r = 0.827$, $p < 0.05$) and total S ($r = 0.789$, $p < 0.05$). The correlation of OM with S is an indicative of S present in OM. The strong interaction of Hg²⁺ with S (inorganic and organic compounds) is already well known, which justifies the observed correlations.

The degree of humification of OM in soil and sediments can be assessed by the C/N ratio. According to Jordão et al. (2000) the values of the C/N below 20 indicate the total decomposition of the

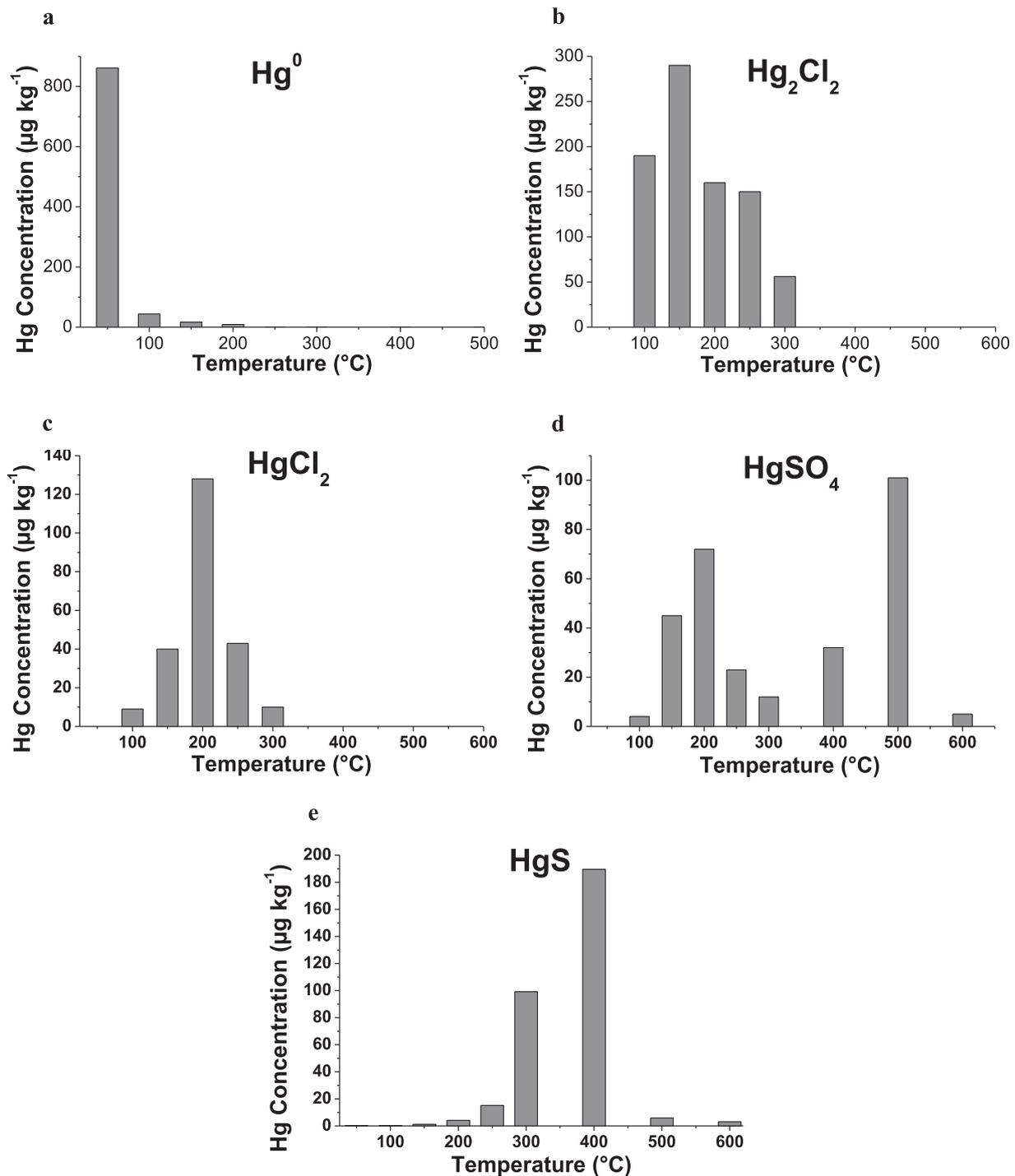


Fig. 3. Thermo-desorption graphics of Hg standards (modified from Windmüller et al., 2013).

OM in the environment and above 30 the decomposition is too low. All sediment samples showed C/N values below 20 (Table 1) suggesting that there is a high degree of decomposition of organic matter in the sample collection site, a condition which, among others, could favor the transport of Hg²⁺ and eventually the methylation of Hg.

3.3. CH₃Hg⁺ concentration

The concentration of CH₃Hg⁺ in sediment samples collected over

Rico and Grama streams ranged from <0.11 to 1.87 µg kg⁻¹ during the dry season (Table 1). In the rainy season only one sample showed CH₃Hg⁺ concentration above the detection limit, sample A5, with 0.35 µg kg⁻¹ of CH₃Hg⁺. It is worthy mentioning that this sample was the only one with significant higher HgT in the rainy season. For samples A1 and A2, collected from sedimentation boxes, the concentration of CH₃Hg⁺ was higher during dry season, 8.0 and 1.33 µg kg⁻¹, respectively. In the rainy season the concentration of CH₃Hg⁺ in these samples was 0.7 µg kg⁻¹ and 1.01 µg kg⁻¹, respectively.

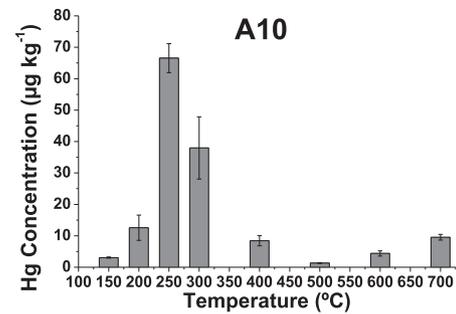
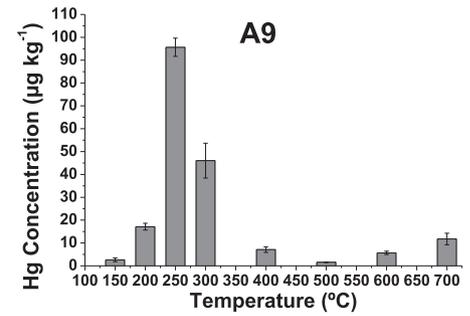
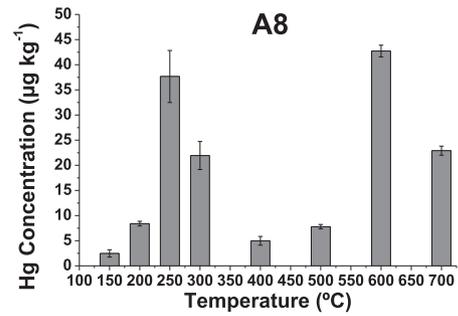
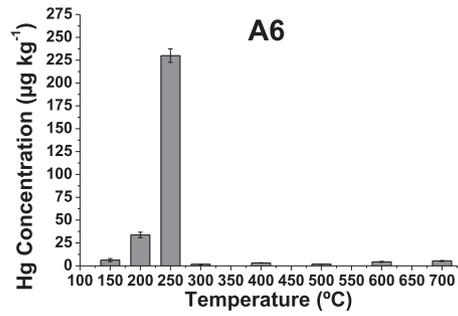
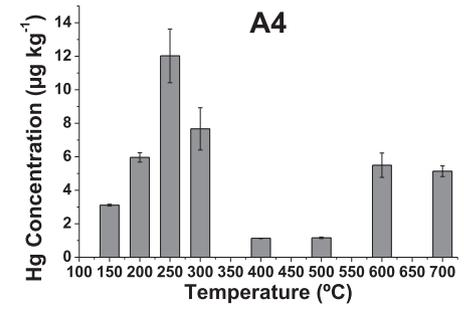
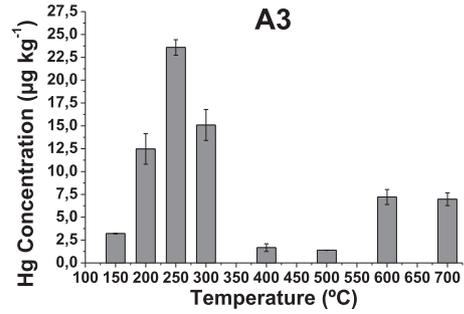
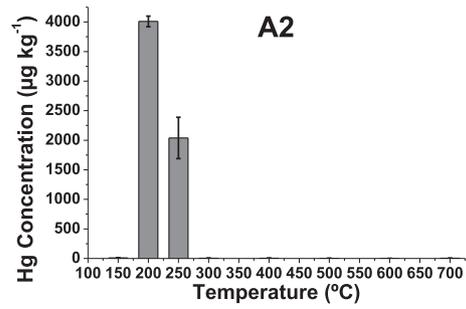


Fig. 4. Thermo-desorption graphics of Hg in sediment samples collected in Descoberto-MG in the dry season.

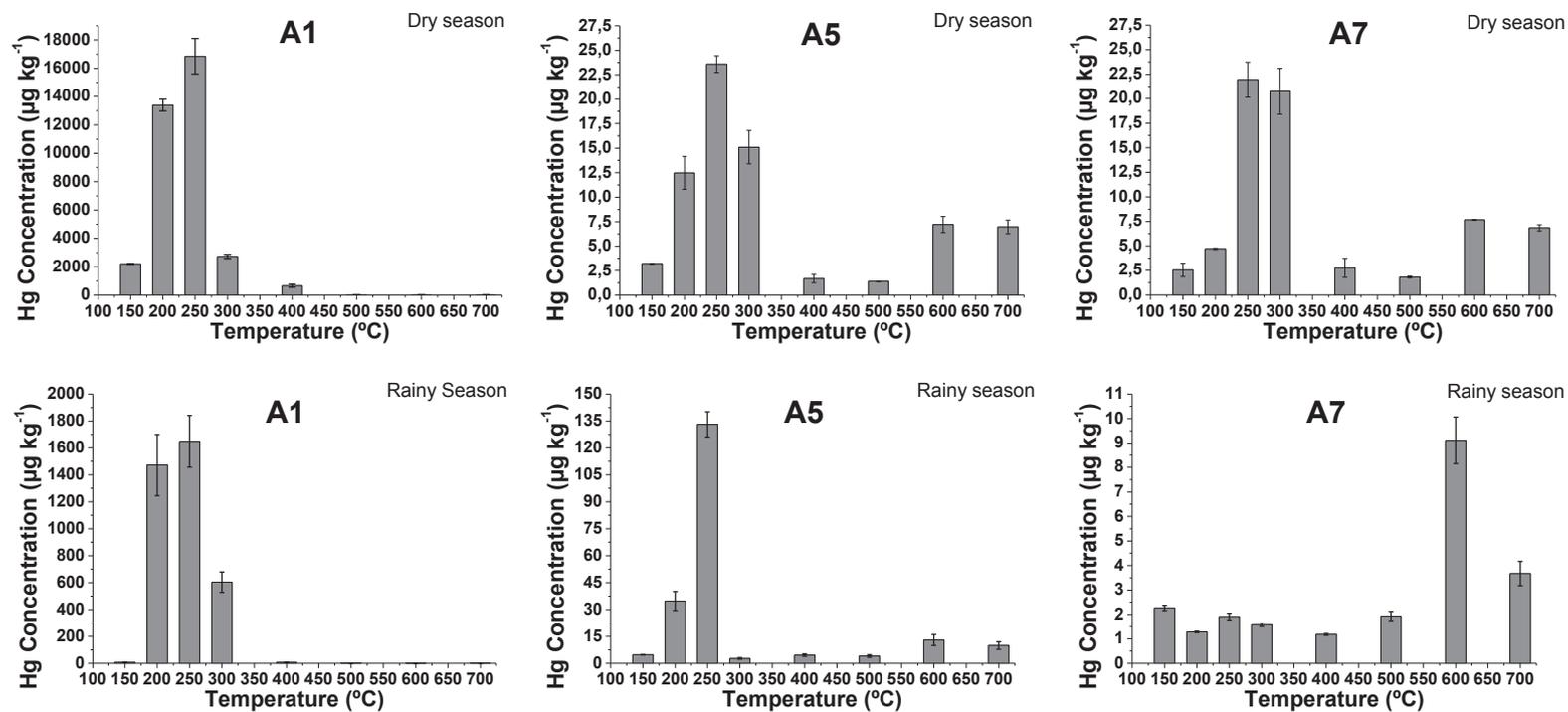


Fig. 5. Thermo-desorption graphics of Hg in sediment samples collected in Descoberto-MG in the dry and rainy season.

Table 2Concentrations of CH₃Hg⁺ and percentages in relation to HgT found in sediment in this study and other papers.

CH ₃ Hg ⁺	^a Present study	^b Pinedo-Hernández et al. (2015)	^c Marrugo-Negrete et al. (2015)	^d Beldowski et al. (2014)	^d Carrasco and Vassileva (2015)	^e Pietilä et al. (2015)
(μg kg ⁻¹)	<0.11–8.0	4.1–43.4	8–68	0.061–0.94	–0.89–7.5	0.8–18
(%)	0.02–0.7	1.5–3.7	3–11	0.12–1.05	<0.4	1.2–12

^a River Sediment/Sedimentation boxes.^b River Sediment.^c Swamp Sediment.^d Sediment marine.^e Peat Soil.

The percentages of CH₃Hg⁺ ranged from 0.02 to 0.7% in which the lowest value corresponds to the sample with highest HgT (sample from one of the boxes) and the highest value corresponds to the sample from the stream with the highest HgT (A6). Marrugo-Negrete et al. (2015) studying sediment samples from tropical swamps in Colombia (Great Achi and Ayapel) impacted by gold mining, found the lowest percentage of CH₃Hg⁺ in the sample with the highest concentration of the HgT. The HgT from Great Achi sediments ranged from 543 to 1021 μg kg⁻¹ and the percentage of CH₃Hg⁺ ranged between 3 and 7%, whereas for samples from Ayapel HgT contents ranged from 145 to 313 μg kg⁻¹ and the percentage of CH₃Hg⁺ ranged from 5 to 11%. These are, in general, higher percentages compared to this work. This difference is expected because the conditions of swamps in terms of higher organic matter contents and lower water flow rates favors the Hg methylation. Other research study of the same group, Pinedo-Hernández et al. (2015), studying surface sediments affected by artisanal and small-scale gold mining in the Mojana region of Colombia found HgT between 196.2 and 1187.6 μg kg⁻¹ and CH₃Hg⁺ concentrations significantly correlated with the HgT and organic matter (OM) and represent between 1.7% and 3.6% of the HgT, i.e., also higher than the results obtained here. According to the authors the temperature was the parameter that favored the methylation due to increased biological activity in higher temperature in the dry season. The Pearson correlation between HgT and CH₃Hg⁺ found in this work, excluding the samples from the box, was positive and very high ($r = 0.878$, $p < 0.05$). This information pointed out that the methylation increases with the increase of HgT, but there should be an Hg concentration from which the methylation is inhibited. The CH₃Hg⁺ concentrations also correlated positively with OM ($r = 0.824$, $p < 0.05$), C/N ($r = 0.931$, $p < 0.05$), Hg²⁺ labile ($r = 0.727$, $p < 0.05$) and Fe₂O₃ ($r = 0.693$, $p < 0.05$).

Although the percentages of CH₃Hg⁺ are low during dry season (0.02 and 0.04%, respectively), the results showed that the concentrations of this toxic pollutant can be extremely high (up to 8.0 μg kg⁻¹). It is showed that the CH₃Hg⁺ concentrations in the boxes can reach 8 times the values found in the streams and therefore the results point out that care should be taken to avoid the transport of this material to the streams.

Sample A1 in the dry station, showed only 6.1% of the HgT is in the forms Hg⁰ and Hg₂⁺ and it presented the lowest percentage of CH₃Hg⁺ (0.02%, Table 1) compared with the other samples. On the other hand, the percentage of Hg²⁺ labile, correlated strongly with CH₃Hg⁺ concentration ($r = 0.727$, $p < 0.05$), both data suggesting that oxidized Hg favors the methylation of the metal.

The study by Feng et al. (2011) showed that the redox conditions are very important for the methylation of Hg and that this decreases with water depth and sediment, i.e., from oxic to anoxic conditions. Study by Eckley et al. (2015), in sediments of Cottage Grove Reservoir, west of Oregon, USA, showed that in the sediments of wetlands, CH₃Hg⁺ concentrations of the more superficial layers 0–2 cm are clearly higher when compared to deeper layers (up to approximately 2.8 μg kg⁻¹ which corresponds to up to 0.9% of

CH₃Hg⁺). The authors also observed increased concentrations and percentages of CH₃Hg⁺ in flood water sediment when compared to permanently flooded areas, i.e., an oxidizing redox potential favors the metal methylation. These layers also had organic carbon concentrations and higher sulfate.

Table 2 shows the comparison of the results of CH₃Hg⁺ concentrations obtained in of this study with other works. They are comparable to the concentrations of some marine sediments as studied by Beldowski et al. (2014) and Carrasco and Vassileva (2015) but the values are lower than river sediments studied by Pinedo-Hernández et al. (2015), swamp sediments studied by Marrugo-Negrete et al. (2015) and by peat soil by Pietilä et al. (2015). Although these results show a lower range, the results showed that the concentration can be as high as 8.0 μg kg⁻¹, which is means that the possibility of bioaccumulation and biomagnifications is not negligible.

In the investigated site, methylation occurs primarily by an aerobic process, as the samples collected are surface sediment. The microscope observation of the water collected from the sedimentation box where the CH₃Hg⁺ concentration was highest (8.0 μg kg⁻¹), it was found the presence of microalgae and cyanobacteria. This observation brings the hypothesis that the methylation box sedimentation can be occurring due to the presence of these microorganisms, or biotic methylation.

The biological process mediated by micro-organisms and fungi can occur via transmethylation reaction. Methylcobalamin, also known as vitamin B12, coenzyme is produced by the aerobic and anaerobic bacteria. The synthesis of CH₃Hg⁺ in the environment via this compound is due to the transfer of a methyl group to Hg in oxidized form, i.e. Hg²⁺ (Barkay et al., 2003; Bisinoti and Jardim, 2004). It is noteworthy that methylcobalamin is widely distributed in the environment (Bisinoti and Jardim, 2004), and possibly this coenzyme is also produced in the investigated site. It is known that other parameters such as pH, temperature, OM concentration, concentration of sulfide, redox conditions also influence the methylation process (Achá et al., 2011), working in together or separately (Bisinoti and Jardim, 2004) as each contributes differently to form CH₃Hg⁺. The characteristics of the medium are defining the process (Bisinoti and Jardim, 2004). Abiotic methylation can not be discarded and systematic studies would be necessary to a better understanding of the ways that this important reaction is occurring.

Jonsson et al. (2012) studied methylation ratios in sediments of the estuary of the River Ore, the Bothnian Bay, Sweden. The results of this study showed that the combination of thermodynamic and kinetic effects of dissolution and desorption of Hg²⁺ from the solid phase influence and result in large differences in the observed methylation rates ranging up to two orders of magnitude. Our results show the difference between the samples in terms of Hg thermo-desorption profiles from the solid phase, thus indicating differences in Hg²⁺ interaction with the matrix and the importance of studying how these differences affects the kinetics and thermodynamics of metal methylation.

4. Conclusions

After 13 years of coming to light Hg contamination in a rural area of Descoberto, Brazil, the present results showed the presence of Hg in sediments near the area at concentrations that exceed the value of quality set by the Canadian Council of Environment ($170 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $490 \mu\text{g kg}^{-1}$). The samples from the Grama and Rico streams show a range of HgT from 5.8 to $266 \mu\text{g kg}^{-1}$. HgT in material from the sedimentation boxes was found to be very high, up to $41,580 \mu\text{g kg}^{-1}$, even in the rainy season, when in general HgT were much lower than in dry season. One of the collection points from the streams shows higher HgT in the rainy season, indication a transport and the possibility of Hg accumulation depending on particulate matter transport phenomena.

The thermo-desorption analysis showed predominance of Hg^{2+} , possibly linked to organic sulfur, suggested by a good positive correlation between Hg^{2+} (labile), HgT ($r = 0.886$, $p < 0.05$) organic matter (OM) ($r = 0.850$, $p < 0.05$) and the total S ($r = 0.789$, $p < 0.05$). The analysis also showed that in the rainy season, that the HgT are in general lower than in dry season, the Hg release at higher temperatures, which means, the Hg that remains in the sediment is stronger bound to this matrix.

The Hg contamination source in the study area is Hg^0 . The oxidation of Hg, observed in thermo-desorption studies, is an essential step prior to methylation and the results of this study support other author results that showed the facility of Hg oxidation in tropical soils.

The CH_3Hg^+ concentration in streams sediment samples ranged from <0.07 to $1.87 \mu\text{g kg}^{-1}$ and in the samples of sedimentation boxes the concentrations were 1.33 and $8.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ during dry season. CH_3Hg^+ concentration showed good Pearson correlation coefficients with HgT ($r = 0.878$, $p < 0.05$), Hg^{2+} (labile) ($r = 0.727$, $p < 0.05$), OM ($r = 0.824$, $p < 0.05$), C/N ($r = 0.931$, $p < 0.05$) and Fe_2O_3 ($r = 0.693$, $p < 0.05$). The sample with the highest percentage of HgT as Hg^{2+} (98%) presented also the highest percentage of CH_3Hg^+ (0.7%) which corroborates the thesis that where the oxidation is happening, methylation is favored.

These values are very preoccupying, showing that care should be taken to avoid the transport of this material to the streams and further studies on the transfer through the food chain would be very important.

Acknowledgments

The authors thank 1) CNPq, 2) CAPES and 3) FAPEMIG for the financial support; 4) Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear for their assistance in sediment collection and X-Ray Fluorescence analyses (Mineral Technology Service Section). The authors also thank the 5) X-Ray Fluorescence Analysis Laboratory of the Departamento de Geologia of the Universidade Federal de Ouro Preto, Brazil and, finally, 6) INCT – ACQUA Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Recursos Minerais, Água e Biodiversidade for total sulfur analyses.

References

Achá, D., Hintelmann, H., Yee, J., 2011. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere* 82, 911–916.

Alexandre, S.C., 2006. Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto – Minas Gerais. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Masters dissertation, p. 53.

Amouroux, D., Wasserman, J.C., Tessier, E., Donard, O.F.X., 1999. Elemental mercury in the atmosphere of a tropical amazonian forest (French Guiana). *Environ. Sci. Technol.* 33, 3044–3048.

Avramescu, M.L., Zhu, J., Yumvihoze, E., Hintelmann, H., Fortin, D., Lean, D.R.S., 2010. Simplified sample preparation procedure for measuring isotope-enriched

methylmercury by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* b29, 1256–1262.

Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 355–384.

Beldowski, J., Miotk, M., Beldowska, M., Pempkowiak, J., 2014. Total, methyl and organic mercury in sediments of the Southern Baltic sea. *Mar. Pollut. Bull.* 87, 388–395.

Bisnotti, M.C., Jardim, W.F., 2004. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Quím. Nova* 27, 593–600.

Bonzongo, J.C., Heim, K.J., Warwick, J.J., Lyons, W.B., 1996. Mercury levels in surface waters of the Carson river-Lahontan reservoir system, Nevada: influence of historic mining activities. *Environ. Pollut.* 92, 193–201.

Canário, J., Vale, C., Caetano, M., Madureira, M.J., 2003. Mercury in contaminated sediments and pore waters enriched in sulphate (Tagus Estuary, Portugal). *Environ. Pollut.* 126, 425–433.

Carrasco, L., Vassileva, E., 2015. Determination of methylmercury in marine sediment samples: method validation and occurrence data. *Anal. Chim. Acta* 853, 167–178.

CCME (Canadian Environmental Quality Guidelines). 2001. http://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/index.html (accessed December 2015).

CONAMA n° 420/2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama> (accessed January 2016).

CONAMA n° 454/2012. <http://www.mma.gov.br/p0ort/conama> (accessed July 2016).

Durão Júnior, W.A., Palmieri, H.E.L., Trindade, M.C., Branco, O.E.A., Carvalho Filho, C.A., Fleming, P.M., da Silva, J.B.B., Windmöller, C.C., 2009. Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. *J. Environ. Monit.* 11, 1056–1063.

Durão Júnior, W.A., 2010. Especificação, quantificação, distribuição e transporte de mercúrio em solos contaminados do município de Descoberto, Minas Gerais. Doctoral thesis. Univ. Fed. Minas Gerais, Dep. Quím. 142.

Eckley, C.S., Luxton, T.P., Mckernan, J.L., Goetz, J., Goulet, J., 2015. Influence of reservoir water level fluctuations on sediment methylmercury concentrations downstream of the historical black butte mercury mine, OR. *Appl. Geochem.* 61, 284–293.

FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente), 2005. Diagnóstico da contaminação ambiental em Descoberto, Minas Gerais, em decorrência do afloramento de mercúrio em dezembro de 2002. Publicação FEAM-RT-DIMOG-001/2005, publicação CDTN-945/2005, Belo Horizonte-MG, p. 166.

FEAM, CDTN, 2006. Diagnóstico da contaminação ambiental em Descoberto, Minas Gerais, em decorrência do afloramento de mercúrio em dezembro de 2002. Relatório final, Belo Horizonte, p. 199.

Feng, X., Bai, W., Shang, I., He, T., Qiu, G., Yan, H., 2011. Mercury speciation and distribution in Aha Reservoir which was contaminated by coal mining activities in Guiyang, Guizhou, China. *Appl. Geochem.* 26, 213–221.

Gosnell, K., Balcom, P., Ortiz, V., DiMento, B., Schartup, A., Greene, R., Mason, R., 2016. Seasonal cycling and transport of mercury and methylmercury in the turbidity maximum of the Delaware estuary. *Aquat. Geochem.* 22 (4), 313–336.

Green-Ruiz, C., Ruelas-Inzunza, J., Páez-Osuna, F., 2005. Mercury in surface sediments and benthic organisms from Guaymas Bay, east coast of the Gulf of California. *Environ. Geochem. Health* 27, 321–329.

Güiza, L., Aristizábal, J.D., 2013. Mercury and Gold Mining in Colombia: a Failed State, vol. 18. Univ. Sci., pp. 33–49.

Horvat, M., Bloom, N.S., Liang, L., 1993. Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 281, 135–152.

Jagtap, R., Maher, W., 2015. Measurement of mercury species in sediments and soils by HPLC–ICPMS. *Microchem. J.* 121, 65–98.

Jenne, E.A., Luoma, S.N., 1977. Forms of trace elements in soils, sediments and associate waters: an overview of their determination and biological availability. In: Wildung, R., Drucker, H. (Eds.), *Biological Implications of Metals in the Environment*. ERDA Symp Ser 42, OAK Ridge, pp. 110–143.

Jonsson, S., Skyllberg, U., Nilsson, M.B., Westlund, P., Shchukarev, E.L., Björn, E., 2012. Mercury methylation rates for geochemically relevant Hg(II) species in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11653–11659.

Jordão, C.P., Alves, N.M., Pereira, J.L., Bellato, C.R., Alvarez, V.H.V., 2000. Adsorção de íons Cu^{2+} em latossolos vermelho-amarelo húmico. *Quím. Nova* 23, 5–11.

Lázaro, W.L., Guimarães, J.R.D., Ignácio, A.R.A., Silva, C.J., Díez, S., 2013. Cyanobacteria enhance methylmercury production: a hypothesis tested in the periphyton of two lakes in the Pantanal floodplain, Brazil. *Sci. Total Environ.* 456–457, 231–238.

Leigh, D.S., 1997. Mercury-tainted overbank sediment from past gold mining in north Georgia, USA. *Environ. Geol.* 30, 244–251.

Leopold, K., Foulkes, M., Worsfold, P., 2010. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Anal. Chim. Acta* 663, 127–138.

Marrugo-Negrete, J., Pinedo-Hernández, J., Díez, S., 2015. Geochemistry of mercury in tropical swamps impacted by gold mining. *Chemosphere* 134, 44–51.

Mauro, J.B.N., Guimarães, J.R.D., Melamed, R., 1999. Mercury methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 631–636.

Nevedo, J.J.B., Martin – Doimeadios, R.C.R., Krupp, E.M., Bernardo, F.J.G., Fariñas, N.R., Moreno, M., Wallace, D., Roperio, M.J.P., 2011. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *J. Chromatogr. A* 1218, 4545–4551.

- Oh, S., Kim, M.K., Yi, S.M., Zoh, K.D., 2010. Distributions of total mercury and methylmercury in surface sediments and fishes in Lake Shihwa, Korea. *Sci. Total Environ.* 408, 1059–1068.
- Palmieri, H.E.L., Fleming, P.M., Branco, O.E.A., Mendes, L.A., Carvalho Filho, C.A., Cintra, M.O.C., Fagundes, O.R., Fortes, F.A., 2009. Avaliação Ambiental após Seis Anos do Afloramento de Mercúrio na Zona Rural do Município de Descoberto, MG. In: XII Congresso Brasileiro de Geoquímica/VIII International Symposium on Environmental Geochemistry. Ouro Preto.
- Pietilä, H., Perämäki, P., Piispanen, J., Starr, M., Nieminen, T., Kantola, M., Ukonmaanaho, L., 2015. Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods. *Chemosphere* 124, 47–53.
- Pinedo-Hernández, J., Marrugo-Negrete, J., Díez, S., 2015. Speciation and bioavailability of Mercury in sediments impacted by gold mining in Colombia. *Chemosphere* 119, 1289–1295.
- Radojević, M., Bashkin, V.N., 1999. Practical environmental analysis. R. Soc. Chem. (Chapter 5), 274–377.
- Rahman, G.M.M., Kingston, H.M., 2004. Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments. *Anal. Chem.* 76, 3548–3555.
- Reichert-Brushett, A.J., Stone, J., Howe, P., Thomas, B., Clark, M., Male, Y., Nanlohy, A., Butcher, P., 2016. Geochemistry and mercury contamination in receiving environments of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environ. Res.* (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.007>.
- Rhodes, V.P., 2010. Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos de área afetada por garimpo de ouro – Rio Gualaxo do Norte, Mariana – MG. Programa de Pós Graduação em Evolução Crustal e Recursos Naturais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Masters dissertation, p. 113.
- Santos, J.S., Guardia, M., Pastor, A., Santos, M.L.P., 2009. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. *Talanta* 80, 207–211.
- Shi, J., Liang, L., Jiang, G., Jin, X., 2005. The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. *Environ. Int.* 31, 357–365.
- Smith, T., Pitts, K., McGarvey, J.A., Summers, A.O., 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1328–1332.
- Soares, L.C., Egreja Filho, F.B., Linhares, L.A., Windmüller, C.C., Yoshida, M.I., 2015. Accumulation and oxidation of elemental mercury in tropical soils. *Chemosphere* 134, 181–191.
- Tinoco, A.A.P., 2008. Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto – MG. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Masters dissertation, p. 89.
- Valle, C.M., 2005. Especificação, quantificação, distribuição e comportamento redox do mercúrio em alguns solos da região de Manaus, AM. Programa de Pós Graduação em Ciências – Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Doctoral thesis, p. 139.
- Valle, C.M., Santana, G.P., Windmüller, C.C., 2006. Mercury conversion processes in Amazon soils evaluated by thermodesorption analysis. *Chemosphere* 65, 1966–1975.
- Windmüller, C.C., 1996. Especificação de mercúrio em solos contaminados por análise de termodesorção acoplada à absorção atômica. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Doctoral thesis, p. 118.
- Windmüller, C.C., Santos, R.C., Athayde, M., Palmieri, H.E.L., 2007. Distribuição e especificação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). *Quím. Nova* 30, 1088–1094.
- Windmüller, C. C., Silva, N. C., Moraes, P. H., Valle, C. M., 2013. Mercury speciation using a commercial direct Mercury analyser. The 11th International Congress on Mercury as a Global Pollutant, Edimburgo. Abstracts of 11th, ICMGP.
- Windmüller, C.C., Durão Júnior, W.A., Oliveira, A., Valle, C.M., 2015. The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): implications for the mercury cycle. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 112, 201–211.

ARTIGO SUBMETIDO

Determination of methylmercury in sediment and cyanobacteria samples: Methods validation and application to a methylation investigation

Louise Aparecida Mendes^{a,*}, Maione Wittig Franco^b, Francisco Antônio Rodrigues Barbosa^b, Paula Iannarelli Aires de Carvalho^b, Jorge Carvalho de Lena^c, Cláudia Carvalhinho Windmöller^a

^aDepartamento de Química, ICEX, UFMG –Antônio Carlos Av., 6627 – 31270-901 – Belo Horizonte – MG, Brazil

e-mail: louisemendes@ufmg.br/ louisemendes@yahoo.com.br

claucw@netuno.lcc.ufmg.br

^bLaboratório de Limnologia Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA), ICB, UFMG –Antônio Carlos Av., 6627 – 31270-901 – Belo Horizonte – MG, Brazil

e-mail: maionewf@hotmail.com

barbosa@icb.ufmg.br

paula.iannarelli27@gmail.com

^cDepartamento de Geologia, DEGEO, UFOP – Morro do Cruzeiro, Escola de Minas – 354000-000 – Ouro Preto – MG, Brazil

e-mail: jorge.delena@degeo.ufop.br

*Corresponding author. Tel.: +55-31-3409-5759.

E-mail address: louisemendes@ufmg.br/ louisemendes@yahoo.com.br (L. A. Mendes)

ABSTRACT

Two methods for the determination of methylmercury (CH_3Hg^+), one in sediment samples and one in cyanobacteria, were validated using gas chromatography coupled to a pyrolysis system with an atomic fluorescence detection system (GC-pyro-AFS). Sediment is one of the major sites of CH_3Hg^+ production and cyanobacteria participate in biotransformation of mercury (Hg) into this species. The methods presented here were based on the extraction of CH_3Hg^+ from these matrices, derivatization, trapping, thermal desorption, GC separation, pyrolysis to reduce Hg^{2+} to elemental species and detection in AFS. The whole validation procedure followed the protocols of INMETRO guide. The results showed that the two methods do not present matrix effect; good linearity (0.994) in the range of 0 to 400 pg CH_3Hg^+ ; repeatability of 3%; intermediate precision of 8%; recovery in spiked sample tests in the range of 93 to 129%; and detection limits of 0.04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ sediment and 1.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ cyanobacteria. Certified reference materials CRM580 and DORM-3 were used to evaluate the accuracy of the method, resulting in 95 and 89% recoveries, respectively. The method for cyanobacteria matrix was used for Hg^{2+} methylation assay with cultures of cyanobacteria and microalgae isolated from water samples collected in an Hg contaminated area. The production of CH_3Hg^+ was detected in the culture of the microalga *Stichococcus* sp. representing a fraction of 0.23% of total Hg added to the medium, indicating its participation in the biotransformation of Hg. The methods were, therefore, adequate for the proposed objective and can be used as important tools in routine analyzes and/or studies of the biogeochemical cycle of Hg.

Keywords: Methylmercury, Cyanobacteria, Sediment, Validation, GC-pyro-AFS.

1. Introduction

CH_3Hg^+ is a highly toxic species, it has high mobility in the environment, it is easy to bioaccumulate it in living organisms and consequently it biomagnifies in the trophic chain.^{1,2} This species is formed in the environment from the inorganic Hg^{2+} , usually through the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB)³⁻⁵ and iron-reducing bacteria (IRB) present in the sediments.³ The methylation of Hg^{2+} occurs through transfer of a methyl group from organic compounds, a reaction that needs to be catalyzed by microorganisms or mediated by a photochemical process.⁶

Sediment is an environmental compartment, which is very important for the study of the Hg cycle. According to Shi et al., sediment is considered as the main site of production of CH_3Hg^+ .⁷ When entering aquatic ecosystems, Hg can react with different compounds or interact with particulate material present in the water and precipitate in the sediment, mainly as the insoluble form HgS .⁸ The sediment allows to the occurrence of innumerable organic or inorganic reactions.⁹ In this matrix, Hg can interconvert to several species of low or high toxicity (for example, CH_3Hg^+), in a process mediated by microorganisms, which can compromise aquatic biota and human health. Studies show that specific conditions are required to favor and/or accelerate methylation, such as: low pH, moderately elevated temperature;¹⁰ seasonality;^{1,10} high concentration of organic matter;¹⁰⁻¹² low water flow rate;¹¹ oxidant redox potential and high concentrations of sulfate.¹²

Short-chain organomercurial species, such as CH_3Hg^+ , can easily penetrate the cell membrane, due to the lipophilic character of the alkyl radical.¹³ Given that CH_3Hg^+ is also soluble in water and is easily absorbed by microorganisms,⁸ it tends to bioaccumulate, mainly due to its affinity for sulfhydryl groups of proteins.¹³ As a

consequence, Hg biomagnifies in the food chain and can reach humans. One of the effects of their intoxication is irreversible damage to the central nervous system.¹³

Cyanobacteria are a group of photosynthetic prokaryotes capable of colonizing various habitats,^{14,15} being found in the water column (pelagic) or sediments (benthic) that receive light radiation, and also in humid soils.¹⁶ They are basically constituted by high molecular weight proteins, glycoproteins and an outer layer of mucilage formed by polysaccharides.¹⁷ Cyanobacteria are part of the phytoplankton community,^{17,18} playing the role of primary producers, and are one of the main entry routes of CH_3Hg^+ in the aquatic food chain.¹ It is worth mentioning that in this complex community, consisting of algae, protozoa, bacteria, fungi and other organisms, the cyanobacteria stand out for their environmental adaptations.¹⁹ In addition, cyanobacteria play a major role in the structuring of biofilms due to the production of an abundant layer of exopolysaccharides, which are the basis for the installation of a complex microbial community.^{20,21} A study by Lázaro et al., demonstrated that the dominance of cyanobacteria is associated with increased production of CH_3Hg^+ .¹ Therefore, the cyanobacteria play important ecological roles that support the processes of Hg bioaccumulation and biotransformation, influencing the biogeochemistry of this element.

Hg chemical speciation studies provide relevant information for the understanding of metal toxicity, mobility and availability.^{22,23} In this case, studying the CH_3Hg^+ species in sediment and cyanobacteria matrices becomes very important because they are possibly the first matrices where the methylation process occurs. In the case of cyanobacteria, bioaccumulation may also be occurring. It is noteworthy that there are few studies on the methylation of Hg and quantification of CH_3Hg^+ in phytoplankton samples or cyanobacteria cultures in the laboratory

Many studies have been carried to develop methodologies for the determination of CH_3Hg^+ in several different matrices. These methodologies generally use the gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry (GC-pyro-AFS),²⁴⁻²⁶ gas chromatography-inductively coupled to plasma mass spectrometry (GC-ICP-MS),²⁶⁻²⁸ high performance liquid chromatography-inductively coupled to plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS)^{25,29,30} and gas chromatography electron capture detector (GC-ECD).^{10,11,31} Techniques that use ICP-MS as detector and isotope dilution are the mainly ones used to study artifact formation, which may occur during the extraction of the analyte.^{24,32-34} GC-pyro-AFS and HPLC-ICP-MS are the techniques that have been widely used. The great advantage of the former over the latter is the low cost of the analysis.

The objective of this work was to validate methods for determination of CH_3Hg^+ by the GC-pyro-AFS technique in environmental samples of sediment and cyanobacteria that could be used as important tools for the study of the biogeochemical cycle of Hg in the environment and specifically methylation studies. An example of application was showed by studying Hg^{2+} methylation with cultures of cyanobacteria and microalgae isolated from water samples collected in an Hg contaminated area.

2. Methodology

2.1 Apparatus

The determination of CH_3Hg^+ was performed on a gas chromatographer coupled to a pyrolysis system with an atomic fluorescence detection system (GC-pyro-AFS), Merx, Mark Brooks Rand Labs, USA. Argon gas free of Hg (grade > 99.9992) - Air Products (Sao Paulo, Brazil) was used as the mobile phase of the chromatographic column. Tenax® trap was used to adsorb the Hg species produced in the derivatization

and trapping step. The purge with nitrogen gas (N₂) free of Hg (high purity grade 99.997) - Oxichama (Contagem, Brazil) was used in the adsorption step.

2.2 Reagents

All reagents used were of analytical grade. The standards were prepared from CH₃HgCl standard solution of 1000 µg L⁻¹ (Brooks Rand Labs, USA), acidified with 0,5% v v⁻¹ de CH₃COOH (J. T. Baker, USA) and 0,2% v v⁻¹ HCl (Merck, Germany). KOH, methanol (gradient grade for liquid chromatography), H₂SO₄ and KCl solution were prepared with Merck reagents (Germany). The sodium tetraethylborate solution (NaBEt₄ - 1.33 mol L⁻¹) was prepared by dissolving NaBEt₄ salt (97%, Sigma Aldrich, USA) in 2 mL of anhydrous tetrahydrofuran (THF) and completing the volume with 38 mL of 2% wv⁻¹ KOH solution. Preparation of this solution requires care such as the use of an inert gas chamber. Sodium acetate buffer from Brooks Rand Labs. Ultrapure water (> 18 MΩ cm) from Milli-Q Element system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout this work.

2.3 Optimization of the chromatographic system and of the derivatisation and trapping step

Preliminarily to the validation of the method, some parameters of the chromatographic system and of the derivatisation and scattering step were optimized in order to obtain a better analytical signal of CH₃Hg⁺. Table 1 presents the parameters optimized with the conditions under which they were tested. The mass of 400 pg CH₃Hg⁺ was used for the optimization. It is worth noting that the column length was

unchanged, as there is only one available commercial column of 31.75 centimeters long, 2.1 mm in diameter, packaged OV-3 (Brooks Rand Labs, USA), composed of phenylmethylsiloxane. Another parameter that remained constant was the temperature of the pyrolytic column (750 °C), where thermal decomposition and reduction of mercury species to elemental Hg (Hg⁰) occurs for quantification in the AFS detector.

Table 1 Optimized chromatography system and derivatization and scattering step parameters and the respective conditions tested

Parameters	Conditions used
Argon flow (GC mobile phase) (mL min ⁻¹)	10.0; 14.0; 16.0; 17.0; 19.0; 25.0 and 31.0
Temperature GC (°C)	30.0; 33.0; 35.0; 36.0; 38.0 and 40.0
Nitrogen flow in the trapping bubbler (mL min ⁻¹)	68; 91; 127; 160; 203; 247; 297; 344 e 394
Reaction time between CH ₃ Hg ⁺ and NaBEt ₄ (min)	0; 2; 5; 8; 11; 14; 17; 20; 23 and 26
Trapping time (min)	5; 10; 15; 20; 25 and 30
Trap drying time (min)	0; 3; 6; 9 and 12
NaBEt ₄ volume (μL)	25; 50; 75; 100 and 125

2.4 Samples used for validation

The sediment sample used in the validation of the method was collected in an area contaminated by Hg from gold mining in Descoberto-MG, Brazil. The sample was intentionally chosen with low concentration of total Hg in order to guarantee also a low

concentration of CH_3Hg^+ . Thus, a low CH_3Hg^+ concentration present in the sample would not influence doping with the same species required for the validation tests.

Cyanobacteria biomass used in this study was obtained from cultures of the strain of *Nostoc paludosum* BA033 (GenBank: KX423684), currently maintained in the Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology – LIMNEA's algae culture bank in the Institute of Biological Sciences in Universidade Federal de Minas Gerais. The samples were cultivated in Erlenmeyers with 5 L capacity in BG-11 culture medium, kept under controlled conditions of light ($27 \mu\text{mol cm}^{-2}$) and temperature ($20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). After 40 days of culture, it was centrifuged and lyophilized.

2.5 Extraction of CH_3Hg^+

2.5.1 Sediments

Before starting the validation procedure, three methods of CH_3Hg^+ extraction from sediment were tested. One procedure suggested by the Merx manufacturer,³⁵ and two other ones described by Carrasco and Vassileva and Horvat et al.^{24,36} The latter was chosen to be used in this work, with some alterations, because of its advantage compared to the others in not using organic solvent.

The sediment sample was subjected to a distillation system (Brooks Rand Labs) following the modified procedure of Horvat et al.³⁶ Sample mass of 0.5000 g was weighed in a teflon tube to which 30 mL of ultrapure water was added together with 500 μL H_2SO_4 8 mol L^{-1} and 200 μL KCl 20% w v^{-1} . Other Teflon tubes for collection of the distillate containing 5 mL of ultrapure water were placed in an ice bath. The sample was distilled at 125 $^\circ\text{C}$ under a nitrogen flow of 61 mL min^{-1} during

approximately 3 hours after which 75% of the distillate had been collected. Then, the distillate was diluted to 50 mL and transferred to a glass jar derivatization system.

2.5.2 *Cyanobacteria*

The extraction of CH_3Hg^+ from the cyanobacteria samples was performed using the procedure proposed by Carrasco & Vassileva and Merx manufacturer with minor alterations.^{25,37} A mass of 0.5000 g of lyophilized cyanobacteria sample was weighed into Teflon tube, 2 mL of 25% m^{-1} KOH/methanol solution was added and the tube was closed, being taken to a thermostatic bath at 75 °C for 3 hours. The volume of the obtained extract was completed to 10 mL. It was stirred in a vortex for 2 minutes and centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. Then, 100 μL of the extract was pipetted and added into 50 mL of ultrapure water in the reaction vial used in the derivatization and trapping step. The volume of the extract for the derivatization step was optimized in order to reduce the limit of detection. The volumes tested were: 20; 30; 50; 100; 200 and 500 μL .

2.6 *Derivatization and trapping step, and determination of CH_3Hg^+*

It was added 300 μL of sodium acetate buffer and 50 μL of sodium tetraethylborate solution (NaBEt_4) to the derivatization system. The set was left to stand for 17 minutes for the contact of the reactants (reaction time), and then purged with nitrogen gas at 91 mL min^{-1} for 25 minutes. Traps were dried with nitrogen gas for 6 minutes and analyzed individually by the thermodesorption system coupled to a

chromatographic column filled with OV-3. The GC temperature was maintained at 35 °C. Argon gas was used as mobile phase and flow rate used was 17 mL min⁻¹.

2.7 Method validation

To evaluate the figures of merit of the methods, the INMETRO DOQ-CGCRE-008 validation guide was used.³⁸ The tested figures of merit were: matrix effect, linearity, working range, limit of detection, limit of quantification, precision and trend/recovery tests.

The analytical curve from 0 to 500 pg was prepared from CH₃HgCl standard solution of 1000 µg L⁻¹, acidified with 0,5% v v⁻¹ CH₃COOH and 0,2% v v⁻¹ HCl. The analytical curves were constructed in triplicate in aqueous solution and using the matrix adjustment method, doping the sediment and cyanobacteria samples. Reference materials CRM-580 (estuarine sediment) and DORM-3 (fish protein) were used, whose concentrations of CH₃Hg⁺ are (75 ± 4) µg kg⁻¹ and (355 ± 56) µg kg⁻¹, respectively.

The blank of the analytical curve in aqueous solution was prepared with 0.5% v v⁻¹ of CH₃COOH and 0.2% v v⁻¹ HCl and then derivatized for posterior analysis. The blanks for the curves for the matrix adjustment method were prepared together with sediment or cyanobacteria extraction procedures for each curve independently, undergoing the same extraction procedures used for sediment and cyanobacteria without addition of CH₃HgCl standard. They were then derivatized for posterior analysis.

It is noteworthy point out that the blank of the analytical routine was submitted to the same procedure applied to the sediment and cyanobacteria samples, i.e., performing all extractions without the presence of the matrix. The analysis of 8 independent replicates of these whites was used to calculate the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

The statistical treatment of the data was performed with Excel 2007 version, following the guidelines of Souza et al.³⁹

2.8 Application of the methods

An application of the method for determination of CH_3Hg^+ in sediment samples has already been published in previous work⁴⁰ and, therefore, only the application for samples of cyanobacteria and microalgae will be addressed.

Strains isolated from water samples collected in the Hg contaminated area at Descoberto, MG, Brazil, were used. Three research works have already described the contaminated area.⁴⁰⁻⁴² It is a small area (ca. 1,300 m²) located on a slope descending towards a stream. Two samples were collected: one in a sedimentation box, whose function is to retain the material leached by rain, and another one in the stream. A volume of 500 mL of the samples was collected in Polypropylene flasks and placed in styrofoam boxes to keep the temperature low. Two mL of each sample were enriched in aqueous BG-11 culture medium in petri dishes maintained at controlled light and temperature conditions. Microcontrolling and solid plating methods were used to obtain the isolates. After obtaining the cultures, they were analyzed under optical microscope for their identification based on morphological characteristics. The cyanobacteria of the genus *Fischerella* sp. and the microalgae of the genus *Stichococcus* sp. were identified. Isolation and identification of the species were carried out by researchers from the LIMNEA laboratory. To produce the samples used in the application of CH_3Hg^+ determination, cultures of cells aged 40 days were doped separately with a concentrated solution of Hg^{2+} , obtaining a final concentration of 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the cultures. They were cultivated under the same conditions previously described for the cyanobacteria *Nostoc*

paludosum (item 2.4). The samples were shaken for 7 days and finally centrifuged, washed and lyophilized for determination of CH_3Hg^+ in GC-pyro-AFS.

Total Hg quantification using a DMA-80 (Milestone) was performed in order to evaluate the percentage of CH_3Hg^+ present in the sample relative to the added Hg.

3. Results and Discussion

3.1 Method Validation

According to the validation guide INMETRO, the validation has the following definitions: (i) it is the confirmation by examination and providing objective evidence that the specific requirements for a particular intended use are attended to; (ii) it is the verification in which the specified requirements are suitable for a intended use. In this work, the main parameters to validate a method were systematically studied, aiming its application in future studies on the biogeochemical cycle of Hg. The validation process was conducted using assays with standard solutions, blanks, spiked samples and certified reference materials.³⁸

3.1.1 Optimization of the chromatographic system

The variables of the chromatographic column, mobile phase flow rate and GC temperature were evaluated taking into account the resolution factor (R_s) and the retention time in order to obtain a shorter analysis time with good resolutions on the analytical signals. The calculation of R_s was performed from the chromatograms obtained. The species release sequence in the chromatograph is: Hg^0 , CH_3Hg^+ , and a third signal that derivatization does not differentiate between Hg^{2+} and $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$, but

the most abundant species is certainly Hg^{2+} , hereafter referred to as Hg^{2+} . The peaks of Hg^0 and CH_3Hg^+ always come closer to each other than the peaks of CH_3Hg^+ and Hg^{2+} , *i.e.*, the signals of the latter are always more separated. For this reason, only the R_s for $\text{Hg}^0/\text{CH}_3\text{Hg}^+$ components will be presented and discussed. Table 2 shows the results obtained for the mobile phase and GC temperature flow tests.

It is observed that the value of R_s is higher than 1.5 for all the varied conditions of the mobile phase flow rate (except for the flow rate of 31.0 mL min^{-1} , $R_s = 1.26$) and the chromatographic column, showing that there is a complete separation between the peaks of Hg^0 and CH_3Hg^+ . The best values of R_s are found for flow rates of 10.0 and 17.0 mL min^{-1} and at temperatures of 30.0 and $33.0 \text{ }^\circ\text{C}$. However, at the 10 mL min^{-1} flow rate the full peak of Hg^{2+} is not obtained by setting the total analysis time to 10 minutes, since the retention time is 4.74 minutes for CH_3Hg^+ , considered to be long. It was also observed instability for this flow rate, since it was the minimum flow rate value of the rotameter, whose use is not advisable.

For flow rates 17.0 and 19.0 mL min^{-1} , the total time of analysis can be reduced to 10 minutes, leading to the observation of the three main complete peaks (Hg^0 , CH_3Hg^+ and Hg^{2+}). It was decided to use the flow rate of 17.0 mL min^{-1} , because it presented better resolution in relation to the flow rate of 19.0 mL min^{-1} and a reduction of the total analysis time and retention time of CH_3Hg^+ compared to the flows of 10.0 ; 14.0 and 16.0 mL min^{-1} .

Although the flow rate of the mobile phase recommended by the EPA 1630 method is 30 mL min^{-1} ,⁴³ the best signal was observed with lower argon gas flow rates. The flow suggested by EPA 1630 method⁴³ has the advantage of reducing the analysis time to 7 minutes, but does not guarantee a good separation of the peaks of Hg^0 and

CH_3Hg^+ , since $R_s < 1.5$ as observed in the flow rate of 31 mL min^{-1} (Table 2). Carrasco & Vassileva used the flow rate of 17.3 mL min^{-1} ,^{24,25} which is similar to the flow rates used in this work.

Even though at temperatures of 30.0 and 33.0 °C the highest value of R_s was observed in relation to the others, with these values it was not possible to obtain the complete signal of Hg^{2+} in 10 minutes of analysis. This is due to the increase in retention time when the GC temperature is decreased. Although the signal used for analysis was only the one related to CH_3Hg^+ , it was considered important to record the exit of all Hg species as a guarantee of the chromatographic column cleaning and to obtain some qualitative information on the presence of this species. Therefore, these temperatures were not chosen to proceed with the CH_3Hg^+ analyzes. At temperatures of 35.0 to 40.0 °C the complete signals of all components (Hg^0 , CH_3Hg^+ and Hg^{2+}) were observed after 10 minutes, with CH_3Hg^+ retention times lower than those observed at temperatures of 30.0 and 33.0 °C. The values of R_s were better at temperatures of 35.0 and 36.0 °C (Table 2). The manufacturer, Merx, recommends the temperature of 36.0 °C for the GC, which can be either adjusted or not. Carrasco & Vassileva used the temperature of 36.0 °C for GC in their works.^{24,25} In the present study, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between the evaluated factors for the temperatures of 35.0 and 36.0 °C. It was therefore decided to set the temperature at 35.0 °C.

Table 2 Resolution factor and retention time obtained for mobile phase and GC temperature optimization

Mobile phase flow rate		
Flow rate (mL min ⁻¹)	Rs (Hg ⁰ /CH ₃ Hg ⁺)	Retention time (min)
10.0	2.62	4.74
14.0	2.12	3.77
16.0	2.24	3.56
17.0	2.64	3.43
19.0	2.14	3.16
25.0	1.54	2.64
31.0	1.26	2.25

GC Temperature		
Temperature (°C)	Rs (Hg ⁰ /CH ₃ Hg ⁺)	Retention time (min)
30.0	3.24	3.98
33.0	2.38	3.78
35.0	2.00	3.42
36.0	2.06	3.38
38.0	1.94	3.22
40.0	1.86	3.02

3.1.2 Optimization of the derivatization and trapping step

The optimized parameters in the derivatisation and scattering step were: N₂ gas flow in the bubbler of the trapezoid; reaction time between CH₃Hg⁺ and NaBEt₄; trapping time; drying time of the trap and the volume of NaBEt₄ solution. These variables were evaluated for the best analytical signal area. The optimization was carried out using a univariate method. The results obtained in the optimization are presented in Table 3.

Table 3 Results of the optimization of the parameters of the derivatisation and trapping step

Parameters	Conditions
N ₂ gas flow in the bubbler of the trapezoid	91 mL min ⁻¹
Reaction time	17 min
Trapping time	25 min
Drying time of the trap	6 min
Volume of NaBEt ₄	50 μL

It was observed that with the increase of the flow of the N₂ gas in the bubbler, which has the function of carrying CH₃Hg⁺ to the Tenax® trap, the analytical signal decreases, increasing the standard deviation of the analysis. It is suggested that there are 2 forms of CH₃Hg⁺ signal loss due to intense bubbling: one can be caused by the water droplets that are carried into the trap, making it difficult to adsorb the Hg species; another is that the force with which the gas carries the analyte does not favor the contact time required for its adsorption. The best analytical signal was obtained for the flow rate of 91 mL min⁻¹, which is lower than the one recommended by the method EPA 1630,⁴³ which suggests a N₂ flow rate of 350 ± 50 mL min⁻¹. A difference of 21% was observed between the largest analytical signal for CH₃Hg⁺ obtained with the N₂ flow rate of 91 mL min⁻¹ and the lowest analytical signal obtained for the flow rate close to the value recommended by method EPA 1630,⁴³ which is 344 mL min⁻¹. Another advantage of using a lower flow rate is the reduction of gas consumption. Therefore, the selected N₂ flow rate of the trapping step to proceed the CH₃Hg⁺ determination was 91 mL min⁻¹.

The reaction time was optimized in order to guarantee the complete reaction between the derivative and the CH_3Hg^+ . The increase of the reaction time, leads to the increase value of the analytical signal, *i.e.*, the longer the reaction time, the greater the extent of the conversion of CH_3Hg^+ to $\text{CH}_3\text{HgCH}_2\text{CH}_3$. The highest value for the analytical signal was observed at 17 minutes. After this time, this value decreases slightly. Based on this, the reaction time was set at 17 minutes, corroborating the recommendation of the method EPA 1630.⁴³

The trapping time is the time required to withdraw the analyte from the reaction vial and to adsorb it in the trap. The results showed that as the time increases, the CH_3Hg^+ analytical signal also increases and stabilizes at 25 minutes. The EPA 1630 method recommends a trapping time of 17 minutes,⁴³ while in the works of Carrasco & Vassileva the time used was 15 minutes.^{24,25} However, the time selected to proceed with the CH_3Hg^+ analyzes in this work was 25 minutes.

The drying of the trap is necessary, since the humidity present in it affects the desorption of the Hg species and, therefore, the analytical signal. There was a difference of the 54% among the CH_3Hg^+ signals observed between 0 and 3 minute. This indicates that the peak area is reduced drastically without the drying of the trap, which confirms the desorption inefficiency. From 3 minutes on, the analytical signal has little variation, with a difference of only 4% between 3 and 12 minutes. In this case, any time above 3 minutes could be chosen for drying the trap. The time of 6 minutes was selected, since at this point a standard deviation of less than 3 minutes was observed and also a guarantee of total drying of the trap. The EPA 1630 method recommends a time of 7 minutes for drying the trap.⁴³

The volume of the NaBEt₄ solution also influences the analytical signal. As the NaBEt₄ volume increases, the analytical signal of CH₃Hg⁺ declines. The largest area of the peak is reached by using a volume of 50 μL. According to EPA 1630,⁴³ the volume of NaBEt₄ solution suggested is 40 μL. The volume of NaBEt₄ selected to proceed with the CH₃Hg⁺ analyzes was 50 μL, as well as in the works of Carrasco & Vassileva.^{24,25}

3.2 Matrix effect

To evaluate the matrix effect, three analytical curves for CH₃Hg⁺ (0; 100; 200; 300; 400 and 500 pg) were prepared in aqueous solution, in sediment, and a third in cyanobacteria biomass. The matrix effect was evaluated by comparing the angular coefficients of the analytical curves of the analyte in the absence and presence of those matrices. These angular coefficients were compared using Fisher's test to evaluate any differences between the angular coefficient variance value, and the Student's t-test to determine whether there was a significant difference between these values, which is indicative of the occurrence of matrix effect. The results are presented in Table 4. The hypothesis tests were performed with significance level of 0.05 using software Excel 2007.

Table 4 Matrix effect evaluation for matrix-adjusted analytical curves in sediment and cyanobacteria biomass

	Angular Coefficient \pm SD*	F calculated	F critic	T calculated	T critic
Aqueous solution	29.46 \pm 0.64				
Matrix adjustment curve in sediment compared to aqueous solution	29.43 \pm 0.13	22.6	19.000	0.07	4.303
Matrix adjustment curve in cyanobacteria biomass compared to aqueous solution	28.3 \pm 0.9	2.10	19.000	1.77	2.776

* SD: Standard Deviation (n = 3).

Table 4 presents the angular coefficients for each analytical curve with their respective standard deviations. Test F shows that there is no significant difference between the standard deviations of the curve obtained with cyanobacteria and the curve with aqueous solution. However, a significant difference was observed between the standard deviations of the curve obtained with the sediment matrix and the curve with aqueous solution. This has an influence on the choice of the method of calculating t-Student values for comparison of the means of the angular coefficients.⁴⁴ The results show that there is no significant difference between the values of angular coefficients of the curves prepared with sediment and the curves prepared with aqueous solutions, as well as between curves prepared with cyanobacteria biomass and aqueous solutions. This shows that there is no significant matrix effect between the CH_3Hg^+ curve in the aqueous solution and the matrix adjustment curve for both sediment and cyanobacteria, showing that the curve in aqueous solution can be used for analytical purposes. Thus, all

subsequent tests were performed with the analytical curve of CH_3Hg^+ in aqueous solution.

3.3 Linearity and regression

Statistical tests were used to evaluate if the analytical curve of CH_3Hg^+ in aqueous solution meets the premises for the use of the Ordinary Least Squares Method (OLSM). Linearity was assessed according to INMETRO and guidelines proposed by Souza.^{38,39} The following parameters were evaluated: visual inspection of the curve; Jackknife method of standardized residuals (outliers); Ryan-Joiner test for normality; Durbin-Watson test for residual independence; homoscedasticity by the Brown-Forsythe or Levene test; and significance of the results obtained for linearity evaluation. It must be pointed out that each of the six levels of the curve was determined in triplicate and independently, totaling 18 points.

The visual inspection indicates that the analytical curve is linear and has the coefficient of determination (R^2) equal to 0.989. However, only the correlation coefficient (r) and the determination coefficient (R^2) are not sufficient for the linearity test. Therefore, other parameters were systematically analyzed.

The occurrence of discrepant values was assessed by the standardized Jackknife method, calculated for each point on the calibration curve. Values with residuals greater than the critical value were eliminated. The test was applied repeatedly until there was no outlier present, following the elimination protocol of up to 2/9 of the data. A total of 4 data were removed by the Jackknife test, among them the level of 500 pg and a replicate of the mass corresponding to 400 pg.

The Ryan-Joiner test was applied to the regression residuals to verify their normality. The results show that these residuals follow the normal distribution, since the deviations of normality are not significant ($p > 0.10$) and the correlation coefficient ($R = 0.9818$) obtained is higher than the critical R (0.9481) for the analytical curve of CH_3Hg^+ (Table 5).

The Durbin-Watson test (d) was applied to evaluate the independence of the residuals. The applied test led to d value of 1.672 (Table 5). In the independence test graph, the points were well distributed in the quadrants, allowing the conclusion that there was no correlation among residuals ($p > 0.05$).

For the homoscedasticity test of the regression residuals, the points of the curve were divided into two groups. Group 1 corresponds to the mass of 0, 100 and 200 pg of CH_3Hg^+ and group 2 corresponds to the mass of 300 and 400pg of CH_3Hg^+ . Homoscedasticity can be estimated by calculating tL (6.91×10^{-1}) using the Brown-Forsythe and Levene test. The tests show that there was no significant difference between the variances studied in groups 1 and 2 ($p > 0.05$), showing that the variances are independent of the concentration for this analytical curve.

The range of 100 to 500 pg for the construction of the analytical curve of CH_3Hg^+ for GC-pyro-AFS, showed deviation from linearity by the ANOVA test. After exclusion of the 500 pg level and one replicate of the 400 pg level, linearity was obtained for a range of 100 to 400 pg, at the 99% confidence level. The regression was significant ($p < 0.05$), indicating that the proposed range meets the premises for OLSM use. The analytical curve data obtained are shown in Table 5.

Table 5 Statistical parameters and data obtained in the evaluation of the premises for using the OLSM method

Statistical parameter	Calibration curve
Slope	28.11
Intercept	288.6
Linear range	100 – 400 pg
R ²	0.994
Número de observações	14
Normality for p > 0.10	
R	0.9818
R critical	0.9481
Independence for p > 0.05	
d	1.672
There is no correlation	1.349 < d < 2.650
Homoscedasticity	
tL	6.91 x 10 ⁻¹
p	0.5029
Linearity deviation (for $\alpha = 0.01$)	
F	5.96
F critical	7.00
Regression (for $\alpha = 0.05$)	
F	2134
F critical	4.74

3.4 Precision and Accuracy

The repeatability (8 independent replicates analyzed on the same day) and intermediate precision (16 replicates in total; sets of 8 independent replicates analyzed on different days) were tested with the standard of 250 pg of CH₃Hg⁺ in aqueous solution, whose level is located near to the central point of the analytical curve. It should be emphasized that, in the absence of a matrix effect, the tests mentioned above were performed in aqueous solution. The recovery rate was 103% for the repeatability test with relative standard deviation (RSD) of 3%. For the intermediate precision, a recovery of 102% with RSD of 8% was obtained. These results are within the criteria

established by the guide of INMETRO and EPA, whose recovery must be between 80 and 120% and RSD should not exceed 15 %.^{38,45}

The trend/recovery was verified with spiked samples and the use of certified reference material: CRM-580 for sediment and DORM-3 for cyanobacteria. Standard sediment spiked tests were conducted with dops of CH_3Hg^+ solution for the final mass corresponding to 80; 175; 275; 375 pg. For cyanobacteria the mass of CH_3Hg^+ for doping were 50, 250 and 350 pg. All doping was carried out in triplicate. The results of trend/recovery are shown in Fig. 1.

The recovery rate of the analyte obtained for the trend/recovery tests and reference materials ranged from 89 to 129% (Fig. 1). According to the acceptance criteria recommended by the INMETRO guide,³⁸ which establish satisfactory recoveries between 80% and 120%,^{45,46} the proposed method presents accuracy, in terms of percentage recovery, within the acceptable range.

Only level 1, corresponding to 80 pg of CH_3Hg^+ in the sediment, exceeded the value of 120% (Fig. 1), might suggest a possible artifact formation. This event has been discussed in the literature as mentioned in the introduction. However, the confirmation of accidental methylation could not be carried out in this work due to the lack of accessibility to an instrument capable of performing isotope dilution tests. Considering that the positive error was not observed for the certified reference material, which has a high concentration of HgT, and also in the other evaluated levels, the artifact production does not seem probable. Given that overestimation of the CH_3Hg^+ content was observed at the level at which the concentration was close to the detection limit of the technique, the high standard deviation and the positive error are justified.

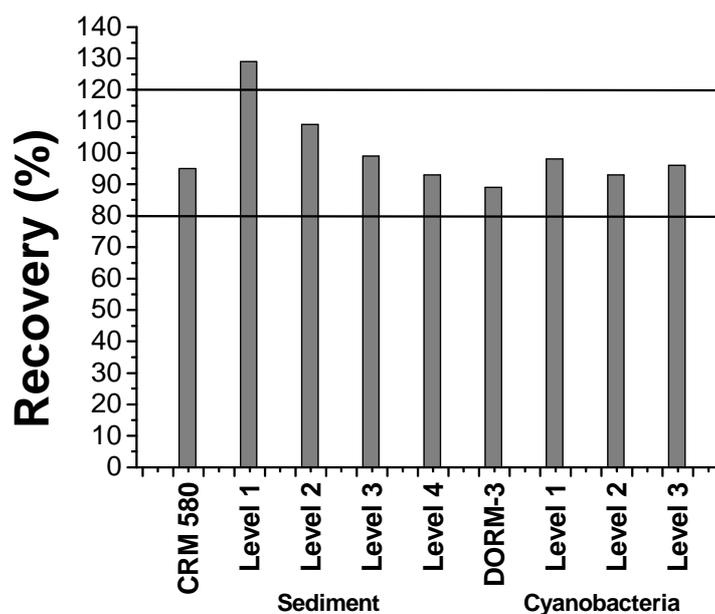


Fig. 1 Recovery rates obtained for the test with reference material and for the spiked samples test.

3.5 Limit of Detection and Limit of Quantification

The LOD and the LOQ were calculated using analytical signal of 8 independent blanks. These blank solutions were prepared using the same reagents used for extraction and derivatization of sediment samples and cyanobacteria. For these calculations, the standard deviation of the analytical signal of the blanks (s), the slope of the analytical curve (b) were considered in the following expressions: $LOD = 3.3 s/b$ and $LOQ = 10 s/b$. The dilutions of each matrix were also considered for the final values calculation.

For sediments, the obtained LOD and LOQ were 0.04 and $0.13 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. For the cyanobacteria the LOD $1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ was and LOQ was $3.9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Faucheur et al. report that the phytoplankton accumulate between 2 and $30 \mu\text{g}$ of CH_3Hg^+ per kg of seaweed in dry weight.⁴⁷ The concentration ranges of CH_3Hg^+ in sediment studies were $(4.1 - 43.4 \mu\text{g kg}^{-1})$;¹⁰ $(8 - 68 \mu\text{g kg}^{-1})$;¹¹ $(1 - 40 \mu\text{g kg}^{-1})$;⁴⁸ and

(0.046 – 5.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$).^{10,11,48,49} These LOD and LOQ values, therefore, allow the methods to be applied for Hg methylation studies in sediments and cyanobacteria.

3.6 Application of the methods

The validated methods were applied to samples of sediments and cultures of cyanobacteria and microalgae obtained from water samples collected in an area in Brazil (Descoberto-MG) contaminated with Hg, due to the use of this metal for the exploitation of gold. A research work on sediments of this area was published in 2016 by Mendes et al. The authors quantified CH_3Hg^+ in river sediments in the contaminated area and in sedimentation boxes at concentrations ranging from <0.11 to $8.0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

As described in the methodology, two water samples were collected in the same area of the sediment sampling sites: one in the sedimentation box and another in a stream in the contaminated area. The cultures of living cells were doped with Hg^{2+} solution in order to evaluate the production of CH_3Hg^+ by the culture of the microorganisms found in the samples.

The cyanobacterium *Fischerella* sp. showed, after the assay, a concentration of CH_3Hg^+ below the LD ($1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$) of the method, which corresponds to values below 0.003% of HgT (dry weight), whose concentration was determined by DMA-80. The microalga presented a production of this organomercurial species, at the concentration of $(25 \pm 2) \mu\text{g kg}^{-1}$ after the test, corresponding to 0.23% of HgT (dry weight). These data shows that the microalgae may be one of the microorganisms responsible for the methylation of Hg^{2+} at the studied site, since it was found in the same sedimentation box where the concentration of CH_3Hg^+ was $8.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (the highest one observed in the contaminated area by Mendes et al.).⁴⁰

Although it is clear that there was methylation by microalgae culture, this proportion of CH_3Hg^+ was very low and it is important that other experiments are performed to better understand under what conditions this microorganism promotes the methylation of Hg and whether other microorganisms present in the contaminated site are also contributing to this important process of the Hg cycle.

4. Conclusions

The validation of the methods for determination of CH_3Hg^+ in sediment samples and cyanobacteria biomass using GC-pyro-AFS showed good results. Among the parameters evaluated in the optimization, it is noteworthy to highlight out the increase of the time and the reduction of the N_2 gas flow in the scattering stage, conditions with which the best analytical signals were obtained. The matrix effect was not observed for the methodology applied in both matrices, making it possible the use of the analytical curve of CH_3Hg^+ in aqueous solution without prejudice to the reliability of the results obtained. Linearity, precision and trend/recovery tests were adequate for the proposed method. Low LOD and LOQ were obtained for both cyanobacteria and sediment analyzes. Although there is no consolidated Brazilian legislation regarding the concentration of CH_3Hg^+ in these matrices, the LOD and LOQ values are appropriate for a possible comparison and discussion of CH_3Hg^+ contamination in environmental samples. These methodologies are an important tool to be used in routine analyses, Hg methylation studies by cyanobacteria and sediment studies in areas vulnerable to environmental contamination by Hg.

The study of methylation by microorganisms found in the contaminated area in Descoberto showed that the cyanobacteria *Fischerella* sp. was not able to produce

CH₃Hg⁺ in the studied conditions. The microalgae *Stichococcus* sp. presented mild methylation ability. However, these are the first results of methylation studies of Hg in living organisms from this contaminated area. It would be important to carry out other studies with changes in some parameters considered important for the biosynthesis of Hg, such as pH, concentration of organic matter, temperature, sulfide concentration, among others.

Acknowledgments

The authors thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support; Limnologia Ecotoxicologia e Ecologia Aquática Laboratório by the partnership.

References

- 1 W. L. Lázaro, J. R. D. Guimarães, A. R. A. Ignácio, C. J. Silva, S. Díez, Cyanobacteria enhance methylmercury production: A hypothesis tested in the periphyton of two lakes in the Pantanal floodplain, Brazil. *Science of the Total Environment*, 2013; **456 – 457**, 231-238.
- 2 L. Carrasco, C. Barata, E. García-Berthou, A. Tobias, J. M. Bayona, S. Díez, Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain), *Chemosphere*, 2011, **84**, 1642-1649.
- 3 S. Jonsson, U. Skylberg, M. B. Nilsson, P. Westlund, E. L. Shchukarev, E. Björn, Mercury methylation rates for geochemically relevant Hg(II) species in sediments, *Environ. Sci. Technol.*, 2012; **46**, 11653-11659.

- 4 D. Achá, H. Hintelmann, J. Yee, Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region, *Chemosphere*, 2011, **82**, 911-916.
- 5 G. C. Compeau, R. Bartha, Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment, *Appl Environ Microbiol.*, 1985, **50**, 498 – 502.
- 6 F. M. M. Morel, A. M. L. Kraepiel, M. Amyot. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1998, **29**, 543-566.
- 7 J. Shi, L. Liang, G. Jiang, X. Jin, The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China, *Environment International*, 2005, **31**, 357-365.
- 8 T. Tomiyasu, A. Naganoa, N. Yonehara, H. Sakamoto, R. K. Oki, H. Akagi, Mercury contamination in the Yatsushiro Sea, south-western Japan: spatial variations of mercury in sediment, *The Science of the Total Environment*, 2000, **257**, 121-132.
- 9 C. Green-Ruiz, J. Ruelas-Inzunza, F. Páez-Osuna, Mercury in surface sediments and benthic organisms from Guaymas Bay, east coast of the Gulf of California, *Environmental Geochemistry and Health*, 2005, **27**, 321-329.
- 10 J. Pinedo-Hernández, J. Marrugo-Negrete, S. Díez, Speciation and bioavailability of Mercury in sediments impacted bu gold mining in Colombia, *Chemosphere*, 2015, **119**, 1289-1295.
- 11 J. Marrugo-Negrete, J. Pinedo-Hernández, S. Díez, Geochemistry of Mercury in tropical swamps impacted by gold mining, *Chemosphere*, 2015, **134**, 44-51.
- 12 C. S. Eckley, T. P. Luxton, J. L. Mckernan, J. Goetz, J. Goulet, Influence of reservoir water level fluctuations on sediment methylmercury concentrations downstream of the historical Black Butte Mercury mine, OR, *Applied Geochemistry*, 2015; **61**, 284-293.

- 13 R. C. C. M. Micaroni, M. I. M. S. Bueno, W. F. Jardim, Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte, *Química Nova*. 2000, **23**, 487-495.
- 14 K. Kosek, Z. Polkowska, B. Zyszka, J. Lipok, Phytoplankton communities of polar regions—Diversity depending on environmental conditions and chemical anthropopressure, *Journal of Environmental Management*, 2016, **171**, 243-259.
- 15 W. F. Vicent. Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions, In: The Ecology of Cyanobacteria. B. A. Whitton, M. Potts, editors, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2002, p. 321 – 340.
- 16 L. Hoffmann, Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology, *European Journal of Phycology*, 1999, **34**, 371-379.
- 17 R. E. Lee, Phycology. fourth ed. Cambridge University Press, Colorado, USA; 2008.
- 18 A. Pelechata, M. Pelechaty, A. Pukacz, Factors influencing cyanobacteria community structure in Chara-lakes, *Ecological Indicators*, 2016, **71**, 477-490.
- 19 C. C. Carey, B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton, J. D. Brookes, Ecophysiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate, *Water Research*, 2012, **46**, 1394–1407.
- 20 F. Rossi, R. Philipps, Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats, *Life*, 2015, **5**, 1218-1238.
- 21 N. Noffke, G. Gerdes, T. Klenke, Benthic cyanobacteria and their influence on the sedimentary dynamics of peritidal depositional systems (siliciclastic, evaporitic salty, and evaporitic carbonatic), *Earth-Science Reviews*, 2003, **62**, 163-176.

- 22 M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, M. Horvat, Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation, *Trends Anal Chem.*, 2005, **24**, 383–92.
- 23 NRC (National Research Council), Bioavailability of contaminants in soils and sediments: Processes, Tools and Applications, The National Academies Press, Washington, DC; 2003.
- 24 L. Carrasco & E. Vassileva, Determination of methylmercury in marine sediment samples: Method validation and occurrence data, *Analytica Chimica Acta*, 2015, **853**, 167-178.
- 25 L. Carrasco & E. Vassileva, Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation, *Talanta*, 2014, **122**, 106-114.
- 26 J. J. B. Nevado, R. C. R. Martín-Doimeadios, E. M. Krupp, F. J. G. Bernardo, N. R. Fariñas, M. Moreno, D. Wallace, M. J. P. Roper, Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis, *Journal of Chromatography A*, 2011, **1218**, 4545-4551.
- 27 H. Pietilä, P. Perämäki, J. Piispanen, M. Starr, T. Nieminen, M. Kantola, L. Ukonmaanaho, Determination of low methylmercury concentrations in peat soil samples by isotope dilution GC-ICP-MS using distillation and solvent extraction methods, *Chemosphere*, 2015, **124**, 47-53.
- 28 B. F. Beck, N. W. Johnson, Geochemical factors influencing the production and transport of methylmercury in St. Louis River Estuary sediment, *Applied Geochemistry*, 2014, **51**, 44-54.
- 29 R. Jagtap, F. Krikowa, W. Maher, S. Foster, M. Ellwood, Measurement of methyl Mercury (I) and Mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS, *Talanta*, 2011, **85**, 49-55.

- 30 J. S. Santos, M. Guardia, A. Pastor, M. L. P. Santos, Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS, *Talanta*, 2009, **80**, 207-211.
- 31 T. Tomiyasu, A. Matsuyama, R. Imura, H. Kodamatani, J. Miyamoto, Y. Kono, D. Kocman, J. Kotnik, V. Fajon, M. Horvat, The distribution of total and methylmercury concentrations in soils near the Idrija mercury mine, Slovenia, and the dependence of the mercury concentrations on the chemical composition and organic carbon levels of the soil, *Environ Earth Sci.*, 2012, **65**, 1309-1322.
- 32 M. L. Avramescu, J. Zhu, E. Yumvihoze, H. Hintelmann, D. Fortin, D. R. S. Lean, Simplified sample preparation procedure for measuring isotope-enriched methylmercury by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, **29**, 1256-1262.
- 33 G. M. M. Rahman, H. M. Kingston, Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments, *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 3548-3555.
- 34 L. Lambertsson, E. Lundberg, M. Nilsson, W. Frech, Applications of enriched stable isotope tracers in combination with isotope dilution GC-ICP-MS to study mercury species transformation in sea sediments during in situ ethylation and determination, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1296-1301.
- 35 Brooks Rand Labs, *Application Note: Extraction of methylmercury from sediments and soils*, 2013a.
- 36 M. Horvat, N. S. Bloom, L. Liang, Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples, *Analytica Chimica Acta*, 1993, **281**, 135-152.

37 Brooks Rand Labs, *Application Note: Alkaline digestion of biological tissue for methylmercury analysis*, 2013b.

38 INMETRO - DOQ-CGCRE-008, *Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos*, Revisão 05, 2016; p. 19.

39 S. V. C. Souza, C. T. Pinto, R. G. Junqueira, In-house method validation: application in arsenic analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, **20**, 241-247.

40 L. A. Mendes, J. C. Lena, C. M. Valle, P. M. Fleming, C. C. Windmöller, Quantification of methylmercury and geochemistry of mercury in sediments from a contaminated area of Descoberto (MG), Brazil, *App. Geochem.*, 2016, **75**, 32-43.

41 C. C. Windmoller, W. A. Durão Júnior, A. Oliveira, C. M. Valle, The redox processes in Hg-contaminated soils from Descoberto (Minas Gerais, Brazil): implications for the Mercury cycle, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, **112**, 201-211.

42 W. A. Durão Jr., H. E. L. Palmiere, M. C. Trindade, O. E. A. Branco, C. A. Carvalho Filho, P. M. Fleming, J. B. B. Silva, C. C. Windmöller, Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil, *J. Environ. Monit.*, 2009, **11**, 1056–1063.

43 EPA 1630, *Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS*, U. S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 2001; p. 49.

44 Sanders DH, Smidt RK. *Statistics A First Course*. Sixth ed. Mc Graw Hill, Boston. 2000; p. 736.

45 EPA. Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program SW-846 Methods. U. S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 1992; p. 32.

46 J. M. Green, Doing a thorough method validation can be tedious, but the consequences of not doing it right are wasted time, money, and resources: A practical guide to analytical method validation, *Anal Chem.*, 1996, **68**, 305-309.

47 S. L. Faucheur, P. G. C. Campbell, C. Fortin, V. I. Slaveykova, Interactions between mercury and phytoplankton: speciation, bioavailability, and internal handling, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, **33**, 1211-1224.

48 L. Spada, C. Annicchiarico, N. Cardellicchio, S. Giandomenico, A. D. Leo. Mercury and methylmercury concentrations in Mediterranean seafood and surface sediments, intake evaluation and risk for consumers, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2012, **215**, 418-426.

49 S. Wang, Y. Jia, S. Wang, X. Wang, H. Wang, Z. Zhao, B. Liu, Total mercury and monomethylmercury in water, sediments, and hydrophytes from the rivers, estuary, and bay along the Bohai Sea coast, northeastern China, *Applied Geochemistry*, 2009, **24**, 1702-1711.