



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**João Pedro Rodrigues de Souza**

**Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO EM CABELOS DE  
COMUNIDADES INDÍGENAS E RIBEIRINHAS**

**Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza**

**Brasília-DF**

**2019**

**João Pedro Rodrigues de Souza**

**DETERMINAÇÃO DE METILMERCÚRIO EM CABELOS DE  
COMUNIDADES INDÍGENAS E RIBEIRINHAS**

Documento-base apresentado à  
Universidade de Brasília para subsidiar a defesa  
da dissertação de mestrado como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação em  
Química.

**Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza**

Brasília-DF

2019

## **Agradecimentos**

Ao Professor Jurandir Rodrigues de Souza pela orientação, respeito, compreensão e paciência durante o período deste curso.

Aos professores José Garrofe Dórea e Jeremie Garnier por participarem da banca de defesa e contribuírem para a melhora desta dissertação.

Aos professores Alexandre Fonseca e José Vicente Bernardi pelas contribuições valiosas oferecidas na defesa de projeto de mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica e Ambiental pela convivência amigável, a companhia agradável e toda a ajuda indispensável para realização deste trabalho.

Aos amigos químicos e não-químicos pelas mensagens de apoio e de preocupação, as sessões de cinema, e por todos os momentos e descontração compartilhados.

A minha família pelo apoio incondicional e indispensável, em especial minha mãe Laurita pelo carinho e paciência.

À Universidade de Brasília e o Instituto de Química por proverem as facilidades, as aulas e as condições necessárias para realização deste mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## Resumo

O Hg é um metal que se apresenta como várias espécies tóxicas no meio ambiente, bioacumulando e biomagnificando em seres vivos. O objetivo deste trabalho é validar e aplicar uma metodologia de análise de mercúrio orgânico e total em cabelos de indivíduos de comunidades indígenas ou ribeirinhas da Amazônia. Com esse intuito, foi analisado mercúrio total em 17 amostras reais de cabelo e material de referência certificado para validação das metodologias propostas com detecção por espectroscopia de absorção atômica com atomização por dessorção térmica (TDAAS). A faixa linear para determinação de THg é de 0,1 a 90 ng de Hg, com LQ = 0,1 ng. A recuperação obtida ao determinar a concentração THg no material BCR 397 foi de 86,2%. Para análise de Hg<sub>org</sub>, foram testados dois métodos de extração, nos quais os resultados se mostraram coerentes para o material de referência certificado BCR 397. A Eluição através de coluna de troca iônica seguida de espectroscopia de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS) foi testada como uma técnica de separação de metilmercúrio, na qual o LQ foi de 0,84 ng. Também foi utilizada a lixiviação ácida com HCl 4% seguida por TDAAS como método de determinação de Hg<sub>org</sub>. Os resultados de THg obtidos para as amostras de cabelo reais são parecidos com os de outros trabalhos, mas os de Hg<sub>org</sub> são divergentes de dados da literatura consultada.

## Abstract

Hg is a metal that presents itself as various toxic species in the environment, bioaccumulating and biomagnifying in living beings. The objective of this work is to validate and apply a methodology for the analysis of organic and total mercury in hair of individuals from indigenous or riverside communities of the Amazon. For this purpose, total mercury was analyzed in 17 real hair samples and certified reference material to validate the proposed methodologies with detection by thermal desorption atomization atomic absorption spectroscopy (TDAAS). The linear range for THg determination is from 0.1 to 90 ng of Hg, with LQ = 0.1 ng. The recovery obtained when determining the THg concentration in BCR 397 material was 86.2%. For Hg<sub>org</sub> analysis, two extraction methods were tested in which the results were consistent for the BCR 397 certified reference material. Elution by ion exchange column followed by cold vapor atomic absorption spectroscopy (CV-AAS) was tested as a methylmercury separation technique in which the LQ was 0.84 ng. Acid leaching with 4% HCl followed by TDAAS was also used as the Hg<sub>org</sub> determination method. The THg results obtained for the real hair samples are similar to those of other works, but those of Hg<sub>org</sub> are divergent from data from the consulted literature.

## **Lista de Siglas e abreviaturas**

**AOAC** – *Association of Official Analytical Chemists*

**ANOVA** – *Analysis of Variance*

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CVAAS** – *Cold Vapour Atomic Absorption Spectroscopy*

**CVAFS** - *Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectroscopy*

**DP** – Desvio padrão

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**ER** – Erro relativo

**ETAAS** – *Eletrotermic Atomic Absorption Spectroscopy*

**GC-ECD** – *Gas Chromatography - Electron Capture Detector*

**GC-ICPMS** - *Gas Chromatography - Inducted Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**GL** – Graus de Liberdade

**Hg<sub>org</sub>** - mercúrio orgânico

**HPLC-ICPMS** – *High Performance Liquid Chromatography - Inducted Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**HPLC-TDAFS** - *High Performance Liquid Chromatography - Thermodesorption Atomic Fluorescence Spectroscopy*

**I.C.95%** - Intervalo de confiança a nível de 95%

**INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

**INPE** – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

**LD** – Limite de detecção

**LQ** – Limite de quantificação

**MQ** – Média quadrática

**MRC** – Material de referência certificado

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**SQ** – Soma quadrática

**THg** – mercúrio total

**TDAAS** - *Thermodessorption Atomic Absorption Spectroscopy*

**U.A.** – Unidades de absorção

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema do equipamento RA-915 <sup>+</sup> acoplado ao PYRO-915 <sup>+</sup> . 1 – Amostra dentro do “barquinho” de quartzo, 2 – primeira câmara de aquecimento, 3 – segunda câmara de aquecimento, 4 – célula analítica pirolítica, 5 – espelho, 6 – filtro de ar, 7 – saída de ar, 8 – corpo do RA-915 <sup>+</sup> , 9 – lâmpada de mercúrio, 10 – computador.....	7
<b>Figura 2</b> - Ciclo do mercúrio no ambiente. Adaptado de Beckers at al., (2017).....	12
<b>Figura 3</b> – Área de.....	19
<b>Figura 4</b> – Sistema de segurança das cápsulas do micro-ondas DGT 100 plus.....	26
<b>Figura 5</b> – Boat de quartzo amostrador.....	26
<b>Figura 6</b> – RA-915 <sup>+</sup> PYRO.....	27
<b>Figura 7</b> – Esquema do equipamento mercury Monitor 3200.....	29
<b>Figura 8</b> - Curvas analíticas usadas para determinação de efeito matriz e suas respectivas funções lineares. A curva de quadrados alaranjados foi feita somente com as soluções padrão, e a com círculos azuis foi feita com MRC fortificado.....	32
<b>Figura 9</b> - Curva analítica para avaliação das figuras de mérito relacionadas a linearidade do método nas condições de trabalho estabelecidas.....	33
<b>Figura 10</b> – Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em todas as amostras.....	48
<b>Figura 11</b> – Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em amostras da aldeia Goroti-re.....	49
<b>Figura 12</b> – Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em amostras da comunidade ribeirinha de São Félix do Xingu.....	49

## Lista de Quadros e Tabelas

<b>Quadro 1</b> - Publicações sobre análise de mercúrio em amostras humanas no Brasil durante o período de 2014 a 2018.....	18
<b>Quadro 2</b> - Comparação entre as duas metodologias utilizadas para separação de Hg <sub>org</sub> .....	44
<b>Tabela 1</b> - Identificação das amostras de cabelo.....	21
<b>Tabela 2</b> - Concentração de mercúrio em peixes coletados no Rio Fresco.....	22
<b>Tabela 3</b> - Variáveis usadas no teste t para verificação de efeito matriz.....	32
<b>Tabela 4</b> - Análise de variância dos dados da curva analítica para análise por TDAAS.....	34
<b>Tabela 5</b> - Funções lineares das curvas analíticas utilizadas para determinação de mercúrio total.....	35
<b>Tabela 6</b> - Valores do sinal e do desvio padrão do branco da curva analítica, e dos limites de detecção e quantificação.....	36
<b>Tabela 7</b> - Resultados de análise de Hg em material de referência certificado e recuperação.....	36
<b>Tabela 8</b> - Valores de concentração de mercúrio total no MRC, desvio padrão de 6 replicatas e coeficiente de variação.....	37
<b>Tabela 9</b> - Figuras de mérito determinadas para análise de Hg total em cabelo por TDAAS.....	38
<b>Tabela 10</b> - Figuras de mérito para método de extração de MeHg por eluição em coluna de troca iônica.....	39
<b>Tabela 11</b> - Resultados das análises das amostras eluídas em coluna de troca iônica. O teor de metilmercúrio (MeHg%) foi calculado com os valores experimentais de [MeHg] em relação às concentrações de mercúrio total.....	39
<b>Tabela 12</b> - Figuras de mérito para validação de metodologia de extração de Hg orgânico por lixiviação com HCl 4%.....	42
<b>Tabela 13</b> - Comparação entre dado experimental e certificado de [MeHg] no BCR397.....	42
<b>Tabela 14</b> - Variáveis usadas no teste de hipóteses.....	43
<b>Tabela 15</b> - Concentrações de mercúrio orgânico determinadas após lixiviação com HCl 4% ..	46
<b>Tabela 16</b> - Resultados das análises de mercúrio total e orgânico, ambos determinados por TDAAS, e valores em porcentagem do teor de mercúrio orgânico nas amostras.....	47

## Sumário

1. <b>Introdução</b> .....	1
2. <b>Objetivos</b> .....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. <b>Referencial Bibliográfico</b> .....	4
3.1. Análise de especiação.....	4
3.1.1. Especiação de metais traço .....	4
3.2. Especiação de Hg .....	5
3.3. Especiação de Hg em cabelo .....	8
3.3.1. Preparo de amostras .....	8
3.3.2. Metodologias analíticas .....	9
3.4. Mercúrio no ambiente .....	11
3.5. Espécies de mercúrio.....	13
3.5.1. Metilmercúrio (MeHg).....	14
3.5.2. Dimetilmercúrio (Me <sub>2</sub> Hg).....	14
3.5.3. Etilmercúrio (EtHg) .....	15
3.6. Bioacumulação e biomagnificação do Hg.....	15
3.7. Monitoramento de contaminação de humanos por mercúrio no Brasil .....	16
4. <b>Materiais e métodos</b> .....	19
4.1. Amostragem .....	19
4.2. Equipamentos .....	23
4.3. Soluções, reagentes e materiais .....	23
4.4. Pré-preparo de amostras .....	24
4.5. Lixiviação de MeHg com HCl 4% .....	24
4.6. Lixiviação com HCl 6 mol.L <sup>-1</sup> .....	24

4.7. Eluição em coluna de troca iônica.....	25
4.8. Determinação de mercúrio total em cabelo por espectroscopia de absorção atômica com dessorção térmica (TDAAS) .....	26
4.9. Análise de mercúrio orgânico por espectroscopia de absorção atômica com vapor frio (CVAAS).....	27
4.10. Tratamento de dados .....	30
<b>5. Resultados e discussões .....</b>	<b>31</b>
5.1. Validação de método para determinação de mercúrio total por TDAAS .....	31
5.1.1. Efeito matriz.....	31
5.1.2. Faixa linear de trabalho/sensibilidade.....	33
5.1.3. Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD).....	35
5.1.4. Recuperação (exatidão).....	36
5.1.5. Repetibilidade (precisão) .....	37
5.2. Separação de MeHg em coluna de troca iônica e detecção por CVAAS.....	38
5.3. Lixiviação com HCl 4% para determinação de mercúrio orgânico .....	41
5.3.1. Validação da metodologia.....	41
5.3.2. Aplicação da metodologia às amostras selecionadas .....	44
5.4. Teor percentual de Hg orgânico nas amostras de cabelo .....	46
<b>6. Conclusões e perspectivas .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>54</b>

## 1. Introdução

Mercúrio (Hg) é um metal considerado tóxico para várias espécies de seres vivos (PUGA et al., 2016). Suas espécies são solúveis em água e gorduras, logo, apresentam alta mobilidade em meio biológico, e podem causar efeitos negativos na saúde humana (EKINO et al., 2007). Dentre essas espécies, os organomercuriais (compostos de Hg ligados covalentemente a grupos orgânicos) são as de maior preocupação ambiental, porque são conhecidas toxinas que afetam o sistema nervoso humano, podendo levar a deficiências intelectuais em pessoas contaminadas (BECKERS; RINKLEBE, 2017).

Em 1950, na baía de Minamata no Japão, uma indústria de cloreto de polivinila que utilizava Hg como catalisador derramou acidentalmente rejeitos no canal de drenagem, que contaminou a biota marinha na região com concentrações de mercúrio de até  $39,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Como consequência do fenômeno de bioacumulação, a concentração em humanos que consumiam frutos do mar da região chegou a  $140 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e as sequelas causadas por essa contaminação ficaram conhecidas como doença de Minamata (EKINO et al., 2007; HARADA, 1995).

A contaminação de metais traços em humanos pode ser avaliada pela análise de cabelo, que é um tipo de amostra que apresenta algumas vantagens: os métodos de amostragem usados para coleta desse tipo de material são não-invasivos, o armazenamento das amostras não requer nenhuma condição especial (resfriamento, controle de pH, etc.) e o transporte é realizado com facilidade devido ao volume pequeno.

Os cabelos são tecidos formados de cadeias de  $\alpha$ -queratina, da qual fazem parte aminoácidos com grupos tiol (R-S-H) pelos quais o Hg (e outros metais) tem alta afinidade. A taxa de crescimento de cabelo é aproximadamente  $10 \text{ mm}\cdot\text{mês}^{-1}$  e 90% de seus folículos são ativos, o que possibilita a agregação dos metais em circulação no sangue a esse tecido e, faz com que a concentração do analito neste reflita hábitos nutricionais e de saúde de um indivíduo (POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

As metodologias para especiação de mercúrio em cabelo humano envolvem a extração dessas espécies para solução ou a digestão completa das amostras, e esses são processos de aos quais estão associados alguns erros e dificuldades analíticas, principalmente a perda do analito e contaminação das amostras. Há, então, uma necessidade de avaliação e validação das metodologias antes de aplicá-las, para garantir a qualidade dos resultados (EURACHEM, 2014).

A detecção de mercúrio em cabelo pode ser feita com a técnica analítica de espectroscopia de absorção atômica (AAS), acoplada ou não a técnicas cromatográficas, que realizam a separação das diversas espécies de Hg (CLOUGH et al., 2018).

A base teórica da AAS é sustentada no fenômeno de absorção de radiação por átomos livres de um elemento. O detector do equipamento mede a diferença da intensidade de um feixe de luz antes e depois da incidência deste nos átomos do analito. A diferença de intensidade gera um sinal de absorbância que é proporcional à concentração do analito na amostra (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

Com o intuito de avaliar a contaminação por mercúrio de indivíduos de duas comunidades indígena e ribeirinha da Amazônia, a proposta deste trabalho é determinar a concentração de Hg em cabelos com enfoque na detecção dos organomercuriais, utilizando técnicas de espectroscopia de absorção atômica e métodos de separação.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

- Validar e aplicar uma metodologia de especiação de mercúrio em amostras de cabelos de populações indígenas e ribeirinhas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar uma metodologia de análise de espécies orgânicas de mercúrio em cabelo humano;
- determinar figuras de mérito para validação da metodologia otimizada;
- gerar dados sobre especiação de mercúrio em amostras de interesse ambiental.

### **3. Referencial Bibliográfico**

#### **3.1 Análise de especiação**

No passado, métodos quantitativos para análise de metais e metaloides eram desenvolvidos para determinar a concentração total de um elemento, sem considerar que as diferentes espécies dos elementos influenciam nas interações e reações nas quais estes se envolvem. À medida que foi se entendendo a importância dessas espécies nos processos ambientais, surgiram metodologias analíticas para analisar separadamente as formas químicas de interesse. Análise de especiação foi o nome pelo qual essas metodologias ficaram conhecidas (LUND, 1990).

Espécies químicas são diferentes estados em que um elemento pode se encontrar na natureza. São consideradas espécies diferentes de um mesmo elemento: íons em estados de oxidação distintos (Ex.:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), diferentes compostos organometálicos de um mesmo metal (Ex.:  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ ), ou mesmo substâncias inorgânicas distintas contendo um mesmo átomo central (Ex.:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ).

Análises de especiação são aplicadas a determinação de compostos inorgânicos, metais, metaloides, alguns ametais (fósforo, nitrogênio, enxofre) e compostos organometálicos. As análises orgânicas, apesar de envolverem a determinação de espécies químicas a nível molecular, não são incluídas no termo em discussão (LUND, 1990).

Nem todas as espécies de um elemento podem ser determinadas individualmente, mas aquelas que apresentam estados termodinamicamente estáveis podem ser diretamente detectadas, previamente separadas ou derivatizadas.

##### **3.1.1 Especiação de metais traço**

A especiação de metais traço apresenta maiores desafios analíticos. Isso porque as concentrações das espécies individuais são ainda mais baixas do que a concentração total do elemento, fazendo-se necessários limites de quantificação na ordem de ppt ou a utilização de técnicas de pré-concentração.

Além do limite de quantificação, a sensibilidade e seletividade são também aspectos que contribuem para a dificuldade de análises de especiação química. As espectroscopias de emissão e absorção atômica, duas das técnicas mais utilizadas em análises de metais traço, não são seletivas para espécies individuais, no entanto podem ser combinadas com cromatografia

líquida ou gasosa, formando métodos com alta seletividade, devido à separação cromatográfica e alta sensibilidade oferecida pela detecção por AES ou AAS (CLOUGH et al., 2018).

Atualmente, o uso de cromatografia líquida combinada com espectrometria de massas (HPLC-ICP-MS) ou espectroscopia de emissão atômica (HPLC-ICP-AES) é mais comum nos trabalhos de análise de especiação, isso porque permite a separação de espécies de amostras em solução líquida por meio de várias opções de colunas cromatográficas e conta com a alta sensibilidade e limites de quantificação dos detectores com plasma indutivamente acoplado (CLOUGH et al., 2018).

Com os recentes desenvolvimentos em síntese de nanomateriais, surgiram vários trabalhos mostrando que nanosensores eletroquímicos e espectroscópicos podem ser usados em análises de especiação em variados tipos de amostras. As amostras em que mais comumente são aplicados esses materiais é água, devido à conveniência de realizar as análises em amostras que já são líquidas e ao objetivo de desenvolver métodos que podem ser utilizados com equipamentos portáteis em análises *in situ* (COSTAS-MORA et al., 2014; GUO et al., 2016; LIU et al., 2016; ZHANG et al., 2014).

Uma dificuldade do trabalho com sensores é a seletividade, pois ainda não há o controle desejado, durante a sua síntese, sobre a composição química e homogeneidade do produto. Esse problema leva a dúvidas nos mecanismos de ligação do sensor ao analito e a incertezas a respeito da emissão do sinal no equipamento.

### **3.2 Especiação de Hg**

Análises de especiação de mercúrio podem ser realizadas com uma ampla variedade de técnicas instrumentais: espectroscopia de absorção atômica, espectroscopia de fluorescência atômica, cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Quando se utiliza as técnicas espectroscópicas de absorção ou fluorescência atômica, a especiação é feita no preparo de amostra, então as soluções contendo cada espécie são inseridas no equipamento separadamente. Além dessas, existem técnicas baseadas em sensores eletroquímicos ou espectroscópicos (AMDE et al., 2016; CLOUGH et al., 2018; POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

Nas espectroscopias de absorção atômica e fluorescência atômica, as formas de atomizar os analitos variam. Os instrumentos mais comuns utilizam a estratégia de vapor frio, ou geração de vapor químico (CVAAS e CVAFS), que consiste em fazer uma reação do mercúrio presente na amostra com um agente redutor para que seja formado um vapor de mercúrio elementar no

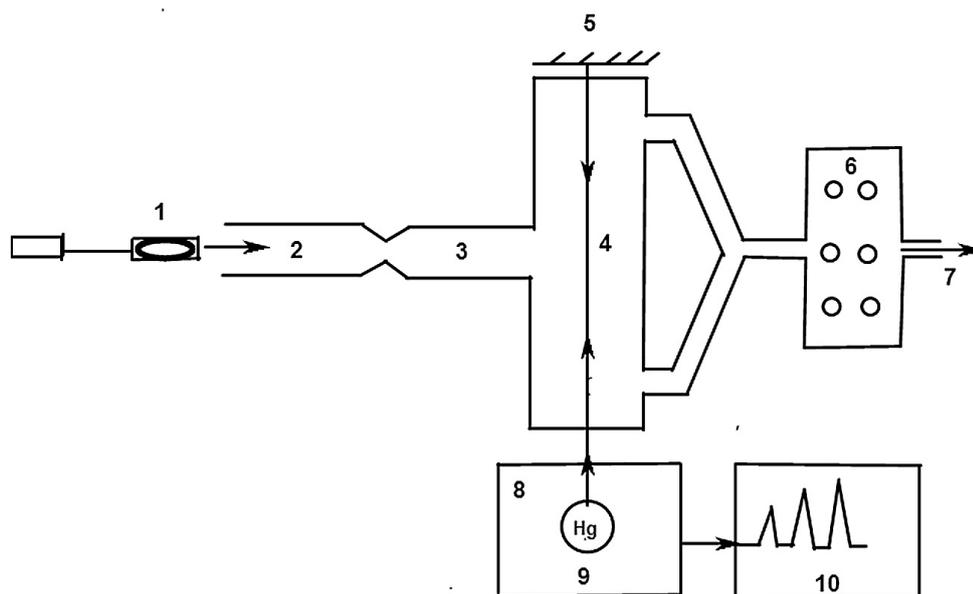
frasco reacional. O vapor gerado é arrastado por um gás inerte até a célula analítica para a detecção (GIL et al., 2015).

As técnicas de geração de vapor têm como principal limitação a restrição a amostras líquidas. Isso significa que são necessárias etapas de preparo de amostra, nas quais ocorre maior introdução de erros em análises químicas. Outro aspecto é que há maior produção de resíduos químicos por causa do uso de reagentes tóxicos ou de difícil tratamento como cloreto estânico, tetrahidroborato de sódio e permanganato de potássio.

Atomização eletrotérmica (ETAAS) e dessorção térmica (TDAAS) são técnicas que fazem uso de altas temperaturas para formar átomos de mercúrio livres. Na ETAAS a amostra é colocada em um forno cilíndrico de grafite que é aquecido por resistência elétrica com uma programação de temperatura, que pode chegar a 3000°C (BERMEJO-BARRERA et al., 1999). Na TDAAS, a amostra, por meio de um recipiente amostrador, é introduzida em uma câmara quente e pirolisada para decomposição da matriz, e em seguida o analito é atomizado também pelo calor da câmara e célula analítica. Os equipamentos com dessorção térmica podem ainda conter uma etapa de amalgamação de mercúrio em uma folha de ouro, que depois é aquecida para liberar o analito (REIS et al., 2015)

Utilizar as técnicas ETAAS e TDAAS oferece as seguintes vantagens: analisar amostras sólidas, o que dispensa etapas de digestão de amostras; limites de detecção e quantificação menores em relação a geração de vapor frio ou químico, devido maior tempo de contato da radiação com o analito; e possibilidade de fazer especificação diretamente no equipamento utilizando controle de temperatura.

Uma das técnicas usadas neste trabalho para as análises de mercúrio é a espectroscopia de absorção atômica com dessorção térmica (TDAAS). No equipamento usado, RA-915<sup>+</sup> com acessório PYRO-915<sup>+</sup>, a amostra contida em um *boat* de quartzo é inserida no equipamento e aquecida (Figura 1). A unidade PYRO-915<sup>+</sup>, responsável pela pirólise da amostra, é composta de duas câmaras de aquecimento e uma célula analítica pirolítica. Cada câmara é aquecida independentemente a temperaturas de 280-800°C para decompor toda a matriz da amostra e reduzir, atomizar e vaporizar o mercúrio presente nela, criando um vapor do metal que é transportado por uma corrente de ar até a célula analítica. Para fazer a especificação, é necessário que espécies sejam separadas no preparo de amostra.



**Figura 1** - Esquema do equipamento RA-915<sup>+</sup> acoplado ao PYRO-915<sup>+</sup>. 1 – Amostra dentro do *boat* de quartzo, 2 – primeira câmara de aquecimento, 3 – segunda câmara de aquecimento, 4 – célula analítica pirolítica, 5 – espelho, 6 – filtro de ar, 7 – saída de ar, 8 – detector, 9 – lâmpada de mercúrio, 10 – computador (PANICHEV; PANICHEVA, 2015)

Uma lâmpada de Hg é a fonte de radiação do equipamento e na célula analítica, os átomos de Hg absorvem a radiação incidida neles. Essa célula contém janelas de quartzo e espelhos, que refletem a radiação para a direção do fotodetector. A lâmpada emite radiação continuamente em um campo magnético e, pela ação de um modulador magnético, a linha espectral do mercúrio com comprimento de onda  $\lambda=254$  nm é desdobrada em três componentes polarizadas:  $\sigma^-$ ,  $\pi$ ,  $\sigma^+$  (Efeito Zeeman) e somente a radiação das componentes  $\sigma^-$  são detectadas pelo fotodetector.

O fotodetector faz a leitura de uma componente  $\sigma^-$  na linha de absorção e outra fora desta. À medida que o vapor de mercúrio entra, a componente na linha de absorção é atenuada e a diferença entre as duas aumenta. Como a diferença lida entre as duas componentes  $\sigma^-$  é menor do que a largura de bandas de absorção molecular e de espalhamento, a interferência causada pela fumaça produzida pela queima da matriz ou pelo vapor de água da amostra é diminuída. O sinal é mostrado em um software instalado em um computador, onde é calculada a área sobre a curva de absorção gerada para cada amostra (SHOLUPOV et al., 2004)

Alguns instrumentos de TDAAS também possibilitam o controle de temperatura das câmaras (RUMAYOR et al., 2015). As diferentes espécies de mercúrio presentes nas amostras são atomizadas em temperaturas diferentes, então, com um programa de temperatura, é possível

fazer com que essas espécies sejam detectadas em tempos separados. A identificação dos picos é feita utilizando padrões das espécies de mercúrio (RUMAYOR et al., 2016).

Os padrões de espécies organomercuriais também são necessários na cromatografia gasosa, mas nesta a separação das espécies de mercúrio orgânico ocorre, na coluna cromatográfica, pela diferença de volatilidade entre elas. Para o uso de cromatografia gasosa, a amostra precisa ser volatilizada antes ou no momento de injeção. Então, além das etapas de digestão e extração, é necessária outra de derivatização para gerar analitos voláteis. Apesar da adição de uma etapa antes da análise, o que ocasiona mais erros analíticos, é possível conseguir LDs e LQs da ordem de  $\text{ng.g}^{-1}$  com GC-ICPMS (LAFFONT et al., 2013).

Outra alternativa é a cromatografia líquida de alta eficiência, que pode ser usada com amostras em solventes não voláteis e consegue LDs e LQs na faixa de  $\text{ng/L}$  (POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017). Uma desvantagem é que os detectores mais usuais não são sensíveis a mercúrio, logo é preciso fazer hifenação com técnicas como ICPMS e CVAFS (DE QUADROS et al., 2014; POLES, 2016) ou fazer derivatização do analito (HASHEMI-MOGHADDAM; SABER-TEHRANI, 2008).

### **3.3 Métodos de especiação de Hg em cabelo**

#### **3.3.1 Preparo de amostras**

Antes da análise, as amostras têm que passar por um tratamento para garantir que estejam homogêneas e na forma adequada para serem inseridas nos equipamentos. Para a extração de espécies de mercúrio é comum a abertura de amostras de cabelo com soluções ácidas ou básicas (DÓREA; MARQUES; ABREU, 2014; KRAWCZYK; STANISZ, 2016; SALAZAR-CAMACHO et al., 2017). Para que o cabelo seja totalmente digerido, além do uso dessas soluções ácidas ou básicas, é necessário aplicar algum tipo de energia para auxiliar o processo. Os aparatos mais comumente utilizados são micro-ondas (KRAWCZYK; STANISZ, 2016; QUEIPO ABAD; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; GARCÍA ALONSO, 2016) e blocos digestores (CZERNY et al., 2014; DÓREA; MARQUES; ABREU, 2014; FAIAL et al., 2015).

É possível também fazer apenas a lixiviação do analito. Nessa técnica os analitos são extraídos do cabelo com soluções ácidas ou básicas contendo agentes complexantes. No contato com essa fase aquosa, as ligações entre as proteínas do cabelo e o metal rompem-se e o analito é “sequestrado” para a fase líquida, de onde pode ser extraído ou diretamente analisado (BERMEJO-BARRERA et al., 1999).

No trabalho realizado por Kratzer et al. (1994), foi mostrada a otimização dos processos de extração de MeHg de cabelos fortificados com Me<sup>203</sup>Hg (isótopo radiometricamente rastreável). Foram testadas soluções de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH e KOH, e após o tratamento com essas soluções, realizou-se extração líquido-líquido com benzeno, seguido por adição de água e evaporação do solvente orgânico, para fazer o analito migrar novamente para solução aquosa. Foi observado pelos autores que a lixiviação com soluções de HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 90-95°C causa a perda do analito por volatilização e degradação. Por outro lado, a lixiviação com soluções de NaOH ou KOH 10 mol.L<sup>-1</sup>, sob a mesma temperatura, não promove perdas aparente, a julgar pelos valores elevados de recuperação do Me<sup>203</sup>Hg.

### **3.3.2 Metodologias analíticas de especiação de Hg em cabelo**

Além das diferentes técnicas instrumentais, são reportadas na literatura várias metodologias para a especiação de Hg em cabelo, e nesse tópico algumas serão apresentadas.

Em um caso de contaminação por ingestão de cloreto de mercúrio, foi realizado um estudo da concentração de mercúrio inorgânico e orgânico no cabelo da paciente contaminada. Para a determinação de Hg inorgânico por CVAAS, o cabelo foi submetido a digestão com aquecimento e solução básica (NaOH 40%) e a análise foi feita com adição de cloreto estanoso para a redução rápida do mercúrio inorgânico.

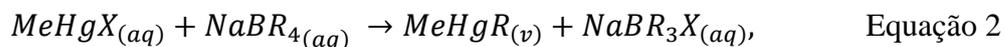
Para determinar a fração orgânica do metal tóxico, esta foi extraída dos cabelos por meio de duas lixiviações consecutivas com HCl 1 N e os extratos foram analisados por CVAAS, utilizando solução de cloreto de cádmio e cloreto estanoso para a redução do mercúrio total na solução (SUZUKI et al., 1992). A limitação desta metodologia é a impossibilidade de analisar separadamente as espécies de mercúrio orgânico nas amostras, pois não é garantido que apenas o metilmercúrio é extraído com o HCl 1N.

Em outro estudo, além de cabelo humano, foi determinada a concentração de metilmercúrio em peixes coletados na bacia do Rio Tapajós. A preocupação com a contaminação de mercúrio gerada por atividades de mineração de ouro na Amazônia levou à realização do trabalho feito com essas amostras. Para determinação de mercúrio total, foi feita digestão ácida das amostras e análise por CVAAS. Para análise de MeHg, os cabelos foram lavados, digeridos com HCl 2N a 100°C por 5 min, e fez-se a extração da espécie orgânica em benzeno. A fase orgânica foi injetada em um cromatógrafo gasoso com uma coluna empacotada e detecção por captura de elétrons (GC-ECD) (AKAGI et al., 1995).

O uso da técnica GC-ECD é uma boa alternativa para análise de MeHg, entretanto é necessária atenção para os componentes da matriz da amostra presentes na solução final que é injetada, porque o detector ECD é sensível a compostos halogenados que podem estar contidos no eluente da coluna. Por esse motivo, é comum o uso de outros métodos cromatográficos mais robustos (DELAFIORI; RING; FUREY, 2016) ou metodologias de espectroscopia atômica (CLOUGH et al., 2018).

Um exemplo é a determinação de metilmercúrio em cabelo por ETAAS, no qual o procedimento de lixiviação com ácido clorídrico, proposto por pesquisadores espanhóis (BERMEJO-BARRERA et al., 1999), foi realizado seguindo as seguintes etapas: lavagem dos cabelos com água deionizada e acetona, pulverização das amostras em um moinho de bolas, suspensão de 0,2 g das partículas de cabelo em 3 ml de HCl 4 % (m/m) seguido de agitação mecânica por 2 min, centrifugação a 2700 rpm por 20 min. Após isso, o sobrenadante (contendo a espécie MeHg) foi retirado com pipeta de Pasteur e introduzido no instrumento. A limitação deste trabalho é que não foi apresentado nenhum estudo (uma análise cromatográfica, por exemplo) comprovando que apenas o metilmercúrio, e nenhuma outra espécie, foi extraído das amostras.

Ao menos três trabalhos da década de 2000 utilizam a técnica de espectroscopia de fluorescência atômica (AFS) acoplada com cromatografia gasosa (FENG et al., 2008; GIBIČAR et al., 2007; MONTUORI et al., 2004). Nas metodologias usadas nesses estudos, as espécies de mercúrio orgânico são volatilizadas por meio de uma reação de alquilação, onde um ligante halogênio é substituído por um grupo etil (Et) ou propil (Pr) (Equação 2).



O primeiro deles (MONTUORI et al., 2004) apresenta uma otimização de parâmetros para extração de MeHg em cabelo e propõe as seguintes condições experimentais: digestão ácida de 20 mg de amostra com 350 µL de HNO<sub>3</sub> 5 mol.L<sup>-1</sup> a 100 °C por 120 min; derivatização com tetraetilborato de sódio (NaBEt<sub>4</sub>) (para volatilizar os analitos); amostragem por *headspace*-SPME, separação cromatográfica das espécies e detecção por CVAFS.

O segundo dos trabalhos citados (GIBIČAR et al., 2007) utilizou um procedimento de lixiviação ácida para extrair todo o mercúrio nos cabelos, em seguida realizou-se extração líquido-líquido para transferência de MeHgBr e EtHgBr para diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>),

derivatização com  $\text{NaBPr}_4$ , pré-concentração das espécies gasosas em armadilha com resina Tenax, separação cromatográfica isotérmica, pirólise (para atomizar e reduzir os organomercuriais a  $\text{Hg}^0$ ) e detecção por CVAFS.

E o terceiro (FENG et al., 2008), avalia a contaminação de mercúrio em uma comunidade chinesa próxima a área de mineração. Para a análise de Hg total, a abertura das amostras de cabelo foi feita com mistura  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  em banho-maria ( $95^\circ\text{C}$ ) e a determinação da concentração foi feita por CVAFS. Para a análise de MeHg, foi seguido um procedimento com digestão básica das amostras (KOH), extração com solvente orgânico, derivatização (etilação) e GC-CVAFS.

A cromatografia hifenada com técnicas espectroscópicas requer muitas etapas de preparo de amostra, que é parte do método analítico com maior introdução de erros, o que caracteriza sua principal desvantagem. Outras desvantagens inclui a demora dos processos de digestão, extração e derivatização e o alto custo das análises devido os elevados preços dos equipamentos e reagentes utilizados nas etapas de preparo.

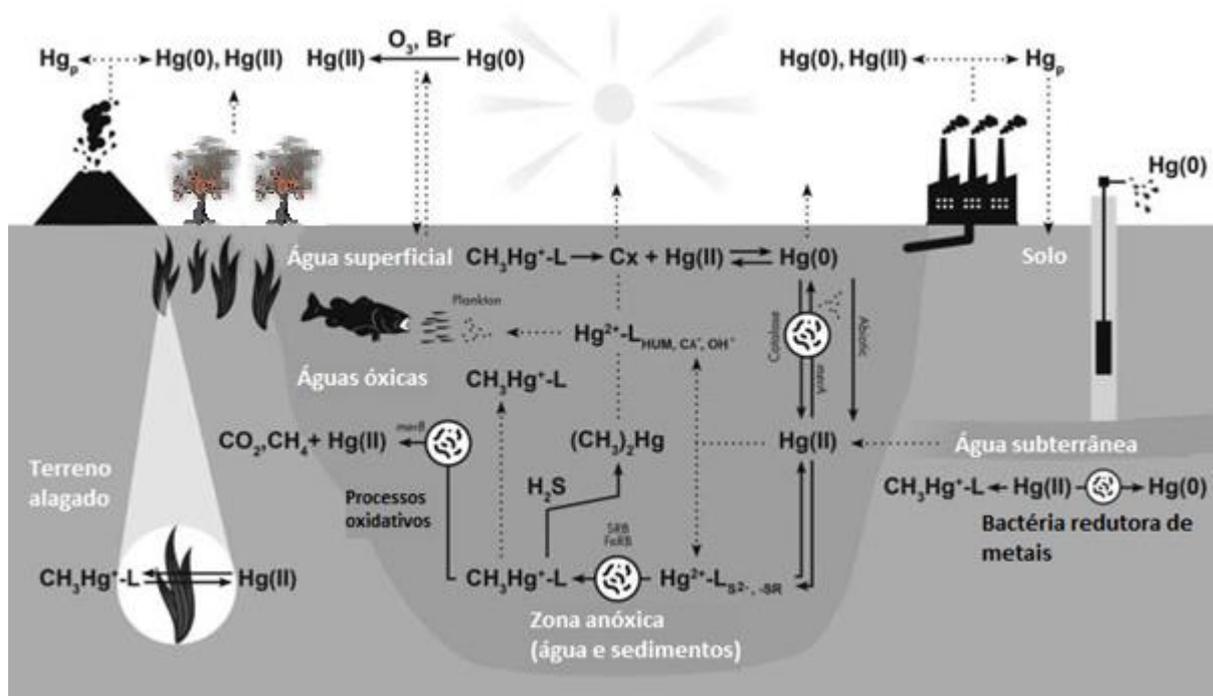
Nos trabalhos mais recentes, além do uso de técnicas cromatográficas (DE QUADROS et al., 2014; SALAZAR-CAMACHO et al., 2017), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) surge possibilitando o rastreamento da fonte de MeHg através da assinatura isotópica dos átomos de mercúrio (LAFFONT et al., 2013; LI et al., 2014)

Também é notável o desenvolvimento de sensores que podem ser usados para determinação espectrofotométrica de uma única espécie de mercúrio (CHEN; LI; CHEN, 2014; DUARTE et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Apesar da utilidade, esses materiais ainda se encontram em fase de desenvolvimento e otimização, além disso, apresentam baixa capacidade de reutilização, difícil reprodução das condições de síntese e baixa linearidade das faixas de trabalho comparado a outros métodos instrumentais.

### **3.4 Mercúrio no ambiente**

Mercúrio é o elemento químico de número atômico 80. Um metal que pode ser encontrado na forma neutra ou em seus dois cátions com estados de oxidação estáveis:  $\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ . Em temperatura ambiente  $\text{Hg}^0$  é um composto líquido, mas é mais encontrado na Terra no mineral cinábrio ( $\text{HgS}$ ) (LEE, 1999).

No ambiente, o mercúrio pode ser encontrado em espécies orgânicas (complexos com uma ou mais ligações covalentes Hg-C) e inorgânicas (cátions livres, minerais, complexos com ânions inorgânicos). Como existe interconversão entre essas espécies, é interessante estudar e considerar o ciclo do mercúrio no ambiente (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010) (Figura 2).



**Figura 2** - Ciclo do mercúrio no ambiente (Adaptado de Beckers et al., 2017)

Nesse ciclo, a espécie  $Hg^{2+}$  dissolvida em águas superficiais é reduzida para  $Hg^0$  por bactérias e processos fotoquímicos e depois o metal é liberado para a atmosfera por volatilização. Uma vez na atmosfera, o  $Hg$  pode residir até um ano nesse ambiente, e esse tempo é suficiente para que ele seja transportado até áreas remotas do planeta, por isso ele é considerado um poluente global.

A deposição do metal tóxico na terra ou no mar acontece por meio da chuva e, em uma escala menor, por adsorção em partículas de fuligem. Além disso, existe também o transporte de mercúrio em cursos de rios, mas este é menor comparado ao fluxo atmosférico.

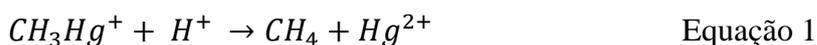
As áreas com maior concentração de mercúrio são os continentes, porque apesar de haver mais chuvas nos oceanos, a quantidade do poluente emitido em áreas urbanas é maior, então a atmosfera desses lugares tem uma concentração mais elevada do metal (MOREL; KRAEPIEL; AMYOT, 1998). As emissões antropogênicas de mercúrio incluem a indústria de

cloro-álcali, de celulose, gerenciamento de resíduos e queima de carvão e combustíveis fósseis. No contexto brasileiro, e mais especificamente no bioma Amazônia, o garimpo (mineração artesanal de ouro) e os incêndios florestais causados por desmatamento são fatores que contribuem para a liberação de mercúrio no ambiente (CORDEIRO et al., 2002; MICHELAZZO et al., 2010; WASSERMAN; HACON; WASSERMAN, 2003).

A influência de atividades humanas no ciclo do Hg foi estudada em um trabalho publicado em 1992, onde se observou, por uma estimativa, que a emissão total de mercúrio na América do Norte havia triplicado nos últimos 150 anos antes da pesquisa, indicando a possibilidade de que a maior parcela do metal no ar seja de origem antrópica (SWAIN et al., 1992).

Em águas superficiais não poluídas, a concentração de Hg é de 1 a 20 ppt, sendo a maior parte cátions divalentes ( $Hg^{2+}$ ) complexados com ligantes orgânicos (grupos alquila, ácidos húmicos) ou inorgânicos (cloretos, cloratos, sulfetos, sulfatos, hidróxidos, óxidos). Na fase sólida, em solos e sedimentos, as concentrações de Hg variam de 50 a 500  $ng.g^{-1}$  (ppb), e geralmente 0,1 a 10% do total é MeHg. Em áreas contaminadas com o metal, essa concentração chega a ser até 50 vezes maior (BECKERS; RINKLEBE, 2017).

O mercúrio dissolvido em água participa de reações químicas, fazendo troca de ligantes nos complexos metálicos ou passando por processos de oxidação e redução. A hidrólise de complexos metil-mercúrio (Equação 1) é um processo termodinamicamente favorecido, mas cineticamente impedido, logo, para que essa reação ocorra é necessário a ação de mecanismos enzimáticos ou fotoquímicos. Isso faz com que esses compostos sejam relativamente estáveis em meio aquoso (MOREL; KRAEPIEL; AMYOT, 1998).



### 3.5 Espécies de mercúrio

Quando se faz uma avaliação de riscos, a concentração total de um metal em um organismo não é suficiente para prever sua toxicidade, mobilidade ou biodisponibilidade. É necessário fazer a especiação do elemento para identificar as diferentes formas do elemento na amostra, formas estas que podem apresentar comportamentos físicos e químicos distintos (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010).

Dentre as espécies orgânicas de maior interesse ambiental, o fenilmercúrio e o etoxietilmercúrio eram usados amplamente como agrotóxicos, entretanto seu uso já foi banido (BECKERS; RINKLEBE, 2017). Já os compostos alquilmercúrio, são citados na maior parte dos trabalhos de especiação, porque estes são tóxicos para seres humanos, e são ligados a riscos de saúde, principalmente deficiências neurológicas (BJØRKLUND et al., 2017; DÓREA et al., 2005; DÓREA; MARQUES; ABREU, 2014; ZHANG; WONG, 2007).

### **3.5.1 Metilmercúrio (MeHg)**

O metilmercúrio é produzido por via biótica, principalmente por bactérias redutoras de sulfato, e, em menor proporção, por bactérias redutoras de ferro (DRISCOLL et al., 2013). A metilação ocorre por meio da captação de  $Hg^{2+}$  biodisponível, mas é de difícil previsão porque a biodisponibilidade do mercúrio inorgânico não é facilmente avaliada.

O cátion metilmercúrio ( $CH_3Hg^+$ ) é raramente encontrado dessa forma no ambiente, e está geralmente coordenado a outros ligantes. O  $CH_3Hg^+$  é um ácido de Lewis macio, e tem afinidade por bases macias presentes no ambiente ( $R^-$ ,  $RS^-$ ,  $CN^-$ ,  $I^-$ ). A maioria dos complexos de  $CH_3Hg^+$  é formada com ligantes com átomos de enxofre em matéria orgânica dissolvida ou em sedimentos, e em proteínas contendo cisteína em seres vivos (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010).

A solubilidade do metilmercúrio em água depende do ligante ao qual está associado. O íon  $CH_3Hg^+$  é tanto hidrofílico como lipofílico, o que permite a passagem da espécie por membranas lipídicas e o seu transporte em meio aquoso (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010).

### **3.5.2 Dimetilmercúrio (Me<sub>2</sub>Hg)**

O  $Me_2Hg$  é menos encontrado no ambiente do que o metilmercúrio. Não há registros de sua detecção em corpos de água doce. Pode ser encontrado em águas oceânicas profundas, sugerindo que sua formação é favorecida em ambientes com baixo teor de oxigênio. Nos continentes, emissões de  $Me_2Hg$  foram observadas em aterros sanitários na China (FENG, 2004) e Estados Unidos (REINHART et al., 2005).

É facilmente volatilizado e degradado a  $MeHg$  por radiação UV-Vis, o que o torna uma fonte de metilmercúrio para atmosfera. Em contraste com o  $MeHg$ , é completamente hidrofóbico e como tem um grupo metila a mais, sua lipofilicidade é maior, facilitando ainda mais a passagem por membranas lipídicas, além disso, é extremamente tóxico ao sistema

nervoso, devido a sua capacidade de atravessar a barreira sangue-cérebro (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010).

### **3.5.3 Etilmercúrio (EtHg)**

É encontrado no ambiente em concentrações menores do que as de metilmercúrio e, sendo menos estável do que o MeHg, decompõe-se facilmente em ambientes aquáticos. É mais lipofílico do que MeHg, no entanto, menos solúvel em água. É produzido na reação de degradação do etilmercúriotiosalicilato de sódio (thimerosal), um antisséptico usado na preservação de vacinas.

A presença de EtHg em humanos, na maioria das vezes, é consequência da imunização com vacinas contendo timerosal, cuja dose de vacina tipicamente administrada (0,5 mL) em crianças contém 25 µg de mercúrio (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010). Não existem registros de produção dessa espécie por microbiota ou vias metabólicas de qualquer organismo e, como não é uma espécie que entra em organismos por via da alimentação, também não há registros de biomagnificação de EtHg.

### **3.6 Bioacumulação e biomagnificação do Hg**

As espécies de Hg nos sistemas aquáticos são captadas por bactérias, fitoplânctons e zooplânctons nas águas e sedimentos. No caso de bactérias, o processo de captação é determinante para que ocorra a metilação e bioacumulação do metal (BECKERS; RINKLEBE, 2017).

O termo bioacumulação pode ser definido como o acúmulo de um contaminante no organismo de seres vivos. Além disso, esse conceito também envolve o entendimento de que a concentração total de uma espécie bioacumulada é o resultado do balanço entre captação e excreção desta.

A biomagnificação, por sua vez, é o aumento da concentração do contaminante ao longo dos níveis tróficos de um ecossistema. Está ligada à retenção, em um predador, de um composto que estava bioacumulado no organismo de sua presa (LEHNHERR, 2014).

O MeHg é a espécie de mercúrio que tem maior capacidade de bioacumulação e biomagnificação. Os compostos  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  são difundidos para dentro de células, onde se dissociam dos átomos de cloro e reagem com componentes intracelulares. Enquanto o  $\text{Hg}^{2+}$  complexa com material particulado celular que é excretado por microrganismos, o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$

liga-se a uma fração solúvel que fica retida no meio intracelular (MOREL; KRAEPIEL; AMYOT, 1998).

Além da lipofilicidade do  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , a afinidade por grupos tiolatos de aminoácidos influenciam na retenção dessa espécie em seres vivos. Como no caso dos peixes, em que essa espécie é encontrada majoritariamente no tecido muscular (formado de proteínas) (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010). A biomagnificação preferencial de MeHg pode ser visualizada pela razão de MeHg/Hg em diferentes amostras (MOREL; KRAEPIEL; AMYOT, 1998):

- 10% em água;
- 15% em fitoplâncton;
- 30% em zooplâncton;
- 95% em peixes.

A ocorrência de mercúrio em humanos é ligada principalmente ao consumo de peixes, entretanto pode também estar associada ao consumo de outros alimentos de áreas contaminadas (FENG et al., 2008), vacina contendo timerosal (DÓREA; FARINA; ROCHA, 2013) e exposição ocupacional (QUEIPO ABAD; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; GARCÍA ALONSO, 2016).

### **3.7 Monitoramento de contaminação de humanos por mercúrio no Brasil**

O monitoramento do Hg e suas espécies é fundamental para a observação e identificação de efeitos relacionados à exposição a esses compostos tóxicos. Assim faz-se necessária a análise desses analitos em amostras de material biológico de seres humanos.

A contaminação de mercúrio na Amazônia é estudada desde a década de 80 (COUTO; CÂMARA; SABROZA, 1988; PFEIFFER; DE LACERDA, 1988), mas a realização de trabalhos com este tema continua até os dias atuais. No trabalho de MORAES PINTO et al. (2019) é observado que o número de artigos publicados na base Web of Science contendo os tópicos “mercúrio” e “Amazônia” não apresenta decréscimo significativo nos últimos anos, evidenciando que este ainda é um tema relevante para a pesquisa brasileira.

O Quadro 1 apresenta artigos indexados na Web of Science nos quais foi analisado mercúrio em amostras de material biológico humano no Brasil nos anos de 2014 a 2018. Observa-se que, dos nove artigos encontrados na busca, oito são pesquisas realizadas com comunidades da Amazônia, evidenciando o maior interesse nesse ambiente, que é um foco de

contaminação por mercúrio no Brasil devido à ocorrência natural de mercúrio na composição geológica da região e às contribuições antropogênicas como garimpo e desmatamento por queimadas.

Pode-se verificar que, dos nove trabalhos apresentados no Quadro 1, seis mostram populações com níveis de mercúrio no cabelo mais altos do que o recomendado pela Organização Mundial de Saúde para pessoas que comem peixe diariamente ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), evidenciando o risco ao qual essas comunidades estão expostas (ARRIFANO et al., 2018; DOS SANTOS FREITAS et al., 2018; FAIAL et al., 2015; FEITOSA-SANTANA et al., 2018; HOSHINO et al., 2015; MARINHO et al., 2014).

**Quadro 1- Publicações sobre análise de mercúrio em amostras humanas no Brasil durante o período de 2014 a 2018**

Referência	Área de amostragem	Matriz de amostras	Métodos de análise	Concentração média de mercúrio ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
MARINHO et al., 2014	São Luís do Tapajós (PA) (n = 40), Barreiras (PA) (n = 37) e Maranhão (PA) (n = 139)	cabelo	THg – CVAAS MeHg – GC-ECD	S. L. do Tapajós: [THg] = $11,41 \pm 7,16$ [MeHg] = $10,30 \pm 7,67$ Barreiras: [THg] = $5,64 \pm 5,55$ [MeHg] = $5,20 \pm 5,06$ Maranhão: [THg] = $2,27 \pm 1,84$ [MeHg] = $2,11 \pm 1,82$
DÓREA; MARQUES; ABREU, 2014	Itapuã (RO) (n = 91) e Bom Futuro (RO) (n = 218)	cabelo	THg – CVAAS	Itapuã - [THg] = 3,5 Bom Futuro - [THg] = 2,2
HOSHINO et al., 2015	Lago do Puruzinho (AM) (n = 38)	cabelo	THg - CVAAS	[THg] = 11,26
FAIAL et al., 2015	Barreiras (PA) (n = 141)	cabelo	THg – CVAAS MeHg – GC-ECD	[THg] = 13,99; [MeHg] = 10,91
REBELO et al., 2017	Distrito Federal (n = 224)	leite materno	THg – CVAFS MeHg – GC-pyro-AFS	[THg] = $2,56 \pm 1,7$ ; [MeHg] = $0,19 \pm 0,28$
CERBINO et al., 2018	Cinco comunidades nas margens dos rios Negro e Madeira (n = 27)	cabelo e leite materno	Leite – ETAAS Cabelo - TDAAS	Cabelo – [THg] = 4,49 Leite materno – [THg] = 0,196
FEITOSA-SANTANA et al., 2018	Lago Puruzinho (RO) (n = 23)	cabelo	THg - CVAAS	[THg] = $18,4 \pm 8,7$
DOS SANTOS FREITAS et al., 2018	São Luís do Tapajós (PA) (n = 41), Barreiras (PA) (n = 71)	cabelo	THg - CVAAS	[THg] = $4,98 \pm 5,38$
ARRIFANO et al., 2018	Caraipê (PA) (n = 37)	cabelo	GC-pyro-AFS	[THg] = 12*; [MeHg] = 10,9*

n – número de amostras, \* - mediana

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Amostragem

Os cabelos analisados foram coletados em um projeto anterior, coordenado pelo prof. Dr. Antônio Carneiro Barbosa, em expedições feitas na década de 1990, em que, além dos cabelos, foram coletados questionários com informações sobre a dieta dos indivíduos e peixes do Rio Fresco. O corte de cabelo foi feito na região do escalpo, próximo à raiz e o armazenamento foi feito em envelopes de papel. (SILVA, 1994).

Situada no estado do Pará, a área de amostragem é a bacia do Rio Fresco, um tributário do Rio Xingu no norte do Pará. Este é um local onde a mineração de ouro é uma atividade realizada desde os anos 1980 e sabe-se que houve introdução de mercúrio de origem antropogênica nas águas do Rio Fresco (BARBOSA et al., 1995). Dentre as populações que vivem nas proximidades deste rio, foram coletadas amostras da aldeia indígena Goroti-re e de uma comunidade de ribeirinhos de São Félix do Xingú.

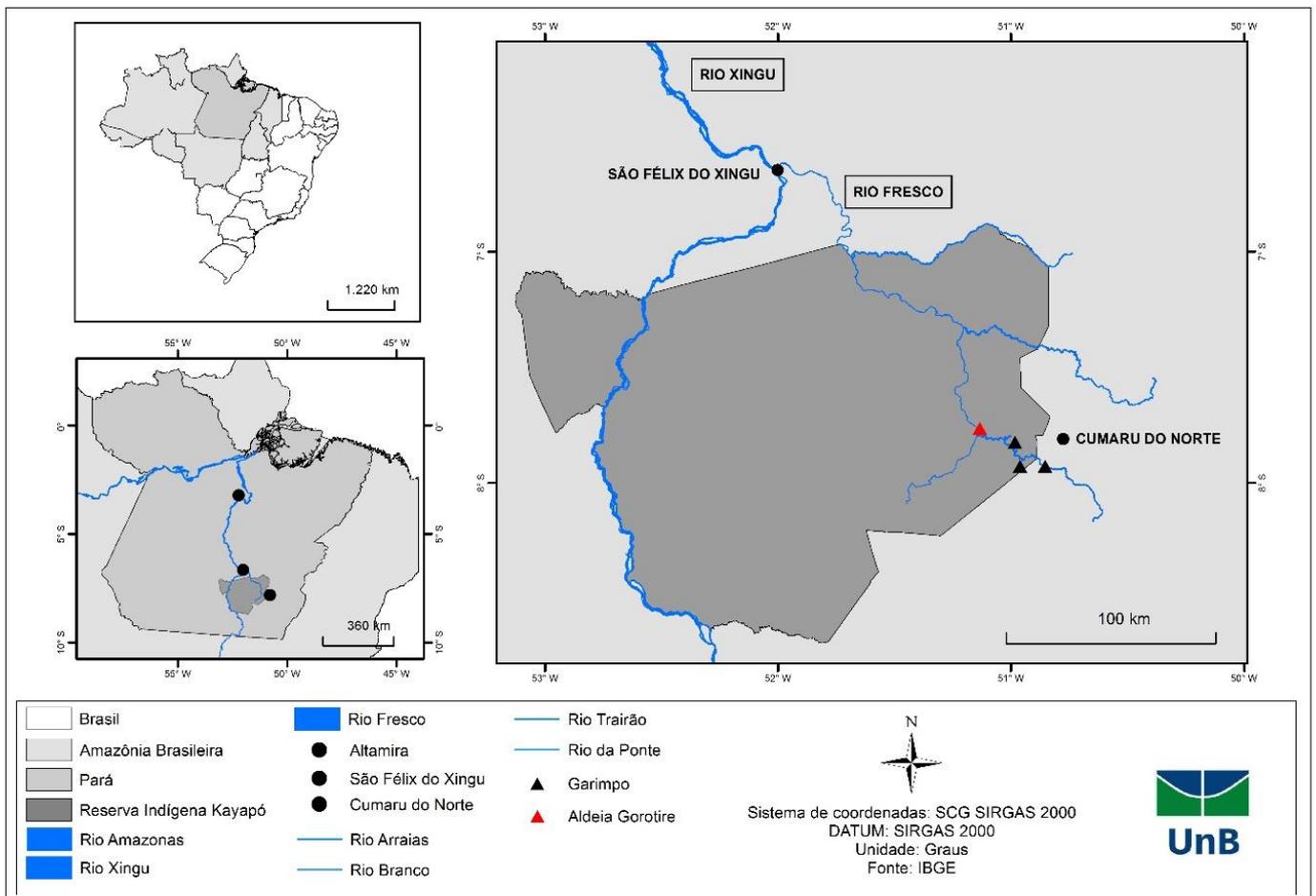


Figura 3 – Área de amostragem

A aldeia Goroti-re faz parte da Reserva Kayapó e os seus habitantes têm como a caça e pesca as principais fontes de proteína animal na alimentação, e o consumo de peixe é geralmente feito semanalmente. De modo similar aos Gorotire, os ribeirinhos de São Félix do Xingu são integrantes de uma comunidade em que a maioria das pessoas consome peixe pelo menos uma vez por semana, segundo informações coletadas pelos questionários (Tabela 1).

Antes da amostragem dos cabelos utilizados nesse trabalho, havia três principais garimpos, próximos à cidade de Cumaru do Norte (Figura 3), que contribuía para emissão de mercúrio no Rio Fresco. O metal era carregado para esse rio através de seus tributários, principalmente o Rio Arraias e o Rio da Ponte, nos quais os garimpos estão localizados.

Segundo estudo com satélites do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), entre os anos 1984 e 1986 já era possível observar um aumento de sólidos suspensos nas águas do Rio Fresco, atribuído ao avanço do processo de ocupação da região e ao surgimento de novos sítios de extração mineral (MARTINI, 1988).

Os garimpos situam-se próximos a igarapés ou em volta de rochas graníticas conhecidas por conter ouro na sua composição. Os pontos dos três maiores garimpos da região estão indicados no mapa na Figura 3, em que se observa a proximidade destes à aldeia Gorotire. O mais próximo da aldeia é o Garimpo de Maria Bonita, que foi motivo de conflito entre os Gorotire e mineradores na década de 1980, terminado em um acordo que determinou a demarcação das terras Kayapó e a participação desses povos originários no lucro gerado pela venda do ouro desse garimpo (FERRARI et al., 1992).

Os hábitos alimentares dos indivíduos dos quais foram coletadas as amostras envolvem o consumo de peixe e, por esse motivo, também foi determinado o teor de Hg em peixes do Rio Fresco, para avaliar a contaminação a qual as pessoas estavam expostas. Os peixes foram coletados nas casas dos moradores da região ou obtidos diretamente de pescadores e, em seguida as partes comestíveis foram separadas e homogeneizadas para serem submetidas a digestão ácida e analisadas por CVAAS. Esses procedimentos foram realizados por outros analistas, ainda na década de 1990, coordenados pelo prof. Dr. Antônio Carneiro Barbosa no Laboratório de Química Analítica e Ambiental na Universidade de Brasília. A Tabela 2 apresenta os valores de THg médio em cada espécie de peixe.

**Tabela 1** - Identificação das amostras de cabelo

<b>Amostra</b>	<b>local de amostragem</b>	<b>Frequência de consumo de peixe</b>	<b>Data de amostragem</b>
APPS 13	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	semanalmente	maio de 1993
PSMG 15	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	semanalmente	maio de 1993
EAO 18	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	semanalmente	maio de 1993
AAB 22	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	mensalmente	maio de 1993
GR-14	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-15	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-22	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-23	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-58	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-59	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-61	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-63	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-65	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-67	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-69	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-71	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992
GR-78	Aldeia Goroti-re	semanalmente	dezembro 1992

Semanalmente – come peixe pelo menos uma vez por semana; mensalmente – come peixe pelo menos uma vez por mês

**Tabela 2** - Concentração de mercúrio em peixes coletados no Rio Fresco

<b>Nome comum da espécie</b>	<b>[THg] ± DP (ng.g<sup>-1</sup>)</b>
Bico de pato (n = 2)	590 ± 24
Corimbatá (n = 2)	65 ± 7
Corvina (n = 2)	252 ± 35
Fidalgo (n = 2)	503,4 ± 55
Mandi (n = 1)	74,7
Matrinchã (n = 1)	63,0
Pacú (n = 4)	< LQ
Piau (n = 2)	83,9 ± 7
Piranha (n = 2)	229,2 ± 0,6
Média (n = 18)	206 ± 210

n – número de indivíduos coletados; DP – desvio padrão entre os indivíduos da mesma espécie; < LQ – concentração de Hg abaixo do limite de quantificação.

As concentrações de THg em duas espécies de peixe excedem 500 ng.g<sup>-1</sup>, que é acima de 300 ng.g<sup>-1</sup>, o limite considerado seguro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) quando o consumo é de até 400 g por semana.

## 4.2 Equipamentos

Os instrumentos usados para as análises de mercúrio foram um Zeeman Mercury Spectrometer RA-915<sup>+</sup> com acessório de pirólise PYRO-915<sup>+</sup> e um espectrômetro de absorção atômica com sistema gerador de vapor frio Mercury Monitor 3200 Thermo Separation Products.

Para medidas de massa, foi utilizada uma balança analítica Metler Toledo modelo AG204. Uma mesa agitadora Tecnal TE-140 foi usada nos procedimentos de extração, além de um centrifugador Excelsa 2.

A digestão de extratos de amostras foi feita em um micro-ondas DGT 100 *plus* da Provecto Analítica utilizando cápsulas de teflon. Um sistema purificador de água Nanopure forneceu a água deionizada usada em todas as soluções e lavagem de vidrarias e outros materiais.

## 4.3 Soluções, reagentes e materiais

Para limpeza de vidrarias e frascos plásticos, foram feitas soluções diluídas de ácido nítrico 10% com ácido nítrico 70% da marca Proquimios.

Uma solução padrão de Hg 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Aldrich foi usada na preparação das soluções para curvas analíticas.

Para procedimentos de lixiviação com ácido clorídrico, foram preparadas uma solução de HCl 4% (m/m) e outra de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> com água deionizada e ácido clorídrico 30% Sigma Aldrich *Suprapur*®.

Na preparação das colunas de troca iônica, foram utilizadas seringas plásticas sem agulha de 3 ml da marca Plastipak fabricadas pela Becton Dickinson Ltda, uma resina Dowex® 1-X8 20-50 mesh da BDH Chemicals e lã de vidro da fabricante Merck. Para limpeza da coluna, utilizou-se solução de HNO<sub>3</sub> 8 mol.L<sup>-1</sup> preparada a partir de ácido nítrico 65% Sigma Aldrich *Suprapur*®.

Para análise em CVAAS, preparou-se solução de cloreto estano 10% dissolvendo-se 10 g de SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck) em 10 mL ácido sulfúrico 96% (Sigma Aldrich) sob uma placa aquecedora. Depois de dissolvidos os sais, a solução foi diluída com HCl 1% em balão de 100 mL. Esta solução foi transferida para um frasco limpo e armazenada a temperatura ambiente.

#### 4.4 Pré-preparo das amostras

No laboratório, algumas amostras foram selecionadas e picotadas com uma tesoura de aço inoxidável e armazenados em tubos de centrífuga plásticos em temperatura ambiente. apenas as utilizadas no experimento de lixiviação com HCl 4%, foram maceradas em almofariz com pistilo, ambos de cerâmica, e depois peneiradas em uma peneira com aberturas de 75  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 Lixiviação de MeHg com HCl 4%

Os experimentos realizados nessa etapa foram adaptados de Bermejo-Barrera et al. (1999). Dezesete amostras foram selecionadas sob o critério de não haver dados sobre a concentração de mercúrio orgânico de análises anteriores.

Na balança analítica, foram pesados aproximadamente 20 mg de amostra ou material certificado e transferidos para tubos plásticos. Os cabelos, então, foram suspensos em 2 mL de HCl 4% adicionados com pipeta volumétrica.

Os tubos com amostras foram agitados em agitador vórtex por 2 min e levados à centrífuga por 20 min a 2700 rpm. Ao sair da centrífuga, o sobrenadante (solução aquosa) foi retirado do tubo com pipeta de Pasteur e armazenado em balões de 5 mL.

O procedimento de lixiviação foi repetido uma vez com mais 2 mL de HCl 4%, e ao final o sobrenadante foi acrescentado ao da primeira extração. O volume final (5 mL) foi completado com água destilada e deionizada.

A análise de mercúrio nas soluções de amostra foi prosseguida como descrito no procedimento de determinação de mercúrio total em cabelo. A introdução das amostras no equipamento foi feita por meio do *boat* de quartzo, a alíquota utilizada foi 350  $\mu\text{L}$  de solução de amostra.

#### 4.6 Lixiviação com HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>

Esse procedimento foi adaptado do descrito no trabalho de Gibičar et al. (2007).

Uma massa de 10 a 30 mg de cabelo foi pesada para cada amostra ou MRC e transferida para um tubo plástico de centrífuga, ao qual foram adicionados 4 mL da solução HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>. Os tubos foram envolvidos em papel alumínio para evitar degradação do MeHgCl por radiação UV e colocados na mesa agitadora, na qual ficaram sendo agitados por uma noite (12  $\pm$  2h) a 250 rpm.

Após o período de agitação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado, ou foram filtradas com papel filtro e funil plástico para separar os cabelos do sobrenadante. Este foi transferido para outro tubo de centrífuga, que foi novamente envolvido em papel alumínio. Os extratos dessa lixiviação foram usados no experimento de eluição em coluna de troca iônica.

#### **4.7 Eluição em coluna de troca iônica**

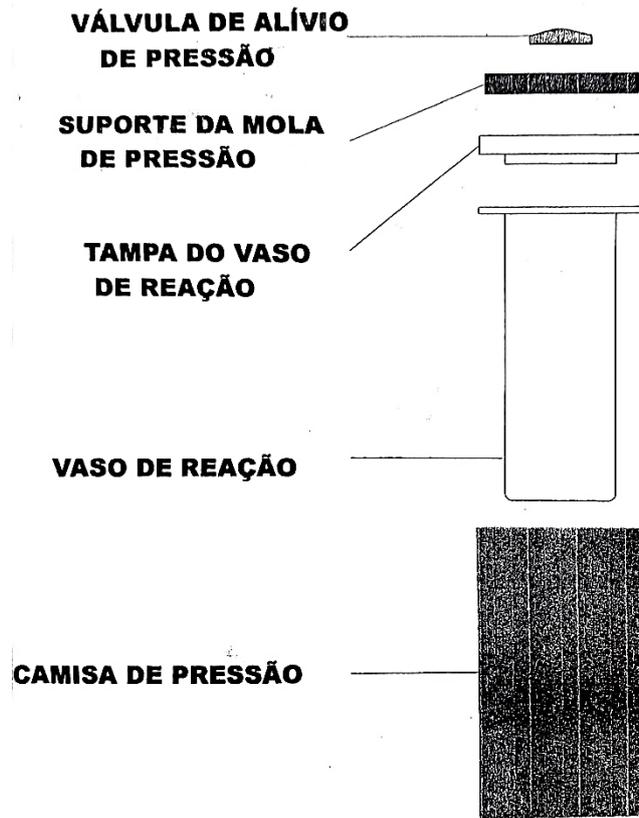
Este procedimento foi adaptado dos experimentos descritos no trabalho de FARIAS; FÁVARO; AGOSTINI (2009)

Para preparo das colunas, primeiro, um pedaço de lã de vidro foi colocado na seringa com auxílio de uma pinça para evitar o vazamento do preenchimento da coluna, depois foi adicionado mais ou menos 1,5 mL da resina Dowex® 1-X8e, em seguida, mais um pedaço de lã de vidro para que as soluções adicionadas não causassem a suspensão da resina. As colunas foram colocadas em uma grade de metal suspensa por garras em um suporte.

A limpeza das colunas foi feita passando 20 ml de água deionizada, de 1 em 1 mL, seguidos de 20 ml de  $\text{HNO}_3$  8 mol.L<sup>-1</sup>, também de 1 em 1 mL. Em seguida as colunas foram ativadas com 10 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>, sendo adicionados de 1 em 1 mL.

As soluções resultantes da lixiviação com HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> foram as amostras utilizadas nesse procedimento. Elas foram vertidas diretamente nas colunas e coletadas (mais ou menos 2 mL) nas cápsulas de teflon do micro-ondas. Em seguida, adicionou-se 2 ou 3 mL de  $\text{HNO}_3$  Suprapur® 65% e 250 µL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% às soluções de amostra e fechou-se as cápsulas. Estas foram apertadas no sistema de segurança do micro-ondas e encaixadas no prato rotativo do equipamento (Figura 4). O programa realizado foi 400W por 7 min seguidos de 0W por 3 min.

Após resfriamento das soluções digeridas, as cápsulas foram abertas e as amostras foram diluídas com água deionizada em balões de 5 ou 10 mL. A análise dessas soluções foi feita por CVAAS.



**Figura 4** - Sistema de segurança das cápsulas do micro-ondas DGT 100 plus

#### **4.8 Determinação de mercúrio total em cabelo por espectroscopia de absorção atômica com dessorção térmica (TDAAS)**

Pesou-se as amostras (5 a 20 mg) na balança analítica em papel de pesagem e elas foram transferidas para um *boat* de quartzo amostrador (Figura 5) do PYRO-RA-915<sup>+</sup> (Figura 6). Em seguida as soluções padrão e amostras foram analisadas, uma de cada vez e em triplicata, no modo 1 do equipamento. Neste modo, a primeira câmara do atomizador é operada a 860-740°C, a segunda câmara e a célula analítica a 600-700°C e o fluxo de ar é 0,8 a 1,2 L.min<sup>-1</sup>. O sinal obtido no computador, a área do pico de absorbância do Hg<sup>0</sup>, foi usado para fazer a curva analítica e determinar a massa de mercúrio nas amostras.



**Figura 5** - *Boat* de quartzo amostrador

A curva analítica foi feita com soluções diluídas do padrão de  $\text{Hg}^{2+}$   $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em concentrações de 1 a  $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O volume usado para a análise das soluções foi de 2 a  $4 \mu\text{L}$ , que foi pipetado com micropipetas e colocadas direto no *boat*. A equação da curva foi determinada por regressão linear dos valores da área do pico de absorbância em função da massa de mercúrio no volume de solução padrão inserida.



**Figura 6 - RA-915<sup>+</sup> PYRO**

Entre cada replicata das amostras ou soluções padrão, o *boat* foi submetido ao procedimento automático de limpeza do equipamento: aquecimento até  $800^{\circ}\text{C}$  para eliminar qualquer traço de mercúrio que possa ter restado após a leitura da amostra.

#### **4.9 Análise de mercúrio orgânico por espectroscopia de absorção atômica com vapor frio (CVAAS)**

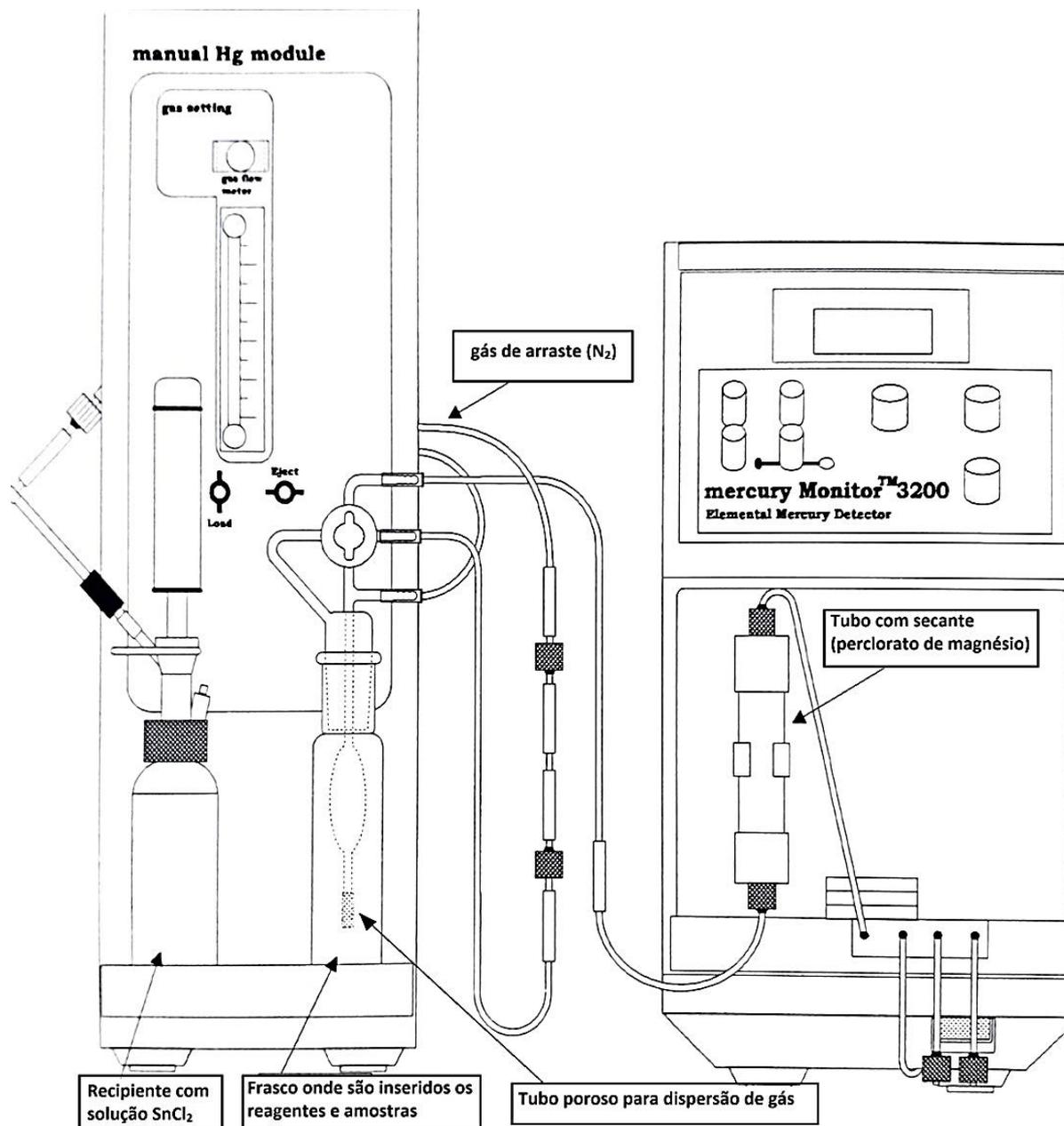
O esquema do equipamento utilizado está representado na Figura 7. O gás de arraste utilizado é o nitrogênio ( $\text{N}_2$ ).

Para fazer curva analítica, foram utilizadas soluções diluídas do padrão de  $\text{Hg}^{2+}$   $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em concentrações de 0,5 a  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A leitura dessas soluções foi feita da seguinte forma e ordem: ao frasco reacional, foram adicionados 5 mL de solução NaCl 1%,  $1 \mu\text{L}$  de solução padrão e  $500 \mu\text{L}$  de solução  $\text{SnCl}_2$  10%, o frasco foi fechado e foram cronometrados 1 min. Após o término do tempo, a válvula controladora de gás foi aberta para liberar a passagem de  $\text{N}_2$  pela solução e o sinal de máximo de absorção foi anotado.

A curva analítica foi construída com o máximo de absorção em função massa de mercúrio contida em 1  $\mu\text{L}$  de solução padrão. Os coeficientes angulares e lineares foram calculados por regressão linear no *software* Excel 2013.

Para a leitura das amostras, o procedimento foi, em ordem: adicionou-se 5 mL de solução NaCl 1%, 500  $\mu\text{L}$  de amostra e 500  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{SnCl}_2$  10%, o frasco foi fechado e foram cronometrados 1 min. Após o término do tempo, a válvula controladora de gás foi aberta para liberar a passagem de  $\text{N}_2$  pela solução e o sinal de máximo de absorção foi anotado.

Todas as leituras foram feitas triplicata, com exceção do branco da curva, que foi lido 7 vezes, e feito seguindo o mesmo procedimento, com exceção da adição de solução padrão ou amostra. Depois da leitura do sinal, as soluções foram descartadas em um frasco de resíduos e o frasco reacional e o tubo poroso foram lavados com água deionizada. Os resíduos foram reservados para tratamento posterior.



**Figura 7** - Esquema do equipamento mercury Monitor 3200

#### **4.10 Tratamento de dados**

Todos os dados obtidos foram analisados no Microsoft Excel, assim como os cálculos dos resultados, a construção dos gráficos apresentados e a análise de variância (ANOVA).

Cálculos de valores de intervalo de confiança e variáveis dos testes F-*Snedecor* e t de Student foram feitos com nível de 95% de confiança (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A validação de método e o cálculo de figuras de mérito foram realizados seguindo orientações do DOQ-CGCRE-008 (Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos) (INMETRO, 2016) e o Guia para Tratamento Estatístico de Validação da ANVISA (ANVISA, 2018).

## 5. Resultados e discussões

### 5.1 Validação de método para determinação de mercúrio total por TDAAS

A análise de mercúrio total nos cabelos foi realizada por espectroscopia de absorção atômica com dessorção térmica (TDAAS), e as figuras de mérito avaliadas para validação dos experimentos foram: efeito matriz, faixa linear e trabalho/sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

#### 5.1.1 Efeito Matriz

A interferência dos componentes da amostra na detecção do sinal correspondente ao analito é chamada de efeito matriz. Uma vez que o padrão do analito com o qual as soluções da curva analítica são feitas não possui a mesma composição que a matriz da amostra, é necessário conferir se essa matriz não interfere na detecção do Hg no cabelo.

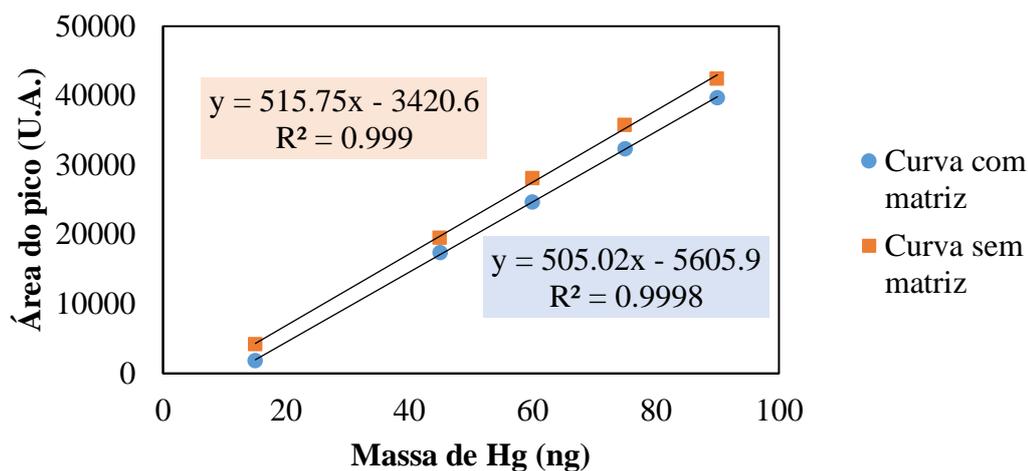
Para verificar a presença desse efeito nas análises, foram feitas duas curvas analíticas segundo modelo de regressão linear (Equação 3): uma com soluções de padrão de mercúrio em diferentes diluições, e outra com material de referência certificado (MRC) fortificado com padrão de mercúrio.

$$y(x) = bx + a \quad \text{Equação 3}$$

onde  $a$  é o coeficiente linear,  $b$  é o coeficiente angular, ou a sensibilidade,  $y(x)$  é a área de do pico de absorbância e  $x$  é massa de mercúrio contida na amostra ou no volume inserido de solução padrão.

Para avaliação do efeito matriz, foi feita uma comparação entre os coeficientes angulares das duas funções por meio de um teste t de Student para comparação de dois valores. Na ausência de efeito matriz, as duas retas apresentadas (Figura 4) devem ser paralelas, ou seja, não deve haver diferença estatisticamente significativa entre o coeficiente linear da curva feita apenas com a solução padrão e o da curva feita com MRC fortificado

A figura 4 mostra as duas curvas analíticas elaboradas para a investigação do efeito matriz. No eixo y estão os valores do sinal dado pelo equipamento, em unidades de absorção, e no eixo x, encontram-se os valores de massa de mercúrio em nanogramas. Observa-se também as funções geradas pela regressão linear dos pontos da curva e que as duas retas apresentam valores de  $R^2$  maiores ou iguais a 0,999, por isso conclui-se que são lineares.



**Figura 8** - Curvas analíticas usadas para determinação de efeito matriz e suas respectivas funções lineares. A curva de quadrados alaranjados foi feita somente com as soluções padrão, e a com círculos azuis foi feita com MRC fortificado.

Para o test t, estabeleceu-se duas hipóteses,  $H_0$  e  $H_1$ :

$$\begin{cases} H_0: Se t_{calc} < t_{tab}, b_1 = b_2 \\ H_1: Se t_{calc} > t_{tab}, b_1 \neq b_2 \end{cases}$$

O cálculo de  $t_{calc}$  foi feito com a Equação 4 e o resultado é mostrado na Tabela 3

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_{b_1 - b_2}} \quad \text{Equação 4}$$

onde  $b_1$  é a inclinação da curva analítica apenas com solução padrão de Hg,  $b_2$  é inclinação da curva analítica com MRC fortificado, e  $S_{b_1 - b_2}$  é a estimativa do desvio padrão da diferença entre  $b_1$  e  $b_2$  (ANVISA, 2018).

**Tabela 1** - Variáveis usadas no teste t para verificação de efeito matriz.

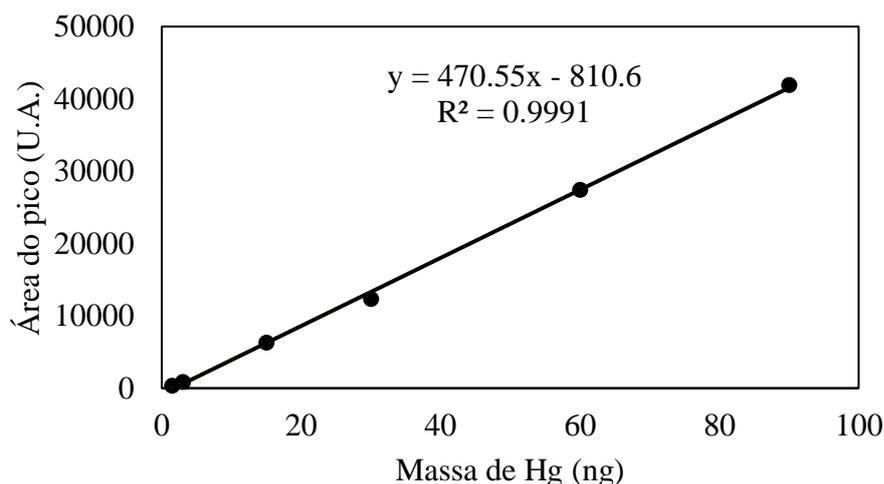
	Curva sem matriz	Curva com matriz
<b>b</b>	515,75	505,02
<b>n</b>	5	5
<b>S<sub>b1-b2</sub></b>	984503,1488	
<b>t<sub>calc</sub></b>	1,09E-05	
<b>t<sub>0,95,6</sub></b>	0,0654	

Na Tabela 1 estão os valores das variáveis utilizadas no teste t. Nela é possível observar que o valor de  $t_{\text{calc}}$  é da ordem de  $10^{-5}$ , um valor muito menor do que o tabelado para 6 graus de liberdade no nível de confiança de 95%. Conclui-se então que a hipótese nula deve ser aceita e descarta-se a possibilidade de efeito matriz no método definido.

### 5.1.2 Faixa linear de trabalho/sensibilidade

A faixa de trabalho escolhida foi de 1,5 a 90 ng. A linearidade da metodologia nessa faixa foi observada pelo teste F-*Snedecor* e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de uma curva analítica nessa faixa. Como se observou a ausência de efeito matriz, uma curva analítica elaborada somente com as soluções padrão foi avaliada para as seguintes figuras de mérito: linearidade, faixa linear de trabalho, sensibilidade.

A Figura 9 mostra gráfico com a curva analítica utilizada para avaliar a linearidade da metodologia, com os valores de absorção no eixo y e a massa de mercúrio, em nanogramas, no eixo x. A equação da reta e o coeficiente de determinação também são apresentados e verifica-se que a curva sem matriz apresenta  $R^2 = 0,9991$ . Portanto, tem-se a primeira evidência da linearidade da metodologia.



**Figura 9** - Curva analítica para avaliação das figuras de mérito relacionadas a linearidade do método nas condições de trabalho estabelecidas.

A Tabela 4 mostra a análise de variância (ANOVA) feita para o conjunto de dados utilizados na elaboração da curva analítica. São apresentadas as somas quadráticas (SQ) e as médias quadráticas (MQ) da regressão e dos ruídos, os graus de liberdade (GL) e os valores de F usados na avaliação da regressão da curva.  $F_{\text{exp}}$  é calculado pela Equação 3:

$$F_{exp} = \frac{MQ_{regressão}}{MQ_{resíduos}}$$

Equação 3

**Tabela 2** - Análise de variância dos dados da curva analítica de análise por TDAAS.

ANOVA			
	SQ	GL	MQ
<b>Regressão</b>	1,4E+09	1	1373440086
<b>Resíduos</b>	1279989	16	79999,3387
<b>Total</b>	1,4E+09	17	80865886,8
<b>F<sub>exp</sub></b>		17168,14299	
<b>F<sub>0,95,1,13</sub></b>		4,66719	

No teste *F-Snedecor*, comparou-se o valor de  $F_{exp}$  com  $F_{0,95;1;13}$ , que é o valor teórico tabelado para 1 grau de liberdade da média quadrática de regressão, 13 graus de liberdade para a média quadrática dos resíduos e 95% de confiança. Duas hipóteses são apresentadas:

$$\begin{cases} H_0: F_{exp} > F_{teor} \\ H_1: F_{exp} \leq F_{teor} \end{cases}$$

A hipótese nula significa que há uma relação linear entre o sinal analítico e a massa de mercúrio, e se a outra hipótese for verdadeira conclui-se que não há uma dependência linear significativa entre y e x.

Como  $F_{exp} = 17168,14$  e  $F_{0,95;1;13} = 4,67$ , a hipótese nula é aceita e comprova-se a linearidade da curva analítica.

As curvas analíticas utilizadas em todas as análises de amostras e de material de referência estão na Tabela 5, acompanhadas de seus respectivos valores de  $R^2$ . Também nessa tabela é apresentada a sensibilidade média, calculada a partir da média dos coeficientes angulares das curvas analíticas.

**Tabela 3** - Funções lineares das curvas analíticas utilizadas para determinação de mercúrio total

<b>Equação da reta</b>	<b>Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Sensibilidade ± DP</b>
$y = 515,75x - 3420,6$	0,999	499 ± 28 U.A./ng de Hg
$y = 470,55x - 810,6$	0,999	
$y = 528,41x - 735,87$	0,999	
$y = 480,51x - 505,26$	0,999	

DP – desvio padrão U.A. – Unidades de absorção

### 5.1.3 Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD)

Os valores de LD e LQ foram determinados a partir dos dados do experimento da curva analítica apresentada na Figura 9 (pág. 31). O limite de quantificação foi calculado pela Equação 4, onde  $s$  é o desvio padrão amostral do branco da curva analítica, e  $b$  é o coeficiente angular da equação da reta.

$$LQ = 10s/b \quad \text{Equação 4}$$

O valor de LQ foi utilizado para o cálculo do limite de detecção (LD) (Equação 5):

$$LD = LQ/3,3 \quad \text{Equação 5}$$

O sinal do branco é obtido pela realização do mesmo procedimento de análise das soluções padrão da curva analítica, mas sem a adição do padrão de mercúrio: uma alíquota da água destilada e deionizada utilizada na preparação das soluções padrão (de volume igual ao coletado estas) é inserida no equipamento através do *boat* amostrador e mede-se o sinal da linha base durante 40 segundos. Para o cálculo dos limites de quantificação e detecção, esse procedimento foi repetido 7 vezes.

A Tabela 6 apresenta os valores do sinal do branco acompanhado do desvio padrão amostral deste. Além disso são mostrados os valores calculados de LQ e LD, dos quais se tira a conclusão de que a metodologia é adequada para quantificar Hg em amostras com massa de mercúrio a partir de 0,1 ng, e detectar valores tão baixos quanto 0,03 ng de Hg.

**Tabela 4** - Valores do sinal e do desvio padrão do branco da curva analítica, e dos limites de detecção e quantificação

<b>Sinal do branco ± DP</b>	91 ± 5 U.A.
<b>LQ</b>	0,10 ng
<b>LD</b>	0,03 ng

U.A. – Unidades de absorção

#### 5.1.4 Recuperação (exatidão)

Foi realizada a análise do material de referência certificado BCR 397 (cabelo humano), que contém valores certificados de concentração de mercúrio total e metilmercúrio. O resultado obtido encontra-se na Tabela 6, onde está acompanhado do intervalo de confiança em nível de 95%. Também pode ser observado o valor da recuperação analítica para Hg nesse material.

O resultado da concentração obtida experimentalmente (Tabela 7) foi utilizado para calcular a recuperação (Equação 6).

$$\text{Recuperação} = \left( \frac{\text{Valor observado}}{\text{valor esperado}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

**Tabela 5** - Resultados de análise de Hg em material de referência certificado e recuperação.

<b>[THg] ± DP</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>[THg] ± IC<sub>95%</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>[THg]<sub>Ref</sub> ± DP</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<b>Recuperação (%)</b>
10,6 ± 0,7	10 ± 3	12,3 ± 0,5	86,2

Para as medidas experimentais, N = 3; IC<sub>95%</sub>. – Intervalo de confiança a nível de 95%

Como critério de aceitação do valor de recuperação foi usada a tabela da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) presente no DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2018), em que consta uma faixa aceitável de 80-110% de recuperação para amostras com concentração do analito na ordem de 10 ppm. Levando em consideração esse critério, o resultado experimental foi considerado válido.

Além do resultado de recuperação estar de acordo com o determinado pela AOAC, observa-se que o valor de referência do material certificado está contido dentro do intervalo de confiança da concentração de mercúrio total encontrada experimentalmente, o que indica confiabilidade das análises.

### 5.1.5 Repetibilidade (precisão)

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação da análise de seis replicatas da concentração de Hg total no material de referência certificado BCR 397. A Tabela 8 mostra os seis resultados de concentração de Hg total no MRC, o desvio padrão entre esses ensaios e o coeficiente de variação, que representa a repetibilidade, utilizada para avaliar a precisão metodologia.

A variação foi de 5,3%, valor que se encontra abaixo do limite de 7,5% aceito pela AOAC para concentrações na faixa de 10 ppm. Portanto, conclui-se que a metodologia pode ser considerada precisa diante dos critérios estabelecidos.

**Tabela 6** - Valores de concentração de mercúrio total no MRC, desvio padrão de 6 replicatas e coeficiente de variação

<b>[THg] (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	
	10,9
	9,9
	10,7
	11,0
	11,0
	9,8
Desvio padrão	0,6
Coeficiente de variação	5,3%

Um resumo das figuras de mérito é apresentado na Tabela 9, onde estão os valores de faixa linear (compreendida entre o limite de detecção e o último ponto da curva analítica), de sensibilidade acompanhada do desvio padrão entre os valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas utilizadas, de LD e LQ, além da recuperação e repetibilidade, que garantiram a precisão e exatidão dessa metodologia.

**Tabela 7** - Figuras de mérito determinadas para análise de Hg total em cabelo por TDAAS

<b>Faixa linear</b>	0,10 a 90 ng
<b>Sensibilidade ± DP</b>	499 ± 28 U.A./ng de Hg
<b>LD</b>	0,03 ng
<b>LQ</b>	0,10 ng
<b>Recuperação (exatidão)</b>	86,2%
<b>Repetibilidade (coeficiente de variação)</b>	5,3%

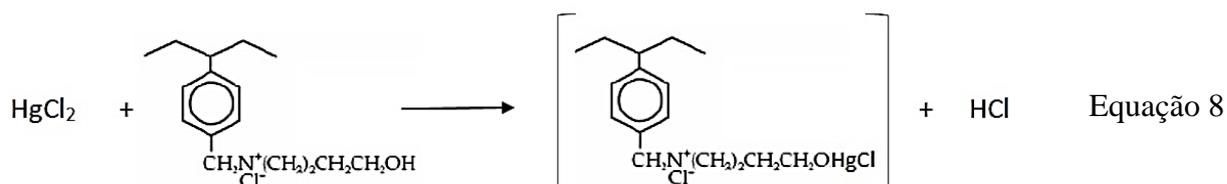
U.A. – Unidades de absorção

Observando essas figuras de mérito, é possível dizer que a metodologia proposta é adequada para determinação de cabelo humano por espectroscopia de absorção atômica com dessorção térmica e oferece resultados exatos e precisos. Por esse motivo a técnica de TDAAS foi utilizada para análise de mercúrio total nas amostras de interesse deste trabalho.

### 5.2 Separação de MeHg em coluna de troca iônica e detecção por CVAAS

As amostras usadas nas análises desse experimento foram lixiviadas com ácido clorídrico 6 mol.L<sup>-1</sup> sob agitação por 12 ± 2 horas. A fase líquida, solução de HCl contendo as espécies de mercúrio na forma de cloretos (HgCl<sub>2</sub>, MeHgCl), foi percolada pela coluna de troca iônica e recolhida para digestão no micro-ondas.

A separação do MeHg ocorre na coluna preenchida com resina trocadora de ânions, depois da ativação desta com HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>. Esse processo ocorre devido à afinidade da resina pelo mercúrio inorgânico, que forma complexos estáveis com a fase estacionária e fica retido na coluna (Equação 8), enquanto as espécies orgânicas presentes na solução não complexam com a resina e, portanto, são eluídas junto com a fase móvel.



As figuras de mérito determinadas para esse método estão apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 8** - Figuras de mérito para método de extração de MeHg por eluição em coluna de troca iônica.

<b>Faixa linear</b>	0,8 a 40 ng
<b>Sensibilidade ± DP</b>	17,478 U.A./ ng de Hg
<b>LQ</b>	0,84 ng
<b>LD</b>	0,25 ng
<b>Exatidão (erro relativo)</b>	5%

Os dados obtidos nesse experimento (Tabela 11) mostram concentrações de MeHg com valores abaixo do esperado para as amostras analisadas, de 0,89  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a 1,92  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (média = 1,45). Em trabalhos realizados com populações ribeirinhas, o mercúrio orgânico representa a maior parte do mercúrio total, com valores de 60 a 90% de  $\text{Hg}_{\text{org}}/\text{THg}$  (DE CASTRO; LIMA, 2018; SILVA, 1994). Apesar disso, o erro relativo para o material certificado BCR 397 apresentou um valor dentro da faixa considerada aceitável, de acordo com o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO e a AOAC (INMETRO, 2018).

**Tabela 9** - Resultados das análises das amostras eluídas em coluna de troca iônica. O teor de metilmercúrio (MeHg%) foi calculado com os valores experimentais de [MeHg] em relação às concentrações de mercúrio total.

<b>Separação em coluna de troca iônica</b>		
<b>Amostra</b>	<b>[Hg<sub>org</sub>] ± DP (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	<b>Hg<sub>org</sub>/THg %</b>
BCR 397	0,9 ± 0,1	7 %
Interc. 2005-1-1	2,5 ± 0,1	19 %
ELS	1,1 ± 0,1	21 %
SSS	0,89 ± 0,02	18 %
EAO	1,55 ± 0,03	44 %
COR	1,92 ± 0,05	43 %
EGS	1,86 ± 0,04	13 %

Os resultados apresentados são todos de amostras que foram maceradas em almofariz e pistilo até a obtenção de um pó de aparência homogênea, logo, nesse caso, não se considerou que o tamanho das partículas das amostras fosse um problema. Além disso, o resultado da análise de uma amostra utilizada em ensaios de intercalibração, Interc. 2005-1-1, que também é um pó homogêneo como o BCR 397, apresentou um erro relativo de 77% em relação ao valor de referência.

Assim, de acordo com os dados obtidos, as seguintes hipóteses foram levantadas:

- a) O mercúrio não foi totalmente extraído das amostras;
- b) o mercúrio orgânico não foi completamente liberado da coluna de troca iônica;
- c) houve perda de mercúrio na digestão em micro-ondas;
- d) ocorreu desmetilação do mercúrio no cabelo ao longo do período em que as amostras ficaram guardadas.

Com relação à primeira hipótese, sabe-se que o mercúrio está ligado a átomos de enxofre na estrutura molecular do cabelo. E esta ligação é altamente estável devido à afinidade do Hg, um ácido macio (volumoso, com baixo estado de oxidação e pouco polarizante), com o enxofre, uma base macia (volumosa, baixa eletronegatividade e alta polarizabilidade). Apesar disso, essa é a hipótese menos provável, porque a concentração do ácido utilizada ( $6 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e o tempo de interação com as amostras (aprox.12h) são elevados, além disso, essa metodologia já é consolidada e amplamente utilizada nos trabalhos encontrados na literatura.

Quanto à segunda hipótese, esperava-se que apenas o mercúrio inorgânico ficasse retido na coluna e que o MeHg fosse totalmente captado na solução eluída da amostra que passou pela coluna. Contudo, os resultados da análise das amostras não correspondem aos valores esperados. Uma das possibilidades, é de que apenas uma parte fração do analito está eluindo com a solução da amostra, ou seja, é necessário mais ácido clorídrico para carregá-lo da coluna para a o recipiente onde a amostra é coletada.

A terceira hipótese é a de que, na etapa de digestão posterior à eluição na coluna de troca iônica, houve perda do analito através de vazamentos nas cápsulas do micro-ondas. Essa hipótese foi levantada porque essas cápsulas são antigas e algumas apresentam sinais de vazamentos prévios.

Nessa etapa de digestão em micro-ondas, o mercúrio orgânico deve ser oxidado para que fique na forma inorgânica e, para que essa reação ocorra, é necessário a adição de ácido

nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio. Ao submeter essa solução de amostra com ácido concentrado e reagente oxidante à radiação micro-ondas, a pressão da cápsula torna-se muito alta e, se o sistema que prende a cápsula não for capaz de suportar a pressão, ela é aberta, causando a perda do analito. Apesar de não terem sido observados sinais de vazamento depois de tirar as cápsulas do micro-ondas, não se descarta essa hipótese porque o sistema pode ter sido aberto para soltar o vapor das soluções, e esse vapor pode ter saído do micro-ondas pelo exaustor.

A última hipótese, a desmetilação do mercúrio no cabelo, pode ser considerada porque já há conhecimento de transformação de metilmercúrio em mercúrio inorgânico em outros órgãos do corpo humano (cérebro, fígado e sangue) (BERGLUND et al., 2005; HAĆ; KRZYZANOWSKI; KRECHNIAK, 2000; SUZUKI et al., 1984). Ademais, em um estudo com garimpeiros colombianos, a possibilidade de desmetilação em cabelo já foi levantada, ao se observar que os resultados de  $Hg_{org}$  nos cabelos dos garimpeiros não refletiam a exposição a qual eles estavam submetidos (LAFFONT et al., 2011).

### **5.3 Lixiviação com HCl 4% para determinação de mercúrio orgânico**

#### **5.3.1 Validação da metodologia**

Para garantir que a metodologia de lixiviação dos cabelos com HCl 4% apresente resultados verdadeiros, foi feita a validação desta por meio da determinação das figuras de mérito apresentadas na Tabela 10.

Para a validação desta metodologia, foram utilizadas as mesmas fórmulas e métodos utilizados na validação da metodologia para determinação de Hg total por TDAAS.

Na tabela 12 se encontra a faixa linear, que vai do valor de LQ (0,2 ng) até o último ponto da curva analítica (60 ng); da sensibilidade, que apresentou valor semelhante ao da metodologia para análise de Hg total (Tabela 9); os limites de quantificação e detecção; e os valores de recuperação e repetibilidade, obtidos a partir da análise do material de referência certificado BCR 397.

**Tabela 10** - Figuras de mérito para validação da metodologia de extração de Hg orgânico por lixiviação com HCl 4%

<b>Faixa linear</b>	0,2 a 60 ng
<b>Sensibilidade ± DP</b>	499 ± 26 U.A./ng de Hg
<b>LQ</b>	0,2 ng
<b>LD</b>	0,06 ng
<b>Recuperação (exatidão)</b>	99,2 %
<b>Repetibilidade (coeficiente de variação)</b>	11,5 %

U.A. – Unidades de absorção

Observando as figuras de métodos da Tabela 12, nota-se que essa metodologia é efetiva para uso de TDAAS na análise de metilmercúrio extraído de cabelo com solução diluída de ácido clorídrico e, que os resultados obtidos dessa análise são precisos e exatos.

A Tabela 13 mostra o resultado experimental da determinação de mercúrio orgânico no material BCR 397 acompanhado do intervalo de confiança no nível de 95%, os valores de  $[Hg_{org}]$  e desvio padrão de referência, e a recuperação analítica calculada pela Equação 6.

**Tabela 11** - Comparação entre dado experimental e certificado de  $[Hg_{org}]$  no BCR 397.

$[Hg_{org}] \pm DP$ ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )	$[Hg_{org}] \pm IC_{95\%}$ ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )	$[Hg_{org}]_{Ref} \pm DP$ ( $\mu g \cdot g^{-1}$ )	<b>Recuperação</b> (%)
0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,87 ± 0,04	99,2

Para as medidas experimentais, N = 9;  $IC_{95\%}$ . – Intervalo de confiança a nível de 95%

A média valores de MeHg extraído do material de referência certificado BCR 397 foi próximo ao esperado e a recuperação calculada está em conformidade com a faixa aceitável (80-110%) definida pela AOAC para concentrações da ordem de 100 ppb. Além disso, a repetibilidade também está de acordo com o limite de 15% estabelecido para concentrações da ordem de 100 ppb.

Para uma comparação estatística entre a medida experimental e o valor certificado de concentração de MeHg no BCR 397, foi utilizado um teste de hipóteses. Calculou-se o valor de  $t_{calc}$  pela Equação 7 e estabeleceu-se duas hipóteses:

$$\begin{cases} H_0: Se |t_{calc}| < t_{tab}, [MeHg] = [MeHg]_{Ref} \\ H_1: Se |t_{calc}| > t_{tab}, [MeHg] \neq [MeHg]_{Ref} \end{cases}$$

$$|t_{calc}| = \frac{([MeHg] - [MeHg]_{Ref})\sqrt{n}}{s} \quad \text{Equação 7}$$

onde,  $n$  é o número de replicatas feitas no experimento,  $s$  é a incerteza associada ao valor experimental e  $t_{tab}$  é o valor tabelado de  $t$  de *Student* para um nível de confiança e graus de liberdade estabelecidos.

A Tabela 14 apresenta os valores das variáveis utilizados no teste  $t$  para comparação entre a  $[Hg_{org}]$  medida e a informada pelo certificado. Observa-se que  $|t_{calc}| < t_{tab}$ , logo a hipótese nula é aceita e conclui-se que a concentração de  $Hg_{org}$  determinada no experimento pode ser considerada semelhante ao valor real do certificado.

**Tabela 12** - Variáveis utilizadas no teste de hipótese

$s$	$n$	GL	Nível de confiança	$t_{calc}$	$t_{tab}$
0,08	3	2	95%	0,216	4,303

O Quadro 2 apresenta aspectos usados para comparar as metodologias de separação de  $Hg_{org}$  por lixiviação com HCl 4% e por eluição em coluna Dowex. Neste quadro, observa-se que, quanto à sensibilidade das técnicas de detecção, o maior valor foi obtido com TDAAS e, além disso, esta técnica apresentou menor limite de quantificação e faixa linear de trabalho mais ampla.

Ainda no Quadro 2, é possível notar que a repetibilidade é uma vantagem da metodologia de lixiviação com HCl 4% e, que o tempo total gasto nos experimentos de eluição em coluna Dowex seguido de detecção por CVAAS é o dobro do gasto na outra metodologia testada. Outro aspecto decisivo na escolha do método foi a necessidade de digestão de amostra, que é uma etapa em que há a possibilidade de perda ou transformação do analito, além de aumentar consideravelmente o tempo de análise.

**Quadro 2** – Comparação entre as duas metodologias utilizadas para separação de Hg<sub>org</sub>

<b>Lixiviação com HCl 4% e detecção por TDAAS</b>	<b>Eluição em coluna de troca iônica e detecção por CVAAS</b>
Sensibilidade - 499 U.A./ng de Hg	Sensibilidade - 17,478 U.A./ ng de Hg
Repetibilidade - DPR 11,5%	Não foi possível repetir resultados
LQ = 0,2 ng	LQ = 0,8 ng
Faixa linear – 0,2 a 60 ng	Faixa linear – 0,8 a 40 ng
Tempo de análise – aprox. 12h	Tempo de análise – aprox. 24h
Não é necessário fazer digestão da amostra	É necessário fazer digestão amostra

Diante dos problemas relatados com a metodologia de eluição das amostras em coluna de troca iônica e do desempenho inferior comparado à lixiviação com HCl 4%, foi decidido pela utilização desta última. Apesar de haver uma melhor fundamentação teórica para a separação das espécies orgânicas por meio da ligação do mercúrio inorgânico com a coluna de troca iônica, as várias etapas de preparo de amostra acarretam a adição de erros na análise. Além disso, problemas no equipamento de CVAAS estavam prejudicando a leitura das soluções de amostras.

### **5.3.2 Aplicação da metodologia às amostras selecionadas**

Seguindo o procedimento descrito na seção 4.5 dos Materiais e Métodos, foram determinadas as concentrações de Hg nas soluções diluídas de amostras (Tabela 11).

Nesse experimento, o MeHg deve ser extraído dos cabelos e complexado com os íons cloreto da solução. O procedimento foi otimizado por Bermejo-Barrera et al. (1999), que, ao variar os parâmetros tempo de extração, concentração de HCl e volume de solução ácida adicionado, chegaram à conclusão de que, destes parâmetros, apenas a concentração do ácido tinha influência nos resultados. Outra observação dos autores é que, uma vez que nem o modo, nem o tempo de agitação mostraram influência no resultado da lixiviação, o processo de migração do MeHg do cabelo para a solução acontece imediatamente após a adição de HCl 4% devido ao tamanho das partículas de amostra (<1 µm).

Na Tabela 15 são apresentados os resultados das análises de mercúrio orgânico nas amostras após lixiviação com HCl 4%. Observa-se que na comunidade ribeirinha de São Félix do Xingu (n= 4),  $[Hg_{org}]$  varia de 0,8 a 2,1  $\mu g.g^{-1}$  (média =  $1,4 \pm 0,6 \mu g.g^{-1}$ ), enquanto nas amostras dos indígenas Kayapó da aldeia Goroti-re (n = 13), a  $[Hg_{org}]$  foi de 0,9 a 1,7  $\mu g.g^{-1}$  (média =  $1,2 \pm 0,2 \mu g.g^{-1}$ ). A concentração de mercúrio encontrada em todas as amostras analisadas por esta metodologia varia de 0,8 a 2,1  $\mu g.g^{-1}$  (média =  $1,2 \pm 0,3 \mu g.g^{-1}$ ).

A respeito dos hábitos alimentares dos ribeirinhos, três das quatro amostras analisadas são de indivíduos que comem peixe pelo menos uma vez por semana, e outra é de uma pessoa que come peixe pelo menos uma vez por mês (Tabela 1). Na tabela 15, as quatro primeiras amostras listadas (APPS 13, PSMG 15 e EAO 18), que apresentaram as maiores concentrações de  $Hg_{org}$  deste grupo, pertencem às pessoas que comem peixe pelo menos uma vez por semana. Já a amostra AAB 22 corresponde ao indivíduo que consome peixe na sua dieta pelo menos uma vez por mês.

A partir dessas observações, pode-se dizer que as variações das concentrações de mercúrio orgânico nos cabelos desses indivíduos refletem os seus hábitos alimentares, como já constatado anteriormente em pesquisas com populações que vivem na mesma área (BARBOSA et al., 1995; BOISCHIO; HENSHEL, 2000).

A respeito dos indígenas Kayapó, não se sabe sobre diferenças nos hábitos alimentares entre os indivíduos, uma vez que a informação disponível é de geralmente consomem peixe em frequência semanal (Tabela 1), mas a concentração de mercúrio orgânico pouco variou entre as 13 amostras analisadas (média =  $1,2 \pm 0,2 \mu g.g^{-1}$ ), sugerindo uma uniformidade na dieta desses indivíduos.

**Tabela 13** - Concentrações de mercúrio orgânico determinadas após lixiviação com HCl 4%

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>	<b>[Hg<sub>org</sub>] ± DP (µg.g<sup>-1</sup>)</b>
APPS 13	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	2,1 ± 0,2
PSMG 15	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	1,67 ± 0,08
EAO 18	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	1,18 ± 0,07
AAB 22	Comunidade ribeirinha S. F. do Xingu	0,79 ± 0,04
GR-14	Aldeia Goroti-re	1,16 ± 0,09
GR-15	Aldeia Goroti-re	1,43 ± 0,05
GR-22	Aldeia Goroti-re	1,02 ± 0,03
GR-23	Aldeia Goroti-re	1,7 ± 0,1
GR-58	Aldeia Goroti-re	1,06 ± 0,02
GR-59	Aldeia Goroti-re	1,2 ± 0,1
GR-61	Aldeia Goroti-re	0,87 ± 0,04
GR-63	Aldeia Goroti-re	1,1 ± 0,1
GR-65	Aldeia Goroti-re	1,3 ± 0,1
GR-67	Aldeia Goroti-re	1,45 ± 0,03
GR-69	Aldeia Goroti-re	1,0 ± 0,1
GR-71	Aldeia Goroti-re	1,07 ± 0,03
GR-78	Aldeia Goroti-re	1,0 ± 0,1

#### 5.4 Teor percentual de Hg orgânico nas amostras de cabelo

A Tabela 16 apresenta as concentrações de mercúrio total e orgânico para as dezessete amostras analisadas, além da porcentagem de mercúrio orgânico sobre mercúrio total nas amostras (Hg<sub>org</sub>/THg %).

As concentrações mercúrio total estão na faixa de 4,7 a 9,4 µg.g<sup>-1</sup>, que se encontra dentro do limite considerado seguro para populações consumidoras de peixe em frequência diária (UNEP DTIE CHEMICALS BRANCH; WHO, 2008). Nota-se também que o teor de mercúrio orgânico se apresenta na faixa de 15 a 39% , levando a uma média de 23% de mercúrio orgânico em todas as amostras.

**Tabela 14** - Resultados das análises de mercúrio total e orgânico, ambos determinados por TDAAS, e valores em porcentagem do teor de mercúrio orgânico nas amostras

Amostra	Origem	[THg] ± DP (µg.g <sup>-1</sup> )	[Hg <sub>org</sub> ] ± DP (µg.g <sup>-1</sup> )	Hg <sub>org</sub> /THg %
APPS 13	Ribeirinhos S. F. do Xingu	5,3 ± 0,4	2,1 ± 0,2	39 %
PSMG 15	Ribeirinhos S. F. do Xingu	4,8 ± 0,4	1,67 ± 0,08	35 %
EAO 18	Ribeirinhos S. F. do Xingu	5,2 ± 0,4	1,18 ± 0,07	23 %
AAB 22	Ribeirinhos S. F. do Xingu	2,19 ± 0,06	0,79 ± 0,04	36 %
GR-14	Aldeia Goroti-re	7,6 ± 0,2	1,16 ± 0,09	15 %
GR-15	Aldeia Goroti-re	5,9 ± 0,7	1,43 ± 0,05	25 %
GR-22	Aldeia Goroti-re	5,6 ± 0,1	1,02 ± 0,03	18 %
GR-23	Aldeia Goroti-re	6,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	29 %
GR-58	Aldeia Goroti-re	7,2 ± 0,3	1,06 ± 0,02	15 %
GR-59	Aldeia Goroti-re	7,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	15 %
GR-61	Aldeia Goroti-re	3,73 ± 0,08	0,87 ± 0,04	23 %
GR-63	Aldeia Goroti-re	5,0 ± 0,3	1,1 ± 0,1	23 %
GR-65	Aldeia Goroti-re	6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	19 %
GR-67	Aldeia Goroti-re	9,4 ± 0,3	1,45 ± 0,03	15 %
GR-69	Aldeia Goroti-re	5,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	19 %
GR-71	Aldeia Goroti-re	4,7 ± 0,1	1,07 ± 0,03	23 %
GR-78	Aldeia Goroti-re	4,7 ± 0,3	1,0 ± 0,1	21 %

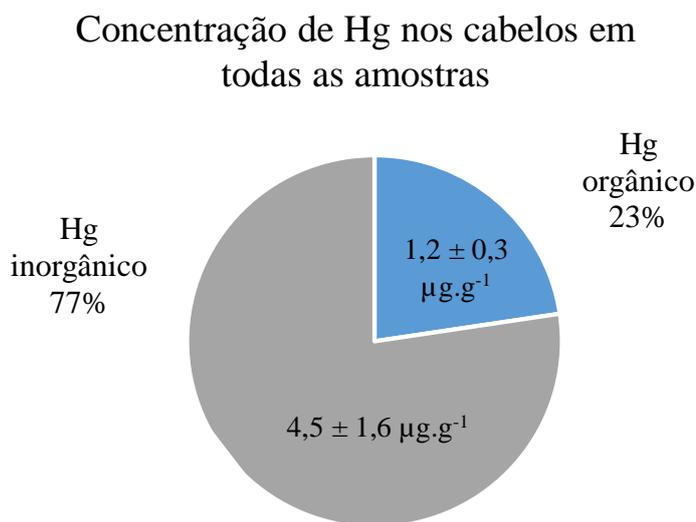
As concentrações de Hg total nas amostras da aldeia Goroti-re encontram-se na mesma ordem de grandeza das encontradas em um trabalho anterior que estudou indivíduos da mesma aldeia e encontrou valores de 3,10 a 6,34 µg.g<sup>-1</sup> (COUTO; CÂMARA; SABROZA, 1988). Esses números mostram que, apesar de essas populações viverem em áreas impactadas por garimpo e se alimentarem de peixes, não há evidência de contaminação dos indivíduos nas comunidades estudadas.

Devido aos níveis seguros de Hg nos cabelos, também não existiam, entre os Gorotire e os ribeirinhos de São Félix do Xingu, registros de casos de doença de Minamata ou outras complicações associadas à contaminação por mercúrio (FERRARI et al., 1992).

As concentrações de THg abaixo do limite de risco provavelmente estão ligadas à dieta dessas populações, uma vez que apenas duas das espécies de peixes consumidas na região apresentam valores de mercúrio total (Tabela 2) acima do limite seguro estabelecido pela OMS, que é de  $300 \text{ ng.g}^{-1}$  quando o consumo é de até 400 g por semana e, considera-se que os indivíduos comam peixes das outras espécies com concentrações menores de THg. Além disso, nos próprios peixes está presente o selênio (Se), um metal utilizado no tratamento de casos de contaminação por mercúrio.

O Se age como um agente complexante na retirada do mercúrio do organismo: por causa da sua maior afinidade com Hg comparado ao enxofre, o metal tóxico é impedido de se ligar a grupos tióis de proteínas no meio fisiológico e forma compostos como HgSe ou MeHgSe que tornam o mercúrio inerte (GAJDOSECHOVA et al., 2018).

A Figura 10 é uma representação gráfica das frações de mercúrio presentes nas amostras analisadas. Observa-se que a média de  $\text{Hg}_{\text{org}}$  é de 23%, enquanto a média da fração inorgânica ( $\text{Hg}_{\text{inorg}}$ ) é de 77%, o que leva à conclusão de que a espécie inorgânica é predominante.

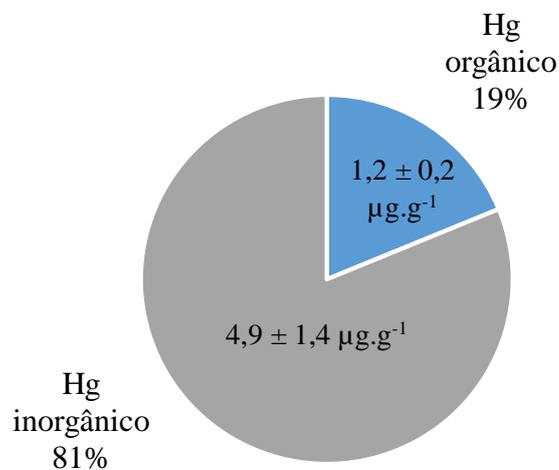


**Figura 10** – Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em todas as amostras

Nas figuras 11 e 12 estão representados os gráficos de distribuição das frações de Hg nas amostras da comunidade ribeirinha de São Félix do Xingu e da aldeia indígena Goroti-re, respectivamente. No caso dos ribeirinhos, o  $\text{Hg}_{\text{org}}$  compreende 33% do total. Já nos indígenas

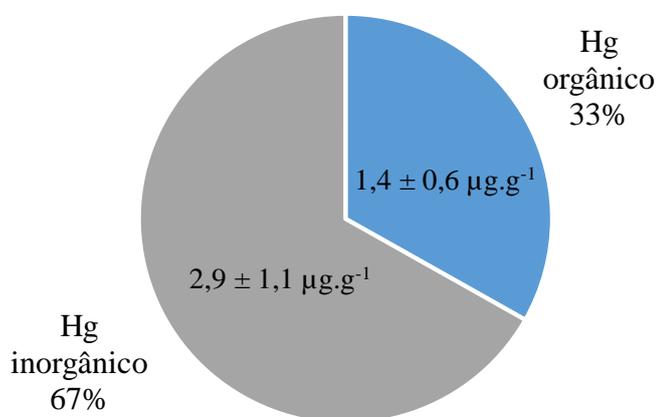
Kayapó da aldeia Goroti-re, as espécies orgânicas são 19% do todo. Verifica-se, então, que a média do percentual de mercúrio orgânico é maior nos ribeirinhos.

### Concentração de Hg nos cabelos de índigenas



**Figura 11** - Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em amostras da aldeia Goroti-re

### Concentração de Hg nos cabelos de ribeirinhos



**Figura 12** - Representação gráfica dos teores médios de Hg orgânico e inorgânico em amostras da comunidade ribeirinha de São Félix do Xingu

Entretanto, apesar dos valores percentuais serem diferentes, as concentrações médias de mercúrio orgânico não apresentam diferença significativa:  $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  para os Gorotire, e  $1,6 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  para os ribeirinhos. Além disso, o pequeno número de amostras utilizado, principalmente dos ribeirinhos ( $n = 4$ ) não é suficiente para determinar uma tendência de contraste entre as duas populações.

Quanto às concentrações de THg, também não apresentam diferença significativa,  $6,1 \pm 1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $4,4 \pm 1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$  para indígenas e ribeirinhos, respectivamente. Essa semelhança nas concentrações de THg entre indígenas e ribeirinhos já foi observada na literatura (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA; SILVA; DÓREA, 1998) e provavelmente se deve à fonte comum de acumulação de mercúrio nessas comunidades: o consumo de peixe.

Como pode ser observado nas figuras 10, 11 e 12 os resultados mostram uma predominância da espécie inorgânica nas amostras e fazem contraste com a literatura estudada, que mostra que o MeHg em comunidades indígenas e ribeirinhas consumidoras de peixe na Amazônia compõe a maior fração do mercúrio acumulado nos cabelos (70 a 99%) (ARRIFANO et al., 2018; BARBOSA et al., 2001; DE CASTRO; LIMA, 2018).

Primeiramente, para uma avaliação da confiança dos resultados obtidos, com relação à metodologia utilizada, constata-se que os valores de concentração de mercúrio orgânico são verdadeiros, uma vez que foi feita a validação do método utilizado e o resultado da análise do material de referência certificado mostrou-se preciso e exato. Dado isso, não é pertinente questionar o resultado das análises, mas é possível analisar mais detalhadamente as etapas da metodologia que levaram a obtenção destes dados.

Comparando o preparo das amostras com o preparo do MRC (QUEVAUVILLER et al., 1992), observa-se dois procedimentos diferentes dos realizados para as amostras: os cabelos coletados para preparação do material BCR 397 foram lavados e em seguida secados antes da pulverização; e a moagem dos cabelos foi feita sob nitrogênio líquido em um moinho de carbeto de tungstênio.

Com relação à primeira observação, a escolha de não lavar os cabelos previamente foi feita com base nas evidências de um trabalho que mostra que procedimentos de lavagem não são eficazes na remoção de contaminação externa (LI et al., 2008). A respeito da pulverização, o uso de moinho automático foi descartado porque não havia disponível um equipamento que

fosse livre de risco de contaminação e que fosse adequado para a quantidade amostra disponível.

O uso de nitrogênio líquido durante a maceração foi testado com uma amostra de cabelo sem identificação coletada em um salão de beleza. Nesse teste, o cabelo foi cortado e colocado em um almofariz de cerâmica, aonde foi adicionando-se nitrogênio líquido e macerando com um pistilo de cerâmica. A utilização desse reagente foi descartada levando em consideração que depois de gastar uma quantidade considerável, a amostra ainda não se encontrava no estado necessário para peneiragem.

Também foi feita a liofilização de uma amostra em tentativa de facilitar a maceração da amostra, mas não foi observada diferença na maceração em relação às amostras não-liofilizadas. Isso acontece porque a quantidade de água na composição do cabelo é muito pequena, logo o processo de liofilização não causa grandes mudanças na rigidez dos fios, que é atribuída à estrutura tridimensional das proteínas que o formam.

Em resumo, é pouco provável que tenha ocorrido perda significativa de analito nas etapas de preparo de amostra anteriores à lixiviação. Ademais, durante etapas de lixiviação até a análise por TDAAS, qualquer perda de analito nas amostras deveria ter acontecido também no MRC, mas como não foi o caso, outras hipóteses foram consideradas.

É possível que a maior parte do mercúrio total tenha uma fonte de contaminação de mercúrio inorgânico, o que concordaria com os resultados encontrados, mas a acumulação de  $Hg_{inorg}$  é mais comum em indivíduos contaminados por exposição ocupacional ou que tenham amálgamas dentárias, onde a absorção acontece por inalação de vapor de mercúrio elementar (UNEP DTIE CHEMICALS BRANCH; WHO, 2008). Entretanto, esse não é o caso de nenhuma das duas comunidades estudadas neste trabalho.

Outra explicação possível seria a perda do ligante orgânico no composto organomercurial. Tem-se como suporte para essa hipótese o conhecimento da ocorrência, em células humanas, do processo de desmetilação do metilmercúrio, ou seja, da transformação de mercúrio orgânico em inorgânico (ASCHNER; ONISHCHENKO; CECCATELLI, 2010; UNEP DTIE CHEMICALS BRANCH; WHO, 2008). Porém são necessários mais estudos sobre a estabilidade das espécies de mercúrio em cabelo para que se possa dizer que tal transformação esteja ocorrendo ou não.

Uma vez que o mercúrio não é o único metal acumulado no cabelo (POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017), talvez seja possível um mecanismo onde outro metal com mais afinidade pelo grupo metil faça a captura da metila, desfazendo a ligação Hg-C sem romper a ligação entre o mercúrio e o enxofre dos grupos tiol nas proteínas do cabelo.

Alguns trabalhos atribuem a todo o mercúrio inorgânico nos cabelos a proveniência da transformação de  $Hg_{org}$  em  $Hg_{inorg}$ , baseados na observação da espécie inorgânica nesse tecido após experimentos com dosagem controlada de MeHg em indivíduos sob estudo (BERGLUND et al., 2005; CARRIER et al., 2001; CLARKSON, 2002; LAFFONT et al., 2011). O problema com essas afirmações, é que são feitas sem conhecimento dos mecanismos de desmetilação e, considerando a complexidade do metabolismo humano, essa hipótese precisa de mais evidências para ser confirmada ou negada.

Ao final, diante dos resultados e hipóteses expostos, ficaram algumas perguntas que podem ser tratadas em trabalhos futuros: ocorreu transformação de  $Hg_{org}$  em  $Hg_{inorg}$  nos cabelos durante o tempo em que ficaram armazenados? E quais os mecanismos dessa possível transformação? É possível que outros fatores além do consumo de peixe influenciem na concentração de mercúrio total e orgânico nas amostras analisadas, e se sim, quais fatores?

## 6. Conclusões e Perspectivas

Das duas metodologias propostas para análise de mercúrio orgânico em cabelo humano, a lixiviação com HCl 4% seguida de detecção por TDAAS apresentou melhor desempenho, com menor limite de quantificação, maior sensibilidade e faixa linear de trabalho mais ampla. Desse modo, cumprindo um dos objetivos propostos, foi possível validar as metodologias de análise de THg e Hg<sub>org</sub> em cabelo humano utilizando TDAAS como método de detecção.

Isso permitiu a aplicação dessas metodologias, outro objetivo proposto, em 17 amostras de cabelos de comunidades expostas à contaminação de mercúrio causada por atividade garimpeira. Os resultados obtidos mostraram que, apesar de as populações ribeirinha e indígena cujas amostras foram analisadas se alimentarem de peixes contaminados com mercúrio, elas não apresentam níveis de mercúrio acima do limite seguro determinado pela OMS. Por isso pode-se considerar que há outros fatores, provavelmente ligados à alimentação, que previnem a acumulação do metal tóxico nessas comunidades.

Os teores percentuais de Hg<sub>org</sub> abaixo de 40% podem ser um indício da transformação de compostos alquilmercúrio em Hg<sub>inorg</sub> nos cabelos ao longo do tempo (mesmo depois de cortados) e, levantaram questionamentos a respeito da estabilidade de espécies alquilmercúrio nesse tecido e da cinética dessa transformação. Isso pode indicar que a análise de mercúrio total em cabelo é um método mais eficiente do que a especiação para avaliar a contaminação por Hg em humanos, pois na especiação deve ser considerada a perda do analito orgânico devido à quebra da ligação entre o mercúrio e o grupo alquila.

Visto que não foi possível determinar com certeza a causa da diferença entre os dados obtidos e os publicados na literatura, propõe-se que sejam feitas mais investigações sobre a estabilidade do metilmercúrio em cabelos. Essa investigação pode ser feita em estudos toxicocinéticos, onde são determinadas a atividade e a meia vida dos analitos em meios biológicos, ou por comparação entre concentrações de mercúrio orgânico em cabelos armazenados por diferentes períodos.

É necessário também, antes de aplicar novamente a metodologia de lixiviação com HCl 4%, que sejam feitos testes a respeito da desmetilação de metilmercúrio em todas as etapas de preparo de amostra, para garantir que os resultados reflitam a concentração de mercúrio orgânico das amostras antes da análise.

## 7. Referências bibliográficas

- AKAGI, H. et al. Human exposure to mercury due to goldmining in the Tapajos River basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 80, n. 1–4, p. 85–94, fev. 1995.
- AMDE, M. et al. Methods and recent advances in speciation analysis of mercury chemical species in environmental samples: a review. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 28, n. 1–4, p. 51–65, 29 out. 2016.
- ANVISA. **Guia para tratamento estatístico de validação** ANVISA, , 2018.
- ARRIFANO, G. P. F. et al. Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. September 2017, p. 299–305, 2018.
- ASCHNER, M.; ONISHCHENKO, N.; CECCATELLI, S. Toxicology of Alkylmercury compounds. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Eds.). . **Organometallics in Environment and Toxicology**. Metal Ions in Life Sciences. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. p. 403–434.
- BARBOSA, A. C. et al. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 80, n. 1–4, p. 109–121, 1995.
- BARBOSA, A. C. et al. Hair mercury speciation as a function of gender, age, and body mass index in inhabitants of the negro river basin, amazon, brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 439–444, 2001.
- BARBOSA, A. C.; SILVA, S. R. L.; DÓREA, J. G. Concentration of Mercury in Hair of Indigenous Mothers and Infants from the Amazon Basin. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 100–105, 8 jan. 1998.
- BARROS NETO, B. .; SCARMINIO, I. S. .; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. [s.l: s.n.].
- BECKERS, F.; RINKLEBE, J. Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 693–794, 3 maio 2017.

BERGLUND, M. et al. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. **Environmental Health**, v. 4, n. 1, p. 20, 3 dez. 2005.

BERMEJO-BARRERA, P. et al. Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, n. 2–3, p. 263–272, 1999.

BJØRKLUND, G. et al. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. **Environmental Research**, v. 159, p. 545–554, nov. 2017.

BOISCHIO, A. A. P.; HENSHEL, D. Fish consumption, fish lore, and mercury pollution - Risk communication for the Madeira River people. **Environmental Research**, v. 84, n. 2, p. 108–126, 2000.

CARRIER, G. et al. A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 171, n. 1, p. 50–60, 2001.

CERBINO, M. R. et al. Metalloproteomics Approach to Analyze Mercury in Breast Milk and Hair Samples of Lactating Women in Communities of the Amazon Basin, Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 181, n. 2, p. 216–226, 25 fev. 2018.

CHEN, L.; LI, J.; CHEN, L. Colorimetric detection of mercury species based on functionalized gold nanoparticles. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 18, p. 15897–15904, 2014.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 11–23, 2002.

CLOUGH, R. et al. **Atomic Spectrometry Update: Review of advances in elemental speciation** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8JA90025F>>

CORDEIRO, R. C. et al. Forest fire indicators and mercury deposition in an intense land use change region in the Brazilian Amazon (Alta Floresta, MT). **Science of the Total Environment**, v. 293, n. 1–3, p. 247–256, 2002.

COSTAS-MORA, I. et al. In situ building of a nanoprobe based on fluorescent carbon dots for methylmercury detection. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 9, p. 4536–4543, 2014.

COUTO, R. C. DE S.; CÂMARA, V. M.; SABROZA, P. C. Intoxicação mercurial: resultados preliminares em duas áreas garimpeiras - PA. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, n. 3, p. 301–315, set. 1988.

CZERNY, B. et al. Screening of trace elements in hair of the female population with different types of cancers in wielkopolska region of Poland. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

DE CASTRO, N. S. S.; LIMA, M. D. O. Hair as a biomarker of long term mercury exposure in brazilian amazon: A systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 3, p. 1–16, 2018.

DE QUADROS, D. P. C. et al. Mercury speciation by high-performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry using an integrated microwave/UV interface. Optimization of a single step procedure for the simultaneous photo-oxidation of mercury species and photo-generation . **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 101, p. 312–319, 2014.

DELAFIORI, J.; RING, G.; FUREY, A. Clinical applications of HPLC-ICP-MS element speciation: A review. **Talanta**, v. 153, p. 306–331, 2016.

DÓREA, J. G. et al. Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Munduruku and Kayabi Indians of Amazonia. **Environmental Research**, v. 97, n. 2, p. 209–219, 2005.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700–711, ago. 2013.

DÓREA, J. G.; MARQUES, R. C.; ABREU, L. Milestone achievement and neurodevelopment of rural amazonian toddlers (12 to 24 months) with different methylmercury and ethylmercury exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 77, n. 1–3, p. 1–13, 2014.

DOS SANTOS FREITAS, J. et al. Cross-sectional study to assess the association of color vision with mercury hair concentration in children from Brazilian Amazonian riverine communities. **NeuroToxicology**, v. 65, p. 60–67, mar. 2018.

DRISCOLL, C. T. et al. Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 4967–4983, 2013.

DUARTE, K. et al. Disposable sensors for environmental monitoring of lead, cadmium and

mercury. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 64, p. 183–190, 2015.

EKINO, S. et al. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, n. 1–2, p. 131–144, 2007.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. [s.l: s.n.].

FAIAL, K. et al. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: Fish consumption as a possible route of exposure. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 66–76, 2015.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; AGOSTINI, M. B. Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 451–460, 2009.

FEITOSA-SANTANA, C. et al. Color vision impairment with low-level methylmercury exposure of an Amazonian population – Brazil. **NeuroToxicology**, v. 66, p. 179–184, maio 2018.

FENG, X. Landfill is an important atmospheric mercury emission source. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, n. 19, p. 2068, 2004.

FENG, X. et al. Human Exposure To Methylmercury through Rice Intake in Mercury Mining Areas, Guizhou Province, China. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 1, p. 326–332, jan. 2008.

FERRARI, Í. et al. **Saúde, Garimpo e Mercúrio entre os Kayapó-Gorotire: Relatório Exploratório, Tendências, Implicações e Perspectivas**. Brasília DF: [s.n.].

GAJDOSECHOVA, Z. et al. The role of selenium in mercury toxicity – Current analytical techniques and future trends in analysis of selenium and mercury interactions in biological matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 104, p. 95–109, jul. 2018.

GIBIČAR, D. et al. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra(n-propyl)borate as derivatizing agent. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 2, p. 329–340, 18 abr. 2007.

GIL, R. A. et al. Vapor generation - atomic spectrometric techniques. Expanding frontiers through specific-species preconcentration. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 875, p. 7–21, 2015.

GUO, Y. et al. Thermal treatment of hair for the synthesis of sustainable carbon quantum dots and the applications for sensing Hg<sup>2+</sup>. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–7, 2016.

HACÍ, E.; KRZYŻANOWSKI, M.; KRECHNIAK, J. Total mercury in human renal cortex, liver, cerebellum and hair. **Science of the Total Environment**, v. 248, n. 1, p. 37–43, 2000.

HARADA, M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–24, 25 jan. 1995.

HASHEMI-MOGHADDAM, H.; SABER-TEHRANI, M. Sensitive mercury speciation by reversed-phase column high-performance liquid chromatography with UV-visible detection after solid-phase extraction using 6-mercaptopurine and dithizone. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 6, p. 1453–1458, 2008.

HOSHINO, A. et al. Mercury exposure in a riverside Amazon population, Brazil: A study of the ototoxicity of methylmercury. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 19, n. 2, p. 135–140, 2015.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - Documento de caráter orientativo**, 2016. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos analíticos**, 2018.

KRAWCZYK, M.; STANISZ, E. Ultrasound-assisted dispersive micro solid-phase extraction with nano-TiO<sub>2</sub> as adsorbent for the determination of mercury species. **Talanta**, v. 161, p. 384–391, 2016.

LAFFONT, L. et al. Hg speciation and stable isotope signatures in human hair as a tracer for dietary and occupational exposure to mercury. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 23, p. 9910–9916, 2011.

LAFFONT, L. et al. Mercury speciation analysis in human hair by species-specific isotope-dilution using GC – ICP – MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 9, p. 3001–3010, 2013.

- LEE, J. D. Química inorgânica não tão concisa. **Editora Edgard Blucher**, 1999.
- LEHNHERR, I. Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Arctic aquatic ecosystems. **Environmental Reviews**, v. 22, n. 3, p. 229–243, 2014.
- LI, M. et al. Assessing sources of human methylmercury exposure using stable mercury isotopes. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 15, p. 8800–8806, 2014.
- LI, Y. F. et al. Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: Suitable or not? **Environmental Research**, v. 107, n. 1, p. 39–44, 2008.
- LIU, J. et al. Effective synthesis of highly fluorescent nitrogen doped carbon nanoparticles for selective sensing of Hg<sup>2+</sup> in food and cosmetics samples. **RSC Adv.**, v. 6, n. 92, p. 89916–89924, 2016.
- LUND, W. Speciation analysis: why and how? **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 337, n. 5, p. 557–564, 1990.
- MARINHO, J. S. et al. Mercury speciation in hair of children in three communities of the Amazon, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- MARTINI, P. R. **O declínio de um grande rio brasileiro detectado por imagens LANDSAT**. V Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. **Anais...**Natal RN: 1988
- MICHELAZZO, P. A. M. et al. Mercury emissions from forest burning in southern Amazon. **Geophysical Research Letters**, v. 37, n. 9, p. 1–5, 2010.
- MONTUORI, P. et al. Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 71–75, jan. 2004.
- MORAES PINTO, L. et al. Mapping the Evolution of Mercury (Hg) Research in the Amazon (1991–2017): A Scientometric Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 7, p. 1111, 28 mar. 2019.
- MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 543–566, nov. 1998.
- PANICHEV, N. A.; PANICHEVA, S. E. Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**,

v. 166, p. 432–441, 2015.

PFEIFFER, W. C.; DE LACERDA, L. D. Mercury inputs into the Amazon Region, Brazil. **Environmental Technology Letters**, v. 9, n. 4, p. 325–330, 1988.

POLES, A. P. DOS S. **Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente empacotado ( MEPS ) Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextraç.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. Elemental hair analysis: A review of procedures and applications. **Analytica chimica acta**, v. 992, p. 1–23, 1 nov. 2017.

PUGA, S. et al. Unveiling the neurotoxicity of methylmercury in fish (*Diplodus sargus*) through a regional morphometric analysis of brain and swimming behavior assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 320–333, 2016.

QUEIPO ABAD, S.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; GARCÍA ALONSO, J. I. Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 36, p. 16–21, 2016.

QUEVAUVILLER, P. et al. Certified reference material (CRM 397) for the quality control of trace element analysis of human hair. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 343, n. 4, p. 335–338, 1992.

REBELO, F. M. et al. Mercury in breast milk from women in the Federal District, Brazil and dietary risk assessment for breastfed infants. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, n. June, p. 99–103, 2017.

REINHART, D. et al. Airborne emissions of mercury from municipal solid waste. i: New measurements from six operating landfills in Florida. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 55, n. 7, p. 859–869, 2005.

REIS, A. T. et al. Thermo-desorption: A valid tool for mercury speciation in soils and sediments? **Geoderma**, v. 237, p. 98–104, 2015.

RUMAYOR, M. et al. Application of thermal desorption for the identification of mercury species in solids derived from coal utilization. **Chemosphere**, v. 119, p. 459–465, 2015.

RUMAYOR, M. et al. A comparison of devices using thermal desorption for mercury

- speciation in solids. **Talanta**, v. 150, p. 272–277, 2016.
- SALAZAR-CAMACHO, C. et al. Dietary human exposure to mercury in two artisanal small-scale gold mining communities of northwestern Colombia. **Environment International**, v. 107, n. June, p. 47–54, 2017.
- SHOLUPOV, S. et al. Zeeman atomic absorption spectrometer RA-915+ for direct determination of mercury in air and complex matrix samples. **Fuel Processing Technology**, v. 85, n. 6–7, p. 473–485, 2004.
- SILVA, S. L. **Contaminação por mercúrio em ribeirinhas e índias da Amazônia: Transferência mãe-filho**. [s.l.] Universidade de Brasília, 1994.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6th. ed. [s.l.] Thomsom Brooks/Cole, 2007.
- SUZUKI, T. et al. Normal organic and inorganic mercury levels in the human feto-placental system. **Journal of Applied Toxicology**, v. 4, n. 5, p. 249–252, 1984.
- SUZUKI, T. et al. An Acute Mercuric Mercury Poisoning: Chemical Speciation of Hair Mercury Shows a Peak of Inorganic Mercury Value. **Human & Experimental Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 53–57, 1992.
- SWAIN, E. B. et al. Increasing rates of atmospheric mercury deposition in midcontinental North America Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lampreys and hagfishes form a natural group. **Science**, v. 257, n. AUGUST, p. 784:788, 1992.
- UNEP DTIE CHEMICALS BRANCH; WHO. **Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure**. Geneva, Switzerland: [s.n.].
- WASSERMAN, J. C.; HACON, S.; WASSERMAN, M. A. Biogeochemistry of Mercury in the Amazonian Environment. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 32, n. 5, p. 336–342, ago. 2003.
- ZHANG, L.; WONG, M. H. Environmental mercury contamination in China: Sources and impacts. **Environment International**, v. 33, n. 1, p. 108–121, 2007.
- ZHANG, Z. et al. Simultaneous Quantification of Hg<sup>2+</sup> and MeHg<sup>+</sup> in Aqueous Media with a Single Fluorescent Probe by Multiplexing in the Time Domain. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11919–11924, 2 dez. 2014.