



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica
Laboratório de Química Ambiental - LQA
Programa de Pós-Graduação



Tese de Doutorado – Área de Química Analítica

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO MERCÚRIO POTENCIALMENTE TÓXICO EM ÁGUAS NATURAIS

Nívea Cristina de Carvalho Guedes
Orientador: Prof. Dr. Wilson F. Jardim

Campinas, 24 de março de 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

G934p Guedes, Nívea Cristina de Carvalho.
Protocolo de avaliação do mercúrio potencialmente
tóxico em águas naturais / Nívea Cristina de Carvalho
Guedes. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Wilson de Figueiredo Jardim.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. Mercúrio. 2. Ácido ascórbico. 3. Toxicidade
aguda. 4. Águas naturais. I. Jardim, Wilson de
Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Protocol of assessment for species toxicity mercury in natural water

Palavras-chaves em inglês: Mercury, Ascorbic acid, Acute toxicity, Natural water

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim (orientador), Prof. Dr. Julio César Rocha (IQ-UNESP-Araraquara), Prof. Dr. Antônio Carneiro Barbosa (IQ-UnB), Profa. Dra. Anne Hélène Fostier (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 24/03/2009

***“Se soubesse que o mundo acabaria
amanhã, ainda hoje plantaria uma
árvore.”***

***Martin Luther King
(1929-1968)***

DEDICATÓRIA

“Ao amor incondicional de Deus, dos meus pais, Luis e Afra, e dos meus irmãos, dedico.”

Agora sei o que é viver o presente precioso independente do tempo e espaço.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela perfeita expressão de vida, agradeço por mais uma etapa de muito aprendizado e ensinamentos.
- Ao professor Wilson Jardim, primeiramente pela oportunidade. Não esqueci as palavras de incentivo em nossa primeira conversa ainda em Manaus. Agradeço a orientação dada neste trabalho, sempre com muita competência, confiança, paciência, amizade e apoio em todos os momentos.
- Aos amigos do LQA e do GIA: Alexandre, Aluisio, Amanda, Anderson, Caroline, Cris, Claudete, Cláudia, Emanuel, Emerson, Fabiano, Flávia, Fernando, Glauciene, Gislaine, Heron, Juliana, Juliano, Karime, Kássio, Kléssia, Leonardo, Lucas, Marco, Silvia, Lívia, Igor, Carol e aos professores Ivo, Jarbas e Celio. Agradeço os momentos agradáveis dentro e fora do laboratório, sempre que precisei todos estiveram prontos a ajudar. Agradecimento especial à Débora, Cassiana e Matheus pela amizade e apoio em vários momentos (coleta, análises, idéias, conversas e etc...), e, à Márcia por me passar suas valiosas experiências com “Hg”.
- Ao pessoal do Laboratório de POA da FEC-UNICAMP: prof. Dr. José R. Guimarães e aos técnicos Marco, Enelton e Lígia. Agradeço pelo apoio na incubação das bactérias. Agradecimento especial à Graciete pelo trabalho com o FIA – turbidimétrico e por toda a ajuda. A todos agradeço pela confiança e amizade.
- Ao Dr. Ézio Sargentini por disponibilizar o laboratório de Química Ambiental da CPPN (INPA) durante a campanha realizada em Manaus e o auxílio durante as coletas. À MSc Maria do Socorro Silva do Laboratório de Águas (INPA) pelas coletas nos igarapés ao longo da AM 010.
- Ao Gilberto Almeida e Ádria do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia (CESET/LIMEIRA), pela colaboração nos ensaios com a *Daphnia similis*.

-
- Aos funcionários do Instituto de Química, sempre dispostos a contribuir, especialmente à Bel da CPG, Fontana e Mário (mecânica fina), pela competência que realizam seus trabalhos, facilitando nossas vidas.
 - Aos professores Dr. Nelson Durán e Dr^a Ljubica pela utilização do laboratório de microbiologia e o autoclave (IQ-UNICAMP).
 - Aos professores Dr. Pedro Fadini, Dr^a Anne Hélène e Dr^a Solange Cadore pelas contribuições no exame de qualificação de Área.
 - Ao grupo do PROCAD-UNICAMP/UFPR/UFRR, principalmente aos professores Solange Cadore e Wilson Jardim pelas oportunidades concedidas neste projeto. A minha amizade e respeito se estendem aos demais pesquisadores cujos trabalhos renderam valiosas publicações.
 - À minha família que sempre me apoiou com amor, respeito e muita alegria.
 - Aos meus super amigos de longe e de perto: Sumaia, Elba, Ivoneide, Fabinho, Eberval, Josiane, Marta e minha outra família da área 35, agradeço por usarem seus “poderes sobrenaturais” em meu favor, não preciso nem dizer o porquê.
 - Aos amigos mais recentes Rodrigo, Ana Laura e a todos da igreja AD-Barão pelas conversas de incentivo e carinho.
 - À FAPEAM pelo auxílio financeiro.
 - Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

Meu muito obrigado!

CURRICULUM VITAE

Nívea Cristina de Carvalho Guedes

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Doutorado em ciências. Área de Química Analítica: Ambiental. Instituto de Química, UNICAMP. Título: “Protocolo de avaliação do mercúrio potencialmente tóxico em águas naturais”, 2009, sob a orientação do prof. Dr. Wilson F. Jardim.
- Mestrado em Química. Área de concentração em Química Analítica Ambiental. Universidade Federal do Amazonas. Título: “Poluição aquática na microbacia do Igarapé do Quarenta, Manaus-AM”, 2003, sob a orientação do prof. Dr. Genilson Pereira Santana.
- Bacharel em Química. Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 1999.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS E ACADÊMICAS

- Projeto de Doutorado. Instituto de Química – UNICAMP
Bolsista: RH-POSGRAD da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM no período de junho/2006-março/2009.
- Projeto de Cooperação Acadêmica – PROCAD/UFRR/UNICAMP/UFPR. Agência CAPES [2006-2008].
- Programa de Estágio Docente – PED C, Instituto de Química da UNICAMP, no período de março a julho de 2006.
- Professor contrato temporário. Universidade Estadual do Amazonas. Campus Tefé (Amazonas). Período: ago/2003 - set/2004.
- Professor substituto. Universidade Federal do Amazonas. Período: set/2001-jun/2003.
- Projeto de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas.
Bolsista: CAPES no período de 2000-2002.
- Projeto de Iniciação Científica. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Bolsista CNPq (dez/1996-jul/1998).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Total de 17 participações, sendo 2 internacionais, entre as quais destacam-se:

- I Encontro Brasileiro sobre Especificação Química. “*Determinação do Hg potencialmente tóxico em águas naturais, usando ácido ascórbico como redutor, por CVAAS*”, apresentação em pôster, São Pedro-SP, 14 a 17 de dezembro de 2008.

-
- SIBJ em Economia, Ciência e Inovação Tecnológica. “*Domestic and industrial waste influence on water, bottom sediment, Lemna Aequinoctialis and Hoplosternum Littorale quality Igarapé do Quarenta stream (Manaus – Brazil)*”, apresentação em pôster. São Paulo, período de 14 a 16 de junho de 2008.
 - IV Encontro Nacional de Química Ambiental. “*Avaliação e identificação da toxicidade de sedimentos utilizando E. coli como organismo teste*”, apresentação oral. Aracajú – SE, período de 11-14 de março de 2008.
 - VIII congresso SETAC Latina América. “*Avaliação da qualidade de sedimentos de rios da região metropolitana de Curitiba-Brasil*”, apresentação oral. Montevideo – Uruguai, período de 8 a 11 de outubro de 2007.
 - IV Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados (IV EPOA). “*Atividade bactericida de óxido de cobre (II) com alta área superficial usando radiação visível*”, apresentação pôster. Cubatão - SP, período de 29 a 31 de outubro de 2007
 - 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. “*Uso do ácido ascórbico para a determinação de Hg: uma proposta para avaliação da toxicidade do Hg em água*”, apresentação pôster. Águas de Lindóia – SP, período de 31 de maio a 03 de junho de 2007.

CURSOS EXTRACURRICULARES

- I Escola de Química Ambiental, Instituto de Química-UNICAMP, carga horária 30h. Período, de 26 a 30 de junho de 2004.
- “Curso Básico sobre Gestão e Estatística Aplicada aos Laboratórios de Qualidade de Água”, coordenador: Ricardo Crubellati, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro com carga horária de 24 horas no período de 23-25/11/2005.

PUBLICAÇÕES

- M. Paschoalino, N.C.C. Guedes, W. Jardim, E. Mielczarski, J.A. Mielczarski, P. Bowen e J. Kiwi. Inactivation of *E. coli* mediated by high surface area CuO accelerated by light irradiation > 360 nm. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199 (1), sep. 2008, p. 105-111.
- N.C.C. Guedes, G.P. Santana, M. C. Pio, T. C. S. Oliveira e E. Amaro. “*Domestic and industrial waste influence on water, bottom sediment, Lemna Aequinoctialis and Hoplosternum Littorale quality Igarapé do Quarenta stream (Manaus – Brazil)*”. Resumo expandido publicado nos anais do SIBJ em Economia, Ciência e Inovação Tecnológica, v. único, 24-27. São Paulo, 2008.

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO MERCÚRIO POTENCIALMENTE TÓXICO EM ÁGUAS NATURAIS

Um protocolo para avaliar o mercúrio potencialmente tóxico em águas naturais foi proposto de acordo com as seguintes etapas: (i) investigação de um redutor seletivo para espécies de mercúrio potencialmente tóxicas presentes em sistemas aquáticos; (ii) otimização do método; (iii) calibração experimental do método realizada com soluções contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg e diferentes ligantes em diferentes razões metal:ligante, utilizando-se ácido húmico (AH), cisteína (Cys), histidina (Hys) e ácido nitrilotriacético (NTA); (iv) aplicação do método em amostras de águas naturais, provenientes de sistemas aquáticos distintos (naturais e impactados), enriquecidas com diferentes concentrações de Hg ($5, 10, 25$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$), baseado na titulação das amostras de águas com concentrações conhecidas de Hg, seguida da determinação do metal pela técnica proposta; (v) para inferir o potencial tóxico do Hg determinado a partir do método proposto, a relação entre os resultados analíticos e respostas dos testes de toxicidade aguda com a bactéria *Escherichia coli* e o microcrustáceo *Daphnia similis* foram avaliados. Foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica do vapor frio acoplado a um sistema FIA com amostragem discreta (o reagente é adicionado na amostra e não em fluxo). Os resultados mostraram que a utilização do ácido ascórbico (AA) como redutor do Hg (Hg_{AA}), em proporções definidas em relação à quantidade da amostra, em $\text{pH } 6,4 \pm 0,1$ (tampão fosfato), com detecção após 60 ± 10 min, apresentou $\text{LQ} = 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, desvio padrão relativo ($n= 6$) em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg de 4%, para uma faixa de trabalho de $0,5 - 60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e fator de linearidade da curva de 97,3%. Os valores de Hg_{AA} determinados nas soluções com os ligantes foram diretamente influenciados pela natureza e pela proporção molar dos complexos formados, sendo $\text{Cys} > \text{Hys} > \text{AH} > \text{NTA}$. Nas amostras de águas naturais o Hg_{AA} apresentou relação direta com o material particulado e carbono orgânico total e inorgânico. Uma significativa correlação foi determinada entre os resultados analíticos e a resposta bacteriana (ANOVA, teste $F_{95\%}$), sendo, $r^2 = 0,97$ para as soluções com os ligantes e $r^2 = 0,94$ para as amostras naturais. A correlação com os resultados da *D. similis* nas amostras naturais em relação ao Hg_{AA} obtido, foi $r^2 = 0,65$, essa correlação não foi significativa pelo teste $F_{95\%}$, mas pode ser considerada expressiva visto o diferente mecanismo de interação deste organismo aquático e o Hg. Considerando que o método apresentou sensibilidade na faixa de trabalho, repetibilidade analítica e significativa correlação com os resultados biológicos, essa nova proposta de determinação de Hg pode ser útil para gerar informações relacionadas com a toxicidade aguda do Hg em águas naturais.

ABSTRACT

PROTOCOL FOR THE ASSESSMENT OF POTENTIALLY TOXIC MERCURY IN NATURAL WATERS

A protocol for the assessment of potentially toxic mercury in natural waters has been developed in accordance to the following stages: (i) research for a selective reductant of potentially toxic mercury species present in natural water samples; (ii) method optimization; (iii) experimental calibration carried out with solutions containing $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg and different organic ligands at different ratios metal:ligand, including humic acid (HA), cysteine (Cys), histidine (Hys) and nitrilotriacetic acid (NTA); (iv) method application in samples from distinct aquatic ecosystems (natural and impacted) were carried out using different concentrations of Hg (5, 10, 25 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$) based on titration of water samples with known Hg concentrations and followed by the metal determination using the purposed method; (v) to infer the Hg toxic potential determined with the proposed method, the relationship between analytical results and acute toxicity test with the bacterium *Escherichia coli* and the microcrustacean *Daphnia similis* was evaluated. A cold vapor atomic absorption spectrophotometer coupled to flow injection (FIA) system with stop-flow sampling was used. The results showed that the use of ascorbic acid (AA) as a reductant (Hg_{AA}), in specific ratios sample:reductant, at $\text{pH } 6.4 \pm 0.1$ (phosphates buffer), with detection after 60 ± 10 min, presented a limit of quantification (LOQ) of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, with a relative standard deviation ($n=6$) at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg of 4%, linear range of $0.5 - 60.0 \mu\text{g L}^{-1}$ and linearity factor of 97.3%. The values of Hg_{AA} determined in the presence of ligands were directly dependent with the ligand nature and concentration, being $\text{Cys} > \text{Hys} > \text{HA} > \text{NTA}$. In natural water samples, Hg_{AA} was directly related to particulate matter, total organic and inorganic carbon. A significant correlation (ANOVA, $F_{95\%}$ test) was observed between analytical results and bacteria response, being $r^2 = 0.97$ for the synthetic solutions with ligands and $r^2 = 0.94$ for natural samples. The correlation with *Daphnia* results and Hg_{AA} in natural samples was $r^2 = 0.65$, not significance at $F_{95\%}$, but it can be expressive, once accepted the different mechanisms of interaction of this aquatic organism. Considering that the method has adequate sensitivity, analytical repeatability and significant correlation with biological results, this new protocol for the determination of Hg can be useful in generating information concerning the Hg acute toxicity in natural water.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações.....	xxv
CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO E OBJETIVO	1
1.0. Apresentação.....	3
1.1. Relevância do trabalho	3
1.2. Objetivos.....	5
CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO.....	7
2.0. Aspectos gerais	9
2.1. Química aquática do mercúrio	12
2.2. Ecotoxicidade em ambientes aquáticos.....	19
2.2.1. Teste de toxicidade com microorganismos	24
2.2.2. Teste de toxicidade com microcrustáceo	27
2.3. Ecotoxicidade do mercúrio.....	29
2.4. Especiação do mercúrio e sua toxicidade.....	31
2.5. Ácido ascórbico como redutor de metais.....	35
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL.....	41
3.0. Materiais e método	43
3.1. Materiais e reagentes	43
3.2. Parâmetros físico-químicos	45
3.3. Determinação do Hg _{reativo}	46
3.4. Desenvolvimento experimental do método proposto.....	47
3.4.1. Otimização do método para a determinação do Hg usando AA como redutor (Hg _{AA}).....	47
3.4.2. Influência da concentração e da natureza do ligante na determinação do Hg _{AA}	48
3.4.3. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade com a bactéria <i>Escherichia coli</i> (amostras com diferentes ligantes).....	50

3.4.4. Aplicação do método proposto em amostras de águas naturais (lagos, igarapés e rios).....	53
3.4.5. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade turbidimétrico com a bactéria <i>Escherichia coli</i> (amostras naturais).....	55
3.4.6. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade com o microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> (amostras naturais)	58
3.5. Programa de proficiência do LQA para análise de mercúrio	59
3.6. Tratamento de resíduo gerado neste trabalho.....	60
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Otimização da técnica para determinação do Hg _{AA}	63
4.2. Influência da concentração e da natureza do ligante na determinação do Hg _{AA} .	74
4.3. Teste de toxicidade usando a bactéria <i>Escherichia coli</i>	77
4.3.1. Testes de toxicidade respirométrico nas amostras com ligantes	77
4.3.2. Testes de toxicidade por turbidimetria e sua aplicação em amostras naturais.....	89
4.4. Aplicação do método do AA em amostras de água de lagos, igarapés e rios	98
4.5. Teste de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> : aplicação em amostras naturais	105
4.6. Correlação dos valores de Hg _{AA} com os resultados dos testes de toxicidade...	110
4.7. Proficiência do LQA para análise de Hg _{total} em material biológico e em água por CVAAS.....	115
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	117
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CAPÍTULO 7: APÊNDICES	139
Apêndice I	141
Apêndice II	142
Apêndice III	144

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1:** Esquema simplificado do ciclo do mercúrio no ambiente (Adaptado de USGS, 2008). 11
- Figura 2.2:** Diagrama de especiação para o sistema Hg^{2+} - H^+ - Cl^- - CO_2 - HPO_4^{2-} - SO_4^{2-} , simulando a composição de água natural. As concentrações usadas foram: $[\text{Cl}^-]_t = 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HPO}_4^{2-}]_t = 0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{SO}_4^{2-}]_t = 0,42 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{Hg}^{2+}]$ ajustada para $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Assumindo que o sistema estava em equilíbrio com o ar tendo uma fugacidade de CO_2 de $370 \text{ } \mu\text{bar}$ (Fonte: Powell *et al.*, 2005). 14
- Figura 2.3:** Diagrama de *Eh*-pH das espécies aquosas de mercúrio, $[\text{Hg}_{\text{total}}] = 25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ à 25°C e 1 atm , para o sistema $\text{Hg} - \text{S} - \text{O} - \text{H} - \text{Cl}$ em concentrações normalmente encontradas em águas naturais (Fonte: Stein *et al.*, 1996). 16
- Figura 2.4:** Relação dose/resposta para uma substância hipotética em uma população homogênea (efeito medido: letalidade), LD (dose letal). 22
- Figura 2.5:** Curva de crescimento bacteriano com suas respectivas fases. (A) fase lag, estágio de latência, não ocorre divisão celular; (B) fase log, crescimento exponencial, divisão celular; (C) fase estacionária, decréscimo na divisão celular; e (D) fase de declínio, morte celular (Tortora *et al.*, 2002). 27
- Figura 2.6:** Ácido *L*-ascórbico. 35
- Figura 2.7:** Forma bicíclica hidratada do ácido dehidroascórbico (A_{bc}). 36
- Figura 3.1:** Sistema FIA condutimétrico utilizado para determinar a concentração de CO_2 na suspensão bacteriana nos testes de toxicidade respirométrico com *E. coli*. O CO_2 contido na amostra difunde através de uma membrana de Teflon[®], na cela de difusão, para o fluxo receptor formando um gradiente de condutividade. 51
- Figura 3.2:** Sistema utilizado nos teste de toxicidade com *E. coli*, usando: (A) FIA – turbidimétrico, (B) amostras e (C) espectrofotômetro com a cela de fluxo acoplado em destaque. 57
- Figura 4.1:** Variação do sinal analítico em função do tempo de reação na determinação do mercúrio, utilizando: (A) AA como redutor, com $[\text{AA}] = 0,28 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Hg}] = 15,0$ e $20,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; pH 2,2 – 2,8; e, um sistema FIA com amostragem discreta, ar como fluido carregador e alça de amostragem de $0,5 \text{ mL}$; (B) SnCl_2 10% em HCl 10% como solução redutora, usando as condições de medidas para determinação de $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ (etapa I) e as condições de determinação do Hg_{AA} descritas acima (etapa II). A detecção foi feita por CVAAS. A seta vertical entre a etapa I e II indica que as medidas foram feitas em diferentes condições. 64
-

Figura 4.2: (A) Variação da resposta analítica em função do tempo para diferentes volumes de injeção da amostra, com $[Hg^{2+}] = 5,0 \mu g L^{-1}$ e a sensibilidade do registrador em 5 mV; (B) Teste usando água e ar como fluido carregador em 60 min e sensibilidade do registrador em 20 mV. Os dois parâmetros foram ajustados em meio ácido, amostragem discreta, usando um sistema FIA de linha única, $[AA] = 0,14 mol L^{-1}$. As medidas foram feitas em duplicatas.	66
Figura 4.3: (A) Curva analítica obtida para um faixa de $0,5 a 10,0 \mu g L^{-1}$ de Hg, $pH = 2,5 - 2,8$, $[AA] = 2,3 \times 10^{-3} mol L^{-1}$, em 60 min de reação; (B) determinação de Hg_{AA} em concentrações $> 10,0 \mu g L^{-1}$ de Hg, usou-se 10 vezes a concentração de AA, $pH = 2,0 - 2,5$.	68
Figura 4.4: Determinação de Hg_{AA} em função do tempo, em concentrações $> 10,0 \mu g L^{-1}$ de Hg, sendo $[AA] = 0,067 mol L^{-1}$, em $pH = 1,8 - 2,5$.	69
Figura 4.5: Resposta analítica em função de diferentes concentrações de Hg e diferentes condições: $pH 2,0 \pm 0,3$ (HCl), $pH 6,4 \pm 0,2$ (tampão fosfato) e $pH 9,0-9,6$ (NaOH); diferentes tempos de leitura (60 e 90 min) feita em duplicata; $[AA] = 0,067 mol L^{-1}$ em todas as condições.	70
Figura 4.6: Curva analítica representativa para a determinação de Hg_{AA} após a otimização do sistema FIA e dos parâmetros como pH, tempo de reação e $[AA]$.	73
Figura 4.7: Sistema FIA otimizado para determinação de Hg usando ácido ascórbico como redutor. Após a formação de Hg^0 , este é arrastado pelo N_2 para cela de detecção do CVAAS. (1) coluna de areia de ouro, (D) descarte, (INJ) injetor/comutador, (V) vácuo, (A) amostra, (AA) solução redutora, (DET) detector, (REG) registrador e (B) bomba peristáltica.	74
Figura 4.8: Estudo da influência do AH, NTA e Cys no sinal analítico na determinação do $Hg_{reativo}$ e do Hg_{AA} . (A) Apresenta a redução do Hg por AA e (B) por $SnCl_2$. A linha --- indica $[Hg_{total}] = 30,0 \mu g L^{-1}$ adicionado em cada solução. Os valores da razão metal:ligante para AH expressa suas concentrações em $\mu g L^{-1}$ e, para os demais ligantes na razão $mol L^{-1}$. O NTA e a Cys foram estudados apenas nas razões 1:1 e 1:50.	76
Figura 4.9: Teste de toxicidade respirométrico com bactéria <i>E. coli</i> na presença da substância de referência (tetraciclina). Esse teste foi utilizado para verificar a sensibilidade da bactéria em $140 \pm 10 min$.	79
Figura 4.10: Definição da concentração de tetraciclina efetivamente tóxica para 50% da população bacteriana (<i>E. coli</i>) a partir dos dados da curva dose / resposta entre o efeito tóxico (%IRB) versus concentração do biocida (tetraciclina). Em detalhe a equação da reta para o cálculo da EC_{50} no teste de toxicidade respirométrico.	80
Figura 4.11: Curva de EC_{50} para Hg em ensaio respirométrico com <i>E.coli</i> realizado em 140 min.	81

Figura 4.12: Porcentagem de inibição média da respiração microbiana (%IRB) da <i>E. coli</i> em relação às diferentes razões Hg:ligante, testes feitos em duplicatas. Os ligantes cisteína (Cys), histidina (Hys) e NTA estão em proporções molares em relação ao Hg adicionado; os valores de ácido húmico (AH) representa sua concentração em mg L ⁻¹ . Não foram realizados testes com 1 mg L ⁻¹ de AH e na razão molar 1:10 com Hys, Cys, e NTA em relação ao Hg adicionado.	83
Figura 4.13: Influência da suspensão bacteriana (meio de cultura incubado) na determinação de Hg _{AA} nas condições dos testes de toxicidade com bactéria <i>E. coli</i> . O Hg _{AA} foi determinado nas condições otimizadas. LQ = limite de quantificação.	85
Figura 4.14: Concentração de Hg _{AA} no teste de toxicidade com <i>E. coli</i> em diferentes concentrações de Cys e uma concentração fixa de Hg (50 µg L ⁻¹), determinada nas condições otimizadas para Hg _{AA} , porém, sem o tampão fosfato; pH do meio do MCI + Hg + Ligante variou entre 6,9-7,1; [bacteriana] = 7 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ .	86
Figura 4.15: Concentrações de (A) Hg _{AA} e (B) Hg _{reativo} em meio de cultura estéril, avaliando o comportamento dos complexos formados em uma concentração fixa de Hg frente a diferentes ligantes (Hys, NTA, AH e Cys) em diferentes razões metal:L, com [Hg _{total}] = 50,0 µg L ⁻¹ . As medidas de Hg _{AA} foram feitas nas condições otimizadas neste trabalho. Cys, Hys e NTA estão em razões molares em relação ao Hg adicionado, para o AH representa sua concentração em mg L ⁻¹ .	88
Figura 4.16: Teste de toxicidade aguda com <i>E. coli</i> , por medidas turbidimétricas, em amostras de águas das campanhas 2 e 3 (AM-Amazônia e CP-Campinas). Medidas discretas em 550 nm e pH = 6,8 ± 0,2. As absorbâncias dos brancos não sofreram alterações durante o ensaio; C1 = controle com meio de cultura mínimo; Hg = adição de 50,0 µg L ⁻¹ de Hg; inc = amostra incubada com a bactéria e B = branco da amostra.	94
Figura 4.17: Teste de toxicidade aguda com <i>E. coli</i> , por turbidimetria, em amostras de águas da campanha 4 (CP-Campinas). Medidas no FIA-turbidimétrico, em 550 nm e pH = 6,8 ± 0,2. As absorbâncias dos brancos não sofreram alterações durante o ensaio; C1 = controle com meio de cultura mínimo; Hg = adição de 50,0 µg L ⁻¹ de Hg; inc = amostra incubada com a bactéria e B = branco da amostra.	95
Figura 4.18: Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano (%ICB) nos ensaios de toxicidade aguda com <i>E. coli</i> , por turbidimetria, em 6h de teste. (A) Amostras de águas coletadas nas campanhas 2 e 3, por medidas discretas; e (B) em amostras de águas da campanha 4, medidas feitas no FIA-turbidimétrico; λ = 550 nm; Controle = amostra <i>in natura</i> incubada; o pH das amostras entre 6,8 ± 0,2; Hg = 50,0 µg L ⁻¹ de Hg e inc = amostra incubada com a bactéria.	97
Figura 4.19: Valores de Hg _{AA} e Hg _{reativo} determinados nas águas das campanhas amostrais 2 e 3. As amostras foram enriquecidas com 50,0 µg L ⁻¹ de Hg, analisadas após 1h de interação Hg x amostra. Nas amostras da Amazônia, as barras verticais representam o desvio padrão nas medidas realizadas no LQA e no INPA, nas demais amostras está relacionada ao desvio padrão das medidas em triplicata.	100

Figura 4.20: Relação dos valores de Hg_{AA} com alguns parâmetros físicos e químicos determinados nas amostras enriquecidas com $50 \mu g L^{-1}$ de Hg. (a) Material particulado; (b) condutividade elétrica e; (c) carbono orgânico e inorgânico.	105
Figura 4.21: Curva de correlação linear da concentração do Hg adicionado na água de diluição em relação à % de imobilização para <i>Daphnia similis</i> (n=3). Teste agudo em 48h. Nos padrões de Hg não foi usado cromato como preservante.	106
Figura 4.22: Correlação da porcentagem de inibição da respiração bacteriana (%IRB) em relação aos resultados analíticos de Hg redutível por (A) AA e (B) por $SnCl_2$ nos testes de toxicidade realizados com os ligantes (Cys, AH, Hys e NTA) em diferentes razões Hg:Ligante, apresentados neste trabalho, sendo o $Hg_{total} = 50 \mu g L^{-1}$.	112
Figura 4.23: Porcentagem de recuperação do Hg adicionado nas amostras de águas naturais redutível por AA (Hg_{AA}) e por $SnCl_2$ ($Hg_{reativo}$) frente aos valores de (A) % de inibição do crescimento bacteriano (ICB) dos testes de toxicidade com <i>E. coli</i> por turbidimetria com $50,0 \mu g L^{-1}$ de Hg em amostras não filtradas (NF); (B) % de imobilidade para as <i>Daphnia</i> com $25,0 \mu g L^{-1}$ e Hg, nas mesmas amostras, sendo (F) amostras filtradas.	114
Figura 7.1: Curva analítica representativa para a determinação de CO_2 nos testes de toxicidade respirométrico com a bactéria <i>Escherichia coli</i> , usou-se curva polinomial para o cálculo da concentração de CO_2 nas amostras dos testes de toxicidade.	141
Figura 7.2: Leituras de absorvâncias dos padrões da escala de McFarland nos comprimentos de onda (A) 420, (B) 600 nm, (C) 550 nm e (D) correlação entre a leitura teórica e experimental para o comprimento de onda de 550 nm. Trabalho feito com o grupo de POA da FEC/UNICAMP.	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Classificação geral para testes de toxicidade.	20
Tabela 3.1: Constantes de estabilidade para os ligantes, cisteína, histidina, NTA e ácido húmico (Sillén & Martell, 1964; Stary & Kratzer, 1988; Ravichandran, 2004).	48
Tabela 3.2: Condições analíticas para avaliação da seletividade do ácido ascórbico na redução do Hg frente aos ligantes (L) NTA, Cys, AH e Hys. A = pH ácido < 3,0 e N ~ pH neutro (tampão fosfato do meio de cultura, pH= 6,8 ± 0,2).	49
Tabela 3.3: Descrição das campanhas de amostragem.	54
Tabela 3.4: Intervalo de pH recomendado para precipitação dos cátions de Hg e Sn.	60
Tabela 4.1: Análise estatística da variação do pH na determinação de Hg _{AA} (teste de Tukey no nível de 99% confiança).	71
Tabela 4.2: Concentração da suspensão bacteriana em unidade formadora de colônias (UFC) por mL de solução e valores de absorvância dos padrões de sulfato de bário na escala de McFarland em 550 nm (Murray <i>et al.</i> , 1995).	91
Tabela 4.3: Absorvância dos padrões da escala de McFarland de 0,5 a 5,0 em 550 nm (dados deste trabalho) relacionados com os resultados de Murray <i>et al.</i> (1995). Resultados do teste de toxicidade relacionando o tempo, abs e UFC mL ⁻¹ em 2h de ensaio.	92
Tabela 4.4: Valores de Hg _{AA} , Hg _{reativo} , pH, E _H , carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI) determinados em águas naturais filtradas (F) e não filtradas (NF); (AH) são amostras enriquecidas com 5,0 mg L ⁻¹ de ácido húmico.	98
Tabela 4.5: Medidas de pH, material em suspensão (MS), condutividade elétrica, carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI), E _H e oxigênio dissolvido, determinadas nas amostras de águas <i>in natura</i> , coletadas nas 2 ^a e 3 ^a campanhas.	101
Tabela 4.6: Valores de Hg _{AA} e Hg _{reativo} determinados em amostras de águas coletas na 4 ^a campanha. As amostras foram enriquecidas com diferentes concentrações de Hg, analisadas após 1h de interação Hg x amostra. (F) filtrada e (NF) não filtrada.	103
Tabela 4.7: Medidas de pH, material em suspensão (MS), condutividade elétrica, E _H , carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI), determinadas nas amostras de água <i>in natura</i> , coletadas na 4 ^a campanha.	104
Tabela 4.8: Porcentagem de imobilidade da <i>Daphnia similis</i> nos testes de toxicidade aguda em soluções contendo ácido húmico (AH) e cisteína (Cys), contaminadas com 50 µg L ⁻¹ de Hg ²⁺ . (L) ligante.	108

Tabela 4.9: Porcentagem de imobilidade da <i>Daphnia similis</i> nos testes de toxicidade aguda em águas naturais filtradas (F) e não filtradas (NF). As amostras foram enriquecidas com 25,0 µg L ⁻¹ de Hg.	109
Tabela 7.1: Resultados do exercício de calibração interlaboratorial para o Hg _{total} realizado pela Canadian Food Inspection Agency em amostras de peixes, alguns resultados respresentativos por ano.	144
Tabela 7.2: Resultados do exercício de calibração interlaboratorial para o Hg _{total} realizado pelo SENAI-CETIND (PEP) em conjunto com o Programa Brasileiro de Metrologia em Química, em amostras de água.	144

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AA	Solução de Ácido Ascórbico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AH	Ácido Húmico
AM	Amostras coletadas na Amazônia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β_n	Constante de formação progressiva
C_m	Fator de linearidade da curva analítica
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CI	Carbono Inorgânico
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
COT	Carbono Orgânico Total
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Amostras coletadas na região metropolitana de Campinas
CVAAS	Espectrofotômetro de Absorção Atômica do Vapor Frio
Cys	Solução de cisteína
E_H	Potencial de redução em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio (mV)
EC ₅₀	Concentração efetivamente tóxica para 50% da população teste
<i>E. coli</i>	Bactéria <i>Escherichia coli</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
FAPEAM	Agência de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FAPESP	Agência de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
Hg _{AA}	Mercúrio redutível por Ácido Ascórbico
Hg _{reativo}	Mercúrio reativo
Hg _{total}	Mercúrio total
Hys	Solução de histidina
ICB	Inibição do crescimento bacteriano

INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IRB	Inibição da respiração bacteriana
LD ₅₀	Dose letal para 50% da população teste
LQ	Limite de Quantificação
LQA	Laboratório de Química Ambiental
MCE	Meio de cultura estéril
MCI	Meio de cultura incubado
MCM	Meio de cultura mínimo
MDG	Mercúrio dissolvido gasoso
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MS	Material em suspensão
SH	Substâncias Húmicas
SHA	Substâncias Húmicas Aquáticas
TD	Tempo de duplicação bacteriano

APRESENTAÇÃO
E
OBJETIVO

1.0. APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está estruturado em oito capítulos. O primeiro capítulo apresenta a relevância e objetivos do trabalho. O segundo capítulo aborda uma revisão bibliográfica que abrange os princípios que orientaram o desenvolvimento da pesquisa. O terceiro capítulo descreve os experimentos realizados para que fosse possível estabelecer a técnica analítica proposta. O quarto capítulo apresenta os resultados obtidos em todas as etapas e suas respectivas discussões. No quinto capítulo está a conclusão geral do trabalho e perspectivas futuras concernentes à aplicabilidade da técnica proposta. Os sexto e sétimo capítulos trazem a bibliografia utilizada e o apêndice, respectivamente.

1.1. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O aumento da industrialização nos últimos 50 anos, aliado à demanda de novos produtos pela crescente população, tanto em nações desenvolvidas quanto naquelas em desenvolvimento, desencadearam vários problemas de ordem ecológica em escala mundial, causados pela introdução de contaminantes no ambiente (Bitton & Dutka, 1986a). Tal fato marca, a partir da década de 60, o surgimento do termo ecotoxicologia nos estudos toxicológicos até então estritamente relacionados com a saúde humana. Para a ecotoxicologia ou toxicologia ambiental, os constituintes existentes nos diversos ecossistemas possuem papel essencialmente nutricional ou potencialmente tóxico, sendo este último dependente do tipo de poluente e de sua concentração, assim como as características do meio afetado, incluindo fauna e flora (Bitton & Dutka, 1986b; Manahan, 2002).

Especificamente, os ecossistemas aquáticos estão sob permanente pressão de poluentes provenientes de fontes pontuais ou não, contínuas ou descontínuas, os quais influenciam de forma diferenciada o corpo aquático receptor, seja marinho ou águas continentais (superficiais e subterrâneas) (WHO, 1997; Smith, 2002; Diamond *et al.*, 2006). Como resposta a esse processo, vários ensaios biológicos e novas técnicas analíticas foram desenvolvidos com o intuito de avaliar, de forma adequada, o real

impacto desses contaminantes na biota dos ecossistemas atingidos. Neste aspecto, as substâncias de interesse para estudos ecotoxicológicos incluem tanto os produtos químicos sintéticos quanto aqueles existentes naturalmente no ambiente, entre os quais se destacam: herbicidas, inseticidas, fertilizantes, compostos orgânicos voláteis, metais, entre outros (WHO, 1997; Manahan, 2002; Diamond *et al.*, 2006). Dentre os metais, o Hg é tido como um dos mais tóxicos encontrados no ambiente se considerarmos sua comprovada toxicidade para os seres vivos (ATSDR, 1999).

No que se refere à contaminação por Hg em ambientes aquáticos destacam-se as atividades industriais e mineração, despejos domésticos, e muitas vezes, sua própria abundância natural em determinados ecossistemas, que uma vez alterado, pode vir a influenciar seu ciclo local (Lindqvist, 1994; Wang *et al.*, 2004). Além disso, o risco de contaminação por este metal ocorre em baixas concentrações, exigindo um maior rigor em suas concentrações toleráveis para preservação da vida aquática e consumo humano (A Lei Federal 57 FR 60910 dos EUA, por exemplo, orienta valores de 0,002 e 0,00001 mg L⁻¹ de Hg total, respectivamente para preservação da vida aquática e consumo humano) (CFR, 2009). A Resolução CONAMA 357 de 2005, dispõe sobre os padrões de qualidade das águas Classe I (destinada à proteção da comunidade aquática, entre outros fins) o valor de 0,0002 mg L⁻¹ de Hg_{total}. Para atender tais critérios, exige-se a determinação da concentração total de mercúrio (Hg_{total}), embora se entenda que a concentração de Hg_{total} é um parâmetro que tem pouca relação com seus efeitos tóxicos, pois suas várias espécies químicas comportam-se diferentemente no ambiente.

Normalmente, para estimar a toxicidade do mercúrio em ambientes naturais ou impactados por atividades antrópicas, tem-se proposto à utilização de testes de efeitos ecológicos em organismos que representam os vários níveis tróficos da cadeia alimentar aquática (bactérias, algas, zooplânctons, invertebrados bentônicos e peixes), os quais, por sua vez, apresentam uma série de problemas operacionais relacionados aos diferentes microorganismos e ao longo tempo de resposta (Bitton & Dutka, 1986a; Boening, 2000), além da não especificidade (Bitton *et al.*, 1992; Gooding *et al.*, 2003).

Com isso, o interesse em determinar espécies de Hg, para estimar o seu real impacto no ambiente e a alta toxicidade aliada ao baixo nível de concentração, bem como sua natureza volátil e sua associação com outros compostos, torna-se relevante o avanço no desenvolvimento de técnicas sensíveis, precisas, de baixo custo e com melhor tempo de resposta. Assim, torna-se um desafio desenvolver métodos operacionais que possam expressar a biodisponibilidade do mercúrio no ambiente aquático, considerando-se que a biodisponibilidade de uma substância é definida como a fração desta substância que pode ser liberada de uma determinada matriz e absorvida por um microorganismo (Apostoli *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2005).

Visando contribuir com um novo protocolo para a determinação do mercúrio biodisponível ou potencialmente tóxico, este trabalho tem como objetivos os itens descritos a seguir.

1.2. OBJETIVOS

- Geral:

Propor um protocolo de avaliação das espécies de mercúrio potencialmente tóxicas presentes em águas naturais, tendo como base analítica o uso de um redutor seletivo das espécies mercuriais biodisponíveis, correlacionando os resultados analíticos obtidos pelo protocolo proposto frente aos resultados biológicos obtidos em testes ecotoxicológicos.

- Específicos:

- Baseado nos projetos FAPESP 99/02212-6 e 02/03795-0 que estudaram os possíveis redutores a serem utilizados para esse fim, optou-se pelo uso do ácido ascórbico por ter apresentado resultados satisfatórios para o desenvolvimento do método (Pompei & Jardim, 1999; Locatelli & Jardim, 2002), buscando estabelecer uma técnica de fácil manuseio após a otimização de seus parâmetros.

- Utilizar a técnica de espectrofotometria de absorção atômica do vapor frio, sensível para determinação em baixas concentrações de Hg, acoplado a um sistema de injeção em fluxo caracterizado por medidas rápidas e precisas.

- Calibrar os resultados analíticos com as respostas de testes ecotoxicológicos de efeito agudo, com diferentes organismos da cadeia trófica, usando a bactéria *Escherichia coli* e o microcrustáceo *Daphnia similis*, com o intuito de avaliar sua correlação com o efeito tóxico do Hg para tais organismos.

- Testar o protocolo em amostras de águas naturais da região amazônica entre outros corpos aquáticos, investigando sua aplicabilidade em diferentes matrizes aquáticas.

INTRODUÇÃO

2.0. ASPECTOS GERAIS

O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre, sendo o cinábrio (HgS) sua forma mais abundante. Nos diversos compartimentos ambientais pode ser encontrado em três estados de oxidação (0, +1 e +2), na forma de vários complexos orgânicos e inorgânicos entre outras espécies, onde o Hg^0 está amplamente distribuído na atmosfera (~ 95%), o Hg^{2+} é predominante em sistemas aquáticos e as formas orgânicas altamente tóxicas para os organismos vivos (Horvat, 1996).

Uma das mais clássicas divisões dos compostos mercuriais compreende a seguinte especificação (Lindqvist *et al.* (1984) *apud* WHO, 1989):

- *voláteis*: mercúrio elementar (Hg^0) e dimetilmercúrio;
- *espécies reativas particuladas ou solúveis em água*: Hg^{2+} , HgX_2 , HgX_3^- , HgX_4^{2-} (com X = OH^- , Cl^- ou Br^-), HgO em partículas aerossóis e complexos de Hg^{2+} com ácidos orgânicos;
- *espécies não reativas*: CH_3Hg^+ , CH_3HgCl , CH_3HgOH e outros compostos organomercuriais, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgS e Hg^{2+} ligados ao enxofre em fragmentos de matéria húmica.

Mesmo sendo ubíquo no ambiente, o mercúrio é tido como uma das principais substâncias poluentes descritas por agências de proteção ambiental em todo o mundo. A Agência dos Estados Unidos para Substâncias Tóxicas e Registros de Doenças lista o mercúrio como a terceira substância mais tóxica (ATSDR, 2007). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004) apresenta um maior rigor nas concentrações toleráveis de suas espécies em corpos aquáticos e em alimentos.

Estudos toxicológicos provam que o mercúrio, especialmente sua forma orgânica, é bastante tóxico para embriões e fetos humanos, e a exposição crônica a este metal pode causar perdas na função dos rins e danos neurológicos (ATSDR, 1999). Seu vapor é altamente tóxico e apresenta efeito cumulativo. O rim é tido como órgão alvo para atuação e acumulação do Hg^{2+} devido à sua alta afinidade com os

grupos tióis das proteínas, peptídicos e aminoácidos, envolvendo uma série de mecanismos intra e extracelular (Blackstone *et al.*, 1974; ATSDR, 1999; Zalups, 2000).

Devido a tais fatores devem-se considerar as principais fontes de emissão de mercúrio para o ambiente com conseqüente influência no seu ciclo local, regional e global. O ciclo global compreende a visão integrada dos níveis de mercúrio nas diferentes matrizes ambientais e os fatores biogeoquímicos que contribuem para a conversão entre as espécies e o seu fluxo nos reservatórios, observando uma média global (Porcella, 1994; Lindqvist, 1994). Os ciclos locais e regionais são termos relativos à área na qual a emissão atmosférica viaja dentro de um ciclo diurno, geralmente 100 e 200 km a partir da fonte, respectivamente (EPA, 1997).

Acordos feitos por conselhos norte americano e europeus têm sido ratificados com intenção de diminuir a emissão global do mercúrio (EPA, 2006a). Wang *et al.* (2004) classificam as fontes de Hg em fontes naturais, antrópicas e de re-emissão, dentre as quais se destacam a deposição atmosférica, a erosão, a queima de combustíveis fósseis, as descargas urbanas, as atividades agrícolas, industriais e de mineração.

A principal fonte de emissão de mercúrio, tanto biogênica quanto antrópica, está na forma de mercúrio elementar para a atmosfera. Anualmente, a emissão global de mercúrio para a atmosfera está na ordem de 4400 a 7500 t ano⁻¹, sendo que seu tempo de residência nesse compartimento é em torno de um ano, dependendo da espécie de mercúrio e das condições climáticas (Lindqvist, 1994; EPA, 2006a).

Uma vez na atmosfera, o mercúrio tem a possibilidade de ser transportado por longas distâncias, onde o seu mecanismo de remoção caracteriza-se pela deposição seca e úmida (Porcella, 1994; Poissant *et al.*, 2008). O fluxo de deposição seca para o mercúrio varia diretamente com o ciclo de temperatura sazonal, tipo de superfície que a deposição ocorrerá e a forma física do mercúrio (gás ou partícula). Da mesma forma, a deposição úmida que ocorre pela chuva e/ou geada depende da região e, conseqüentemente, de suas condições climáticas. Adicionalmente, a cada evento de chuva ocorre lixiviação do solo e lavagem da vegetação, o que leva a um maior aporte do mercúrio nos ecossistemas aquáticos, sendo grande parte na forma de Hg⁰ (Stein *et*

al., 1996). Contudo, a presença de metil-Hg tem sido detectada em água de chuva. Corroborando com o ciclo do mercúrio no ambiente, o efeito de volatilização anual do mercúrio a partir do solo, vegetação e água, geralmente, excede a quantidade de mercúrio depositada (Porcella, 1994). A Figura 2.1 mostra de forma simplificada o transporte do mercúrio no ambiente.

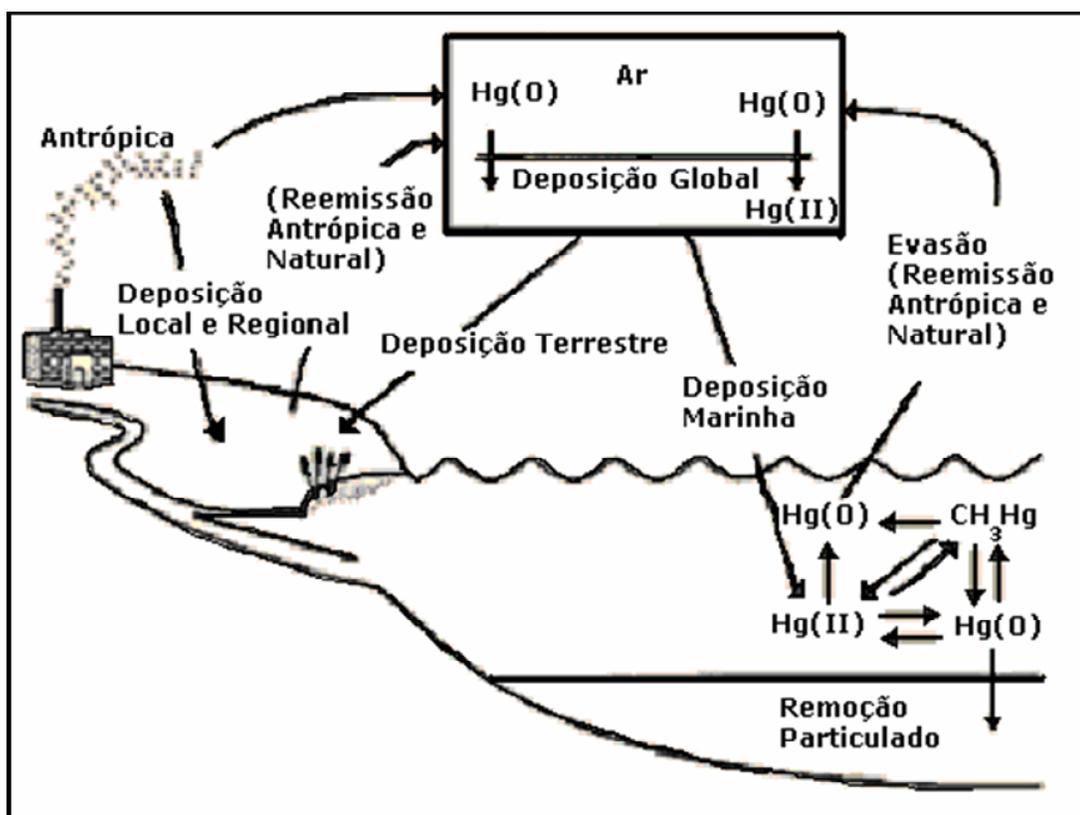


Figura 2.1: Esquema simplificado do ciclo do mercúrio no ambiente (Adaptado de USGS, 2008).

2.1. Química aquática do mercúrio

De maneira geral, a concentração basal de Hg em águas não poluídas é extremamente baixa. Em regiões do Ártico, por exemplo, foram encontrados valores de 0,02 a 1,0 ng L⁻¹ em água doce e oceânica. No entanto, concentrações de até 15,0 ng L⁻¹ foram reportadas em lagos na Suécia e Finlândia (Poissant *et al.*, 2008). Na bacia do Rio Negro, área da região Amazônica sem indício de atividades de garimpo ou industrial, concentrações de 2,1 a 29,1 ng L⁻¹ e de 3,3 a 8,8 ng L⁻¹ de Hg total foram relatadas para águas pretas e brancas, respectivamente (Bisinoti, 2005). Em locais com fonte de contaminação industrial pode variar de 10,0 a 40 ng L⁻¹, alcançando até 1000 ng L⁻¹ em regiões com características geológicas com abundância de mercúrio ou atividade de garimpo (Stein *et al.*, 1996; Malm, 1998; Jiang *et al.*, 2006). Desta forma, verifica-se que nos sistemas aquáticos, a concentração de mercúrio pode variar significativamente.

No sistema aquático, as espécies mercuriais dependem de interações com outros constituintes e das potencialidades do meio (tais como a dinâmica, o pH, as condições redox, temperatura, entre outros) para se predizer sua biogeoquímica e, conseqüentemente, seu potencial tóxico para os organismos. Assim, ao ser incorporado no sistema aquático, o mercúrio pode seguir várias rotas de transformações (Stein *et al.*, 1996). Os principais fatores que influenciam nessas rotas, tais como, solubilidade, pH, potencial redox, complexação, sorção e dessorção serão abordados neste trabalho.

Os compostos mercuriais apresentam solubilidade em água bastante variada. O Hg⁰ a 30°C apresenta uma solubilidade de 2,0 µg L⁻¹, enquanto o cloreto mercurioso apresenta solubilidade de 2,0 mg L⁻¹. A solubilidade do cloreto de metil-Hg em água é maior que a do cloreto mercurioso em aproximadamente três ordens de grandeza, devido à alta solubilidade do cátion metil-Hg. O nitrato e o sulfato de mercúrio, por exemplo, possuem elevada hidrossolubilidade (Stein *et al.*, 1996). Estudos demonstraram que vapores de mercúrio são mais solúveis no plasma e hemoglobina do que em água destilada ou solução salina isotônica (ATSDR, 1999). Portanto, a solubilidade dos compostos de Hg está intimamente relacionada à sua especiação

(elementar, orgânica ou inorgânica), sendo que, na forma inorgânica, o ânion definirá sua solubilidade (Stein *et al.*, 1996; Ravichandran, 2004).

O Hg^0 é a forma mais volátil das formas mercuriais, sendo que o dimetilmercúrio também pode volatilizar (Horvat, 1996). Essa propriedade faz com que a sua concentração seja extremamente baixa em águas naturais. Paraquetti *et al.* (2004), avaliaram a distribuição do mercúrio dissolvido gasoso (MDG) em diferentes tributários da Baía de Sepetiba (Brasil), onde os valores de MDG estiveram entre 0,02 e 0,19 ng L^{-1} em amostras com concentrações de Hg total entre 0,4 a 66,6 ng L^{-1} . Os autores compararam esses resultados com aqueles obtidos em rios de outras regiões do planeta, cujos valores variam de <0,01 - 0,18 ng L^{-1} . Fadini (1999) estudou o fluxo de MDG na interface água-atmosfera em lagos de águas claras e negras da região Amazônica, encontrou valores entre 0,01 a 0,06 ng L^{-1} de MDG para uma faixa de Hg_{total} de 3,81 – 8,62 ng L^{-1} . O fluxo de MDG determinado nesse trabalho variou entre < 0,59 e 2,53 $\text{pmol m}^{-2} \text{h}^{-1}$. O autor constatou a influência de mecanismos de foto-redução, o qual durante o dia impediu a formação de Hg^0 nas águas escuras e aumentou o Hg^0 nas águas claras. Resultados semelhantes, relacionados com foto-redução de espécies mercuriais, foram obtidos por Silva (2004) e por Lindqvist *et al.* (1994). Consequentemente, o perfil de MDG na coluna d'água tende a decrescer com a profundidade (Silva, 2004; Amyot *et al.*, 1997).

Quanto ao mercúrio inorgânico, espécie abundante nos sistemas aquáticos, pode ser convertido via processos abióticos e bióticos em espécies neurotóxicas lipofílicas alquiladas, as quais podem biomagnificar ao longo da cadeia trófica (Boening, 2000; Barbosa *et al.*, 2003; Bisinoti & Jardim, 2003). As formas orgânicas predominantes são metil, etil e fenilmercúrio.

Verifica-se que a porcentagem de mercúrio orgânico em relação ao Hg total, em ambientes aquáticos, varia de < 0,1 a 17% (Fitzgerald, 1994; Bisinoti *et al.*, 2007) dependendo da concentração de matéria orgânica lábil, fotodegradação da forma orgânica, pH, temperatura e a atividade bacteriana, esta última, em baixas concentrações de oxigênio. Geralmente a concentração de metil-Hg aumenta ao longo da coluna d'água (Porcella, 1994; Fitzgerald, 1994). Em amostras de água coletadas

próximo ao sedimento de fundo, na Baía de Minamata (Japão), Tomiyasu *et al.* (2008) encontraram teor de metil-Hg de $50 \pm 24\%$ em relação ao Hg total. Essa porcentagem relativamente alta foi justificada pela proximidade da amostra com o sedimento de fundo, o qual foi tido como uma fonte de metil-Hg para a coluna d'água.

O efeito do pH na solubilidade do mercúrio e seus compostos, pode ser demonstrado de acordo com o diagrama de especiação do Hg^{2+} para água doce (Figura 2.2). O diagrama foi construído baseado nas constantes de formação recomendadas pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC), o resultado indicou a formação de diferentes espécies mercuriais com a variação do pH.

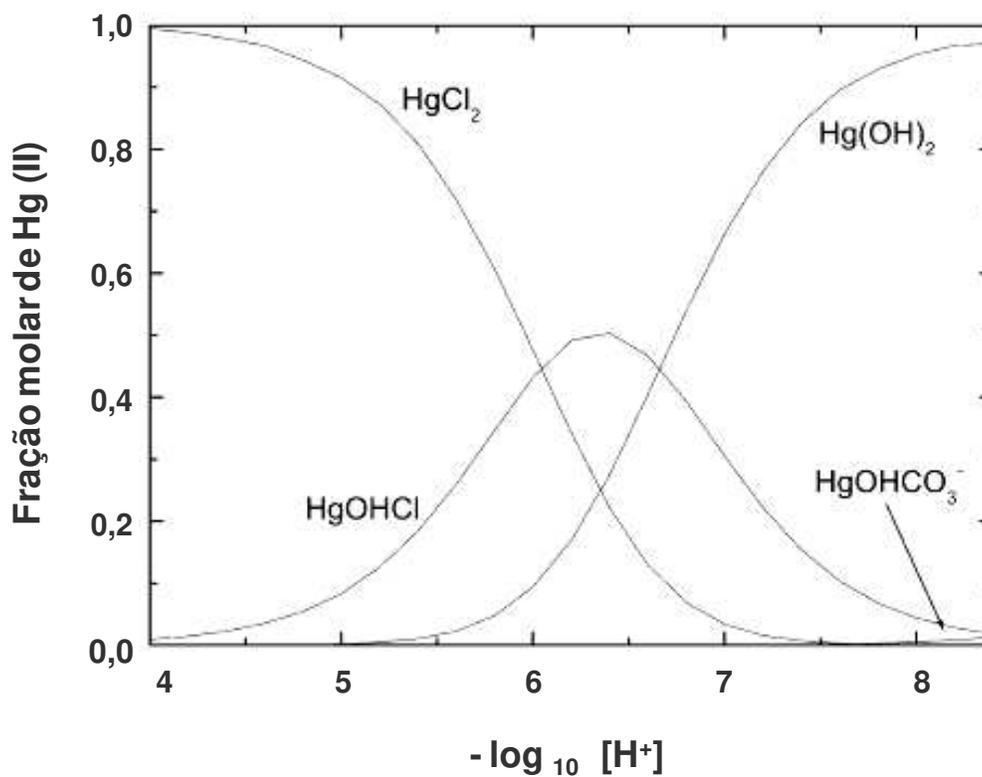


Figura 2.2: Diagrama de especiação para o sistema Hg^{2+} - H^+ - Cl^- - CO_2 - HPO_4^{2-} - SO_4^{2-} , simulando a composição de água natural. As concentrações usadas foram: $[\text{Cl}^-]_t = 0,23 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HPO}_4^{2-}]_t = 0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{SO}_4^{2-}]_t = 0,42 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{Hg}^{2+}]$ ajustada para $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Assumindo o sistema em equilíbrio com o ar, tendo uma fugacidade de CO_2 de $370 \text{ } \mu\text{bar}$ (Fonte: Powell *et al.*, 2005).

Segundo o diagrama, ao se variar o pH entre 4,0 e 8,5, as espécies predominantes com o aumento do pH são $\text{HgCl}_{2(\text{aq})}$, $\text{HgOHCl}_{(\text{aq})}$ e $\text{Hg}(\text{OH})_{2(\text{aq})}$, além de algumas outras espécies formadas em quantidades desprezíveis. Isto sugere que na ausência de ligantes orgânicos que apresentam constante de complexação alta com o Hg^{2+} , o sistema predominante é $\text{Hg}^{2+} - \text{OH}^- - \text{Cl}^-$. Em condições onde estiverem presentes espécies de HgS , a influência do pH é significativa por aumentar a solubilidade desta espécie em pH ácido (2 a 5) (Powell *et al.*, 2005).

Em geral, condições ácidas facilitam a formação de complexos solúveis (HCl_2 , CH_3Hg) ao passo que condições alcalinas facilitam a formação de complexos voláteis (Hg^0 e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) (Stein *et al.*, 1996). É importante ressaltar que em condições ácidas e elevadas concentrações de carbono orgânico, a metilação e acumulação do mercúrio em peixes pode ser favorecida (Gilmour & Henry, 1991; Porcella, 1994).

Outro parâmetro que dita à distribuição do mercúrio em ambientes aquáticos é o potencial de oxi-redução do sistema. Sob condições ácidas (pH < 6), o mercúrio elementar pode ser oxidado para o mercúrio divalente (Bisinoti & Jardim, 2003). Conseqüentemente, o comportamento do mercúrio divalente é determinado por subseqüentes complexações com compostos orgânicos e inorgânicos (Powell *et al.*, 2005; Apostoli *et al.*, 2006). Bisinoti & Jardim (2003) verificaram que o Hg^0 é um bom substrato para formação de Hg orgânico, os autores utilizaram experimentos microcosmo, onde obtiveram uma máxima metilação em valores de potencial redox entre +100 a +200 mV.

Uma interessante ferramenta que permite inferir, do ponto de vista termodinâmico, quais espécies devem prevalecer numa dada região do corpo aquático quando os valores de pH e Eh são conhecidos, é o diagrama de estabilidade $Eh - \text{pH}$ (Figura 2.3). De acordo com a Figura 2.3, o campo de estabilidade mostrado para o sistema $\text{Hg} - \text{S} - \text{O} - \text{H} - \text{Cl}$ em concentrações geralmente encontradas em águas naturais e uma concentração máxima de Hg_{total} igual a $25 \mu\text{g L}^{-1}$, pode-se verificar as possíveis formas predominantes em cada região.

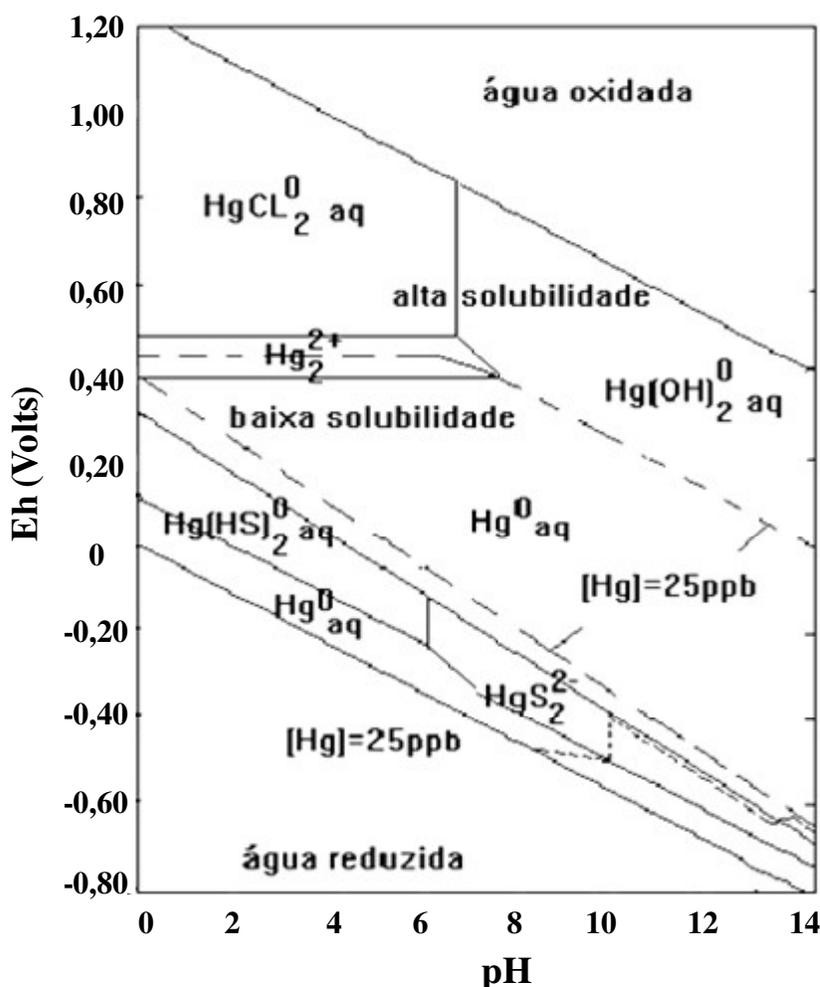


Figura 2.3: Diagrama de Eh - pH das espécies aquosas de mercúrio, $[Hg_{total}] = 25 \mu\text{g L}^{-1}$ à 25°C e 1 atm, para o sistema $\text{Hg} - \text{S} - \text{O} - \text{H} - \text{Cl}$ em concentrações normalmente encontradas em águas naturais (Fonte: Stein *et al.*, 1996).

Sob condições oxidantes, em água doce, as formas predominantes são os complexos de cloro e hidróxido ($\text{HgCl}_{2(aq)}$ e $\text{Hg(OH)}_{2(aq)}$), ao mesmo tempo que em água salgada prevalece a formação da espécie HgCl_4^{2-} . Por outro lado, em condições redutoras e na presença de complexantes como H_2S e HS^- , a forma predominante é o HgS , que em geral se precipita por ser uma espécie muito insolúvel ($S=10^{-53} \text{ mg L}^{-1}$), podendo ser retirada rapidamente da coluna d'água. No entanto, se tal água for reoxigenada, o HgS pode ser resolubilizado e, assim, tornar-se disponível para

subsequentes reações de oxidação (Stein *et al.*, 1996; Ravichandran, 2004). A importância das reações de oxidação é que o mercúrio divalente é o principal precursor para formação de compostos mercuriais com maior solubilidade como $\text{HgCl}_{2(\text{aq})}$ e $\text{Hg}(\text{OH})_{2(\text{aq})}$ (Porcella, 1994).

O conhecimento da sorção e dessorção do mercúrio no ambiente apresentam uma importante contribuição para o entendimento do seu destino e transporte. A sorção refere-se à remoção de um soluto a partir da fase aquosa para a superfície de uma fase sólida, considerando que o termo sólido pode referir-se tanto ao solo quanto ao sedimento. O mecanismo inverso representa o efeito da dessorção (Melamed & Boas, 2002).

A interferência do material particulado na disponibilidade do Hg foi estudada por Jardim & Canela (1997). Os autores demonstraram que a presença de material particulado diminui cerca de três vezes a concentração de Hg^{2+} recuperado após a adição de uma quantidade conhecida do metal. A competitividade dos sólidos em suspensão pelo Hg reativo obteve uma significativa correlação com a diminuição da concentração do mercúrio total dissolvido e o aumento da concentração do mercúrio particulado em água de rio segundo Paraquetti *et al.* (2004).

Normalmente, a sorção de Hg aumenta com o aumento do conteúdo de carbono orgânico no meio. Porém, a magnitude do efeito do pH para a sorção difere de acordo com a espécie presente. Em $\text{pH} < 5$, as condições são ótimas para sorção do HgCl_2 pela matéria orgânica. Já em $\text{pH} > 5$, ocorre a formação de complexos Hg-humato bastante solúvel, reduzindo a sorção do Hg (Stein *et al.*, 1996).

As substâncias húmicas (SH) representam a principal forma de matéria orgânica distribuída no planeta terra. Diferentemente dos complexantes ou ligantes simples, as SH contêm grande número de sítios complexantes, resultando em alta estabilidade termodinâmica dos complexos formados (Neubecker & Allen, 1983). Portanto, uma importante contribuição das SH no ciclo aquático do Hg está relacionada com as principais formas iônicas mercuriais, Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , as quais são fortemente complexadas por ácidos húmicos, fúlvicos e outras moléculas orgânicas presentes em

ambientes naturais (Rocha *et al.*, 2000). Considera-se que 50 a 80% da matéria orgânica dissolvida em águas naturais são SH (Ravichandran, 2004).

A afinidade de ligação do mercúrio e compostos orgânicos, pode ser quantificada usando a constante de estabilidade condicional (K), sob condições específicas de pH, concentração do ligante e do metal, temperatura e salinidade do meio, representada na Equação 2.1.

$$K = \frac{[\text{complexo organo-metálico}]}{[\text{Hg}^{2+}] [\text{ácido húmico}]} \quad (2.1)$$

O logaritmo da constante de estabilidade para Hg^{2+} -complexo húmico, por exemplo, pode variar de 18,4 a 28,1, dependendo das condições do ambiente (origem da SH), pH do meio, método de extração e razão entre a $[\text{Hg}]/[\text{SH}]$ (Ravichandran, 2004). Experimentos realizados para avaliar o potencial de ligação da matéria orgânica natural com espécies mercuriais, tanto por mecanismo hidrofóbico como por mecanismo iônico, sugeriram a sequência de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg} > \text{Hg}^0 > \text{CH}_3\text{HgX}$ (onde $\text{X} = \text{OH}^-$ ou Cl^-) para o potencial hidrofóbico, porém isso não pode ser observado em sistemas aquáticos com baixo conteúdo de sólidos. Para explicar a interação Hg-matéria orgânica por mecanismo iônico, sugeriu-se a influência da ligação por meio dos sítios sulfídricos contidos na matéria orgânica (Loux, 1998).

As frações de ácidos húmicos e fúlvicos presentes na matéria orgânica dissolvida aquática são capazes de reduzir o Hg iônico para sua forma elementar (Ravichandran, 2004). Rocha *et al.* (2003) pesquisaram a competição entre o mecanismo de complexação e redução do Hg pelas substâncias húmicas aquáticas (SH) oriunda de rios tropicais. Os resultados mostraram a preferência para redução do mercúrio nas frações de SH que continham maiores razões de grupos fenólicos/ carboxílicos e menor razão de grupos contendo enxofre.

Por outro lado, a dessorção do Hg de solo ou sedimento é geralmente baixa, variando de 10^{-3} a 10^{-5} vezes a sorção. Em experimento feito em até 70h de agitação

com água destilada, menos de 1% do Hg^{2+} sorvido foi desorvido de sedimentos de rio (Stein *et al.*, 1996). Porém, a drenagem ou a oxigenação do sedimento pode ressolubilizar as formas de mercúrio precipitado no sedimento (Melamed & Boas, 2002). Observa-se um gradiente de concentração ao longo da coluna d'água, em locais que sofreram descarga de Hg, onde maiores concentrações de Hg são encontradas próximo ao sedimento, com diminuição gradativa até a superfície (Gill *et al.*, 1999; Tomiyasu *et al.*, 2008), sugerindo que a dessorção do Hg do sedimento pela ressuspensão ou dragagem, dependendo do ambiente aquático, pode ser significativa.

2.2. Ecotoxicidade em ambientes aquáticos

O conceito de ecotoxicologia segundo a IUPAC, diz respeito aos estudos dos danos causados à biota pela exposição a agentes químicos ou físicos em populações ou comunidades de determinados ecossistemas aquáticos ou terrestres (Duffus *et al.*, 2007). Isto inclui a definição das fontes, condições, efeitos, limites de segurança para exposição, mecanismo de ação das substâncias, diagnóstico, prevenção e tratamento de intoxicação (Manahan, 2002).

A toxicidade de uma substância é medida pelos efeitos adversos causados aos organismos vivos, referente à quantidade de substância administrada ou absorvida, geralmente expressa em valores absolutos da dose ou concentração administrada, a rota pela qual será administrada (inalação, ingestão, aplicação, contato) e o tempo de exposição. De modo geral, os organismos diferem significativamente quanto a sua susceptibilidade as substâncias tóxicas, por isso inúmeros testes de toxicidade que expressam esse efeito foram padronizados e indicados oficialmente (APHA, 1995).

No monitoramento da qualidade das águas, os testes de toxicidade são desejáveis, pois somente os parâmetros químicos e físicos não são suficientes para avaliar o potencial efeito à biota. A Tabela 2.1 apresenta a classificação geral dos testes de toxicidade padronizados oficialmente.

Tabela 2.1: Classificação geral para testes de toxicidade.

Parâmetro	Classificação		
Duração	Curto (shot-term)	Intermediário	Longo (long-term)
Método de adição da solução teste	Estático	Renovável	Fluxo
Objetivo	Controle de qualidade de efluentes ou sistemas biológicos.	Toxicidade ou sensibilidade relativa do organismo.	Toxicidade de um único composto ou misturas.

Fonte: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995).

Dependendo do objetivo, pode-se avaliar o efeito tóxico agudo e/ou crônico, tanto na água quanto no sedimento (CETESB, 1992). O efeito agudo caracteriza-se por uma resposta severa e rápida a um estímulo, em que se observa a letalidade ou alguma outra manifestação que a antecede, tal como o estado de mobilidade. Por conseguinte, o efeito crônico representa a resposta a um estímulo que continua por longo tempo, normalmente por períodos que vão de 1/10 do ciclo de vida até a totalidade da vida do organismo, tais efeitos são mais sutis, sendo detectados em prolongados períodos de exposição ou por respostas fisiológicas adversas na reprodução e crescimento do organismo (Baird, 2002).

A resposta do estímulo causado pelo agente tóxico pode ser representada por valores de concentração ou dose letal (LC ou LD), concentração efetivamente tóxica (EC) entre outras nomenclaturas. A quantidade da população afetada pelo agente tóxico (20, 50 ou 100% da população teste) irá classificar a amostra como tóxica ou não, sendo que essa porcentagem depende da sensibilidade do organismo e do objetivo do teste. Os principais fatores que influenciam as respostas dos testes de toxicidade descrito no manual para métodos padronizados (APHA, 1995), são:

● *Fatores ligados ao agente tóxico:*

⇒ propriedade físico-química (solubilidade, grau de ionização, coeficiente de partição, pK_a , tamanho molecular, estado físico, etc.);

⇒ impurezas e contaminantes.

● *Fatores relacionados com o organismo:*

⇒ espécie, linhagem, fatores genéticos;

⇒ fatores imunológicos, estado nutricional, dieta;

⇒ sexo, estado hormonal, idade, peso corpóreo;

⇒ estado emocional, estado patológico.

● *Fatores relacionados com a exposição:*

⇒ via de introdução;

⇒ dose ou concentração.

● *Fatores relacionados com o ambiente:*

⇒ temperatura, pressão;

⇒ radiações;

⇒ outros (luz, umidade, etc.).

Portanto, o valor de dose/resposta gerado nos testes de toxicidade é obtido a partir da resposta do organismo em função da dose administrada. Normalmente, a representação gráfica busca a forma da chamada “curva S”, na qual se podem observar todas as fases do organismo frente ao agente tóxico e extrair o valor LD e/ou LC_n (onde, $n = \%$ de indivíduos afetados). A dose correspondente ao ponto de inflexão da curva é estatisticamente estimada como a dose que causa efeito tóxico em 50% da população teste. A Figura 2.4 descreve uma típica curva dose/resposta relacionada ao comportamento de uma população teste afetada com o aumento da concentração do agente tóxico (Manahan, 2002).

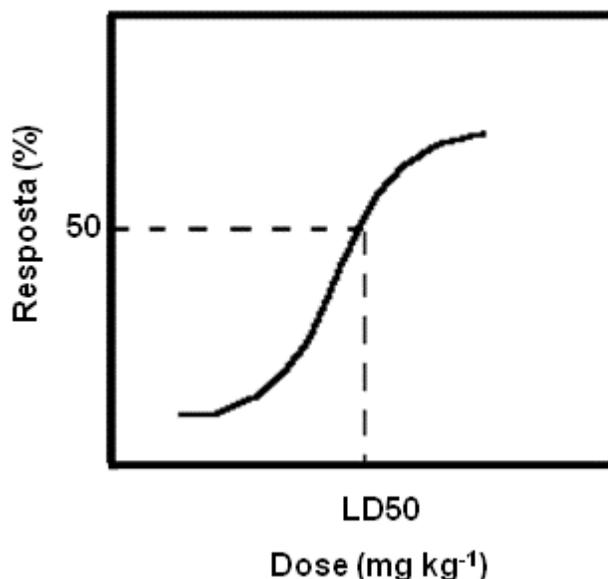


Figura 2.4: Relação dose/resposta para uma substância hipotética em uma população homogênea (efeito medido: letalidade), LD (dose letal).

Com relação ao atual estágio das pesquisas relacionadas com estudos toxicológicos, nota-se a preocupação com a saúde pública devido sua exposição a uma série de substâncias potencialmente tóxicas. Existem inúmeras substâncias químicas, às quais normalmente pode-se estar exposto, tanto através de produtos industriais e de consumo, como também quando estão presentes nos alimentos, na água e no ar (Manahan, 2002; Apostoli *et al.*, 2006). Geralmente, supõe-se que poucas dessas substâncias representam um risco significativo, para a saúde humana, nas concentrações de exposição existentes. Tal pensamento deve-se ao fato de que os efeitos na saúde produzidos pela maioria delas são geralmente desconhecidos pela população em geral. Por exemplo, pela ingestão de peixes e outros organismos aquáticos, os quais podem ser suscetíveis a bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (Barbosa, 1997; Swanson *et al.*, 2006; Passos *et al.*, 2007).

Devido a essa problemática, a maioria dos países adotam mecanismos legais para o registro e gerenciamento de usos dos produtos químicos. O critério mais justo e

racional para se proibir, restringir ou liberar o uso de um dado produto é, obviamente, analisar o risco de causar danos para o ambiente e conseqüentemente para saúde pública, definindo claramente os critérios e métodos para tal análise.

As legislações brasileira, européia e a norte americana exigem testes de toxicidade para os efluentes industriais destinados aos corpos aquáticos, visando a proteção da vida aquática ou consumo humano (EEC, 2000; CONAMA, 2005; CFR, 2009).

Destacam-se dois grupos de testes de avaliação de toxicidade: (i) o primeiro teste é o de efeito à saúde, *in vitro*, baseado em respostas de componentes sub-celular (enzimas, DNA, RNA), células isoladas (cultura de célula, células de glóbulos vermelhos), tecidos ou órgão e; (ii) o segundo teste de efeito ecológico (ecotoxicológicos), são os conduzidos principalmente para medir a toxicidade aguda em organismos aquáticos que representam os vários níveis tróficos da cadeia (Bitton & Dutka, 1986a).

De maneira geral os testes de efeito ecotoxicológicos podem ser aplicados em todos os ecossistemas aquáticos (estuário, águas subterrâneas, pluviais, superficiais e etc.), ressaltando que cada teste tem sua função específica de acordo com as características do meio e microorganismos provenientes de habitats diferentes (Tsui *et al.*, 2006).

As propriedades físicas e químicas dos sistemas aquáticos afetam a abundância, a composição das espécies, estabilidade, produtividade e condições fisiológicas da população dos organismos aquáticos. Portanto, os testes de efeito ecológico são usados para avaliar a qualidade da água considerando a própria comunidade do ecossistema, incluindo a avaliação da bioconcentração, bioacumulação e biomarcadores. Assim como, pode avaliar o efeito dessas águas em organismos saudáveis sobre condições controladas, de acordo com os testes realizados em laboratório usando técnicas padronizadas (APHA, 1995).

Tradicionalmente, em sistemas aquáticos, os organismos mais usados são crustáceos, algas e peixes (EPA, 2002). No entanto, pesquisas têm sido realizadas no intuito de utilizar microorganismos com respostas mais rápidas e representativas em

termos ambientais, para descarga de resíduos e otimização de processos industriais. Priorizam-se ensaios com respostas rápidas, menor custo e maior reprodutibilidade (Farré & Barceló, 2003).

2.2.1. Teste de toxicidade com microorganismos

Na maioria dos testes de toxicidade com microorganismo, as exigências operacionais, tais como: (i) manter os microorganismos em culturas que necessitam de cuidados para não sofrer contaminação; (ii) reprodução uniforme do microorganismo, necessitando de uma população saudável e uniforme; (iii) necessidade de grandes volumes de soluções para diluição, além do cuidado rigoroso com os recipientes manipulados (uso de auto-clave e capela de fluxo laminar); (iv) controle de aclimatação (temperatura, iluminação, e em alguns casos, controle da vazão de CO₂), pH, turbidez, entre outros cuidados (Bitton & Dutka, 1986a), não favorecem a popularização para uso rotineiro.

A princípio, esses testes foram padronizados com o intuito de avaliar a dose resposta de um agente específico em escala de laboratório, e seus valores respostas extrapolados para os vários níveis da cadeia alimentar até chegar ao ser humano. Contudo, tal pensamento tem sido mudado, saindo do determinismo e passando para o nível probabilístico, usando condições de mesocosmos, microcosmos até aplicações *in situ*. Dentre os organismos utilizados para esse fim, destacam-se os testes com bactéria e com microcrustáceo.

● Testes com bactéria

Os testes de toxicidade utilizando bactérias têm se popularizado devido ao seu menor tempo de resposta e reprodutibilidade frente aos demais. Existem vários tipos de bactérias utilizadas para essa finalidade, como as espécies *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* e *Pseudomonas fluorescences*, que respondem em termo da inibição de

bioluminescência. As espécies *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* respondem de acordo com a inibição de metabólicos (Parvez, 2005; Bitton & Dutka, 1986a).

Os testes com bactérias mais utilizados são aqueles baseados na inibição de bioluminescência, acarretando o desenvolvimento de uma variedade de marcas comerciais baseadas no mesmo princípio (Microtox[®], Lumistox[®], ToxAlert[®]), considerados como métodos sensíveis e reprodutíveis. Esses testes geralmente avaliam o efeito sub-letal no organismo vivo. Os resultados são expressos em EC₂₀ (concentração efetiva da amostra que causa inibição de 20% da emissão da luz emitida pelo microorganismo). Para utilização destes ensaios em amostras de águas naturais é necessário um meio com solução salina e filtração prévia da amostra, o que pode levar a inibição da solubilidade de algumas substâncias. A turbidez e a cor da amostra podem interferir na medida da intensidade luminosa (Parvez, 2005).

Assim como os outros testes, os testes com bactérias também não são capazes de identificar qual substância apresenta toxicidade. Utgikar *et al.* (2004) avaliaram o sistema Microtox em soluções com metais isolados e misturas. O estudo mostrou que houve um mecanismo de inibição diferente para cada metal, e que apenas o critério de análise do EC₅₀ não foi suficiente para identificar essa diferença. A mistura dos metais apresentou um efeito tóxico sinérgico entre os metais.

Com o intuito de utilizar bioensaios para identificar o agente estressante específico, kits comerciais chamados MetPAD e MetPlate desenvolvidos por Bitton (2005) são utilizados para responder especificamente à presença de metais em amostras ambientais, incluindo água, efluentes industriais e sedimentos. O bioensaio MetPAD foi testado em amostras de efluentes contendo metais e vários compostos orgânicos tóxicos, tais como fenol, formaldeído, clorofórmio e pentaclorofenol. Os resultados mostraram que o reagente respondeu especificamente à presença de metais e não indicou efeito adverso na presença apenas das substâncias orgânicas (Bitton *et al.*, 1992).

Existem várias outras técnicas para quantificar o crescimento de uma população microbiana, como por exemplo: contagem em placa, contagem celular eletrônica, contagem microscópica, membrana filtrante, turbidez e produtos metabólicos (Pelczar *et*

al., 1980). Jardim *et al.* (1990), Jardim *et al.* (1993) e Farah (2001) usaram a relação entre a concentração de CO₂ produzido na suspensão bacteriana de *E. coli* e o seu crescimento através da técnica de injeção em fluxo com medidas de condutividade.

A medida indireta da concentração de uma suspensão bacteriana pelo seu grau de turvação ou capacidade de dispersão da luz é bastante difundida na literatura. É um método já estabelecido, usado para estudo de crescimento bacteriano que possibilita fazer medidas em tempo real (Bitton & Dutka, 1986a; Murray *et al.*, 1995; Begot, 1996). Uma típica curva de crescimento bacteriano e suas respectivas fases estão apresentadas na Figura 2.5.

Assim como para a maioria dos organismos vivos, o crescimento das bactérias é influenciado por fatores físicos (pH, temperatura e pressão osmótica) e químicos (água, carbono, nitrogênio, oxigênio, minerais e fatores orgânicos de crescimento) (Tortora *et al.*, 2002). A espécie utilizada neste trabalho, *Escherichia coli*, possui as seguintes características: classificada como coliforme fecal, sendo seu habitat o intestino grosso humano; pertence ao grupo quimiorganotrófico, isto é, depende da oxidação de compostos orgânicos como fonte de energia e como fonte de carbono (heterotrófico); cresce facilmente em meio de cultura simples e fermenta glicose com produção de CO₂ (Pelczar *et al.*, 1980).

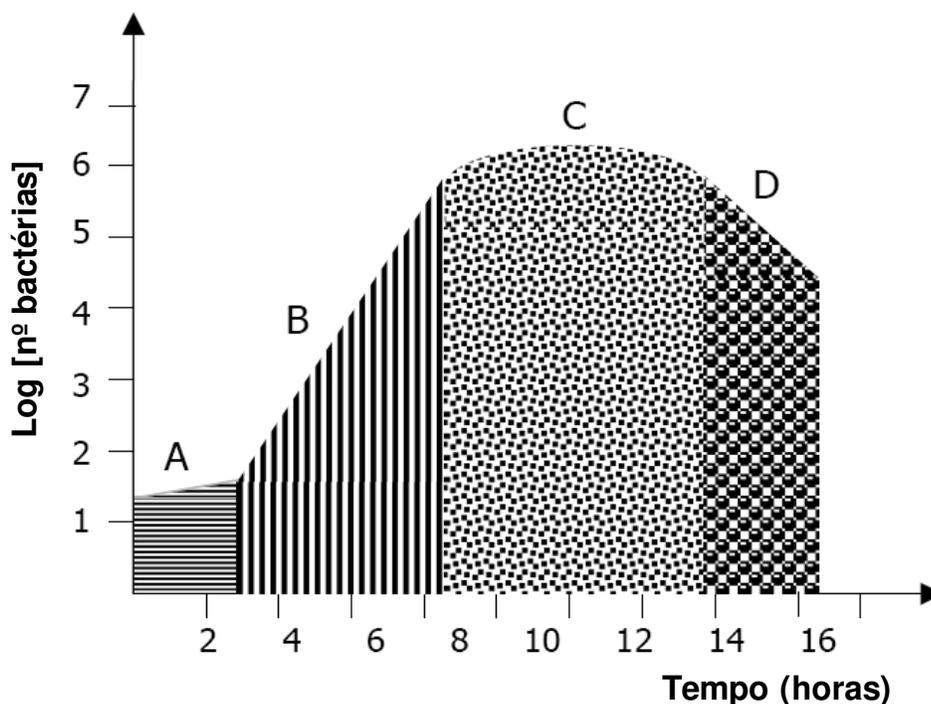


Figura 2.5: Curva de crescimento bacteriano com suas respectivas fases. (A) fase lag, estágio de latência, não ocorre divisão celular; (B) fase log, crescimento exponencial, divisão celular; (C) fase estacionária, decréscimo na divisão celular; e (D) fase de declínio, morte celular (Tortora *et al.*, 2002).

2.2.2. Teste de toxicidade com microcrustáceo

Os microcrustáceos mais utilizados em testes de toxicidade são *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* ou *pulex*. São os mais indicados para ecossistemas de água doce, recomendados e padronizados como métodos oficiais como uma ferramenta para avaliação das condições ambientais de corpos aquáticos impactados, tanto por metais quanto por outras substâncias tóxicas (EPA, 2002; ABNT, 2004).

As respostas desses ensaios podem ser de efeito agudo ou crônico, obtidos pela imobilização/morte ou baixa reprodução das espécies, sendo que este último indica efeito crônico. A vantagem desse tipo de teste é a alta sensibilidade e o curto ciclo reprodutivo frente a outros organismos (Farré & Barceló, 2003). As principais

desvantagens estão no tempo de resposta de 48h para efeito agudo ou até 7 dias para efeito crônico e, principalmente, ao rigoroso controle das condições de análises e dos organismos testes. Outras espécies, além daquelas citadas anteriormente, podem ser usadas como organismo indicador de toxicidade, baseados no crescimento ou sobrevivência, tais como insetos aquáticos, moluscos marinhos e outros (EPA, 2002).

Tsui *et al.* (2006) investigaram a variação da toxicidade aguda do mercúrio para *Daphnia magna* sobre diferentes condições de temperatura, população de origem, tamanho e pré-exposição ao Hg. Os valores de EC₅₀ variaram entre 12 e 55 µg L⁻¹ de Hg²⁺, a tolerância ao Hg aumentou com a diminuição da absorção de Hg nos organismos pré-expostos, devido à possível atividade de desintoxicação. Por outro lado, a porcentagem de sobrevivência diminuiu em maiores temperaturas, e em indivíduos menores. A diferença de EC₅₀ das três populações de diferente origem variou de 24,8 a 42,4 µg L⁻¹.

O microcrustáceo *Daphnia similis* é menos usado como organismo teste quando comparado com as outras espécies de *Daphnia*, porém, é indicado como organismo para teste de toxicidade pela OECD desde 1984. Esse microcrustáceo foi descrito pela primeira vez em 1876, em Jerusalém (Hudec, 1991). No Brasil, seu cultivo é amplamente realizado por ser indicado como testes oficiais segundo normas da ABNT 12713 (2004). A *Daphnia similis* (Crustácea, Cladocera) é um microcrustáceo planctônico que atua como um consumidor primário na cadeia trófica aquática de água doce, seu mecanismo de alimentação é por filtração da matéria orgânica em suspensão (EPA, 2002).

Para o cultivo em laboratório, as *Daphnias* são alimentadas diariamente por suspensões contendo algas (*S. capricornutum*) e mantidas em meio com nutrientes em condições específicas de fotoperíodo e temperatura. Em geral, apresenta alta sensibilidade a pequenas variações no ambiente (Wren & Stephenson, 1991). Guimarães *et al.* (2004) e Neto & Brondi (2006) utilizaram o teste agudo com *Daphnia similis* para avaliar a qualidade de água de reservatórios e de captação para distribuição, respectivamente. O resultado da água de reservatório mostrou mortalidade em 48h menor que 10%, o que indica não toxicidade. Já, as águas de captação

(amostra bruta) e a água do decantador da ETA, apresentaram em torno de 20% de mortalidade e, nas amostras cloradas (acima de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro) a mortalidade esteve acima de 50%, alcançando 100% em concentrações maiores. Tais resultados foram satisfatórios para a avaliação da toxicidade das diferentes amostras.

2.3. Ecotoxicidade do mercúrio

As diferenças na distribuição e metabolismo das várias espécies mercuriais (elementar, inorgânica e orgânica) são o que determinam suas biodisponibilidade e toxicidade (Apostoli *et al.*, 2006). A forma orgânica do mercúrio é extremamente tóxica, tanto para a biota quanto para os seres humanos, devido a sua solubilidade lipídica, estabilidade e propriedade iônica que lhe permite atravessar a membrana plasmática (ATDS, 1999). A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais facilita a absorção pela pele em até 100% quando comparados aos compostos inorgânicos (ATDS, 1999; Apostoli *et al.*, 2006).

A transformação de espécies inorgânicas para as formas metiladas são os primeiros passos para o processo de bioacumulação e biomagnificação. A facilidade do mercúrio em um corpo aquático ser metilado, como discutido anteriormente, é largamente determinada pelas ligações com o carbono orgânico dissolvido (COD), principalmente, ácidos húmicos e fúlvicos.

Para trutas, por exemplo, os valores de LC_{50} para mercúrio orgânico e inorgânico foram de 84 e $903 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (WHO, 1989). Em estudos realizados em peixes piscívoros, onívoros, detritívoros e herbívoros, oriundos da região amazônica, próximo a locais com atividades de garimpo (Rios Madeira e Tapajós), mais de 80% do mercúrio total encontrado estava na forma de metil-Hg, com uma variação de concentrações de $0,1 - 1,25 \text{ mg kg}^{-1}$ de metil-Hg (Kehring & Malm, 1999). Em peixes piscívoros provenientes do Rio Negro, também localizado na região amazônica, mas sem histórico de atividade de garimpo, o valor médio de Hg total ($n = 326$) foi de $688,9 \text{ ng g}^{-1}$ (Barbosa *et al.*, 2003). Tais valores ultrapassaram a concentração de Hg permitida em peixes para consumo ($0,5 \text{ mg/kg}$ de Hg_{total} , ANVISA, 1998).

O Hg^{2+} é bastante tóxico devido sua grande afinidade com grupos sulfídricos das proteínas, enzimas, hemoglobina e albumina (Zalups, 2000). A diferença da toxicidade do Hg^{2+} e Hg^0 em uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli*, foi determinada ao se observar que a mesma porcentagem de inibição da respiração bacteriana deu-se em concentrações de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Hg^{2+} e 5000 mg L^{-1} de Hg^0 , o que evidencia a baixa toxicidade da espécie elementar somado a sua alta volatilidade (Jardim *et al.*, 1993).

Boening (2000) apresenta uma vasta revisão sobre alguns efeitos causados em organismos dos vários níveis tróficos. De um modo geral, o mercúrio apresenta-se altamente tóxico em baixas concentrações. O mercúrio inorgânico apresentou efeito prejudicial para cultura bacteriana em concentrações de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Os compostos organomercuriais exerceram o mesmo efeito em concentrações até 10 vezes mais baixas. Tal relação manteve-se para os outros níveis da cadeia, variando de microorganismos aquáticos até pássaros. Os invertebrados aquáticos mostraram-se muito suscetíveis aos efeitos tóxicos do mercúrio, apresentando concentrações que variaram de $1,0$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para efeito agudo. Porém, esse valor foi influenciado pelo estágio de desenvolvimento do organismo, sendo que a toxicidade aumentou com a temperatura e diminuiu com o aumento da dureza da água.

Historicamente, a preocupação com a contaminação de mercúrio em corpos aquáticos deu-se em meados dos anos 50, com o desastre de contaminação na baía de Minamata (Japão). Neste caso, passaram-se longos anos para demonstrar que a “Síndrome de Minamata” foi devido às altas concentrações de mercúrio orgânico proveniente dos efluentes da Chisso Hiryo Corporation, este mercúrio teria sido bioconcentrado ao longo da cadeia alimentar, afetando mais de 3000 pessoas ao longo do tempo (ATSDR, 1999). Outros episódios de contaminação por mercúrio foram relatados no Iraque, Indonésia, Estados Unidos, China e Brasil, entre outros (ATSDR, 1999; EPA, 2006a).

Um fator importante na consideração da ecotoxicidade do Hg, visando à proteção da vida aquática e saúde humana, é o uso de valores orientadores ou padrão de qualidade para restringir o risco de contaminação por Hg no ambiente aquático. Os mecanismos para obtenção destes valores, normalmente são baseados em estudos de

populações expostas à substância ou em estudos ecotoxicológicos em escala de laboratório. Prioriza-se a toxicidade crônica, mas, geralmente, os dados apresentam resultados de toxicidade aguda usando uma população teste relativamente baixa e concentrações relativamente alta do metal e, então, os valores são extrapolados para uma escala mais ampla da população por meio de avaliação de risco (WHO, 2004). O ideal para elaboração de tais valores seria considerar aspectos particulares de cada região.

Nesse aspecto, a Organização Mundial de Saúde orienta valores de critério de qualidade da água para uma média mundial, sendo 0,0006 e 0,001 mg L⁻¹ de Hg total para água potável e descarga de efluentes, respectivamente (WHO, 2004). Ficando a cargo de cada país determinar seu respectivo valor padrão de qualidade.

Alguns estados americanos adotam como critérios de qualidade de água para o mercúrio, valores de 12 ng L⁻¹ para proteção da vida aquática e 50 ng L⁻¹ para proteção da saúde humana. Para descarga na Bacia dos Grandes Lagos, considerando suas particularidades, é aplicado um critério para mercúrio de 1,3 e 1,8 ng L⁻¹ para proteção da vida aquática e saúde humana, respectivamente. Desde 2001, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos recomenda como critério de qualidade da água o valor de 0,3 mg de metil-Hg por kg em peixes (EPA, 2006b). O Brasil adota 0,0002 mg L⁻¹ visando proteção da vida aquática e 0,01 mg L⁻¹ para efluentes (CONAMA, 2005). Portanto, é de suma importância a existências de métodos analíticos que possam auxiliar no monitoramento da concentração de Hg que represente sua biodisponibilidade.

2.4. Especiação do mercúrio e sua toxicidade

O avanço em técnicas analíticas de especiação elementar tem apresentado ganhos significativos, principalmente no que concerne à amostragem e estocagem da matriz a ser analisada, bem como a minimização de contaminação e manipulação da espécie de interesse (Apostoli *et al.*, 2006). Sobretudo, tal conhecimento tem contribuído de forma substancial para o entendimento dos ciclos biogeoquímicos e do

real potencial tóxico de cada espécie. Neste sentido, alguns estudos têm buscado correlacionar os efeitos da especiação *versus* sua toxicidade.

Um dos primeiros estudos realizados com esse intuito foi publicado por Morris & Russel (1973). Nesse estudo, foi mostrado o efeito da quelação do cobre na diminuição de sua toxicidade para algas. Em 1976, Sunda e Guillard quantificaram a fração do cobre considerada tóxica para microorganismo marinho. Florence (1992) mostrou que as análises voltamétricas realizadas com cobre tinham uma estreita relação com a toxicidade do metal em meio aquático. Para o mercúrio alguns procedimentos analíticos que propõem avaliar sua concentração efetivamente tóxica serão considerados a seguir.

Os métodos disponíveis de determinação das diferentes formas de Hg são, geralmente, classificados de acordo com a técnica de isolamento e do sistema de detecção, os quais baseiam-se na extração com solvente, redução diferenciada, adsorção/dessorção, complexação, cromatografia gasosa com ou sem derivatização, entre inúmeras técnicas de separação. Os métodos para determinação de Hg são selecionados de acordo com a natureza da amostra e o nível de concentração esperado (Horvat, 1996). As técnicas de quantificação usualmente empregadas para baixas concentrações são as de espectrofotometria de fluorescência atômica do vapor frio (CV-AFS) obtendo resultados na ordem de ng L^{-1} , e a técnica de espectrofotometria de absorção atômica do vapor frio (CV-AAS), na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (Apostoli *et al.*, 2006). Todavia, após o isolamento da espécie de interesse pode-se usar inúmeras técnicas de determinação já estabelecidas, como as de voltametria de redissolução anódica, plasma indutivamente acoplado à espectrometria de massas ou emissão atômica, análise por ativação com nêutrons entre outras (Florence, 1992; Micarone *et al.*, 2000; Apostoli *et al.*, 2006).

Em geral, a determinação de Hg envolve as seguintes etapas: coleta, pré-tratamento/preservação/estocagem da amostra, liberação do Hg da matriz (extração/purificação/pré-concentração), separação das espécies de interesse e quantificação (Horvat, 1996).

As principais espécies de mercúrio de interesse ambiental, determinadas em corpos aquáticos são o metil-Hg, o mercúrio dissolvido gasoso (MDG), o Hg_{reativo} , além do Hg_{total} . O metil-Hg traz informação sobre o estoque da espécie orgânica de mercúrio extremamente tóxica. Por outro lado, o MDG consiste, basicamente, de Hg^0 (~ 97%) com pequenas frações de outras espécies voláteis, tais como $HgCl_2$, CH_3HgCl ou $(CH_3)_2Hg$. O Hg_{total} representa a soma de todas as espécies de mercúrio presentes em águas que são oxidadas na presença de um oxidante forte como o cloreto de bromo. O Hg_{reativo} é a espécie de mercúrio definida operacionalmente como a fração que é reduzida por Sn^{2+} sob determinadas condições experimentais, também é tida como a fração lábil do mercúrio (Bloom, 1994; Lamborg *et al.*, 2003). No entanto, é importante considerar que muitas vezes um valor estritamente determinístico, diz respeito apenas a composição da amostra e pode não representar seu real efeito tóxico no ambiente, como é o caso da determinação do Hg_{total} .

Alguns estudos relacionados à toxicidade das espécies mercuriais em ecossistemas aquáticos foram realizados no sentido de verificar a influência da matéria orgânica, de ligantes e das modificações nas propriedades do meio, tais como a temperatura e pH, frente às respostas biológicas e/ou a distribuição de suas concentrações nos compartimentos água, sedimento e atmosfera (Jahanbakht *et al.*, 1998; Bloom, 1994). Para isso, foram utilizados testes de toxicidade e modelos de especiação relacionados a resultados analíticos obtidos por técnicas padronizadas. Os resultados demonstraram que a toxicidade estava diretamente relacionada com a especiação química do Hg e, que, parâmetros como Hg_{total} e Hg_{reativo} não corresponderiam a tais resultados (Pompei & Jardim, 1999; Janssen *et al.*, 2003; Jay *et al.*, 2005). Segundo Bloom (1994) e Lamborg *et al.* (2003), o Hg_{reativo} pode não ser um parâmetro analiticamente viável para representar biogeoquimicamente às formas mercuriais, já que sua concentração depende de uma série de escolhas operacionais arbitrárias como pH, tempo de acidificação e tempo de purga.

Mais recentemente, biossensores têm sido usados para converter respostas de um elemento biológico (enzima, DNA ou um microorganismo) em uma medida analítica quando expostos a alguns metais, podendo ser usados *in situ*, com resposta em até 30

min. Porém, os efeitos da matriz e/ou o sinergismo/antagonismo oriundos de outros metais, são poucos conhecidos (Bitton, 2005).

Barrocas (2004) e Ahmad *et al.* (2005), desenvolveram biossensores com o objetivo de determinar a espécie de Hg biodisponível em ambientes aquáticos. Barrocas (2004) utilizou a bactéria *E. coli* geneticamente modificado para produzir bioluminescência (luciferina-luciferase), a qual seria proporcional ao Hg^{2+} livre. Esse biossensor apresentou limite de detecção de 0,7 pM e ao ser aplicado em amostras de água naturais contaminadas com Hg, foi sensível a presença de matéria orgânica e a presença de ligantes como Cl^- e EDTA. Ahmad *et al.* (2005) usaram fosfatase alcalina bovina (AP) imobilizada no copolímero poly-(HEMA-co-BA), onde a presença de Hg^{2+} inibe a atividade da AP (medida colorimétrica), o biossensor respondeu em uma faixa linear de 1 a 5 mM de Hg^{2+} , porém não foi aplicado em amostras naturais. Os trabalhos mostraram-se promissores no que se refere à determinação de concentrações que realmente interagem com a biota, no entanto, é extremamente importante avaliar suas aplicabilidades.

Novos métodos para determinação das espécies mercuriais têm surgidos a cada ano, consequência do avanço de novas tecnologias e o melhor entendimento sobre as diferentes espécies e suas interações com a matriz analisada. Pode-se citar o desenvolvimento de sensores (Ahmad *et al.*, 2005; Kuswandi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008), método de geração de vapor de mercúrio usando fotocatalise (UV/TiO₂) com detecção *on line* por AFS e HPLC-AFS para especificação de Hg (Yin *et al.*, 2007), microextração em fase sólida com posterior detecção por cromatografia gasosa, que distingui as formas orgânicas e inorgânica de Hg (Díez & Bayona, 2008).

2.5. Ácido ascórbico como redutor de metais

O ácido ascórbico (AA) é uma substância orgânica simples que tem despertado grande interesse devido aos seus efeitos benéficos como vitamina. Apresenta fórmula molecular $C_6H_8O_6$ e fórmula estrutural de acordo com a Figura 2.6. Pertence a classes das vitaminas solúveis em água, conhecida como vitamina C, ácido *L*-ascórbico, ácido *L*-xyloascorbico, 3-oxo-*L*-gulofuranolactone. A elucidação desta estrutura estável para o ácido *L*-ascórbico deu-se em 1933 (Sawyer, 1982).

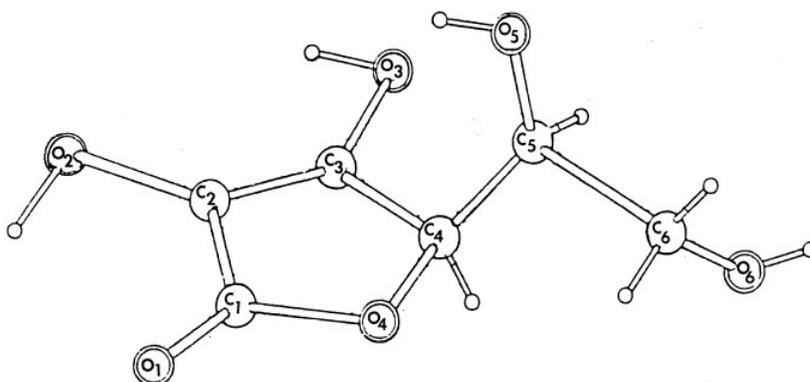
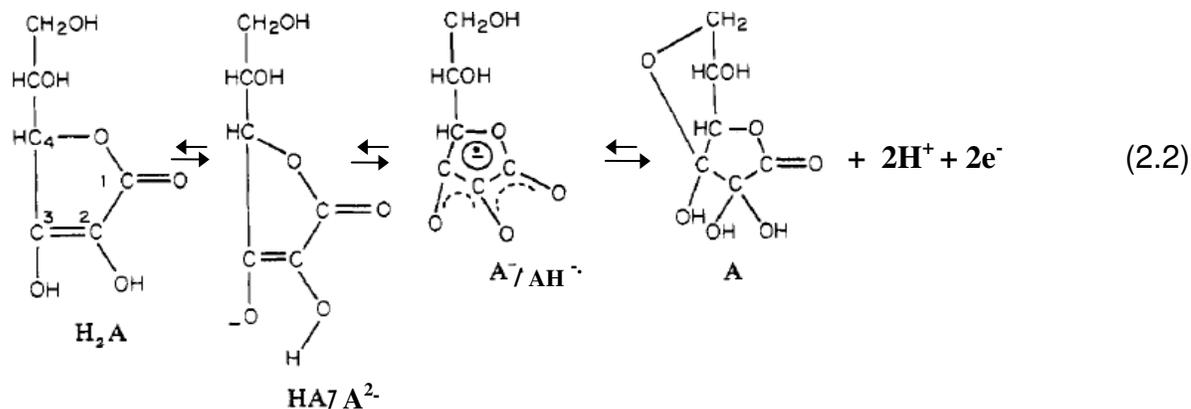


Figura 2.6: Ácido *L*-ascórbico.

A propriedade redox do ácido *L*-ascórbico é a principal característica química de interesse para estudos nas áreas da Química (Mehrotra, 1969; Sharma *et al.*, 1992; Kazakevicienė, 2007), Bioquímica, Farmacológica e Médicas (Stevens, 1982; Davies *et al.*, 1991; Dirks *et al.*, 1994; Silva, 2007).

Sua estrutura é caracterizada por um arranjo eno-diol que apresenta comportamento ácido-base após a primeira ionização no 3-hidroxil. O grupo diol do ácido *L*-ascórbico (AA), representado na Equação 2.2 como H_2A , é oxidado formando o ácido *L*-hidroascórbico (A). No equilíbrio os ânions (HA^- e A^{2-}) são estabilizados pela distribuição da carga através do sistema enona $O1=C1-C2=C3-O3$ (Davies *et al.*, 1991; Davies, 1992). A Equação 2.2 apresenta o sistema redox do AA, onde a formação de

radicais (HA^\cdot e A^\cdot) intermediários pode tornar o processo redox reversível sob condições específicas (Sawyer, 1982; Coichev & Fonaro, 1998).



Esta etapa é caracterizada pela perda de um elétron na formação do radical *L*-ascorbato intermediário (HA^\cdot), seguida da dissociação dessa espécie e formação do radical A^\cdot . No entanto, somente com a perda do segundo elétron que o ácido *L*-hidroascórbico (A) é formado. Porém, deve-se considerar que em meio aquoso, o ácido A predomina 99% na sua forma bicíclica hidratada (A_{bc}) com constante de equilíbrio relativamente elevada ($K = 6 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 2.7).

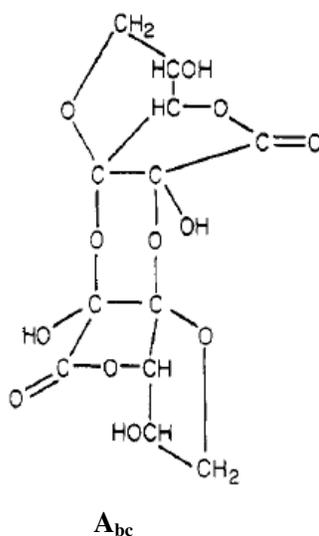


Figura 2.7: Forma bicíclica hidratada do ácido dehidroascórbico (A_{bc}).

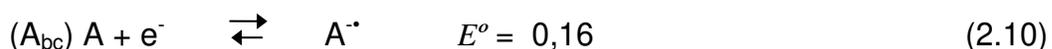
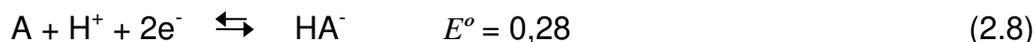
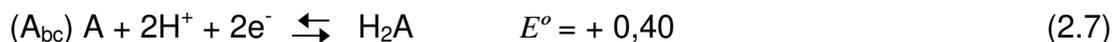
A reação de oxi-redução do ácido *L*-ascórbico e seus respectivos pares redox são influenciadas por reações de transferências simultâneas de prótons, já que para a oxidação total do AA, dois prótons e dois elétrons são perdidos (Coichev & Fonaro, 1998). Essa propriedade faz com que o AA e seus derivados sejam frequentemente estudados em mecanismo de transferência de elétrons (Coichev & Moya, 2006; Kazakevicienė, 2007).

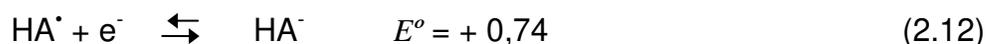
Assim, as propriedades ácido-base das espécies participantes do sistema redox do ácido *L*-ascórbico podem ser sumarizadas nas Equações 2.3 – 2.6.



Onde, HA^\bullet é o radical ascorbato intermediário entre $\text{HA}^- \leftrightarrow \text{A}^{2-}$ e; $\text{A}^{\bullet-}$ é a base conjugada de A (ácido dehidroascórbico). Verifica-se nesse equilíbrio que o AA é um ácido moderadamente fraco na perda do primeiro e do segundo hidrogênio. Já o HA^\bullet é um ácido forte comparado às demais espécies. No entanto, cada uma das espécies apresenta comportamento redox particular.

Valores do potencial padrão de redução estimado para o sistema A/AA têm sido estudados, principalmente no sentido de elucidar o potencial de redução das espécies intermediárias. As Equações de oxi-redução de algumas espécies estão representadas a seguir (Equações 2.7 – 2.12, sendo E° em V) (Tur'yan & Kohen, 1995; Creutz, 1981):



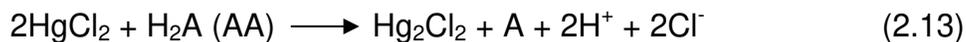


Devido a essa diferença de potencial entre as espécies, o uso do AA como redutor em soluções aquosas é bastante disseminado na literatura, sobretudo em estudos com complexos de íons metálicos (Mehrotra, 1969). Davies (1992), Coichev & Fonaro (1998) descrevem uma série de interações do AA com íons metálicos de transição, relatando sobre a instabilidade da maioria dos complexos formados e a influência do pH, da natureza do íon metálico e do ligante para a velocidade de reação de oxidação do AA. Mukerjee *et al.* (2006) também observaram a influência da concentração dos íons cloreto e do pH na reação de transferência de elétron entre AA e complexos moleculares.

Quanto à interação do Hg e AA, a cinética da reação de oxi-redução entre essas duas espécies tem sido investigada com diferentes objetivos, entre os quais estão: (i) estudos direcionados para o entendimento de sistemas de transferências de elétrons (Sharma *et al.*, 1992), principalmente no uso de eletrodo de mercúrio na oxidação do AA (Gasca *et al.*, 1981; Tur'yan & Kohen, 1995); (ii) desenvolvimento de métodos analíticos (Vitkun *et al.*, 1974; Mushran *et al.*, 1975; Stevens, 1982); e (iii) estudos relacionados com toxicidade do Hg (Blackstone *et al.*, 1974; Dirks *et al.*, 1994; Battke *et al.*, 2005).

Dados sobre o sistema redox AA e mercúrio, sugerem um mecanismo de transferência de elétron por esfera interna, onde envolve a formação de complexo intermediário (Davies, 1992) que, em geral, é influenciado pelo pH do meio. Dados cinéticos indicam uma reação de pseudo primeira ordem para a reação de oxidação do AA por Hg em excesso de AA e, de segunda ordem para uma variação menor de concentração (Mushran *et al.*, 1975; Sharma *et al.*, 1992). Mushran *et al.* (1975), descrevem a influência dos íons cloreto na diminuição da velocidade dessa reação em meio ácido (pH < 2,0) a 35°.

A estequiometria da reação em meio contendo íons cloreto em pH 2,0 está representada pela Equação 2.13 (Mushran *et al.*, 1975; Sharma *et al.*, 1992):



Onde, dois moles de HgCl_2 foram necessários para oxidar um mol de AA. Porém, em pH próximo a neutralidade, a formação do íon HA^- e, possivelmente, dos radicais $\text{HA}^\bullet/\text{A}^\bullet$ prevalecem sobre as demais espécies, fazendo com que a redução do Hg^{2+} para Hg^0 ocorra ao considerar a ordem das propriedades redutoras das espécies, sendo $\text{A}^{2-} > \text{HA}^- > \text{H}_2\text{A}$ (Sharma *et al.*, 1992). Tal interação justifica o uso tanto do AA quanto do Hg em estudos de transferência de elétrons.

No que tange à toxicidade do Hg e as propriedades do ácido ascórbico, Dirks *et al.* (1994) buscaram relacionar a aplicação intravenosa de ácido ascórbico, em indivíduos adultos com histórico de contaminação de Hg, com o aumento da excreção de Hg pela urina, o objetivo foi diminuir os efeitos tóxicos do metal em tais indivíduos. Segundo os autores essa relação tem sido estudada desde 1840 para diferentes organismos obtendo resultados promissores, porém o mecanismo pelo qual ocorre não é esclarecido. Outra relação interessante foi demonstrada por Battke *et al.* (2005) e Halbatch *et al.* (2008), na qual a presença de AA como fitoredutor em plantas aumentou a emissão de Hg^0 em sistemas hidropônicos contaminados com Hg^{2+} , principalmente em meio alcalino.

Concernente ao uso do AA como agente redutor na determinação de mercúrio descrito na literatura, têm-se desde técnicas titrimétrica usando azul de variamina como indicador, passando pela técnica indireta da determinação do excesso de AA, assim como no uso deste composto para aumentar a sensibilidade na determinação por AAS (Vitkun *et al.*, 1974; Mushran *et al.*, 1975).

Baseado no processo de redução do Hg pelo AA, o Laboratório de Química Ambiental – LQA já havia desenvolvido dois projetos de pesquisa (Projetos FAPESP 99/02212-6 e 02/03795-0) investigando a possibilidade do uso deste redutor de modo seletivo, propondo as bases de um método analítico que expressasse a concentração de Hg efetivamente tóxica baseada na redução das espécies mercuriais biodisponíveis. Sabia-se que soluções contendo a mesma concentração total de mercúrio, mas na presença de diferentes ligantes tais como cisteína, NTA, EDTA (ou diferentes

concentrações de um mesmo ligante) apresentava diferentes toxicidades para a bactéria *E. coli*. No entanto, quando estas soluções eram analisadas usando cloreto estano como redutor, todas elas forneciam a mesma concentração de Hg. Ou seja, não havia uma correlação entre os dados analíticos e as respostas biológicas observadas, uma vez que as bactérias respondiam diferentemente às soluções contendo os ligantes e a mesma concentração de Hg_{total}. Nestes estudos preliminares, foram testados diferentes redutores para as espécies mercuriais (cisteína, glicose e ácido ascórbico) utilizando a técnica de absorção atômica com geração de vapor de Hg a frio. Os resultados com ácido ascórbico mostraram-se promissores, considerando que dentre os redutores testados, apenas este composto foi sensível à presença dos diferentes ligantes em diferentes proporções. Tal método, porém, não foi analiticamente estabelecido devido às dificuldades de reprodutibilidade e de um sistema robusto (Pompei & Jardim, 1999).

O segundo projeto, em continuidade ao descrito acima, aplicou o mesmo princípio, usando ácido ascórbico como redutor, desta vez baseado em um método padronizado (EPA 1631) que utiliza a técnica de espectrofotometria de fluorescência atômica do vapor frio, consideravelmente mais sensível que a absorção atômica. O objetivo foi avaliar o ácido ascórbico como redutor seletivo das espécies mercuriais presentes naturalmente em ambientes aquáticos. Foi estabelecida uma curva analítica linear na faixa de 2 a 180 ng L⁻¹ de Hg, com posterior aplicação em amostras de águas de rio. No entanto, nessa concentração não foi possível a calibração com resultados de testes de toxicidade (Locatelli & Jardim, 2002).

O presente trabalho foi desenvolvido baseado nestes dois projetos anteriores, considerando as limitações apresentadas. Para isso, foi necessário a otimização e validação de uma técnica analítica que utilizasse o ácido ascórbico como redutor das espécies mercuriais potencialmente tóxicas, num intervalo de concentração que tornasse possível calibrar os resultados analíticos com resultados biológicos e posterior aplicação em amostras naturais. Os critérios utilizados estão descritos no item sobre os objetivos gerais e específicos propostos no Capítulo 1 deste trabalho.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

3.0. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Materiais e reagentes

As soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e água ultrapura $18 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (MilliQ). Foram usadas técnicas limpas de manipulação para análise de Hg (EPA, 1994; Fadini & Jardim, 2000; Bisinoti, 2005), assim como a utilização de sala limpa classe 100. As pipetas de transferências e os balões volumétricos utilizados foram devidamente calibrados e aferidos (erro < 0,3%).

- **Solução de ácido ascórbico 10% (m/v) em HCl 0,5% (AA), pH = 1,0 – 1,3** : usada como solução redutora, foi preparada a partir da pesagem do ácido ascórbico PA 99% (Synth), seguida da adição de 0,5% de ácido clorídrico PA 37% (Mallinkrodt) destilado sub-ebulição e completado o volume com água ultrapura. A quantidade de ácido clorídrico foi definida no projeto FAPESP 02/03795-0. Esta solução foi preparada no momento da análise e conservada em frasco de polietileno ao abrigo de luz.

- **Solução tampão fosfato (1,0 mol L⁻¹), pH = 6,8**: preparada pela dissolução de 136,1 g de KH₂PO₄ e 174,2 g de K₂HPO₄, seco em estufa a 130°C por 2h, para 1L de solução.

- **Solução padrão de Hg²⁺**: solução de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg²⁺, preparada a partir da diluição adequada da solução estoque marca AccuStandard[®], de concentração igual a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 10% HNO₃. Para preservação adicionou-se 50 μL / 100,0 mL de uma solução 0,5% m/v de íons Cr₂O₇²⁻ (K₂Cr₂O₇, Cinética Química) e 1,0 mL / 100,0 mL de HCl concentrado destilado sub-ebulição PA 37% (Mallinkrodt). Nas análises utilizando o método do ácido ascórbico, não foi adicionada a solução de íons Cr₂O₇²⁻, apenas adicionou-se o ácido clorídrico.

- **Solução de cloreto estanoso 10% (m/v) em HCl 10%**: usada como solução redutora na determinação do Hg_{reativo}, obtida pela pesagem do cloreto estanoso PA 99% (Synth) 10% (m/v) em HCl concentrado PA 37% (Mallinkrodt) destilado sub-ebulição 10% (v/v).

-
- **Solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹**: preparada pela adição de 5,4 mL de ácido sulfúrico 95-97% (Merck) em 1,0 L água ultrapura.

 - **Solução padrão de carbonato/bicarbonato de Na**: utilizada na curva analítica na determinação de carbono inorgânico (CI) e CO₂ (determinado no teste de toxicidade respirométrico com *E. coli*). A solução foi feita a partir de uma solução de carbono inorgânico 1000 mg C L⁻¹, preparada pela mistura de 3,5 g de bicarbonato de Na e 4,41 g de carbonato de Na, previamente calcinado em mufla a 285 °C por 1h, diluído em água ultrapura.

 - **Solução de ácido húmico (AH)**: Utilizou-se sal de ácido húmico – Na (Aldrich), fez-se uma solução 10 g L⁻¹ em água ultrapura para posteriores diluições.

 - **Solução de cisteína (Cys)**: solução aquosa 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de cisteína PA 98% (Sigma).

 - **Solução de histidina (Hys)**: solução aquosa 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de histidina PA 99% (Merck).

 - **Solução de ácido nitriloacético (NTA)**: solução aquosa 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de ácido nitrilotriacético (BDH).

 - **Meio de cultura mínimo (MCM)**: foi utilizado como meio de crescimento para a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) nos testes de toxicidade. Foram dissolvidos em 400 mL de água destilada, 3,5 g de fosfato monobásico (Cinética Química); 1,5 g de fosfato dibásico (Vetec); 0,5 g de sulfato de amônio (Nuclear); 0,05 g de sulfato de magnésio heptahidratado (Cinética Química) e 0,25 g de citrato de sódio (Nuclear). Esta solução foi levada até a ebulição usando microondas, seguida da adição de 100 mL de uma solução de glicose 10% (m/v) (Synth) previamente fervida. O pH foi ajustado para 7,1 usando hidróxido de sódio 4,0 mol L⁻¹.

-
- **Solução de sulfato de bário para escala de McFarland:** solução utilizada como padrão para inóculo da bactéria *Escherichia coli*, feita a partir de misturas adequadas de uma solução de cloreto de bário $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Carlo Erba) diluída em uma solução 1% de ácido sulfúrico 95-97% (Merck) (v/v). Esses padrões foram calibrados com seus respectivos valores de absorvância em 550 nm e contagem de placa das unidades formadoras de colônias, segundo Murray *et al.* (1995) e Karlson *et al.* (1972).
 - **Solução de hidróxido de sódio $4,0 \text{ mol L}^{-1}$:** preparada pela diluição adequada de hidróxido de sódio PA 99% (Allkimia[®]) em água ultrapura.
 - **Água de diluição:** utilizada nos testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis*. Consiste em água (superficial ou subterrânea não contaminada) filtrada em rede de plâncton com malha de 30 a 45 μm , apresentando dureza, alcalinidade, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica constantes ou variações mensais menores que 10% de suas respectivas médias, além de variações de pH menor que 0,7 unidades em relação a sua média. A padronização desses parâmetros foi feita de acordo a norma ABNT NBR 12713 (ABNT, 2004) utilizada neste trabalho.

3.2. Parâmetros físico-químicos

- **pH:** foi determinado empregando-se um pHmetro Tai Orion (PerpHect 370) devidamente calibrado (soluções tampões pH 4,0 e 7,0 da Synth).
- **Potencial redox (E_H):** foi determinado utilizando-se um eletrodo redox de platina combinado com eletrodo de referência Ag, AgCl, KCl ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$) da marca Analyser 6A05-JB acoplado ao medidor multiparâmetro da Thermo Orion 250A. Antes de cada medida o equipamento foi calibrado com uma solução tampão redox de sulfato ferroso de amônio e sulfato férrico amoniacal (+475 mV, 25 °C). Todos os valores de potencial redox foram corrigidos para o eletrodo padrão de hidrogênio (E_H) somando-se +220 mV (Light, 1972).

- **Condutividade elétrica e oxigênio dissolvido (O₂):** foram determinados empregando um medidor multiparâmetro WTW modelo multi 340i, calibrados segundo manual do equipamento, usou-se soluções padrões de eletrólitos e o acessório de calibração com ar saturado com vapor d'água, respectivamente.
- **Carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI):** foram quantificados pela técnica de oxidação catalítica em alta temperatura utilizando um equipamento TOC V CPN da Shimadzu, com detector de infravermelho não dispersivo para CO₂ e, operação para detecção de carbono total, inorgânico e orgânico.
- **Material em suspensão (MS):** foi determinado por gravimetria, usando filtros de éster de celulose 0,45 µm (MFS – Advantec).

3.3. Determinação do Hg_{reativo}

A determinação do Hg_{reativo} foi realizada em um analisador de mercúrio por absorção atômica do vapor frio (CVAAS), marca Buck Scientific – 400A, acoplado ao sistema de injeção por fluxo (FIA) conforme descrito por Pasquini *et al.* (1988). Nesse sistema, uma solução de SnCl₂ 10% (m/v) (Synth) em HCl 10% (v/v) (Mallinkrodt) é usada como fluido carregador e reagente. O fluido carregador transporta a amostra para a cela de separação gás/líquido por uma única linha. Na cela há a introdução do gás de arraste (N₂) que carrega o Hg⁰ para a cela de detecção do equipamento (em uma vazão de 0,2 L min⁻¹). A limpeza da cela de detecção é feita através de vácuo. Os sinais obtidos são registrados em um registrador (Linear – LR93025) conectado ao equipamento. O Hg_{reativo} foi determinado em todas as situações em que foi aplicado o método proposto com ácido ascórbico a fim de comparar os resultados obtidos por AA com valores determinados por um método já estabelecido.

3.4. Desenvolvimento experimental do método proposto

3.4.1. Otimização do método para a determinação do Hg usando AA como redutor (Hg_{AA})

O método proposto neste trabalho está baseado na redução do mercúrio por uma solução 10% de ácido ascórbico (m/v) (Synth) em HCl 0,5% (v/v) (destilado sub-ebulição), com posterior detecção do Hg⁰ por um sistema FIA disposto de forma similar ao sistema usado na determinação do Hg_{reativo} por CVAAS, ou seja, para cada parâmetro (Hg_{reativo} e Hg_{AA}) foi utilizado diferentes sistemas FIA, porém, o mesmo dispositivo de detecção. Para tal, o sistema proposto foi otimizado avaliando-se: (i) a cinética da reação entre o ácido ascórbico e o Hg; (ii) o volume de amostragem; (iii) o fluido carregador; (iv) a concentração da solução redutora; (v) e o pH.

Os estudos preliminares do tempo de reação entre o AA e o Hg foram realizados em padrões de 0,0 a 20,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺, para uma concentração fixa de 0,28 mol L⁻¹ de AA, em pH ácido (entre 2-3) e intervalos de leituras do Hg⁰ de 0, 25, 45 e 60 min. A partir desses resultados, fixou-se o tempo de reação e variaram-se os demais parâmetros.

A avaliação da influência do pH foi estudada na faixa de concentração de Hg de 0,0 – 60,0 µg L⁻¹, em pH ácido (2,0 ± 0,3, concernente ao HCl), tampão fosfato (pH = 6,4 ± 0,1) e básico (entre 9-9,6 pela adição de NaOH).

Modificações na alça de amostragem e ensaios para definir o fluido carregador do sistema FIA nas medidas de Hg_{AA} foram realizados no sentido de melhorar a sensibilidade da resposta analítica, já que o sinal analítico nos estudos preliminares mostrou-se inferior aos obtidos para o Hg_{reativo}. Assim, foram testados diferentes volumes da alça de amostragem (0,5, 1,0 e 2,0 mL) e a definição do fluído carregador deu-se com água deionizada, com a própria solução redutora e com ar.

Após estabelecer o tempo de reação, o volume a ser amostrado, a solução de arraste e o pH, estudou-se a cinética da reação ao se variar a concentração do agente redutor entre 0,003 – 0,067 mol L⁻¹. Após a otimização foi utilizado o sistema FIA disposto na Figura 4.7 no Capítulo 4.

3.4.2. Influência da concentração e da natureza do ligante na determinação do Hg_{AA}

A influência da concentração e da natureza de diferentes complexantes na determinação do Hg, usando AA como redutor, foi estudada em duas etapas. Na primeira etapa, o método foi empregado em diferentes soluções aquosas contendo $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e complexantes tais como Cys, NTA e AH em diferentes proporções metal:ligante. Os ligantes foram escolhidos baseados em estudos sobre a influência de diferentes ligantes na toxicidade do Hg (Mohapatra *et al.*, 1997; Divine, 1999) e considerando suas respectivas constantes de estabilidade, apresentadas na Tabela 3.1. O intuito foi verificar a relação da concentração de Hg_{AA} determinada nessas soluções com os valores das constantes de formação dos respectivos complexos. Basicamente avaliar se os valores de Hg_{AA} poderiam estar relacionados com as constantes de formação dos complexos, comprovando a seletividade do ácido ascórbico como redutor das diferentes espécies formadas.

Tabela 3.1: Constantes de estabilidade para os ligantes, cisteína, histidina, NTA e ácido húmico (Sillén & Martell, 1964; Stary & Kratzer, 1988; Ravichandran, 2004).

Ligantes	Fórmula	Constante de estabilidade (log K_1)	Log β^{**}
Cisteína (H_2L)	$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	43,57 ^(a)	$\beta_2 = 40,0$
Histidina (HL)	$H(C_3H_2N_2)CH_2CH(NH_2)COOH$	15,0 ^(b)	$\beta_2 = 21,2$
NTA (H_3L)	$N(CH_2COOH)_3$	14,3 ^(b)	$\beta_2 = 14,6$
Ácido húmico	AH, AF e Humina*	18 – 28 ^(c)	-

(a) Em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ – KNO_3 , 25 °C; (b) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ – $NaClO_4$, 25 °C; (c) experimentos realizados em substâncias húmicas aquáticas com diferentes métodos de extração da DOM em \neq pH.

* AH (ácido húmico), AF (ácido fúlvico) e Humina apresentam alto teor de grupos carboxílicos, hidroxilas fenólicas e carbonilas de vários tipos; ** β = constante de estabilidade progressiva.

Na segunda etapa, após a realização dos testes de toxicidade, o método foi empregado em amostras do meio de cultura estéril, em água deionizada e meio de cultura incubado com a bactéria *E. coli*. Nessa etapa, o objetivo foi correlacionar as respostas analíticas do método proposto com as respostas biológicas dos testes de toxicidade e, verificar se o meio de cultura influenciaria nas medidas analíticas. Em cada amostra foram adicionadas quantidades específicas de soluções de Cys, Hys, NTA e AH nas mesmas proporções metal:ligante já estabelecidas na primeira etapa, porém, desta vez, a concentração de Hg_{total} em cada amostra foi de $50,0 \mu g L^{-1}$ (baseado na curva de EC_{50} dos testes de toxicidade com *E. coli*). O $Hg_{reativo}$ foi determinado em soluções com as mesmas proporções metal:ligante para avaliar a relação desse parâmetro com a concentração de Hg biodisponível. As condições de análises em cada etapa estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições analíticas para avaliação da seletividade do ácido ascórbico na redução do Hg frente aos ligantes (L) NTA, Cys, AH e Hys. A = pH ácido < 3,0 e N ~ pH neutro (tampão fosfato do meio de cultura, pH= $6,8 \pm 0,2$).

		[L] na solução de trabalho ($mol L^{-1}$)	[Hg] _{total} ($mol L^{-1}$)	Relação Hg:L	Tempo de interação Hg:L	pH
1ª ETAPA (1)	NTA	5×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-7}$	1:1; 1:5; 1:50	20 min	A
	Cys	5×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-7}$	1:1; 1:5; 1:50	20 min	A
	AH	10,0 ⁽³⁾	$1,5 \times 10^{-7}$	1:100; 1:200; 1:10 ³ ; 1:10 ⁶	20 min	A
	Hys	5×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-7}$	-	-	-
2ª ETAPA (2)	NTA	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-7}$	1:1; 1:5; 1:50	-	A/N
	Cys	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-7}$	1:1; 1:5; 1:50	-	A/N
	AH	10,0 ⁽³⁾	$2,5 \times 10^{-7}$	1:100; 1:200; 1:10 ³	-	A/N
	Hys	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-7}$	1:1; 1:5; 1:50	-	A/N

(1) Experimentos realizados em meio aquoso (água deionizada); (2) Experimentos realizados em meio aquoso, meio de cultura estéril e meio de cultura incubado; (3) A concentração da solução de trabalho de AH foi de $10,0 g L^{-1}$, seguida das diluições necessárias para as proporções em $\mu g L^{-1}$ de Hg:AH.

3.4.3. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade com a bactéria *Escherichia coli* (amostras com diferentes ligantes)

- Sistema FIA-condutimétrico usado no teste de toxicidade

O teste respirométrico foi feito segundo a técnica descrita por Jardim *et al.* (1990) e Jardim *et al.* (1993), adaptada. Esta técnica mede o CO₂ liberado na respiração microbiana por meio de um sistema FIA condutimétrico, segundo mostra a Figura 3.1. O sistema consiste de uma bomba peristáltica (Ismatec – MS Reglo), uma válvula para injeção/comutação da amostra, uma cela de difusão, uma cela de condutividade e um condutivímetro (Tecnal/Digimed – CD 20). Os sinais obtidos no condutivímetro eram enviados para um registrador (ECB – RB 201). Este sistema é baseado na difusão de CO₂ da amostra através de uma membrana de Teflon[®] (cela de difusão) para um fluxo de água ultrapura (fluxo que passa por colunas de troca iônica em direção a cela de condutividade). O CO₂ ao entrar no fluxo receptor de água ultrapura, reage produzindo os íons H⁺ e HCO₃⁻, gerando um gradiente de condutividade na cela, o qual é registrado.

Entre o injetor/comutador e a cela de difusão a amostra entra em contato com uma solução ácida (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) que faz com que o equilíbrio da reação da Equação 3.1 seja deslocado para a formação do CO₂.



A concentração de CO₂ foi calculada a partir de uma equação polinomial de segunda ordem, baseada na altura dos picos gerados a partir dos padrões de 100; 300; 500; 700; 1000; 2000; 3000 e 4000 μmol L⁻¹ de CO₂ (Apêndice I).

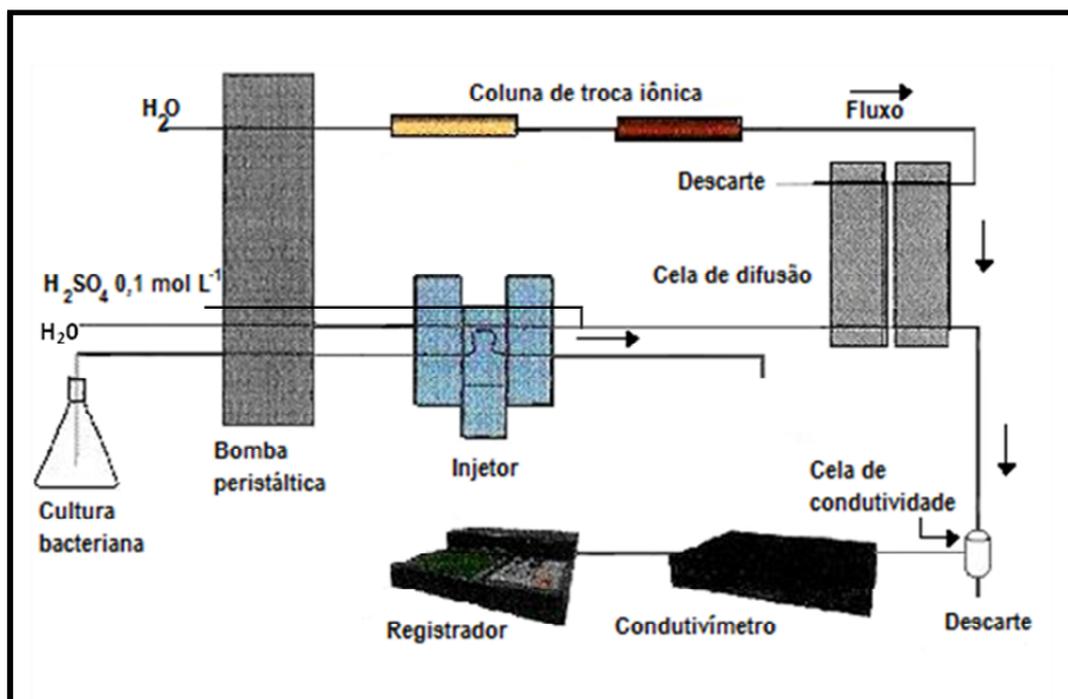


Figura 3.1: Sistema FIA condutimétrico utilizado para determinar a concentração de CO₂ na suspensão bacteriana nos testes de toxicidade respirométrico com *E. coli*. O CO₂ contido na amostra difunde através de uma membrana de Teflon®, na cela de difusão, para o fluxo receptor formando um gradiente de condutividade.

• Teste de toxicidade respirométrico

Neste teste de toxicidade foi utilizado o meio de cultura mínimo (MCM) como nutriente para a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922 – Fundação Tropical/Campinas), descrito no item reagentes. A inibição da respiração do microorganismo foi determinada medindo o CO₂ liberado na respiração microbiana usando-se o sistema FIA condutimétrico descrito acima.

O inóculo de estoque bacteriano foi feito em 70,0 mL do MCM, onde foram adicionadas três alças de platina de 2,0 mm de diâmetro preenchidas com *E. coli*, retiradas do meio NA (Agar Nutriente) original. O inóculo foi feito em capela de fluxo

laminar para ensaios microbiológicos. O tempo de incubação foi de 15 ± 1 h, em banho a 37°C (Fanem[®] - BM 100).

O início do teste de toxicidade deu-se com a transferência de alíquotas da suspensão bacteriana incubada anteriormente, para uma quantidade maior do meio de cultura estéril, até atingir a concentração de $400 \pm 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CO_2 no meio aquoso. Em seguida, com auxílio de uma proveta, 50,0 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para erlenmeyers previamente autoclavados. Os ensaios de toxicidade foram sempre realizados medindo-se a inibição da respiração de uma suspensão bacteriana controle frente às suspensões nas quais foram adicionadas o agente estressante e os complexantes. As leituras foram feitas a cada 30 min, durante 2h. Durante todo o ensaio as amostras foram mantidas em banho a 37°C .

A necessidade de realizar diversos testes de toxicidade cujas respostas fossem comparáveis inter-dias, tornou essencial o controle do crescimento inicial da população bacteriana. Esse controle foi feito tanto pela concentração inicial de CO_2 através do sistema FIA, quanto pelo uso da escala de McFarland. A escala de McFarland Standard foi utilizada por ser um método usado para padronizar inóculo de microorganismo frente à turbidez de uma escala de padrões de sulfato de bário medida em comprimentos de ondas que variam de 420 a 600 nm. A turbidez medida estima a concentração da suspensão bacteriana em unidade formadora de colônia por mL (UFC mL^{-1}), padronizada por contagem em placa (Murray *et al.*, 1995; Bier, 1985).

Para verificar a repetibilidade do crescimento bacteriano no MCM nos ensaios inter-dias (avaliando a estabilidade do organismo teste) utilizou-se como substância de referência (biocida) uma solução de tetraciclina $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Esta solução foi, posteriormente, substituída pela amostra de MCM contendo $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, a qual apresentou o mesmo comportamento de crescimento bacteriano durante os ensaios.

A priori os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de mercúrio ($5,0$; $10,0$; $15,0$; $30,0$ e $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$) para definir a concentração efetivamente tóxica para 50% da população bacteriana (EC_{50}), e assim, definir a concentração de trabalho que apresentasse uma porcentagem de inibição significativa. A partir disso, os testes com

Hg na presença dos complexantes foram realizados de acordo com as condições analíticas apresentadas na Tabela 3.2 (2ª etapa de experimentos) em pH ~ neutro.

Assim, com exceção das amostras controles e os brancos, as demais amostras foram contaminadas com uma concentração de Hg_{total} de $50 \mu g L^{-1}$ (EC₁₀₀ da *E. coli*), seguindo a seguinte ordem de medida:

- MCM sem bactéria (branco do teste);
- suspensão bacteriana controle (controle padrão 1 de crescimento);
- suspensão bacteriana com o complexante (branco do complexante);
- suspensão bacteriana com Hg ou tetraciclina (substância de referência);
- suspensão bacteriana com complexante + Hg (amostra) e
- suspensão bacteriana controle (controle padrão 2 de crescimento).

A calibração com os resultados analíticos foi feita utilizando uma curva de correlação entre os valores de porcentagem de inibição da respiração bacteriana (%IRB) frente os valores de Hg determinado usando AA (Hg_{AA}) e $SnCl_2$ ($Hg_{reativo}$). A finalidade foi verificar qual desses parâmetros estaria diretamente relacionado com os valores de %IRB, representando, assim, a parcela tóxica do metal.

3.4.4. Aplicação do método proposto em amostras de águas naturais (lagos, igarapés e rios)

Uma vez estabelecida a correlação entre a resposta analítica de Hg redutível por ácido ascórbico (Hg_{AA}) frente as respostas dos ensaios de toxicidade na presença de complexantes, o método foi testado em diferentes amostras de águas naturais. Foram utilizadas amostras coletadas em quatro campanhas, provenientes de diferentes ecossistemas aquáticos, impactados e não impactados. As análises preliminares, de caráter exploratório, foram realizadas em amostras coletadas na última campanha do projeto temático denominado “Fluxo do mercúrio na bacia do rio Negro – Amazônia” (mantidas refrigeradas e ao abrigo de luz) e em amostras lacustres coletadas no Parque

Hermógenes Leitão (nas cercanias da UNICAMP). A segunda campanha foi realizada em igarapés e rios da Amazônia com apoio do laboratório de Química Ambiental da CPPN – INPA (Manaus – AM) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Já as terceira e quarta amostragens foram feitas em corpos aquáticos da região metropolitana de Campinas. A Tabela 3.3 apresenta os dados das campanhas de amostragem.

Tabela 3.3: Descrição das campanhas de amostragem.

Campanha	Local	Data	Localização
1	Rio Tarumã (AM1)	01/04	60° 03' W e 01° 54' S – AM
	Rio Tarumã (AM2)	12/04	60° 03' W e 01° 54' S – AM
	Lago Fernadola (AM3)	12/04	62° 56' W e 00° 46' S – AM
	Lago Hermógenes Leitão (CP1)	07/07	47° 04' W e 22° 48' S – Cam
2	Rio Negro 1 (AM4)	08/07	60° 08' W e 03° 04' S – AM
	Rio Negro 2 (AM5)	08/07	60° 09' W e 03° 03' S – AM
	Rio Solimões 1 (AM6)	08/07	59° 53' W e 03° 08' S – AM
	Rio Solimões 2 (AM7)	08/07	59° 52' W e 03° 10' S – AM
	Igarapé Km 30, BR 174 (AM8)	08/07	59° 59' W e 02° 06' S – AM
	Igarapé Mariano Vivenda Pontal (AM9)	08/07	60° 04' W e 02° 57' S – AM
	Igarapé Mariano, Km 6, AM 10 (AM10)	08/07	60° 00' W e 02° 56' S – AM
Reserva Sauim Castanheiras (AM11)	08/07	59° 56' W e 03° 08' S – AM	
3	Ribeirão Anhumas (CP2)	10/07	47° 05' W e 22° 46' S – Cam
	Rio Atibaia (CP3)	10/07	47° 09' W e 22° 44' S – Cam
	Ribeirão das Pedras Nascente (CP4)	10/07	47° 03' W e 22° 51' S – Cam
	Ribeirão das Pedras B. Geraldo (CP5)	10/07	47° 04' W e 22° 49' S – Cam
4	Ribeirão Anhumas (CP2)	02/08	47° 05' W e 22° 46' S – Cam
	Rio Atibaia (CP3)	02/08	47° 09' W e 22° 44' S – Cam
	Ribeirão das Pedras Nascente (CP4)	02/08	47° 03' W e 22° 51' S – Cam
	Ribeirão das Pedras B. Geraldo (CP5)	02/08	47° 04' W e 22° 49' S – Cam

As amostras foram coletadas em garrafas de polietilenotereftalato (PET) comercializadas com água mineral, como proposto por Fadini & Jardim (2000). Após o descarte da água mineral, retirada do rótulo e lavagem exaustiva com água ultrapura, as garrafas foram embaladas em três sacos de polietileno, sendo abertas apenas no momento da coleta. Durante as coletas foram usadas luvas de polietileno, as garrafas foram lavadas com a própria amostra várias vezes e preenchidas com amostras de águas superficiais. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso no que se prefere à estocagem de amostras para determinação de Hg em baixas concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{ng L}^{-1}$), assim como para coletas de amostras de águas destinadas para diferentes espécies mercuriais, tais como Hg_{total} , $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ e $\text{Hg}_{\text{orgânico}}$ (Hall *et al.*, 2002; Bisinoti, 2005).

Foram coletados 2,0 L de amostra, dos quais 500,0 mL foram filtrados e conservados para posterior análise. As amostras foram conservadas refrigeradas ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo de luz (embaladas com papel alumínio).

Foram determinados nas amostras *in natura* os seguintes parâmetros: pH, potencial redox (E_{H}), carbono orgânico total e o inorgânico (COT e CI), condutividade elétrica, temperatura, material em suspensão (MS) e oxigênio dissolvido (O_2).

O mercúrio redutível por AA (Hg_{AA}) e mercúrio redutível por SnCl_2 ($\text{Hg}_{\text{reativo}}$) foram determinados em amostras filtradas ($0,45\mu\text{m}$) e não filtradas, ambas enriquecidas com mercúrio em concentrações que variaram de 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} . Aguardou-se entre zero e 1h de interação entre o Hg adicionado e a amostra de água, nesse intervalo não houve diferença na resposta analítica, após esse tempo o redutor foi adicionado na mistura, então, o Hg_{AA} foi determinado de acordo com as condições otimizadas. A influência da concentração da matéria orgânica foi estudada em amostras enriquecidas com 5,0 mg L^{-1} de ácido húmico.

3.4.5. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade turbidimétrico com a bactéria *Escherichia coli* (amostras naturais)

Esse ensaio foi adaptado para substituir o respirométrico, devido à interferência no sinal analítico ocasionado pelas altas concentrações de carbono inorgânico contidas

nas amostras impactadas. Contudo, foi usado o mesmo microorganismo (*E. coli*) e o mesmo método de padronização e incubação pré-estabelecidos no ensaio respirométrico.

Considerando que o método turbidimétrico é somente aplicável a suspensões bacterianas relativamente densas, deve-se atentar para o fato de que o valor obtido não depende somente do número de partículas, como também de seu tamanho e de sua translucidez. Por esta razão, a medida deve ser feita em comparação com um padrão previamente relacionado a uma suspensão bacteriana aferida por contagem em placa (Murray *et al.*, 1995; Bier, 1985).

Devido aos fatores mencionados anteriormente, o teste de toxicidade usado neste trabalho, foi baseado na escala de McFarland, onde foram usados padrões de sulfato de bário correspondentes a 0,25; 0,5; 1; 3; 5; 7 e 10 da escala de McFarland. Recomenda-se que seja feito pelo menos um teste com contagem de placa para padronizar os padrões. Desta forma, o primeiro teste foi realizado para acompanhar o crescimento bacteriano no MCM. A cada medida da turbidez fez-se o plaqueamento para a calibração da escala. A partir de então, os demais testes foram acompanhados somente com os padrões de sulfato de bário feitos a cada teste de toxicidade.

Foram testados dois métodos para acompanhar o crescimento bacteriano por turbidimetria em $\lambda = 550$ nm (λ escolhido após testes de estabilidade). No primeiro método utilizou-se cubeta de 10,0 mm nas leituras no espectrofotômetro (JENWAY, modelo 6405). Cada leitura foi realizada manualmente (leitura discreta) após a amostra controle atingir a absorvância inicial estipulada em 0,030 abs, em intervalos de 30 e/ou 60 min. Os tempos de ensaios foram de 4, 6 e 8h de teste estático até se obter o melhor tempo de resposta de inibição do crescimento bacteriano, expresso em %ICB.

No segundo método, fez-se o mesmo controle do crescimento inicial bacteriano do método anterior, porém foi utilizado um sistema FIA de linha única para o transporte da amostra até o caminho óptico. As leituras foram feitas em uma célula de quartzo de 10,0 mm (marca Hellma) de fluxo contínuo, acoplada a um espectrofotômetro (Micronal, modelo B382), sendo que o feixe de luz passa exatamente por um orifício de 1,0 mm de diâmetro, conforme apresentado na Figura 3.2. As leituras foram feitas a cada 30 min

durante 6 e 8h de ensaio estático. Este sistema foi montado em conjunto com o grupo do Laboratório de Processos Oxidativos da FEC-UNICAMP.

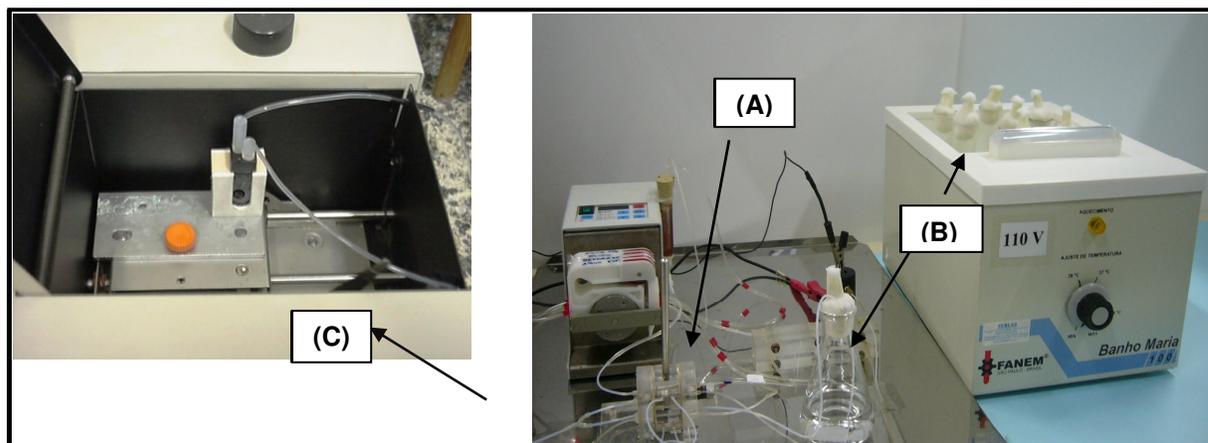


Figura 3.2: Sistema utilizado nos teste de toxicidade com *E. coli*, usando: (A) FIA – turbidimétrico, (B) amostras e (C) espectrofotômetro com a cela de fluxo acoplado em destaque.

Ensaio de toxicidade com bactéria em águas naturais geralmente são realizados por contagem de placa, luminescência ou colorimetria, os quais apresentam suas vantagens e desvantagens. Porém, o uso direto do parâmetro turbidez não é um método usual devido a uma série de interferentes contidos na amostra, principalmente cor e material em suspensão (Leite & Morita, 1999; Parvez *et al.*, 2005). No entanto, para aproveitar a forma padronizada de crescimento da *E. coli* e a estrutura do laboratório, foi proposto e padronizado neste trabalho, um método de incubação em amostras naturais para leitura da turbidez. O método consiste em um período de incubação de 16h no meio de MCM. Após esse período, retiraram-se alíquotas do meio incubado e foram adicionadas imediatamente em erlenmeyrs contendo 50,0 mL de:

- MCM (controle 1 de crescimento padrão da bactéria);
- MCM + Hg (amostra de referência, para verificar a sensibilidade da bactéria);
- amostra *in natura* controle (para verificar o crescimento bacteriano na amostra);

- amostra *in natura* + Hg (verificar a influência do Hg no crescimento na amostra);
- brancos do MCM e da amostra sem bactéria foram mantidos nas mesmas condições para avaliação de possíveis contaminações.

O pH de todas as amostras foi ajustado com tampão fosfato para $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$ e foram mantidas em banho a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A calibração com os resultados analíticos foi feita utilizando curva de correlação entre os valores de porcentagem de inibição do crescimento bacteriano nas amostras de águas naturais (%ICB) frente os valores de Hg determinado usando AA (Hg_{AA}) e SnCl_2 ($\text{Hg}_{\text{reativo}}$).

3.4.6. Calibração dos resultados analíticos utilizando testes de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia similis* (amostras naturais)

Os testes de toxicidade com *Daphnia similis* foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia (UNICAMP/CESET/LIMEIRA), usando-se a norma ABNT NBR 12713 (ABNT, 2004). O procedimento caracteriza-se por teste estático, conduzido por 48 h na ausência de luz, com neonatos de 8 – 12 h de vida de *Daphnia Similis* como organismos testes. Os neonatos foram aclimatados em água de diluição pelo menos 4 h antes do início do teste. Alíquotas de 50,0 mL de cada amostra foram colocadas em recipientes individuais de polietileno (em triplicata), seguida da adição de cinco neonatos. Amostras controles foram feitas com água de diluição. Os resultados foram expressos em EC_{50} (concentração efetiva que apresenta efeito deletério para 50% da população teste) de imobilidade ou morte do organismo, contados com auxílio de um contador de colônia. A calibração com os resultados analíticos foi feita utilizando curva de correlação entre os valores de porcentagem de imobilização/morte dos organismos testes, frente os valores de Hg determinado usando AA (Hg_{AA}) e SnCl_2 ($\text{Hg}_{\text{reativo}}$).

3.5. Programa de proficiência do LQA para análise de mercúrio

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o Laboratório de Química Ambiental (LQA) participou de dois programas de proficiência para determinação de Hg_{total} em amostras de peixes e de água.

No período de janeiro de 2002 a março de 2006 foi realizado o Mercury Quality Assurance Program pela Canadian Food Inspection Agency (Manitoba – Canadá). A cada 3 meses, 4 amostras de peixe liofilizadas e enlatadas foram recebidas e analisadas conforme sugerido no site do próprio programa (www.inspection.gc.ca). A determinação de Hg_{total} foi realizada em triplicata e em dois dias diferentes. As amostras foram abertas com auxílio de um abridor de latas, seguida da pesagem de 0,1 – 0,5 g da amostra em erlenmeyers (previamente limpos em banho ácido), onde foram adicionados 5,0 mL da solução ácida (1,0 mL de HNO_3 e 4,0 mL de H_2SO_4). A amostra foi levada ao aquecimento a 60 °C por 2 h até a digestão completa (o digerido deveria estar claro), após o resfriamento, foram adicionados lentamente 15,0 mL de $KMnO_4$ 6% (m/v) com agitação contínua em banho de gelo, mantendo-se em repouso por 12h. Para o excesso de permanganato de potássio foi adicionado, lentamente, H_2O_2 30 % (v/v) até solução ficar clara. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde o volume foi ajustado para 50,0 mL com água ultrapura. As leituras de Hg_{total} foram determinadas por emprego de um sistema FIA acoplado ao CVAAS, descrito no item para determinação de $Hg_{reativo}$.

Em junho de 2006 e outubro de 2008, foi realizado o Programa de Ensaio de Proficiência pelo SENAI-CETIND (PEP) em conjunto com o Programa Brasileiro de Metrologia em Química. A participação nesse programa foi por intermédio da Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, para o parâmetro Hg_{total} em água. A determinação do Hg_{total} foi realizada pela redução das espécies mercuriais pela ação do cloreto estanoso (10% de $SnCl$ em HCl 10%), em amostra que sofreram digestão oxidativa. A digestão oxidativa foi feita a temperatura ambiente, pela adição de 10,0 mL L^{-1} de uma solução de cloreto de bromo 0,02 mol L^{-1} durante 30 min (Szakács *et al.*, 1980), seguida da adição de 4,0 mL L^{-1} de cloridrato de hidroxilamina 30 % (m/v) que

promove a redução do excesso de cloreto de bromo, aguardou-se 5 min até a quantificação, na qual foi utilizado o mesmo sistema FIA e equipamento (CVAAS) descritos no ensaio de proficiência anterior.

3.6. Tratamento de resíduo gerado neste trabalho

Todos os resíduos contendo mercúrio e estanho foram tratados por precipitação com hidróxido de sódio, seguindo a recomendação da comissão de segurança do IQ-UNICAMP. A maioria dos íons metálicos é precipitada como hidróxidos ou óxidos em pH básico, sendo necessário controlar cuidadosamente o pH, devido a redissolução do precipitado em excesso de base. A Tabela 3.4 mostra os intervalos de pH recomendados para precipitação dos cátions tratados.

Tabela 3.4: Intervalo de pH recomendado para precipitação dos cátions de Hg e Sn.

Cátions	Faixa (pH)
Hg ⁺	8 → 9
Hg ²⁺	8 → 9
Sn ²⁺	7 → 8
Sn ⁴⁺	7 → 8

Fonte: Joyce (1984).

Após a precipitação e decantação, o sobrenadante foi retirado, e o excesso foi filtrado com papel de filtro. O precipitado foi seco em estufa e enviado à comissão de segurança da UNICAMP para estoque em menor volume.

**RESULTADOS
E
DISCUSSÃO**

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da técnica para determinação do Hg_{AA}

O método proposto foi otimizado de acordo com o conjunto de experimentos descritos no capítulo anterior (item 3.4). Na primeira etapa do trabalho, buscaram-se as condições que apresentariam melhor sensibilidade analítica.

Sabendo-se que as reações de oxi-redução entre o AA e íons ou complexos metálicos ocorrem numa ampla faixa de pH, entre 2 e 8 (Davies, 1992), somado aos resultados dos trabalhos anteriores realizados no LQA, a idéia inicial foi usar um sistema similar ao usado para a determinação do Hg_{reativo}, o qual utiliza um sistema por injeção em fluxo com amostragem contínua e em pH extremamente ácido. Foi considerado que Locatelli & Jardim (2002) estipularam uma concentração de 0,5% de HCl para a solução redutora de AA a partir de testes realizados com várias concentrações de HCl. O pH da solução de AA sem HCl é de 2,0 – 2,1. Os autores utilizaram uma proporção 1:1 da solução redutora e amostra contaminada com Hg, em um sistema de purga e trapeamento, por 30 min.

Para avaliar a sensibilidade das medidas analíticas em relação ao tempo de reação, foi determinado tanto o Hg_{reativo} quanto o Hg_{AA} em padrões contendo 5,0 a 20,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺. As condições de redução para as medidas com ácido ascórbico foram em pH ~ 2,5 e na proporção 1:1 da solução redutora e amostra, o que corresponde a [AA] = 0,28 mol L⁻¹. Foi usado um sistema FIA com amostragem discreta, ar como fluido carregador e alça de amostragem de 0,5 mL. A determinação do Hg_{reativo} foi realizada em duas etapas. A primeira utilizou as mesmas condições descritas anteriormente para AA e a segunda as condições de determinação do Hg_{reativo} segundo Pasquini *et al.* (1988), tendo como solução redutora uma solução de SnCl₂ 10% em HCl 10%. Os resultados estão dispostos na Figura 4.1, a qual mostra a resposta analítica da redução do Hg²⁺, usando AA como redutor (Figura 4.1A) e resposta analítica da redução do Hg²⁺ por SnCl₂ (Figura 4.1B), ambas em função do tempo de reação.

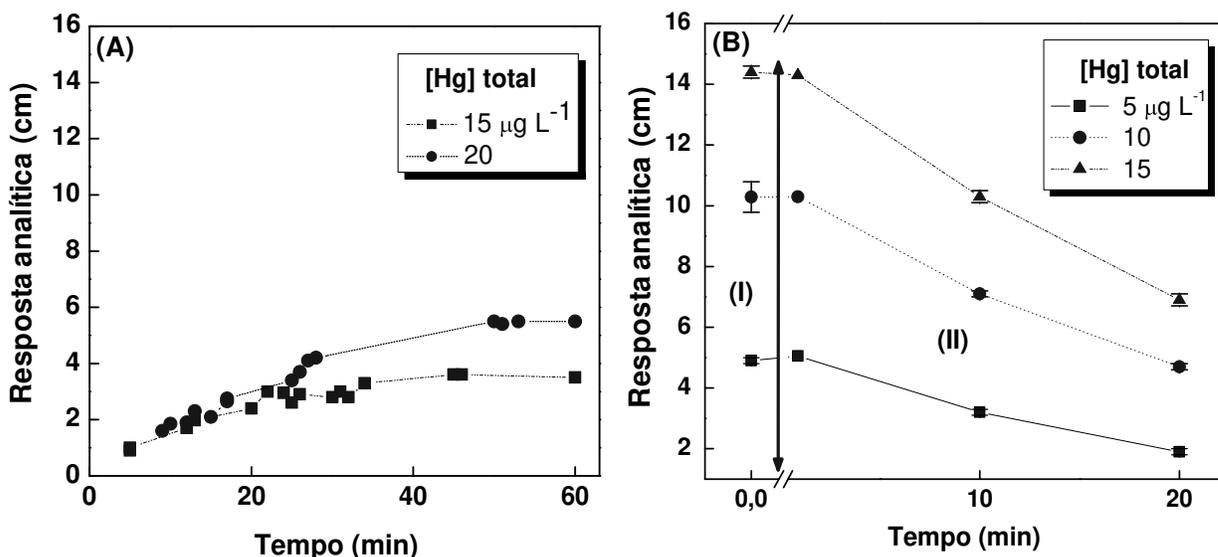
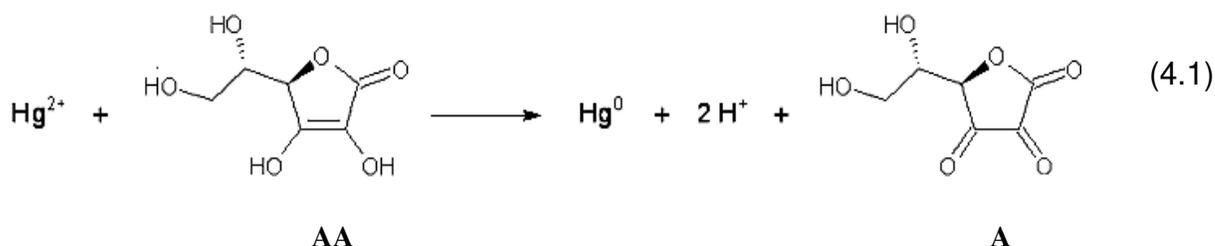


Figura 4.1: Variação do sinal analítico em função do tempo de reação na determinação do mercúrio, utilizando: (A) AA como redutor, com $[AA] = 0,28 \text{ mol L}^{-1}$; $[Hg] = 15,0$ e $20,0 \text{ µg L}^{-1}$; pH 2,2 – 2,8; e, um sistema FIA com amostragem discreta, ar como fluido carregador e alça de amostragem de 0,5 mL; (B) SnCl_2 10% em HCl 10% como solução redutora, usando as condições de medidas para determinação de $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ (etapa I) e as condições de determinação do Hg_{AA} descritas acima (etapa II). A detecção foi feita por CVAAS. A seta vertical entre a etapa I e II indica que as medidas foram feitas em diferentes condições.

Uma análise das Figuras 4.1A e 4.1B mostra que na concentração de $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e em pH ácido, a solução de AA apresentou um poder de redução bastante inferior ao da solução de SnCl_2 , visto a diferença da sensibilidade da resposta analítica de quase três vezes. Verifica-se ainda, que entre 45 e 60 min, a concentração de Hg redutível por AA tende a estabilizar-se. Na Figura 4.1B, os resultados com SnCl_2 na etapa I, na qual foram usadas as condições de medidas para determinação de $\text{Hg}_{\text{reativo}}$, mostram que não houve diferença em relação ao sinal analítico obtido no tempo zero da etapa II, nas condições de determinação do Hg_{AA} descritas acima. Por outro lado, o Hg^0 medido, usando SnCl_2 na etapa II, diminuiu com o tempo quando foi determinado nas mesmas condições de medidas para o Hg_{AA} . A partir desses resultados verifica-se

um equilíbrio dinâmico entre a concentração de Hg^0 que foi reduzido e mantido em solução e a quantidade de Hg^0 perdido por volatilização influenciado pela velocidade de reação de redução. A reação de oxi-redução que ocorre entre íons Hg^{2+} e AA, baseada na Eq. (2.2) (item 2.5), pode ser representada pela Equação 4.1.



Comparando o potencial de redução do AA, $E^{\circ}_{A/AA} = + 0,390 \text{ V vs N.H.E.}$ (sendo “A” as formas hidratadas ou cíclicas do ácido *L*-hidroascórbico), frente ao potencial de redução do Hg ($E^{\circ}_{\text{Hg}^{2+}/\text{Hg}^0} = + 0,854 \text{ V vs N.H.E.}$), nota-se que o AA apresenta um poder de redução muito maior, direcionando o sentido da reação para a formação do Hg^0 , porém, de forma muito mais lenta do que com SnCl_2 . No caso do Sn tem-se $E^{\circ}_{\text{Sn}^{4+}/\text{Sn}^{2+}} = + 0,154 \text{ V vs N.H.E}$ e o seu potencial formal de redução aumenta com o aumento da concentração de HCl (Sharma *et al.*, 1978; Butle & Swift, 1972). Mushran *et al.* (1975) verificaram que a cinética da reação redox AA e Hg é de pseudo primeira ordem, em condições de $[\text{AA}] > [\text{Hg}]$. Os autores verificaram duas etapas na reação, sendo a primeira rápida com a dependência da concentração de AA e a segunda, lenta, aumentando gradativamente com o aumento da concentração de Hg. Sharma *et al.* (1992) estudaram a cinética de reação entre HgCl_2 e AA em meio ácido clorídrico. Também identificaram uma etapa inicial rápida seguida de uma etapa lenta. É importante ressaltar a possível ocorrência de complexos $[\text{AA}^-/\text{A}^{2-}]\text{-Hg}$ antes da reação redox e a interferência devido às reações simultâneas de transferência de prótons (Creutz, 1981; Davies, 1992; Coichev & Fonaro, 1997).

Assim sendo, após verificar a cinética da reação entre o Hg e o AA, definiu-se que a amostragem do método seria discreta. Nesse caso, o agente redutor é adicionado diretamente na amostra, ao invés de ser utilizado, também, como fluido

carregador do sistema FIA. Assim, optou-se por um sistema de linha única para coleta, considerando que a reação entre o Hg e o AA é relativamente lenta quando comparada com a reação com o SnCl₂, cuja reação é imediata, o que justifica a utilização de uma amostragem em fluxo contínuo.

Após estabelecer o sistema a ser utilizado, procurou-se melhorar o sinal analítico variando o volume da alça de amostragem, o fluido carregador, a concentração do AA e pH do meio, com o intuito de obter uma curva analítica linear e que apresentasse repetibilidade. A Figura 4.2 mostra os resultados provenientes dos testes com diferentes volumes de injeção e fluido carregador, usando, agora, a metade da concentração de AA do teste anterior.

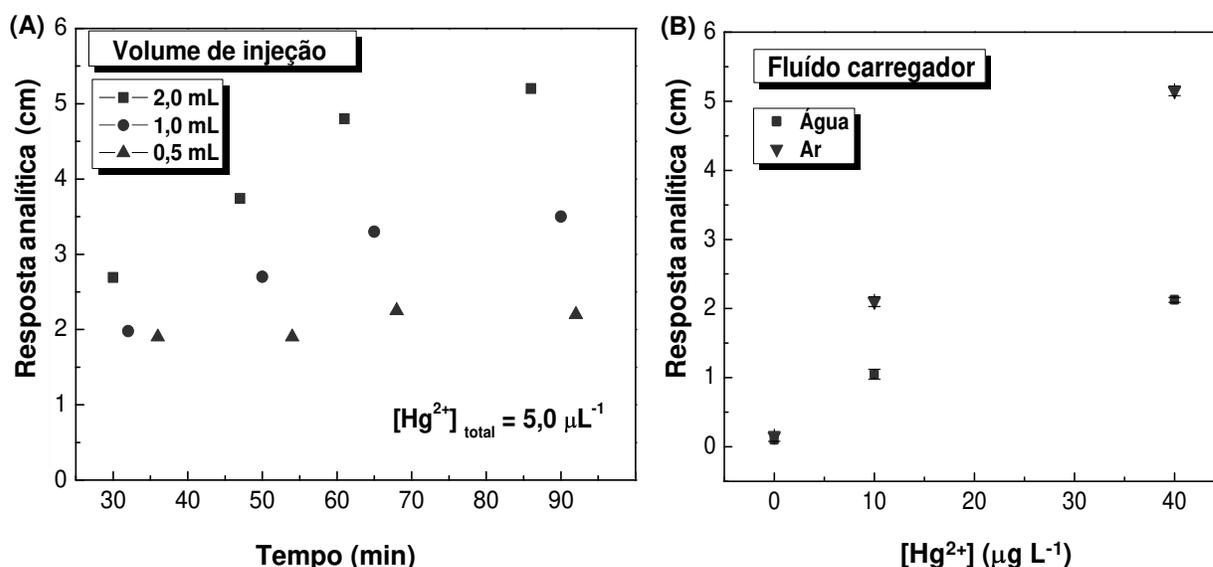


Figura 4.2: (A) Variação da resposta analítica em função do tempo para diferentes volumes de injeção da amostra, com $[\text{Hg}^{2+}] = 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e a sensibilidade do registrador em 5 mV; (B) Teste usando água e ar como fluido carregador em 60 min e sensibilidade do registrador em 20 mV. Os dois parâmetros foram ajustados em meio ácido, amostragem discreta, usando um sistema FIA de linha única, $[\text{AA}] = 0,14 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram feitas em duplicatas.

A influência do volume de amostra injetado (alça de amostragem) foi diretamente proporcional ao sinal analítico (Figura 4.2A). No entanto, esse parâmetro foi compensado, posteriormente, com o acerto da concentração da solução redutora na amostra, pois à medida que se estipulou a concentração de AA para cada faixa analítica, a sensibilidade analítica aumentou significativamente, não havendo a necessidade de uma alça de amostragem maior que 0,5 mL. Em relação ao fluido carregador, o uso da própria solução redutora foi descartado após verificar a velocidade da reação. O ar como fluido carregador apresentou resultados satisfatórios em relação ao uso da água, além de minimizar a geração de resíduos e não ter o problema de encher a cela de detecção do equipamento (ver Figura 4.2B). É importante esclarecer que foi usada uma sensibilidade diferente no registrador para cada teste ilustrado na Figura 4.2, por isso a similaridade na altura dos picos, mesmo em concentrações diferentes. Os resultados apresentados deste ponto em diante foram realizados com um volume de injeção de 0,5 mL e ar como fluido carregador.

As primeiras curvas analíticas em meio ácido mostraram uma linearidade na faixa de 0,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Hg_{AA} . Foram testadas concentrações de AA de 0,002 a 0,008 mol L^{-1} . Obteve-se uma curva linear em 0,002 mol L^{-1} de AA, representada na Figura 4.3A. Entretanto, com o aumento da concentração de Hg, o AA mostrou-se um reagente limitante, mesmo em concentrações 10 vezes maior do que a usada na curva anterior, conforme visto na Figura 4.3B. Tal fato está condizente com os resultados de Mushran *et al.* (1975) e Sharma *et al.* (1992), os quais verificaram que a reação redox entre AA e Hg é influenciada pela concentração das duas espécies. Somado a isso, verifica-se que à medida que se aumenta a concentração de Hg^{2+} , o pH diminui (variação de 2,5 – 2,0), pois o padrão de Hg é feito em meio ácido clorídrico, o que acarreta no efeito causado pelos íons Cl^- e H^+ , já discutidos. A partir de então, foram testadas concentrações de AA de 0,003 a 0,110 mol L^{-1} . Os resultados mostraram que para obter uma faixa linear com concentração de Hg acima 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, seria necessário pelo menos 0,067 mol L^{-1} de AA entre 60 e 90 min de reação (Figura 4.4).

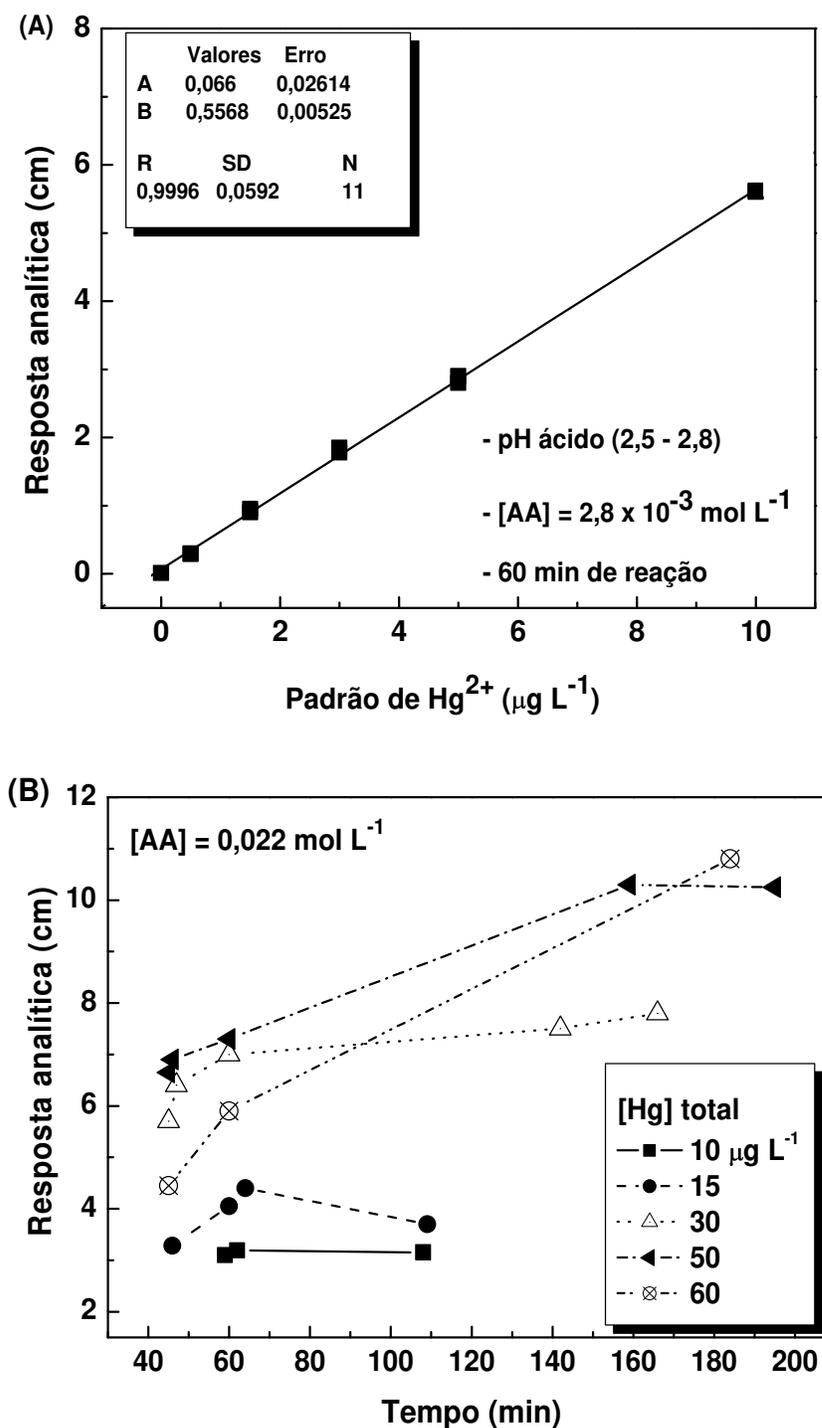


Figura 4.3: (A) Curva analítica obtida para uma faixa de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, pH = 2,5 – 2,8, $[\text{AA}] = 2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em 60 min de reação; (B) determinação de Hg_{AA} em concentrações > 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, usou-se 10 vezes a concentração de AA, pH = 2,0 – 2,5.

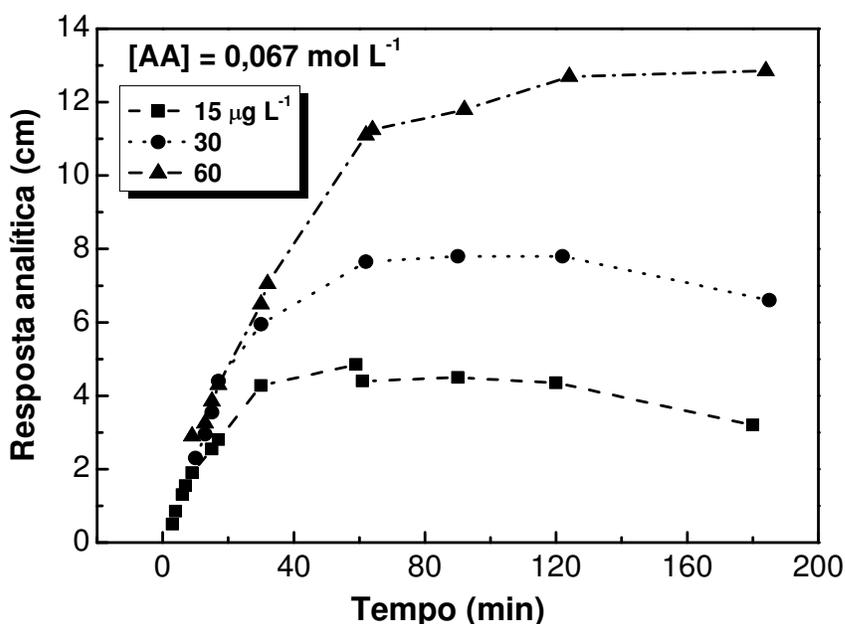


Figura 4.4: Determinação de Hg_{AA} em função do tempo, em concentrações $> 10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, sendo $[\text{AA}] = 0,067 \text{ mol L}^{-1}$, em $\text{pH} = 1,8 - 2,5$.

Buscou-se essa faixa de concentração visando à calibração com os testes de toxicidade, cuja concentração de EC_{50} para microorganismos e microinvertebrados, geralmente, oscila entre $5,0$ e $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (Boening, 2000). De acordo com a Figura 4.4, nota-se que o tempo de reação necessário para a leitura está em torno de 60 ± 10 min, pois o sinal tende a estabilizar-se, diminuindo após 90 min nas menores concentrações, provavelmente devido à volatilização do Hg^0 formado.

A escolha da faixa de pH para a determinação do Hg_{AA} foi avaliada a partir da resposta analítica de alguns pontos da curva em $\text{pH } 2,0 \pm 0,3$ (ácido), $\text{pH } 6,4 \pm 0,2$ (tampão fosfato) e $\text{pH } 9,0-9,6$, em diferente tempo de leitura (60 e 90 min) feitas em duplicatas. A média do sinal analítico para cada concentração nas diferentes condições está expressa na Figura 4.5. As linhas representam a correlação linear para cada condição estudada. A partir dos resultados de correlação linear, uma análise de variância (ANOVA, teste de Tukey) das médias dos valores dos coeficientes angulares com seus respectivos desvios padrões, para cada condição, foi realizada para verificar se as curvas diferiam entre si. O teste de Tukey é utilizado para comparações múltiplas,

que, em conjunto com ANOVA, tem o intuito de avaliar quais médias diferem significativamente. O teste está baseado na distribuição normal q , similar a distribuição t do t-Student. Os cálculos foram feitos no programa Origin 7.0. A Tabela 4.1 mostra o resultado estatístico, em que as médias seguidas de letras iguais não diferem entre si com 99% de confiança. Os resultados obtidos em relação à condição com pH ácido, em 60 min, apenas apresentou variação significativa com os resultados em pH próximo a neutralidade em 90 min. Em relação aos demais resultados, não foram vistas diferenças significativas. Considerando que os resultados em pH ácido e pH próximo a neutralidade (tampão fosfato) em 60 min não foram estatisticamente diferentes, optou-se trabalhar com pH em meio tamponado em $6,4 \pm 0,2$ para todos os pontos da curva, assim como nas amostras com os complexantes e nas amostras naturais. Isto acarretou maior repetibilidade da resposta analítica, pois em algumas análises em que o pH foi $< 2,8$ houve variação do sinal analítico devido a influência dos H^+ nessa faixa de pH.

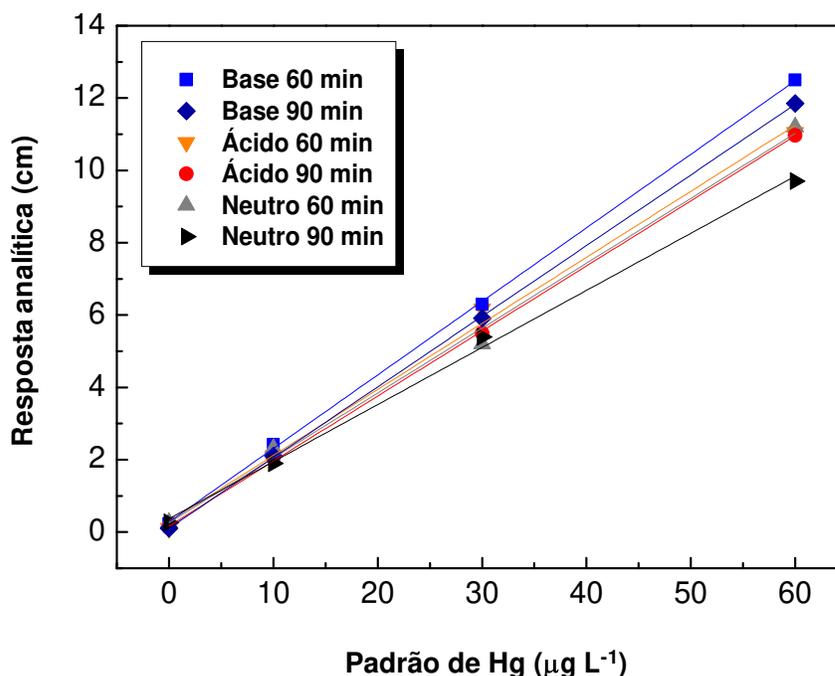


Figura 4.5: Resposta analítica em função de diferentes concentrações de Hg e diferentes condições: pH $2,0 \pm 0,3$ (HCl), pH $6,4 \pm 0,2$ (tampão fosfato) e pH $9,0-9,6$ (NaOH); diferentes tempos de leitura (60 e 90 min) feita em duplicata; $[AA] = 0,067 \text{ mol L}^{-1}$ em todas as condições.

Tabela 4.1: Análise estatística da variação do pH na determinação de Hg_{AA} (teste de Tukey no nível de 99% confiança).

Condições (pH ⁽¹⁾ – tempo)	Coefficiente angular (média ± desvio padrão)	Teste de Tukey*
Básico – 60 min	0,2033 ± 0,0022	a
Básico – 90 min	0,1953 ± 0,0011	a
Ácido – 60 min	0,1826 ± 0,0075	ab
Ácido – 90 min	0,1798 ± 0,0017	b
~ Neutro – 60 min	0,1794 ± 0,0080	b
~ Neutro – 90 min	0,1578 ± 0,0053	c

(1) pH: Básico (9,0-9,6); Ácido (2,0); ~ Neutro (6,4) em tampão fosfato;

*Letras iguais indicam que não existe diferença significativa entre as médias.

A despeito de as condições em pH básico apresentar um melhor sinal analítico, nessa faixa de pH o AA decompõe-se rapidamente (~ 0,5 min em pH 8,6), tornando a solução redutora instável (Mushran *et al.*, 1975; Creutz, 1981). Sabe-se que o potencial de redução do ácido ascórbico depende do pH e da oxidação das outras espécies formadas na reação redox. Dados da literatura indicam que o íon ascorbato (A²⁻) seria a principal espécie redutora das espécies de ácido ascórbico formadas em solução aquosa e que esse íon é predominante em pH > 7 (Creutz, 1981; Davies, 1992).

O uso do ácido ascórbico como redutor na determinação de mercúrio foi investigado por Vitkun *et al.* (1974) para determinação de Hg⁰ por absorção atômica do vapor frio. Os autores verificaram que a redução do Hg⁰ é praticamente imperceptível em pH = 1 e atinge o máximo em pH = 5, mantendo-se constante em pH maiores. Nesse caso, não foi considerada a velocidade da reação. Os autores utilizaram em seu método pH = 11 e 50 mg de AA para cada 3 mL da amostra, porém, o objetivo foi determinar o Hg_{total} nas amostras analisadas, já que em pH básico a espécie predominante é o A²⁻. O que reforça a idéia de se manter o pH próximo a neutralidade na determinação do Hg_{AA}, com o intuito de obter condições brandas de redução das espécies mercuriais, capaz de determinar apenas as espécies biodisponíveis.

A Figura 4.6 apresenta uma curva analítica representativa após os parâmetros otimizados. Para uma faixa de trabalho de até $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, foi necessário uma concentração de $[\text{AA}] = 0,067 \text{ mol L}^{-1}$ em pH $6,4 \pm 0,2$ (tampão fosfato). Nestas condições, o limite de quantificação (LQ) foi $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg_{AA} , com $r = 0,997 \pm 0,002$ e fator de linearidade da curva analítica (C_m) = 97,3%. O desvio padrão relativo de 6 replicatas em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg foi de 4%. O LQ foi determinado a partir de 12 repetições da leitura do branco e utilizou-se o critério 10d da leitura do branco, conforme a Equação 4.2 (Miller & Miller, 1993):

$$\text{LQ} = 10 d + \bar{X}_{\text{Branco}} \quad (4.2)$$

Onde:

d = desvio padrão das leituras dos brancos

\bar{X}_{Branco} = média das leituras dos brancos

Para o cálculo de C_m , usou a Equação 4.3:

$$C_m = (1 - dm/m) \times 100 \quad (4.3)$$

Sendo: dm = desvio padrão da inclinação da reta (m) retirada da curva analítica.

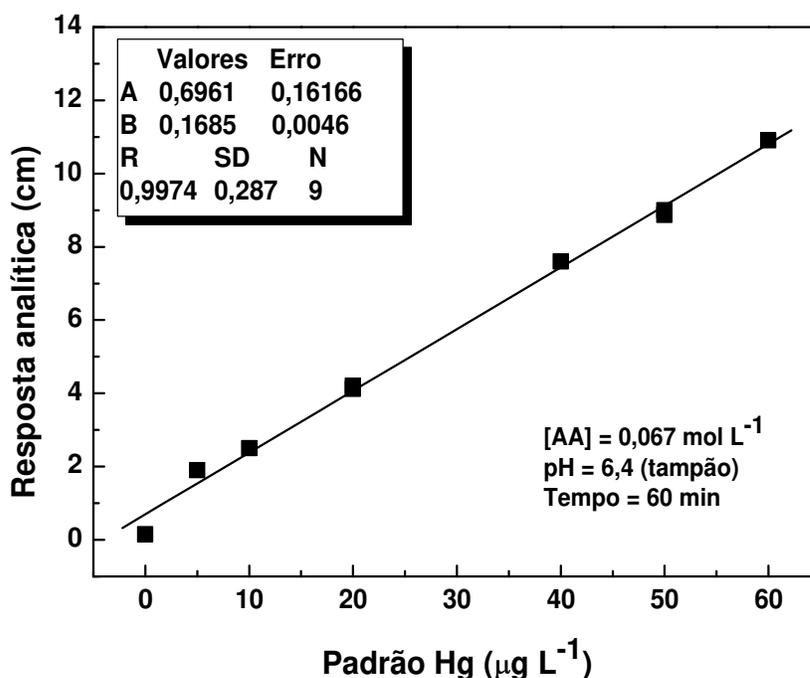


Figura 4.6: Curva analítica representativa para a determinação de Hg_{AA} após a otimização do sistema FIA e dos parâmetros como pH, tempo de reação e [AA].

Assim, as condições otimizadas foram: (i) o tempo estipulado para a leitura da amostra foi de 60 ± 10 min, após a adição do redutor; (ii) foi estipulado como fluido carregador do sistema FIA, que leva a amostra até a cela de separação, ar filtrado por uma coluna de areia de ouro; (iii) o volume de injeção da amostra foi de 0,5 mL; (iv) e a concentração da solução redutora foi de $[AA] = 0,067 \text{ mol L}^{-1}$ para $[Hg] > 10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Já para $[Hg] < 10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, pode ser usada a concentração de $[AA] = 0,003 \text{ mol L}^{-1}$; (v) e, por fim, o pH do meio foi tamponado para $6,4 \pm 0,1$ com tampão fosfato ($\text{pH} = 6,8 \pm 0,1$).

Considerando que a solução redutora tem uma concentração fixa (10% de AA), então, para as duas faixas de concentrações de Hg, foram usadas proporções v/v para interação da solução redutora e a amostra, sendo 120 mL de AA por litro de amostra e 5,0 mL de AA por litro de amostra, para $[Hg] > 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $[Hg] < 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Neste estudo, foi usado um volume de 25,0 mL de amostra. Logo, a

quantidade do redutor foi proporcional a esse volume. O sistema FIA otimizado para a determinação de Hg redutível por ácido ascórbico está ilustrado na Figura 4.7.

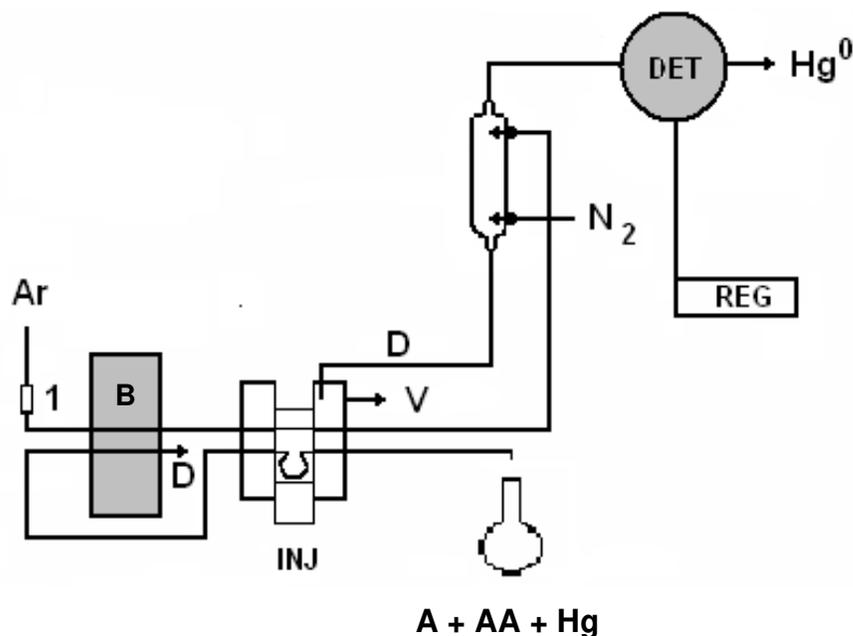


Figura 4.7: Sistema FIA otimizado para determinação de Hg usando ácido ascórbico como redutor. Após a formação de Hg^0 , este é arrastado pelo N_2 para cela de detecção do CVAAS. (1) coluna de areia de ouro, (D) descarte, (INJ) injetor/comutador, (V) vácuo, (A) amostra, (AA) solução redutora, (DET) detector, (REG) registrador e (B) bomba peristáltica.

4.2. Influência da concentração e da natureza do ligante na determinação do Hg_{AA}

Nesta fase experimental, foi avaliada a seletividade do ácido ascórbico na determinação do Hg_{AA} frente alguns ligantes orgânicos (Cys, AH e NTA) em água ultrapura, mantendo-se a concentração de $[\text{Hg}_{\text{total}}] = 30 \mu\text{g L}^{-1}$. Tais resultados foram comparados com os resultados obtidos para $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ nas mesmas razões metal:ligante.

Nas Figuras 4.8A e B estão os resultados comparativos entre as respostas analíticas obtidas nas determinações dos parâmetros Hg_{reativo} e Hg_{AA} , respectivamente, determinados nas soluções com diferentes razões metal:ligante, nas condições descritas na Tabela 3.2 (1ª etapa). Essa etapa foi realizada antes do estabelecimento da curva analítica em pH 6,4, por isso os valores de Hg_{reativo} e Hg_{AA} foram comparados em relação ao sinal analítico e não em relação ao Hg determinado. O objetivo foi averiguar como a redução do Hg^{2+} por AA ocorreria na presença de ligantes com diferentes sítios de ligação.

Nota-se que ao usar o AA como redutor para uma concentração de Hg igual a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, ocorre uma seletividade significativa, principalmente nos casos em que foram utilizados Cys nas proporções 1:1 e 1:50 e AH nas concentrações de 50,0 e 100,0 mg L^{-1} , razões de $1:10^3$ e $1:10^6$, respectivamente, de acordo com a Figura 4.8A. Nessas condições, os menores valores de Hg_{AA} foram obtidos nas amostras contendo as maiores concentrações desses ligantes. Os resultados obtidos em soluções contendo a mesma concentração de Hg e NTA em diferentes proporções não apresentaram influência significativa no sinal analítico de Hg_{AA} , independente da razão metal:ligante. Por outro lado, o sinal analítico resultante da determinação do Hg_{reativo} , apresentados na Figura 4.8B, basicamente foi o mesmo para todas as soluções com os diferentes ligantes, apresentando uma redução total do Hg contido em cada amostra, independente da concentração do ligante estudado. Notou-se apenas uma influência do ligante no sinal analítico do Hg_{reativo} na concentração de 100 mg L^{-1} de AH (razão $1:10^6$).

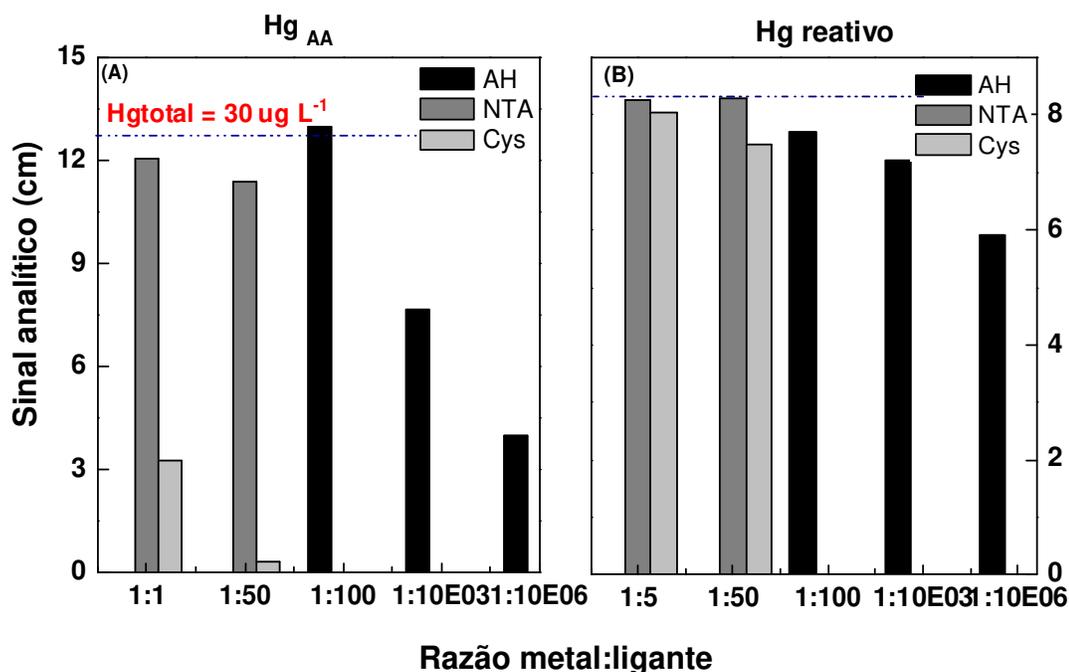


Figura 4.8: Estudo da influência do AH, NTA e Cys no sinal analítico na determinação do Hg_{reativo} e do Hg_{AA}. (A) Apresenta a redução do Hg por AA e (B) por SnCl₂. A linha --- indica [Hg_{total}] = 30,0 µg L⁻¹ adicionado em cada solução. Os valores da razão metal:ligante para AH expressa suas concentrações em µg L⁻¹ e, para os demais ligantes na razão mol L⁻¹. O NTA e a Cys foram estudados apenas nas razões 1:1 e 1:50.

Essas diferenças nos resultados podem ser explicadas considerando as particularidades de cada ligante. A Cys (H₂L) é um aminoácido polar neutro, com dois hidrogênios ionizáveis e radicais que tendem a formar ponte de hidrogênio. Basicamente, possui três sítios de ligação em potencial, o grupo sulfídrico (HS⁻) e o oxigênio e nitrogênio do grupo carboxílico. Na faixa de pH de 2 – 8, o complexo mais estável que a Cys pode formar com o íon Hg²⁺ é um complexo Hg(HL)₂ que possui alta constante de formação progressiva, sendo β₂ = 40,0 (Stary & Kratzer, 1988). O ácido nitrilotriacético (NTA) é um agente quelante sintético, com três hidrogênios ionizáveis e oxigênio e nitrogênio do grupo carboxílico como ligantes. O NTA tende a formar complexo com íon metálico na razão 2:1 (ligante:metal), cuja constante de formação

progressiva desse complexo apresenta $\beta_2 = 14,6$, que é consideravelmente menor que a do complexo Hg-Cys. Já as substâncias húmicas (SH) contêm vários sítios complexantes por molécula, dentre os quais se destacam os ftalatos e salicilatos. Sua composição média elementar pode variar entre 53-58% de C, 3-6% de H, 32-38% de O, 0,8-4,0% de N e 0,1-1,5% de S, o que faz com que os complexos Hg-AH sejam, razoavelmente estáveis. No entanto, é importante salientar que complexos de SH com metais como Zn, Mg, Fe, Cu e Cd, geralmente, são mais estáveis que o Hg-SH e que a reação entre Hg e SH é, consideravelmente, lenta (Rocha *et al.*, 2003; Bellin, 2006; Wu *et al.*, 2008).

Considerando a hipótese que o Hg fortemente ligado/adsorvido pode não ser biodisponível, pode-se dizer que o parâmetro Hg_{AA} representaria melhor do que o $Hg_{reativo}$ a disponibilidade do Hg na presença desses ligantes, pois a redução pelo AA foi seletiva de acordo com o complexo formado, sendo Cys > AH > NTA. Tal relação está de acordo com a ordem decrescente de suas constantes de estabilidade, $43,57 > 18 - 28 > 14,3$ (Tabela 3.1).

Tendo em vista que a especiação do Hg desempenha um papel importante, tanto para o transporte quanto para a toxicidade no ambiente, partiu-se para calibração dos resultados analíticos de Hg_{AA} com os testes de toxicidade. Portanto, os resultados da segunda etapa do estudo da influência dos ligantes, incluindo a Hys, serão apresentados no item testes de toxicidade nas amostras com ligantes (item 4.3).

4.3. Teste de toxicidade usando a bactéria *Escherichia coli*

4.3.1. Testes de toxicidade respirométrico nas amostras com ligantes

No teste de toxicidade respirométrico foi determinada a concentração efetivamente tóxica que inibiria 50% da respiração microbiana (EC_{50}), assim como os cálculos do tempo de duplicação (TD) e a % de inibição da respiração bacteriana (%IRB), os quais foram necessários para comparação dos resultados entre os ensaios

e entre as amostras. Os cálculos para %IRB e TD deram-se pelas Equações 4.4 e 4.5 (Zwietering, 1990; Farah, 2001):

$$\% IRB = [(C - A) / C] \times 100 \quad (4.4)$$

Sendo: C, a diferença da concentração de CO₂ final e inicial do controle e A, a diferença da concentração de CO₂ final e inicial da amostra para 140 ± 10 min de ensaio.

Para o tempo de duplicação temos:

$$\ln \frac{[C_t]}{[C_0]} = kt \quad (4.5)$$

onde C_t é a concentração de CO₂ num tempo qualquer, C_0 é a concentração de CO₂ inicial; k é a constante relacionada com o crescimento bacteriano (retirada da relação direta do tempo vs concentração de CO₂ durante todo o ensaio) e t o tempo expresso em minutos. Logo, o TD será aquele na qual C_t for igual a 2 vezes C_0 . Assim, o t pode ser calculado de $\ln 2 = kTD$. Para o cálculo do TD foi necessário a identificação da fase log do crescimento bacteriano controle.

Na Figura 4.9 está representada a curva de crescimento bacteriano em meio de cultura mínimo (MCM) e com diferentes concentrações do biocida tetraciclina. Esse teste foi usado, inicialmente, para avaliar a sensibilidade da bactéria. Nota-se que a fase log da *E. coli* nos Controles 1 e 2, deu-se em aproximadamente 45 min. Portanto, o TD e a %IRB foram calculados somente para as quatro últimas leituras.

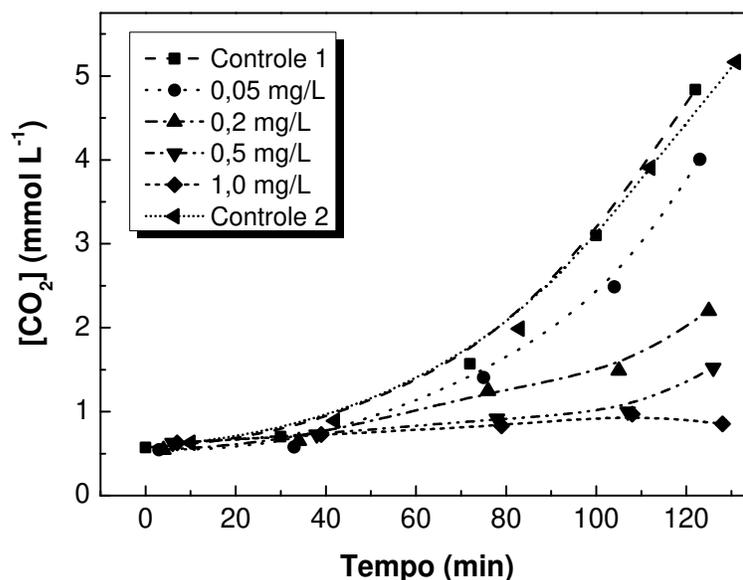


Figura 4.9: Teste de toxicidade respirométrica com bactéria *E. coli* na presença da substância de referência (tetraciclina). Esse teste foi utilizado para verificar a sensibilidade da bactéria em 140 ± 10 min.

A partir desses resultados, foi calculada a concentração efetivamente tóxica para 50% (EC_{50}) da população bacteriana. Foram usados os valores de %IRB, conforme a Equação 4.4, para cada concentração de tetraciclina usada. A EC_{50} foi calculada segundo a equação da reta na faixa linear dos valores de %IRB *versus* a concentração de tetraciclina correspondente, conforme mostra a Figura 4.10. Apesar de o resultado indicar uma concentração de $EC_{50} = 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de tetraciclina, definiu-se o uso de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ que provocou inibição da respiração bacteriana em torno de 80%, pois o importante de uma substância de referência é que seu valor de %IRB apresente repetibilidade nos ensaios inter-dias (Bitton & Dutka, 1986a; Pelczar *et al.*, 1980). Assim, em todos os ensaios foram calculados o tempo de duplicação (TD) da bactéria na presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de tetraciclina. Os resultados estiveram próximos ao $TD = 130 \pm 20$ min, e os ensaios que apresentaram TD da substância de referência fora desse intervalo não foram considerados.

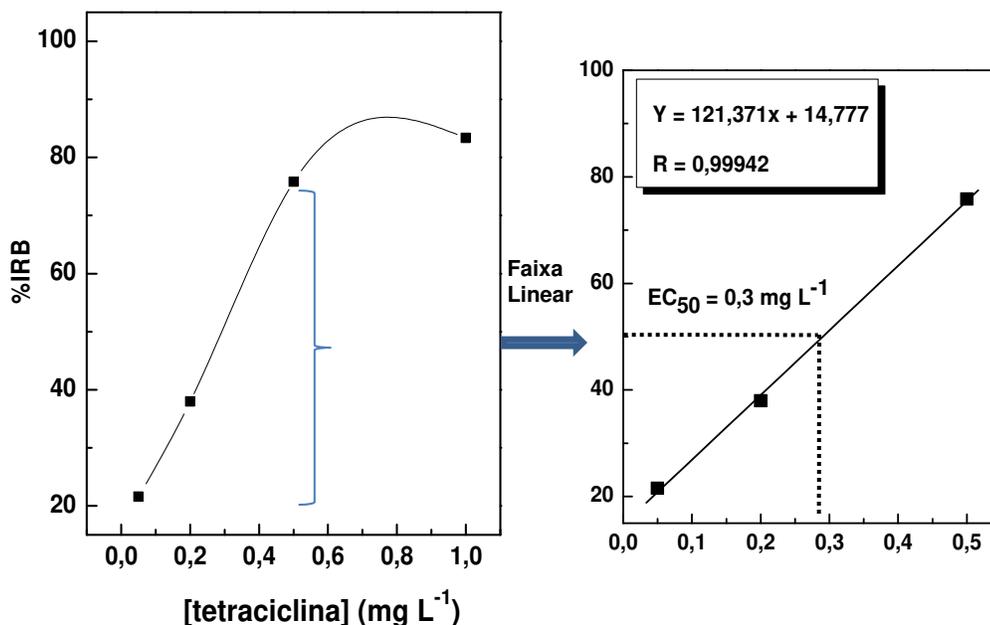


Figura 4.10: Definição da concentração de tetraciclina efetivamente tóxica para 50% da população bacteriana (*E. coli*) a partir dos dados da curva dose / resposta entre o efeito tóxico (%IRB) versus concentração do biocida (tetraciclina). Em detalhe a equação da reta para o cálculo da EC₅₀ no teste de toxicidade respirométrico.

Nesse aspecto, é importante salientar que a quantidade inicial de bactéria definirá o TD da massa bacteriana. Por essa razão, alguns ensaios com maior ou menor concentração de CO₂ estipulada para iniciar os testes ($400 \pm 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) apresentaram resultados com diferentes TD. Portanto, as condições iniciais foram controladas tanto pela medida de CO₂ quanto pela absorvância de $0,030 \pm 5$ ($\lambda = 550$ nm) correspondente a uma população bacteriana próximo a $4 - 7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, conferida por contagem em placa. Detalhes sobre o uso de medidas de absorvância serão abordados nos testes de toxicidade por turbidimetria.

Após ter estabelecido as condições do teste de toxicidade utilizando a tetraciclina, deu-se início aos testes de toxicidade com Hg e os ligantes (Cys, Hys, NTA e AH). Para isso, foi imprescindível determinar a EC₅₀ para o Hg nas condições de trabalho. A curva analítica representativa da média da %IRB de três ensaios com

diferentes concentrações de Hg, está descrita na Figura 4.11. A EC_{50} foi calculada segundo a equação da reta dos valores médios das concentrações de Hg aplicada em relação ao efeito de inibição da respiração bacteriana correspondente, resultando em $EC_{50} = 30,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} . A partir da curva, verificou-se que $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg apresentou 100% de IRB. Posteriormente, essa concentração foi usada nos ensaios com os ligantes, a fim de averiguar qual amostra inibiria tal efeito.

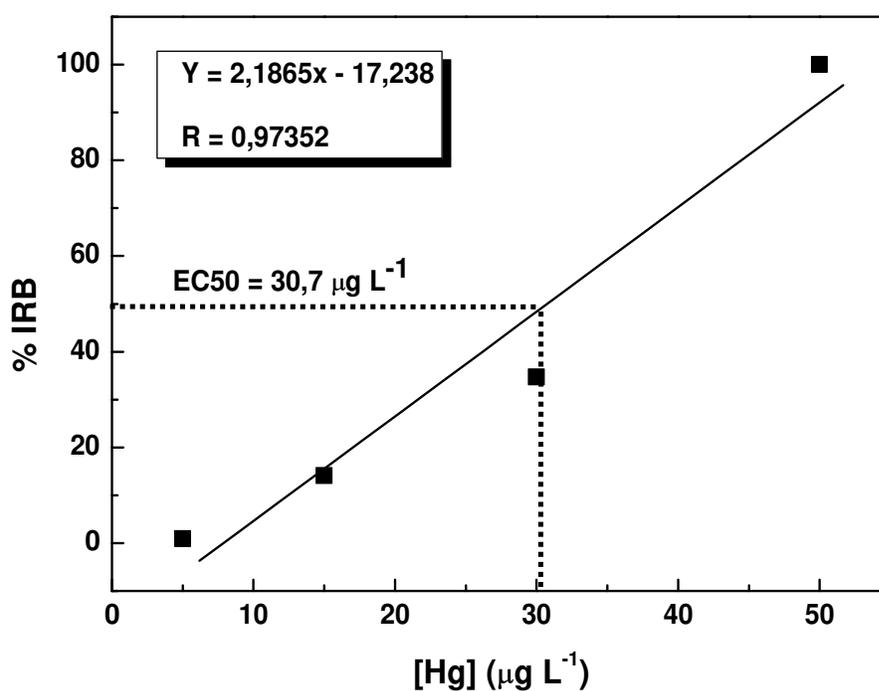


Figura 4.11: Curva de EC_{50} para Hg em ensaio respirométrico com *E. coli* realizado em 140 min.

A EC_{50} para mercúrio em testes com bactérias dá-se em uma faixa muito ampla de concentração, o que vai depender da sensibilidade da resposta medida, do tempo de exposição e quantidade de bactéria. Uma menor população bacteriana será mais sensível ao agente tóxico. O Hg mostrou-se tóxico para diferentes espécies de bactéria isolada de sistema de tratamento de lodo, utilizado para tratamento de esgoto municipal, em concentrações que variaram entre $0,07 \pm 0,15 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg. Essas

medidas foram realizadas, avaliando os níveis de ATP intracelular (ATSDR, 1999). Jardim *et al.* (1990) utilizaram o mesmo sistema FIA respirométrico utilizado neste trabalho. Observaram que $50,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$ reduziu cerca de 50% da respiração bacteriana e em $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} o processo metabólico foi totalmente inibido para bactéria *E. coli*. Farah (2001) também determinou em seu trabalho com sistema FIA respirométrico, tendo *E. coli* como organismo teste, uma EC_{50} de $49,3 \pm 0,4$ para Hg^{2+} . Por outro lado, Boening (2000) descreve que o Hg inorgânico apresenta efeito prejudicial para cultura bacteriana em concentrações de $1,0$ a $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo do organismo, da densidade da cultura e condições experimentais. No entanto, o critério de avaliação da toxicidade do Hg neste trabalho, é a relação da presença de diferentes ligantes em diferentes razões metal:ligante e a inibição do efeito deletério em 100% da população bacteriana, apresentado por concentrações em torno de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} (Figura 4.11).

Os resultados dos testes que apresentaram o tempo de duplicação da amostra com a substância de referência e dos controles (média do C-1 e C-2) de $\text{TD} = 130 \pm 20$ min e 41 ± 6 min, respectivamente, estão apresentados na Figura 4.12.

Os ensaios na presença de Cys, AH e Hys mostraram uma inibição do efeito deletério do mercúrio à medida que se aumentava a proporção desses ligantes, principalmente para a Cys. Para o AH e Hys, esta inibição se deu em concentrações acima de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AH e na razão molar 1:5 de Hg:Hys. Os resultados obtidos com NTA não apresentaram inibição da toxicidade do Hg nas proporções estudadas. É importante destacar que as amostras contendo apenas Hys, AH, NTA e Cys não apresentaram toxicidade. O branco do ligante com $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AH, aumentou o crescimento bacteriano até 8% em relação a média dos controles. Os demais brancos, contendo $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos ligantes Cys, Hys e NTA, apresentaram um aumento no crescimento bacteriano em torno de 6%. O coeficiente de variação dos resultados das amostras em duplicatas e em dias diferentes não excederam 7%.

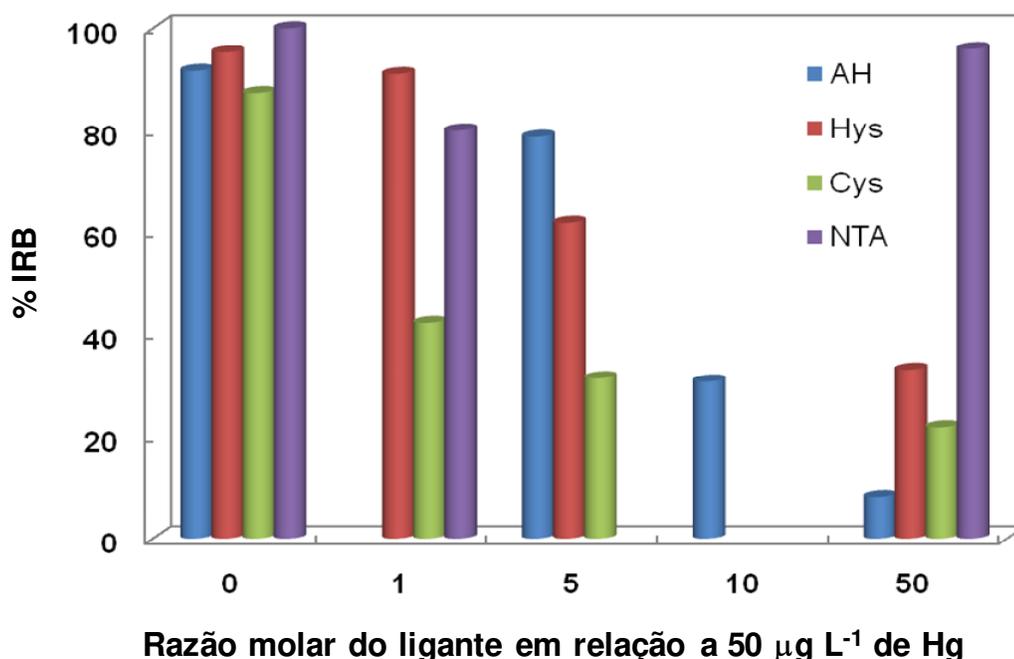


Figura 4.12: Porcentagem de inibição média da respiração microbiana (%IRB) da *E. coli* em relação às diferentes razões Hg:ligante, testes feitos em duplicatas. Os ligantes cisteína (Cys), histidina (Hys) e NTA estão em proporções molares em relação ao Hg adicionado; os valores de ácido húmico (AH) representa sua concentração em mg L⁻¹. Não foram realizados testes com 1 mg L⁻¹ de AH e na razão molar 1:10 com Hys, Cys e NTA em relação ao Hg adicionado.

Portanto, pode-se afirmar que a biodisponibilidade do Hg para a *E. coli*, neste estudo, esteve diretamente relacionada com o tipo de complexo formado. Esses resultados mostram-se concordantes com estudos realizados com Hg em diferentes organismos, ligantes e condições experimentais (Mohapatra *et al.*, 1997; Divine, 1999; Golding *et al.*, 2002). O mecanismo de atuação do Hg, mais difundido na literatura, em células de bactéria e algas é através da difusão passiva de espécies mercuriais lipofílicas, bem como as espécies HgCl₂ e HgS, que atravessam a membrana lipídica (Golding *et al.*, 2002; Jay *et al.*, 2005). Em estudos com ligantes contendo grupo tiol, como a cisteína (grupos R-CH(NH₂)COO⁻ e R-S⁻), observou-se a diminuição da toxicidade do Hg para os testes usando um sensor com substrato bacteriano (Tauriainen *et al.*, 2000), teste luminescente com bactéria Microtox (Ribo *et al.*, 1989),

citotóxicos (Divine *et al.*, 1999) e teor de clorofila para algas (Mohapatra *et al.*, 1997). Esse efeito é justificado pela alta afinidade do Hg^{2+} com a forma aniônica de grupos sulfídricos, cuja constante de formação é maior que 10^{10} , consideravelmente maior que a constante de afinidade dos grupos aminos e carboxílicos (Histidina – $\text{R}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ e NTA – $\text{N}(\text{CH}_2\text{-COO}^-)$) (Divine *et al.* 1999; Ravichandran 2004).

Convém destacar a pronunciada inibição da toxicidade do Hg na presença de Cys em relação aos demais aminoácidos. Mohapatra *et al.* (1997) discutem sobre a toxicidade dos possíveis complexos formados de aminoácidos com Hg. Nesse contexto, podem-se formar complexos menos tóxicos (com baixa carga) ou não tóxicos (complexos neutros). Complexos catiônicos metálicos são mais tóxicos que os complexos aniônicos e espécies neutras, pois os cátions podem competir com sítios de ligação na superfície celular. Com a Hys, o mercúrio forma complexos catiônicos, por isso não foi eficaz na inibição da toxicidade do metal. Golding *et al.* (2002) verificaram que o aumento da concentração Hys não inibiu a absorção do Hg^{2+} pelas células bacterianas contendo o “bioreporter” (mer-lux). Nesse estudo, os autores usaram as bactérias *E. coli* e *Vibrio anguillarum*. O NTA apresenta em sua molécula radicais com grupos carboxílicos, onde o Hg^{2+} pode se ligar e formar moléculas levemente polares. Isso pode acarretar melhor interação com a superfície da parede celular (Pelczar *et al.*, 1980; Bitton & Dutka, 1986a). No caso do NTA deve-se considerar, ainda, que dos ligantes utilizados, o NTA é a menor molécula e, também, apresenta a menor constante de formação para o complexo NTA-Hg. As substâncias húmicas (SH) contêm vários sítios complexantes por molécula, resultando em alta estabilidade dos complexos, porém, apenas ocorreu inibição significativa em concentrações de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AH correspondente a razão 1:200 (Hg:AH em $\mu\text{g L}^{-1}$).

Os resultados dos testes de toxicidade com os ligantes mostraram que a inibição do efeito deletério do mercúrio seguiu a ordem decrescente: Cys > Hys > AH > NTA. Por conseguinte, foram determinadas as concentrações de Hg_{AA} e $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ nas condições dos ensaios de toxicidade.

Foi determinado o Hg_{AA} no meio de cultura incubado com *E. coli* (MCI), em água deionizada sem *E. coli* e no meio de cultura estéril (MCE), todos na presença dos

mesmos ligantes e razões metal:ligante dos ensaios de toxicidade. Primeiramente, foi determinado o Hg_{AA} na suspensão bacteriana contaminada com concentrações de 0,5 a $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} . Observou-se que em concentrações abaixo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (0,5, 3,0, 5,0 e 7,0) os resultados foram constantes e próximos do limite de quantificação ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), o que pode ser relacionado a uma possível adsorção do Hg na suspensão bacteriana (Figura 4.13). No entanto, em concentrações acima desse valor obteve-se uma correlação linear com $r = 0,99$ para uma faixa de 20,0 a $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} .

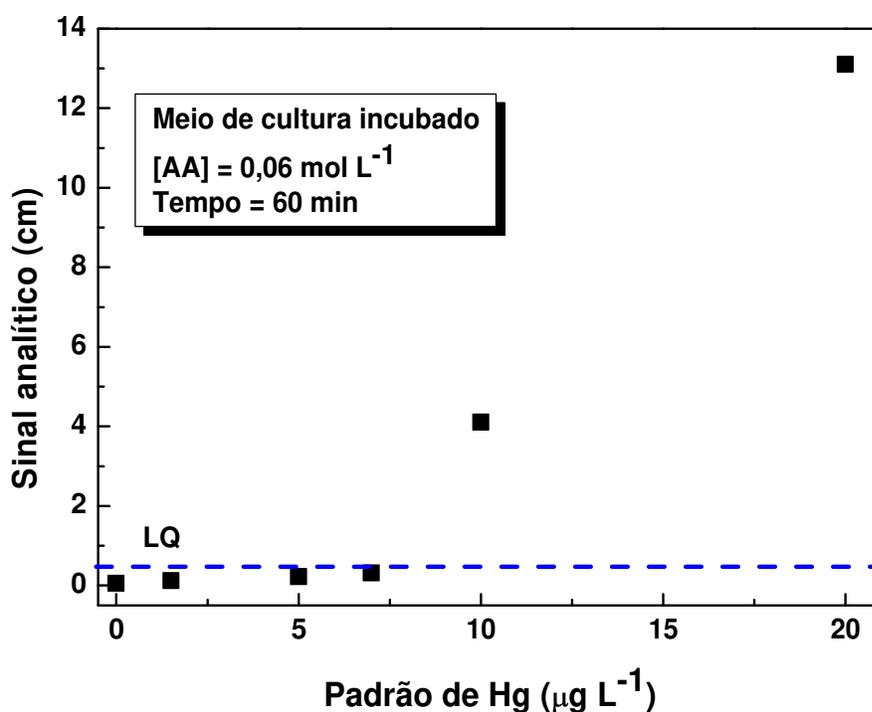


Figura 4.13: Influência da suspensão bacteriana (meio de cultura incubado) na determinação de Hg_{AA} nas condições dos testes de toxicidade com bactéria *E. coli*. O Hg_{AA} foi determinado nas condições otimizadas. LQ = limite de quantificação.

Bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, contêm plasmídeos que se ligam especificamente com Hg^{2+} , devido a existência da proteína regulatória (*MerR*) que pode reduzir o Hg^{2+} a Hg^0 , mas, para que isso ocorra, o Hg tem que ser introduzido na célula, por difusão passiva dos íons livres ou ligados a moléculas lipofílicas, o que causaria efeito tóxico (Golding *et al.*, 2002; Barrocas, 2004). Jardim *et al.* (1993) verificaram que

a quantidade de Hg total apresentado na forma dissolvida em uma cultura bacteriana de *E. coli* (8×10^8 células mL^{-1}) diminui até 3 vezes em relação a sua concentração inicial em 60 min.

No entanto, outra hipótese em relação a esse resultado está baseada na concentração de AA de $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada nesse experimento. Essa concentração é utilizada para determinar a curva analítica com concentrações de Hg $> 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, o Hg poderia ter sido perdido por volatilização com a rápida redução com excesso de AA. Os resultados da Cys nessas condições reforçam tal pensamento, pois a quantidade de Hg redutível por AA nas razões 1:5 e 1:50 (metal:ligante), que estiveram abaixo de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, apresentaram praticamente a mesma concentração (Figura 4.14).

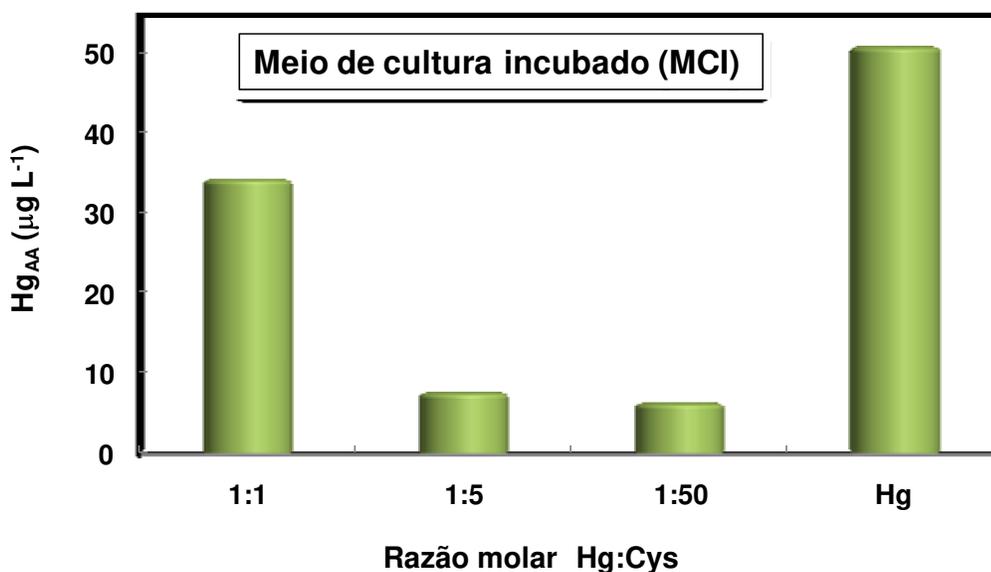


Figura 4.14: Concentração de Hg_{AA} no teste de toxicidade com *E. coli* em diferentes concentrações de Cys e uma concentração fixa de Hg ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), determinada nas condições otimizadas para Hg_{AA}, porém, sem o tampão fosfato; pH do meio do MCI + Hg + Ligante variou entre 6,9-7,1; [bacteriana] = 7×10^6 UFC mL^{-1} .

Na razão 1:1 de Cys-Hg, a concentração de Hg redutível por AA foi de aproximadamente 60%, o que está condizente com a formação do complexo estável

$\text{Hg}(\text{HL})_2$, ou seja, para cada complexo formado é necessário um íon de Hg para duas moléculas de Cys. Contudo, apesar desse resultado promissor, a determinação do Hg_{AA} nos demais ensaios não foram reprodutíveis, principalmente em concentrações abaixo da faixa linear. O aumento da concentração bacteriana ($7 \times 10^6 - 35 \times 10^6$ UFC/mL) durante os 60 min de interação do AA e amostra, pode ter contribuído para essa incerteza nos resultados.

Nesta fase do trabalho foi definido o uso do tampão fosfato próximo a neutralidade. Tal valor de pH é semelhante ao pH do meio de cultura para testes de toxicidade e, também está condizente com a maioria dos valores de pH encontrados em águas naturais (Bitton & Dutka, 1986a; WHO, 1997). Dessa forma, as condições de análise não estariam alterando o pH natural da amostra, corroborando para uma melhor interpretação biogeoquímica do Hg_{AA} nas amostras naturais.

Considerando que o efeito tóxico do Hg na bactéria depende da introdução do metal através da membrana celular e, que, nos ensaios de toxicidade foram demonstradas quais espécies inibem esse efeito tóxico, a determinação do Hg_{AA} no MCE (meio s/ bactéria) pode expressar o comportamento dessas espécies durante o ensaio de toxicidade. Os resultados com MCE e os com água deionizada foram análogos, mostrando que o meio de cultura não interfere na determinação seletiva do AA. Os resultados tanto para o Hg_{AA} quanto para o $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ no MCE estão apresentados na Figura 4.15A e B.

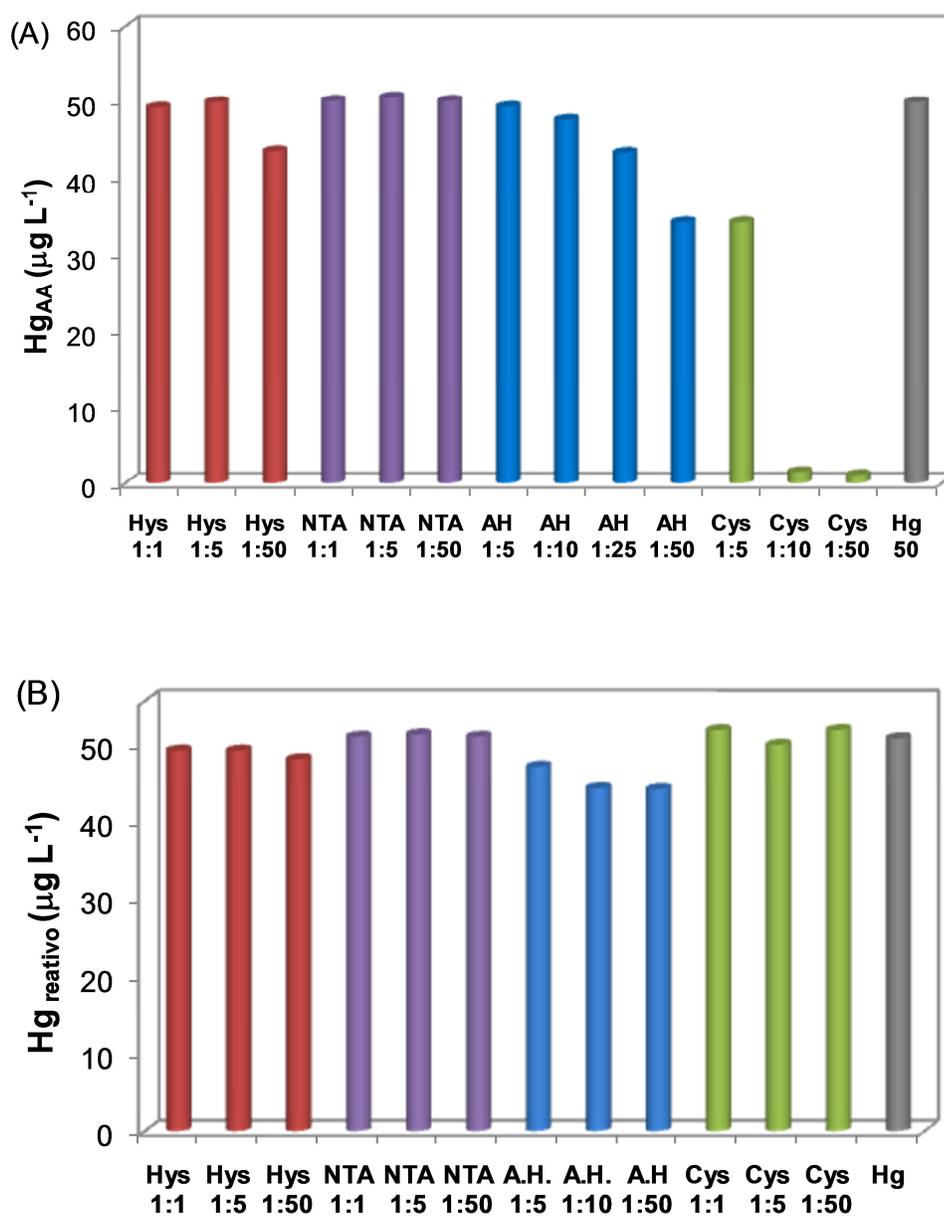


Figura 4.15: Concentrações de (A) Hg_{AA} e (B) Hg_{reativo} em meio de cultura estéril, avaliando o comportamento dos complexos formados em uma concentração fixa de Hg frente a diferentes ligantes (Hys, NTA, AH e Cys) em diferentes razões metal:L, com [Hg_{total}] = 50,0 µg L⁻¹. As medidas de Hg_{AA} foram feitas nas condições otimizadas neste trabalho. Cys, Hys e NTA estão em razões molares em relação ao Hg adicionado, para o AH representa sua concentração em mg L⁻¹.

O resultado de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ determinados no MCE foram condizentes com os resultados obtidos em água ultrapura na primeira etapa deste trabalho com os ligantes, no qual o Hg_{AA} mostrou-se mais seletivo que o $Hg_{reativo}$. Os dados na presença de Hys, que não havia sido estudada na etapa anterior, mostram que ao se utilizar Hys na razão molar 1:50, ocorreu uma pequena diminuição nos valores de Hg_{AA} quando comparados a concentração total de Hg. Por outro lado, os valores de $Hg_{reativo}$ apresentam um comportamento similar ao da primeira etapa, em que foi reduzido praticamente todo o Hg adicionado independente do ligante e da razão molar.

Golding *et al.* (2002) verificaram que na presença de Hg, sais presentes em um meio de cultura mínimo análogo ao usado neste trabalho, tiveram a seguinte distribuição das espécies predominantes, sendo ~ 32% de $Hg(NH_3)^{2+}$, 59% de $Hg(OH)_2$, 5×10^{-5} % de $HgCl_2$ e $9,0 \times 10^{-2}$ % na forma de $HgOHCl$. Os autores verificaram que a absorção do Hg na bactéria estudada foi diretamente proporcional à concentração de Hg adicionado e não foi influenciada por algum componente do meio, mesmo quando as espécies neutras $Hg(OH)_2$ e $HgCl_2$ estiveram em excesso. Indiretamente, pode-se concluir que os componentes do meio não formam ligações suficientemente fortes com o Hg, deixando-o biodisponível tanto para o teste de toxicidade quanto para a determinação de suas espécies, porém, ambos são influenciados por ligantes com maiores constantes de formação em relação aos sais presentes no meio. Posteriormente, será apresentada a correlação das medidas analíticas em função das respostas dos testes de toxicidade (no item 4.6 sobre calibração do método).

4.3.2. Testes de toxicidade por turbidimetria e sua aplicação em amostras naturais

O teste de toxicidade com *E. coli*, utilizando o método turbidimétrico, foi requerido após a aplicação do protocolo em águas naturais, onde procurou avaliar se a concentração de Hg_{AA} iria responder de forma seletiva em águas com diferentes características físico-químicas, contaminadas com Hg. O objetivo foi verificar se o valor de Hg_{AA} determinado em tais amostras seria relacionável com as respostas biológicas

nos testes de toxicidade com a bactéria *E. coli*, assim como ocorreu com as amostras contendo os ligantes.

Foram realizados testes preliminares com águas do Rio Negro (AM4 e AM5) e com águas do Ribeirão Anhumas (CP2) com o método respirométrico. Para a amostra CP2, com concentração de carbono inorgânico (CI) igual a 24,2 mg L⁻¹, iniciava-se o ensaio com concentrações de CO₂ muito alta em relação à curva analítica. Tal concentração diminuiu ao longo do ensaio, independente da adição da bactéria ou Hg. Para as amostras AM4 e AM5, foi observado um crescimento bacteriano lento nas amostras *in natura*, o que já predizia que o teste não teria seu ponto final em 2h. Conseqüentemente, o método respirométrico não foi viável para avaliar a toxicidade do Hg nessas águas.

O teste de toxicidade com *E.coli* usando a turbidez da suspensão bacteriana apresentou-se extremamente prático, já que foi usado o mesmo organismo e as mesmas condições de incubação da bactéria. No entanto, no que tange a escolha do tempo de ensaio, medida da turbidez (λ , forma de leitura, pH, quantidade de bactéria inicial) e concentração de Hg (com ou sem preservantes), foi requerida a padronização devido à complexidade da amostra.

Primeiramente foi estabelecido o comprimento de onda (λ) relacionado com a escala de McFarland para que fosse possível relacionar a turbidez com o crescimento bacteriano. McFarland Standard é uma série de soluções com diferentes escalas de turbidez que permite estimar a densidade das suspensões microbianas, sendo bastante utilizada para padronizar inóculo em antibiograma por teste visual, utilizando soluções extremamente estáveis (Karlson *et al.*, 1972). Murray *et al.* (1995) apresentam a calibração dos padrões de sulfato de bário na escala de McFarland de 0,5 a 5,0 a partir da concentração bacteriana, as leituras dos padrões foram realizadas em 550 nm. A relação entre a concentração bacteriana e a turbidez em cada escala está mostrada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Concentração da suspensão bacteriana em unidade formadora de colônias (UFC) por mL de solução e valores de absorvância dos padrões de sulfato de bário na escala de McFarland em 550 nm (Murray *et al.*, 1995).

BaSO ₄ (mg L ⁻¹)	Escala McFarland	Absorvância ⁽¹⁾ 550 nm	População ⁽²⁾ (10 ⁶ UFC mL ⁻¹)
2,4 x 10 ⁻⁵	0,5	0,125	150
4,8 x 10 ⁻⁵	1	0,250	300
9,6 x 10 ⁻⁵	2	0,500	600
1,44 x 10 ⁻⁴	3	0,750	900
1,92 x 10 ⁻⁴	4	1,000	1200
2,4 x 10 ⁻⁴	5	1,250	1500

⁽¹⁾ A absorvância da população bacteriana pode variar de acordo com a população e com o λ utilizado;

⁽²⁾ População medida por contagem de placa.

A utilização de diferentes comprimentos de onda tem sido visto na literatura. Gimenez (1994) mediu a turbidez das soluções padrões da escala em 420 nm e fez a comparação com diferentes suspensões microbianas. Os resultados foram promissores para uso em antibiograma. Andrews (2005) utilizou $\lambda = 625$ nm com caminho ótico de 1,0 cm para leitura de absorvância do padrão 0,5 da escala de McFarland, o correspondente a $2,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de sulfato de bário. Esse padrão tem intervalo aceitável das medidas de turbidez entre 0,08 a 0,13. Na prática, o importante é ter um padrão estável (padrão de sulfato de bário) que possa padronizar os resultados obtidos e que esse padrão tenha sido aferido com contagem da população bacteriana em placa.

Neste trabalho, foi realizada a varredura na região de 420 a 650 nm, do meio de cultura incubado. Selecionou-se $\lambda = 550$ nm, por apresentar maior estabilidade nas medidas, tendo em vista que a absorvância diminui com o aumento de λ (Apêndice II). Em seguida, foram feitos padrões da escala de McFarland de 0,5 a 5,0 e medida a sua absorvância em 550 nm para verificar se eram comparáveis com o realizado por Murray *et al.* (1995). Os resultados dos padrões de sulfato de bário foram similares aos obtidos por Murray *et al.* (1995) podendo ser relacionados. Até 2h de teste de toxicidade a

população bacteriana esteve abaixo do padrão 0,5 da escala. No entanto, para essa faixa, a população bacteriana foi avaliada por contagem em placa das UFC mL⁻¹, sendo que acima dessa faixa a relação pode ser feita com a escala de McFarland, conforme dados apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Absorbância dos padrões da escala de McFarland de 0,5 a 5,0 em 550 nm (dados deste trabalho) relacionados com os resultados de Murray *et al.* (1995). Resultados do teste de toxicidade relacionando o tempo, abs e UFC mL⁻¹ em 2h de ensaio.

Escala McFarland	Absorbância ⁽¹⁾ 550 nm (n=3)	Absorbância ⁽²⁾ 550 nm	População ⁽²⁾ (10⁶ UFC/mL)
0,5	0,128 ± 0,005	0,125	150
1	0,261 ± 0,004	0,250	300
3	0,738 ± 0,009	0,750	900
5	1,102 ± 0,010	1,250	1200
Teste de toxicidade ⁽³⁾			
Tempo (min)	0	60	120
Absorbância	0,030	0,058	0,094
(10⁶ UFC/mL) 2h de teste	7 x 10 ⁶	35 x 10 ⁶	70 x 10 ⁶

⁽¹⁾ Absorbância do padrão de sulfato de bário feito segundo escala de McFarland; ⁽²⁾ População bacteriana e absorbância correspondente medida por contagem de placa, dados de Murray *et al.* (1995);

⁽³⁾ Resultado da contagem de placas em intervalos de leitura de absorbância no testes de toxicidade com *E. coli* realizados neste trabalho.

O teste turbidimétrico mostrou-se menos sensível para acompanhar o crescimento bacteriano do que o teste respirométrico, por isso foi necessário aumentar o tempo de ensaio. Normalmente, para se aumentar a sensibilidade do organismo em teste de toxicidade com bactérias, utiliza-se os critérios do tempo de exposição ou a diminuição da população bacteriana (Bitton & Dutka, 1986a; Golding *et al.*, 2002). Para propor uma forma de avaliar um efeito de um agente tóxico em uma determinada matriz, é preciso ter claro qual resposta se está procurando. O objetivo do teste

turbidimétrico aplicado em águas naturais, proposto neste trabalho, foi verificar o comportamento de uma quantidade conhecida de bactéria, adicionadas nas diferentes amostras de águas naturais (impactadas e não impactadas), contaminadas com concentração fixa de Hg, e, se tais diferenças relacionadas às características de cada amostra ocasionariam um efeito de inibição da toxicidade do Hg, como ocorreu na presença dos diferentes ligantes.

Alsop *et al.* (1980) descrevem um teste de inibição para o crescimento bacteriano, baseado na medida de densidade ótica de um meio de cultura controle e outro meio com a substância tóxica. A turbidez do meio foi lida em 530 nm, sendo o branco uma amostra não incubada. Os valores da absorvância nas amostras foram calculados relacionando a absorvância da amostra em relação à absorvância do controle.

Neste trabalho, os testes de toxicidade em águas naturais foram feitos com amostras das campanhas 2, 3 e 4, devido ao tempo de preservação das demais amostras (apresentadas na Tabela 3.3, item 3.4). As amostras foram contaminadas com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg e o efeito tóxico foi determinado pela turbidez causada na amostra devido ao crescimento bacteriano. Foram feitas medidas discretas e por FIA-turbidimétrico. Para isso, o teste com *E. coli* por medidas de turbidez foram realizados em diferentes condições, até se obter resultados satisfatórios concernente ao efeito tóxico do mercúrio nas amostras naturais.

O teste foi padronizado para as seguintes condições: o pH nas amostras ajustados para $6,8 \pm 0,2$ (utilizando tampão fosfato) e o uso do preservante cromato no padrão de Hg foi dispensado. Essas definições foram importantes para diminuir o estresse bacteriano quando adicionadas nas amostras naturais e não no meio de cultura mínimo (Loomis, 1978; Kelly *et al.*, 2003). As leituras foram realizadas a cada 30 min, durante 6h de ensaio. Esse tempo foi definido após o acompanhamento do crescimento na amostra controle por 24 h, em que foi obtido um crescimento exponencial em até 22 h, quando os organismos entraram na fase estacionária. Os ensaios que acompanham a turbidez são relativamente lentos e dependendo da bactéria, pode variar de 6 a 36 h até atingir sua fase estacionária (Zwietering *et al.*, 1990; Begot *et al.*,

1996). Neste trabalho, o tempo de seis horas foi suficiente para avaliar a diferença de crescimento na amostra controle e nas amostras contaminadas.

O teste que utilizou o sistema FIA-turbidimétrico apresentou maior frequência analítica por intervalo de leitura, aproximadamente 40 s para cada amostra. Para as leituras discretas, gastou-se 3 ± 1 min por amostra. As Figuras 4.16 e 4.17 são representativas dos ensaios de toxicidade realizados com amostras naturais contaminadas com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, por medidas discretas e por FIA-turbidimétrico, respectivamente. Comparando-se os resultados, observam-se diferenças no sinal de absorbância das leituras discretas em relação às do FIA-turbidimétrico, ocasionadas pela diluição da amostra no fluido carregador do sistema FIA (água deionizada).

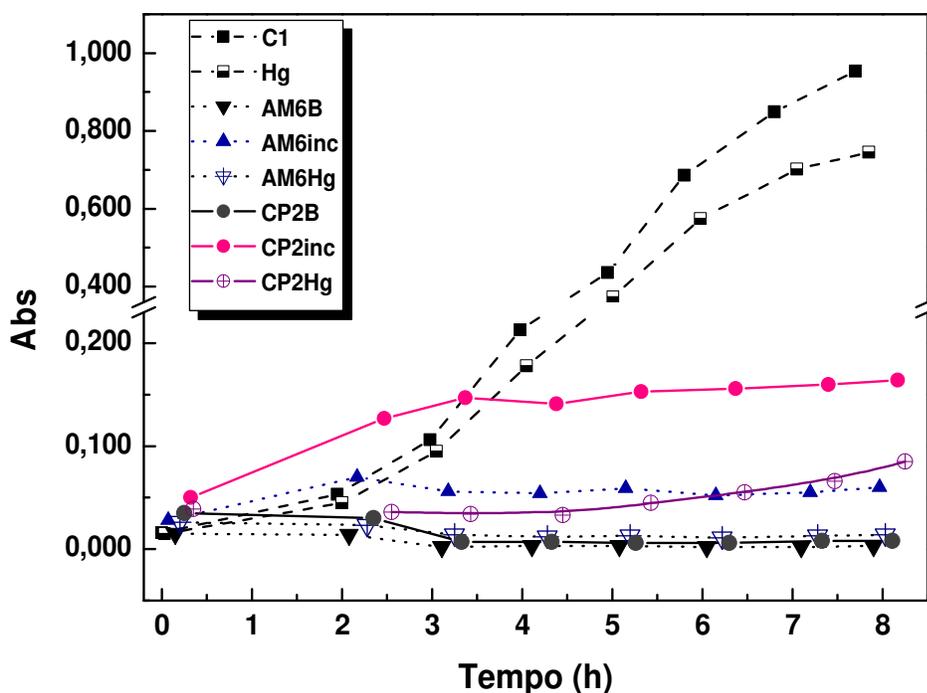


Figura 4.16: Teste de toxicidade aguda com *E. coli*, por medidas turbidimétricas, em amostras de águas das campanhas 2 e 3 (AM-Amazônia e CP-Campinas). Medidas discretas em 550 nm e $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$. As absorbâncias dos brancos não sofreram alterações durante o ensaio; C1 = controle com meio de cultura mínimo; Hg = adição de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg; inc = amostra incubada com a bactéria e B = branco da amostra.

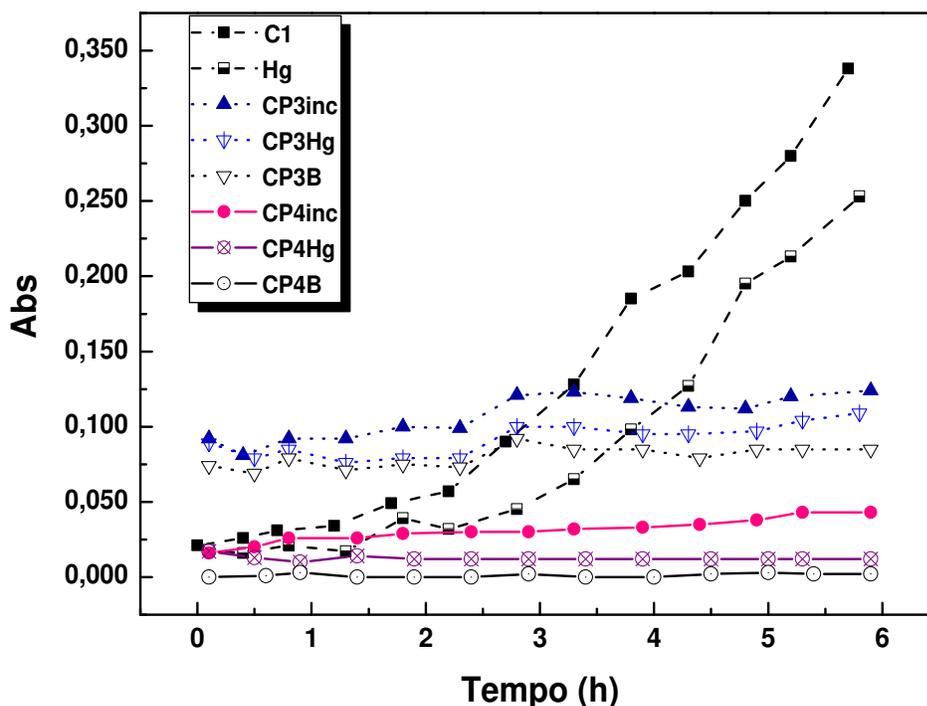


Figura 4.17: Teste de toxicidade aguda com *E. coli*, por turbidimetria, em amostras de águas da campanha 4 (CP-Campinas). Medidas no FIA-turbidimétrico, em 550 nm e $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$. As absorbâncias dos brancos não sofreram alterações durante o ensaio; C1 = controle com meio de cultura mínimo; Hg = adição de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg; inc = amostra incubada com a bactéria e B = branco da amostra.

De acordo com os resultados apresentados, de um modo geral, houve um crescimento bacteriano significativo no controle feito em meio de cultura mínimo (MCM) comparado aos das amostras naturais, em quase cinco ordens de grandeza, considerando a diferença das absorbâncias dos brancos de cada amostra. Verificou-se que o efeito tóxico do Hg na amostra de referência diminuiu quando comparado a 100% de inibição obtida no teste respirométrico, provavelmente, devido ao aumento do tempo de ensaio somado à ausência do cromato no padrão de Hg. A substância de referência com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg em MCM apresentou entre 27-32% de inibição, independente da técnica utilizada, indicando reprodutibilidade das condições dos testes de toxicidade, principalmente no que se refere ao comportamento bacteriano. Entre as amostras

naturais, o maior crescimento deu-se em amostra com maiores concentrações de matéria orgânica e íons dissolvidos (CP2), ao passo que nas amostras menos impactadas, como as da Amazônia (AM6) e CP4, o crescimento foi mínimo e em torno de 6 % em relação ao crescimento do controle em MCM. O que pode estar relacionado com a taxa de crescimento exponencial que não pode ser mantida em sistema fechado (ensaio estático), pois depois de determinado período, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes, acúmulo de metabólitos tóxicos e limitação de espaço (Pelczar *et al.*, 1980; Zwietering *et al.*, 1990; Begot *et al.*, 1996). Tais resultados estão concordantes com a escassez de nutrientes dessas águas. Logo, os resultados de inibição do crescimento bacteriano (ICB), nas amostras naturais, foram calculados em relação ao crescimento na amostra controle *in natura*, em pH tamponado. A %ICB e tempo de duplicação bacteriano (TD) nas amostras foram calculados pelas mesmas equações usadas nos ensaios respirométricos (Equações 4.4 e 4.5), sendo que os valores de concentração de CO₂ foram substituídos pelos valores de absorvância.

Foram determinados a %ICB na amostra de referência (contendo 50,0 µg L⁻¹ de Hg) e o TD para amostra controle (em MCM) em 6h de ensaio. Os valores encontrados foram de 27 e 32% de ICB e, TD = 67 ± 1 e 79 ± 1 min, para medidas discretas e FIA, respectivamente. O desvio padrão desses dados foi de 8%, o que torna viável a comparação do efeito tóxico do Hg entre as amostras (Pelczar *et al.*, 1980). Portanto, foram calculados a %ICB nas amostras contaminadas com Hg em relação ao crescimento nas amostras naturais incubadas, apresentadas nas Figuras 4.18. Para os cálculos foram subtraídos os valores de absorvância dos brancos e foram consideradas três casas decimais depois da vírgula, já que o crescimento nas amostras incubadas foi mínimo. As diferenças entre as absorvâncias das amostras incubadas e seus respectivos brancos, foram: AM6 = 0,056, CP2 = 0,155, CP3 0,041 e CP4 0,039. As Figuras 4.18(A) e (B) mostram o comportamento bacteriano nas amostras não filtradas, enriquecidas com 50,0 µg L⁻¹ de Hg.

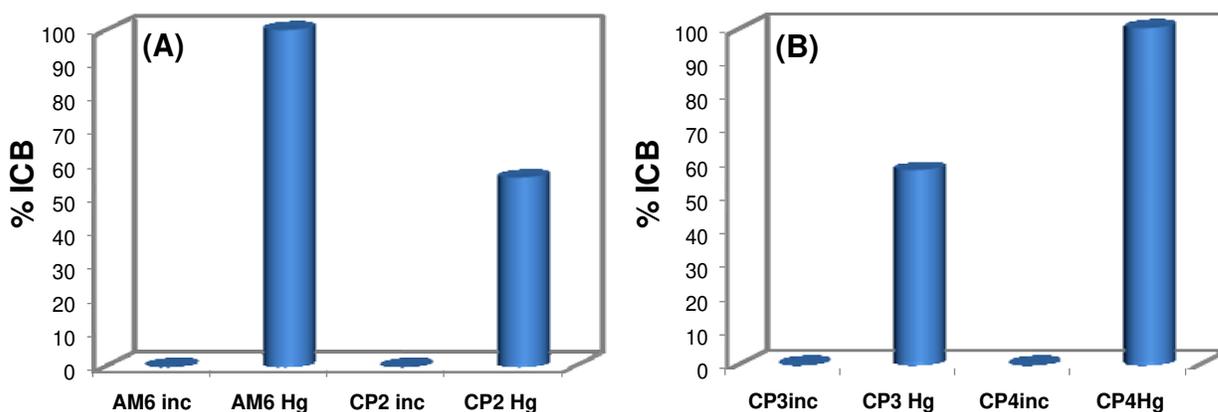


Figura 4.18: Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano (%ICB) nos ensaios de toxicidade aguda com *E. coli*, por turbidimetria, em 6h de teste. (A) Amostras de águas coletadas nas campanhas 2 e 3, por medidas discretas; e (B) em amostras de águas da campanha 4, medidas feitas no FIA-turbidimétrico; $\lambda = 550 \text{ nm}$; Controle = amostra *in natura* incubada; o pH das amostras entre $6,8 \pm 0,2$; Hg = $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg e inc = amostra incubada com a bactéria.

Avaliando o comportamento bacteriano na Figura 4.18, em relação ao gráfico de crescimento bacteriano mostrado nas Figuras 4.16 e 4.17, observa-se que as amostras com as menores concentrações de matéria orgânica e íons dissolvidos foram as mais sensíveis ao efeito tóxico do mercúrio, ou seja, apresentaram maiores valores de %ICB (amostras AM6 e CP4). Como descrito anteriormente, a taxa de crescimento não poderia ser mantida, considerando um ensaio estático, aliado à escassez de nutrientes e a presença do agente tóxico (Hg). Isso provocou uma ICB em torno de 100%. Já as amostras com maiores variações de íons dissolvidos, matéria orgânica e material em suspensão (CP2 e CP3) amenizaram o efeito tóxico do Hg em torno de 50%. No entanto, os resultados dos ensaios de toxicidade com as demais amostras da Amazônia e com as amostras filtradas estiveram sempre em torno de 100% de ICB, o que pode indicar que a quantidade de Hg adicionado provocou uma saturação do metal no meio. Devido a essa hipótese, buscou-se avaliar a toxicidade do Hg nessas águas, por meio

do teste de toxicidade aguda com a *Daphnia similis* que apresentaram um EC_{100} em $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg (dados abordados no item 4.5).

4.4. Aplicação do método do AA em amostras de água de lagos, igarapés e rios

A Tabela 4.4 mostra os resultados dos testes preliminares com as amostras enriquecidas com $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, sendo Hg_{AA} , Hg_{reativo} entre outros parâmetros. Nota-se que os valores de Hg_{AA} diferenciaram as amostras filtradas e as amostras enriquecidas com ácido húmico, principalmente CP1, cujo valores de Hg_{AA} representaram 48,1% e 26,4% do Hg adicionado na amostra, respectivamente. O que não ocorreu com os valores de Hg_{reativo} .

Tabela 4.4: Valores de Hg_{AA} , Hg_{reativo} , pH, E_H , carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI) determinados em águas naturais filtradas (F) e não filtradas (NF); (AH) são amostras enriquecidas com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido húmico.

Amostra	Hg_{AA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg_{reativo} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	pH	$E_H^{(1)}$ (mV)	COT (mg L^{-1})	CI (mg L^{-1})
AM3 (F)	$4,8 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$	6,8	471	2,4	0,4
AM3 (NF)	$4,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	7,2	509	1,4	0,4
CP1(F)	$2,4 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$	7,4	483	8,3	4,3
CP1 (NF)	$0,4 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,2$	7,2	520	10,3	4,7
CP1(F)AH	$1,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,2$	7,4	483	13,0	4,3
CP1(NF)AH	<0,3	$2,3 \pm 0,1$	7,2	520	15,0	4,3
Hg_{total} $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$	$4,9 \pm 0,02$	$5,0 \pm 0,2$	5,9	336 ⁽²⁾	-	-
Branco Σ Amostra	<0,3	<0,3	5,9	364 ⁽²⁾	-	-

⁽¹⁾ Valores de E_H corrigidos para o potencial padrão de hidrogênio; ⁽²⁾ O E_H foi medido após a adição do AA.

Nas amostras não filtradas, ambos os métodos sofreram interferência da interação do Hg com o material em suspensão, pois de um modo geral os valores de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ estiveram abaixo dos valores de Hg_{total} nas amostras não filtradas, sendo que nos resultados obtidos por AA esse efeito foi mais significativo. Dentre os parâmetros analisados, verificou-se que o enriquecimento de COT, de 8,3 para 13,0 mg L⁻¹, influenciou mais os resultados de Hg_{AA} do que os de $Hg_{reativo}$. A contribuição do processo de adsorção do mercúrio, tanto com matéria orgânica dissolvida quanto no material em suspensão, foi o que determinou a disponibilidade do Hg redutível por AA. Este resultado indica que a matéria orgânica dissolvida e particulada (MO) governa o tipo de ligação e o transporte do Hg nesses ambientes (Lamborg *et al.*, 2003; Ravichandran, 2004).

Considerando que os resultados preliminares mostraram-se propícios para distinguir as diferentes amostras, deu-se início às campanhas amostrais na Amazônia e na região de Campinas, ocasião em que as amostras foram contaminadas com 50,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺ (baseada no EC₁₀₀ da *E. coli*). Nas amostras da Amazônia contaminadas com Hg, o Hg_{AA} foi determinado, tanto no laboratório do INPA (Manaus) como no LQA-UNICAMP, com o objetivo de avaliar repetibilidade das medidas ao se usar diferentes marcas de reagentes e condições de laboratório. Para isso foi calculado o coeficiente de variação (CV%) dos resultados, cujos valores, não excederam 4,3 %. A Figura 4.19 apresenta os valores médios de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$, obtidos nas águas coletas na segunda e na terceira campanha amostral.

Na avaliação da influência das características de cada amostra nos resultados de mercúrio redutível por AA e por SnCl₂, verificou-se de um modo geral, que as amostras da Amazônia (AM4 à AM11 oriundas de ambientes naturais) não apresentaram capacidade de complexação suficiente com a quantidade de mercúrio adicionado, pois as concentrações de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ foram similares e em torno de 100% de recuperação do Hg_{total} . Tal fato sugere que as características físico-químicas destas águas não alteraram a disponibilidade do Hg redutível, tendo em vista que a variação do pH, MS, condutividade, Cl, COT e E_H não foram significativas entre as amostras, apenas as diferenças inerentes às características naturais de água brancas (AM6 e

AM7) e pretas (demais AM) da região amazônica (Tabela 4.5).

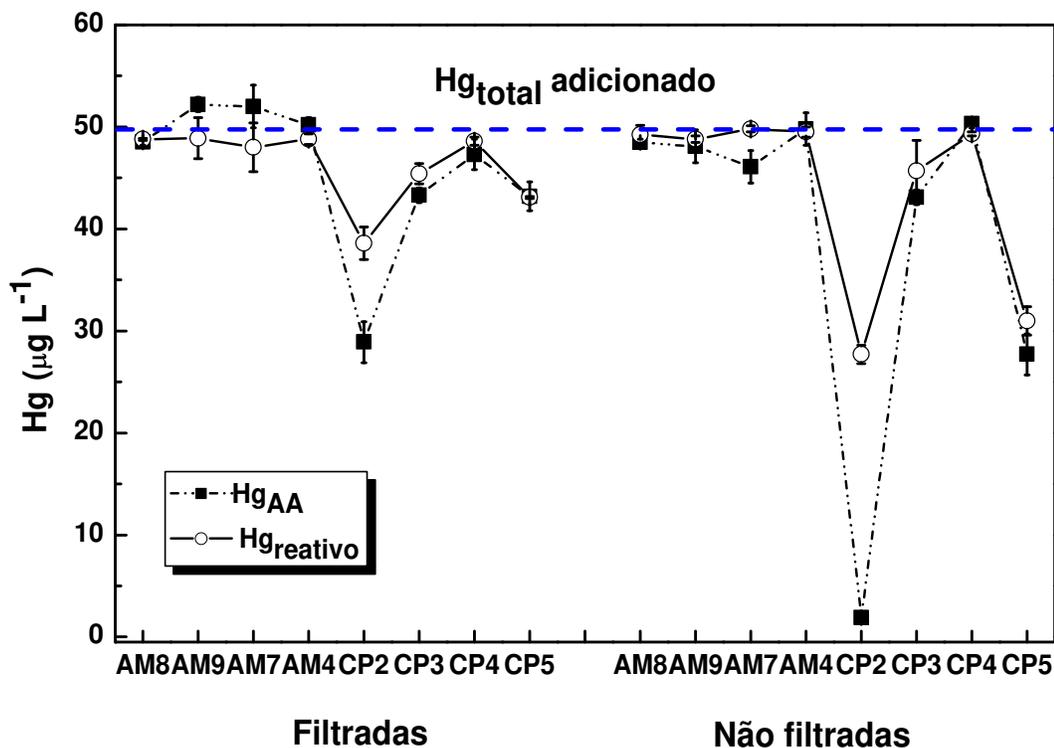


Figura 4.19: Valores de Hg_{AA} e Hg_{reativo} determinados nas águas das campanhas amostrais 2 e 3. As amostras foram enriquecidas com 50,0 µg L⁻¹ de Hg, analisadas após 1h de interação Hg x amostra. Nas amostras da Amazônia, as barras verticais representam o desvio padrão nas medidas realizadas no LQA e no INPA, nas demais amostras está relacionada ao desvio padrão das medidas em triplicata.

Ruzic (1982) comenta os aspectos que envolvem a titulação direta de metais em águas naturais e sua importância para contribuição do entendimento das espécies livre desse metal. Esse método é empregado para a obtenção das constantes de estabilidade de ligação de metais com os vários sítios de ligações contidos na matéria orgânica natural, incluindo estudos com o Hg (Lamborg *et al.*, 2003; Han & Gill, 2005) e temas relacionados à biodisponibilidade de outros metais (Tauriainen *et al.*, 2000), entre

outro estudos. Portanto, a adição de Hg nas amostras, usadas neste trabalho, pode prever o comportamento desses sistemas ao receberem uma carga de Hg e qual a capacidade de suporte para esse metal sem que cause danos para a biota. Nesse caso, as amostras naturais da Amazônia mostraram-se mais suscetíveis à toxicidade do Hg, se considerarmos que os valores de Hg_{AA} obtidos neste trabalho têm demonstrado relação com a parcela do mercúrio fracamente ligado. Resultado semelhante foi obtido para as amostras coletadas na nascente do Ribeirão das Pedras (CP4), apesar desta apresentar maiores concentrações de Cl e maior condutividade elétrica em relação às amostras da Amazônia.

Tabela 4.5: Medidas de pH, material em suspensão (MS), condutividade elétrica, carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI), E_H e oxigênio dissolvido, determinadas nas amostras de águas *in natura*, coletadas nas 2^a e 3^a campanhas.

Amostra	pH	MS (mg L ⁻¹)	C (μ S cm ⁻¹)	COT (mg L ⁻¹)	CI (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)	* E_H (mV)	O ₂ (mg L ⁻¹)
AM4	5,1	2,5	11	9,7	0,5	29,4	550,7	-
AM5	4,9	2,0	11	9,8	0,6	30,0	532,1	-
AM6	6,6	24,0	63	4,7	4,6	29,5	494,2	-
AM7	6,7	20,6	68	4,2	4,7	30,1	485,1	-
AM8	4,5	3,3	11	6,3	0,7	24,0	499,9	-
AM9	5,1	4,0	10	7,2	0,6	30,0	491,0	-
AM10	5,2	14,6	7	3,6	0,5	27,0	479,0	-
AM11	5,6	5,3	19	4,8	1,2	30,4	466,3	-
CP2	7,3	28,3	426	13,9	24,2	21,4	361,8	3,4
CP3	7,2	7,9	481	7,7	11,0	23,7	339,0	3,9
CP4	5,8	0,7	103	3,6	11,5	26,3	515,0	2,2
CP5	7,1	19,9	274	7,4	21,0	22,3	416,0	2,1

* Valores de E_H corrigidos para o potencial padrão de hidrogênio

Por outro lado, os locais amostrados na região de Campinas, tidos como ambientes que sofrem influências antrópicas por receberem descargas de esgotos domésticos e industriais, foram caracterizados por baixos valores de oxigênio dissolvido e alta condutividade elétrica. Tais amostras apresentaram resultados similares para as concentrações de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$. No entanto, esses valores foram bastante diferentes da concentração de Hg_{total} esperada, sobretudo nas amostras CP2 e CP5, com maiores concentrações de MS, COT, CI e íons dissolvidos. Os valores de pH (7,0-7,4) e E_H (339-441 mV) não foram expressivos para serem considerados como fator de influência na determinação de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ nessas amostras, com exceção da amostra CP4 (pH 5,8 e $C = 103 \mu S cm^{-1}$).

Fazendo uma comparação destes resultados com os resultados preliminares nas amostras ambientais, verifica-se uma maior seletividade do método proposto (Hg_{AA}) frente ao do $Hg_{reativo}$ nos testes preliminares, quando os valores de Hg_{AA} diferenciaram as amostras filtradas das não filtradas e amostras com maiores concentrações de matéria orgânica, sendo todas contaminadas com $5,0 \mu g L^{-1}$ de Hg. Já nos resultados apresentados acima, obtidos nas últimas campanhas amostrais, essas diferenças entre os valores de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ não ocorreram, o que pode estar relacionado a uma saturação das amostras *in natura* pela concentração de Hg utilizada ($50,0 \mu g L^{-1}$). Para avaliar tal efeito, fez-se a determinação desses dois parâmetros em amostras com menores concentrações de mercúrio ($5,0$; $10,0$ e $25,0 \mu g L^{-1}$) apresentados na Tabela 4.6. Tais amostras foram coletadas na 4ª campanha amostral em Campinas. Os resultados dos parâmetros físico-químicos dessa campanha estão descrito na Tabela 4.7.

Os resultados de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$, apresentados na Tabela 4.6, são representativos das amostras mais impactadas, sendo caracterizados pela influência de seus valores nas menores concentrações de Hg ($5,0$ e $10,0 \mu g L^{-1}$) adicionadas. Nessa faixa de concentração, os valores de $Hg_{reativo}$ foram maiores que os de Hg_{AA} , estando de acordo com os resultados preliminares. Verificou-se, ainda, nessas condições, uma melhor distinção entre os valores obtidos nas amostras filtradas e não filtradas, caracterizado pela influência do material em suspensão. No entanto, nas maiores

concentrações de Hg (25,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), esse efeito não foi pronunciado, sendo que, em algumas amostras, os valores de $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ foram menores do que o Hg_{AA} . Nota-se que independente do Hg adicionado, tanto o Hg_{AA} como $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ sofrem influência do material em suspensão. Observou-se que os valores de $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ e Hg_{AA} estão relacionados com as características de cada amostra. A relação dos valores de Hg_{AA} e alguns parâmetros físico químicos foram analisados e estão representados na Figura 4.20.

Tabela 4.6: Valores de Hg_{AA} e $\text{Hg}_{\text{reativo}}$ determinados em amostras de águas coletas na 4ª campanha. As amostras foram enriquecidas com diferentes concentrações de Hg, analisadas após 1h de interação Hg x amostra. (F) filtrada e (NF) não filtrada.

Amostra	Hg_{AA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\text{Hg}_{\text{reativo}}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg_{AA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\text{Hg}_{\text{reativo}}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Hg_{AA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\text{Hg}_{\text{reativo}}$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Hg total	50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	
CP2 (F)	50,1 \pm 3,8	51,2 \pm 0,4	-	-	7,1 \pm 0,6	8,9 \pm 0,3
CP3 (F)	49,9 \pm 1,6	53,1 \pm 1,8	25,0 \pm 1,2	-	9,1 \pm 0,3	9,1 \pm 0,3
CP4 (F)	52,8 \pm 1,9	50,2 \pm 2,5	30,2 \pm 0,1	19,5 \pm 0,6	11,3 \pm 0,2	11,0 \pm 0,9
CP5 (F)	46,6 \pm 1,3	50,3 \pm 0,2	22,7 \pm 0,6	19,4 \pm 0,1	7,2 \pm 0,6	8,5 \pm 0,3
CP2 (NF)	44,3 \pm 2,7	40,0 \pm 2,3	19,7 \pm 1,7	19,4 \pm 1,5	3,6 \pm 0,1	4,5 \pm 0,9
CP3 (NF)	46,9 \pm 1,3	39,1 \pm 1,5	21,3 \pm 1,3	19,9 \pm 0,4	4,7 \pm 0,5	4,0 \pm 0,1
CP4 (NF)	56,0 \pm 0,1	45,5 \pm 2,0	28,0 \pm 0,3	26,3 \pm 0,3	10,4 \pm 0,3	10,8 \pm 1,0
CP5 (NF)	39,8 \pm 0,8	31,3 \pm 0,6	22,2 \pm 0,1	18,4 \pm 1,0	2,0 \pm 0,2	5,5 \pm 0,1
Hg total	10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$			
CP2 (F)	6,2 \pm 0,5	7,2 \pm 0,4	2,2 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2		
CP2 (NF)	5,5 \pm 0,2	7,1 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,3		

(-) Valores não determinados

Tabela 4.7: Medidas de pH, material em suspensão (MS), condutividade elétrica, E_H , carbono orgânico total e carbono inorgânico (COT e CI), determinadas nas amostras de água *in natura*, coletadas na 4ª campanha.

Amostra	pH	MS (mg L ⁻¹)	C (μS cm ⁻¹)	COT (mg L ⁻¹)	CI (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)	* E_H (mV)
CP2	7,2	130,0 ± 9,2	154	6,6	12,84	27,5	400,5
CP3	7,3	249,5 ± 2,1	136	8,1	6,66	28,2	396,6
CP4	5,8	3,0 ± 0,1	102	1,3	25,89	27,1	441,2
CP5	7,4	46,5 ± 0,7	274	8,4	22,8	27,5	403,0

* Valores de E_H corrigidos para o potencial padrão de hidrogênio

De acordo com a Figura 4.20, tem-se uma correlação negativa dos valores de Hg_{AA} com o material em suspensão, carbono orgânico e carbono inorgânico, sendo os coeficientes de correlação linear iguais a $r = - 0,80$, $r = - 0,76$ e $r = - 0,85$, respectivamente. A condutividade elétrica não influenciou na determinação do Hg_{AA} . A presença de matéria orgânica dissolvida (MOD), como discutido neste trabalho, pode aumentar a mobilidade do Hg no ambiente aquático. Porém, segundo Ravichandran (2004), nem sempre ocorre uma correlação positiva com a interação de Hg – MOD. Uma correlação positiva Hg-MOD, geralmente implica que a origem do Hg no ambiente aquático é oriunda do sedimento ou lixiviação do solo, onde o Hg é livre e co-transportado com a matéria orgânica. Por outro lado, nos casos em que o mercúrio na coluna d'água é proveniente de fonte direta, nenhuma correlação pode ser encontrada. Jaffe & Lu (2001), sugerem que os complexos Hg – MOD podem ser removidos da coluna d'água através da adsorção biogênica ou pela co-precipitação com $CaCO_3$. Considerando a relação inversa entre COT, CI e MS, conclui-se que a adsorção foi o principal fator neste estudo.

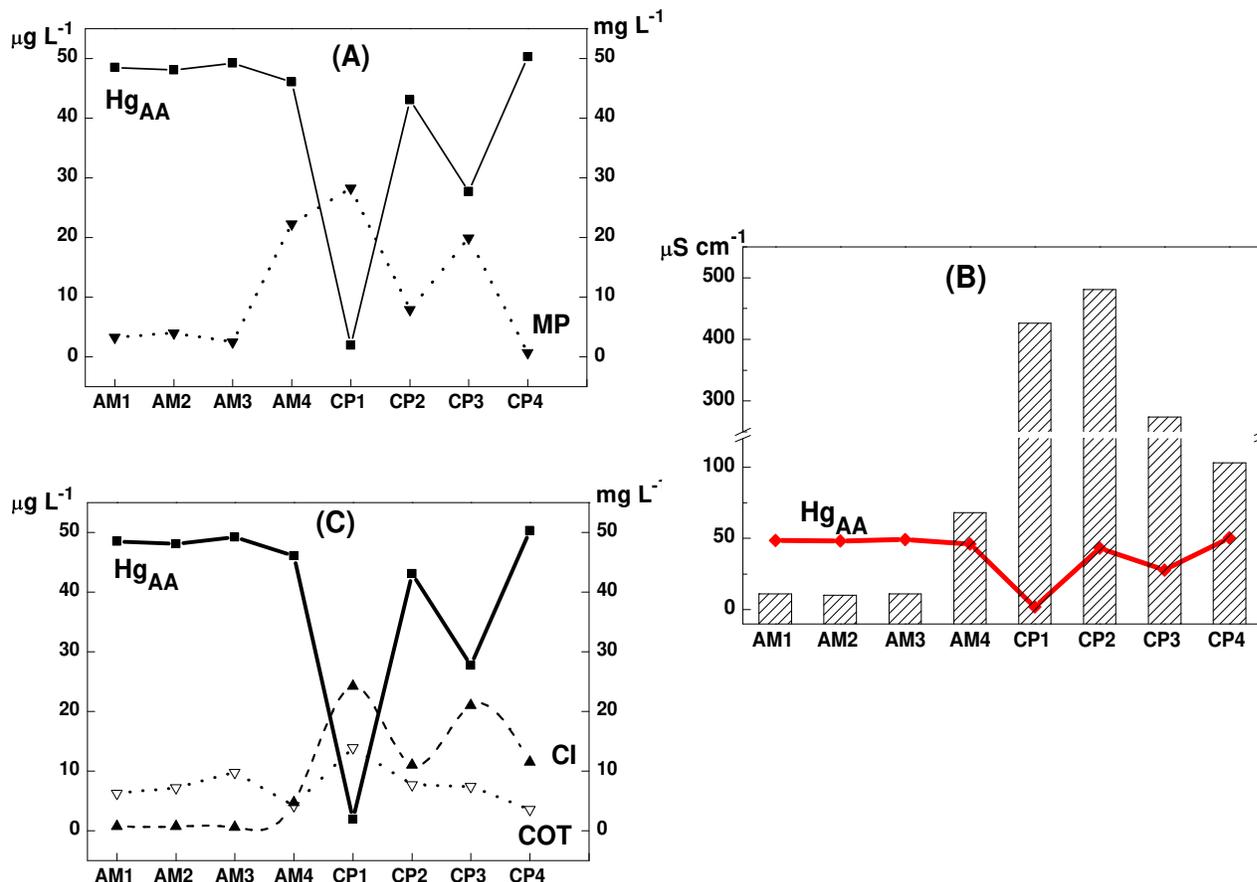


Figura 4.20: Relação dos valores de Hg_{AA} com alguns parâmetros físicos e químicos determinados nas amostras enriquecidas com 50 μg L⁻¹ de Hg. (a) Material particulado; (b) condutividade elétrica e; (c) carbono orgânico e inorgânico.

4.5. Teste de toxicidade com *Daphnia similis*: aplicação em amostras naturais

Além da avaliação do teste de toxicidade para bactérias, que são organismos de estrutura mais simples da cadeia trófica, buscou-se avaliar se as mesmas amostras que apresentaram potencialidades tóxicas devido à presença de Hg, também apresentariam

para um organismo superior da cadeia trófica. Nesse caso, utilizou-se a *Daphnia similis* devido a sua sensibilidade a pequenas mudanças no ambiente.

O método usual para determinar EC_{50} dos testes de toxicidade com *Daphnia similis* difere de acordo com os resultados obtidos. Geralmente, usa-se o método da média de imobilidade ou morte da população teste ou o método de probabilidade (ABNT, 2004; EPA, 2002). Neste trabalho, o resultado do efeito tóxico do Hg foi proporcional para cada triplicata, o que justifica o cálculo da concentração efetivamente tóxica (EC) pela interpolação das concentrações de Hg aplicada e os valores médios das porcentagens de imobilidade para cada conjunto de dados. Foi gerada uma equação da reta pela correlação linear dos valores, apresentada na Figura 4.21. Os cálculos nas amostras naturais foram feitos pela porcentagem de imobilização dos organismos testes em relação à amostra controle. Amostras com mais de 50% de imobilidade são consideradas tóxicas (ABNT, 2004).

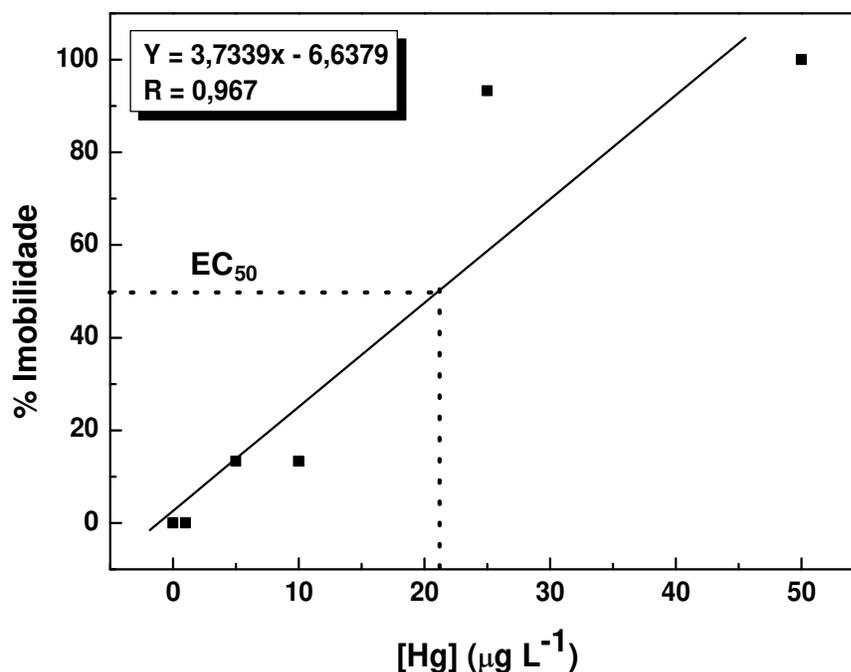


Figura 4.21: Curva de correlação linear da concentração do Hg adicionado na água de diluição em relação à % de imobilização para *Daphnia similis* (n=3). Teste agudo em 48h. Nos padrões de Hg não foi usado cromato como preservante.

Segundo a curva de imobilização da *Daphnia* para diferentes concentrações de Hg, obteve-se uma EC₅₀ de 21,1 µg L⁻¹ de Hg²⁺. Porém, houve uma mudança brusca na imobilização dos organismos em uma faixa que variou entre 10,0 e 25,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺, o que faz com que a incerteza em torno da EC₅₀ aumente. Além disso, a extrapolação da curva, neste estudo, tem o objetivo de determinar a concentração que provoca efeito tóxico em 100% da população teste (EC₁₀₀) numa concentração menor do que a usada para *E. coli*. Então, os resultados mostraram-se satisfatórios, já que 25,0 µg L⁻¹ de Hg causou esse efeito para *Daphnia*.

Foram realizados ensaios usando a água de diluição das *D. similis* contaminadas com 50,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺, na presença de AH e Cys em diferentes razões metal:ligante. O objetivo desse teste foi comparar as respostas entre os testes de toxicidade, usando *E. coli* e *D. similis*, já que no primeiro, os ligantes inibiram o efeito tóxico do Hg. Conforme pode ser visto na Tabela 4.8, pode-se verificar que todas as amostras foram tóxicas para o organismo teste, independente do ligante e da razão M:L. Observou-se uma diminuição sutil da toxicidade com o aumento da concentração de Cys. O AH apresentou um efeito que inibiu a toxicidade do Hg em quase 50%, porém esse efeito foi independente da quantidade do AH presente. O que torna claro as diferenças nos mecanismos de intoxicação entre os dois organismos utilizados nesse trabalho (bactéria e microcrustáceo).

Tabela 4.8: Porcentagem de imobilidade da *Daphnia similis* nos testes de toxicidade aguda em soluções contendo ácido húmico (AH) e cisteína (Cys), contaminadas com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} . (L) ligante.

Amostra razão molar M:L	[Hg] (μgL^{-1})	pH	% imobilidade
Controle teste	0	8,79	0
Hg	50	8,81	100
AH 1:1	50	8,46	60
AH 1:5	50	-	53
AH 1:50	50	8,4	60
AH 50 (controle)	0	8,51	0
Cys 1:1	50	8,74	100
Cys 1:50	50	-	93,3
Cys 1:100	50	8,7	86,6
Cys 100 (controle)	0	8,67	6

Os resultados dos testes de toxicidade realizados com amostras naturais contaminadas com 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, estão contidos na Tabela 4.9. Tal concentração estaria diminuindo pela metade o efeito da saturação da concentração de Hg nas amostras naturais. Inicialmente foram testadas todas as amostras *in natura*, com o intuito de averiguar o potencial tóxico de cada amostra. Verificou-se que apenas a amostra CP4 (NF) apresentou potencialidade tóxica para 40% dos organismos testes. Isto se deve, provavelmente, à baixa concentração de matéria orgânica (COT 1,3 mg L^{-1}), mas o fator principal deu-se, possivelmente, pelo pH levemente ácido (pH = 5,8) dessas águas. Por conseguinte, a presença do Hg potencializou o efeito tóxico nessa amostra, para 100% de morte do organismo estudado.

§: Porcentagem de imobilidade da *Daphnia similis* nos testes de toxicidade aguda em águas naturais filtradas (F) e não filtradas (NF). As amostras foram enriquecidas com 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg.

Ensaio controle	% Imobilidade	Amostra	% Imobilidade
Controle do ensaio	0	Hg – 25	100,0
Controle CP2-F	0	CP2-F-Hg	10,0
Controle CP2-NF	0	CP2-NF-Hg	60,0
Controle CP3-F	0	CP3-F-Hg	20,0
Controle CP3-NF	0	CP3-NF-Hg	40,0
Controle CP4-NF	40	CP4-NF-Hg	100,0
Controle CP5-NF	0	CP5-NF-Hg	13,3
Controle CP5-F	7	CP5-F-Hg	33,3
Controle AM6 – NF	0	AM6-NF-Hg	60,0

Em relação aos demais resultados, nota-se que as amostras não filtradas, exceto a CP5, apresentaram uma porcentagem de imobilidade maior do que as amostras filtradas. Tal fato pode ser explicado pela característica da *Daphnia similis* de atuar como filtro natural nos ambientes aquáticos, a qual absorve parte do mercúrio associado à matéria orgânica e/ou material particulado presente no meio. Amostras com alta turbidez influenciam na sobrevivência desses organismos (EPA, 2002). Verificou-se que as amostras que mais inibiram o efeito tóxico do Hg, nesse ensaio, apresentaram uma variação aleatória em relação aos parâmetros físico-químicos. Tsui *et al.* (2006) observaram que valores de concentração letal para *Daphnia magna*, em 24h de teste, variam de 12 à 55 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} , para adição de 5 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg.

Nessas condições, os organismos apresentaram entre 10 e 26 mg kg⁻¹ de Hg em peso úmido, indicando uma relação da concentração adicionada e a quantidade absorvida pelo organismo. Geralmente a quantidade de Hg absorvido pelas espécies *Daphnia* é diretamente proporcional à concentração total de Hg no ambiente. Essa capacidade é aumentada em espécies maiores (~ 3-6 mm) e com o aumento da temperatura (Tsui *et al.*, 2006; Sarma *et al.*, 2007). Neste trabalho, as condições de temperatura e tamanho dos organismos teste foram constantes, o que leva considerar que a diferença de toxicidade apresentada está diretamente relacionada com as interações do Hg adicionado nas diferentes amostras. Esses valores foram relacionados com as concentrações de Hg_{AA} obtidos nessas mesmas amostras, contaminadas com 25 µg L⁻¹.

4.6. Correlação dos valores de Hg_{AA} com os resultados dos testes de toxicidade

No intuito de avaliar as concentrações de Hg_{AA} determinadas neste trabalho com relação à parcela do Hg biodisponível em águas naturais, os resultados de Hg_{AA} provenientes das soluções aquosas contendo diferentes razões metal:ligante e das amostras de água contaminadas com 25,0 e 50,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺ foram relacionadas com os resultados dos testes de toxicidade nessas mesmas condições, já discutidos neste trabalho. Nessa etapa, a calibração com ensaios biológicos permitirá inferir se as diferenças de concentrações, tanto para Hg_{reativo} quanto para Hg_{AA} em relação do Hg_{total}, são representativas para o entendimento da biogeoquímica do Hg no ambiente aquático.

O coeficiente de correlação linear entre esses dois parâmetros foi determinado a partir de uma curva de calibração entre os resultados analíticos obtidos nas soluções com os ligantes e nas amostras de águas enriquecidas com o Hg frente aos resultados dos testes de toxicidade respirométrico nas soluções com os ligantes e turbidimétrico e com as *Daphnias* nas amostras naturais. Foi aplicado o teste F (ANOVA) para avaliar a

significância estatística da regressão no nível de 95% de confiança (Bruns *et al.*, 2007). Usou-se a distribuição $F_{1,n-2}$, onde, 1 e n-2 são os números de graus de liberdade da média quadrática devida à regressão e da média quadrática residual, respectivamente. O valor de F fornece uma indicação da significância da regressão. Um valor de $F_{\text{calculado}}$ menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$ (contido na tabela de distribuição de F, 5%) indica que a regressão não é significativa. Para uma relação inversa à relação anterior, a regressão é considerada significativa, indicando que os valores devido ao erro (resíduos) não são expressivos quando comparados à variação decorrente da relação linear prevista. As Figuras 4.22 e 4.23 mostram a correlação entre a %IRB (teste respirométrico) frente aos valores de Hg_{AA} nos testes com todos os ligantes (Cys, AH, Hys e NTA) e a correlação dos valores de Hg_{AA} com os valores de %ICB dos testes de toxicidade turbidimétrico e % de imobilidade das *Daphnias* em águas naturais, respectivamente.

Nota-se que a seletividade do AA na redução do Hg apresentou uma correlação positiva com os dados de toxicidade, relacionando a dependência da proporção e da natureza do ligante discutidos nos itens 4.2 e 4.3.1 deste Capítulo. Assim, pode inferir que tal concentração é efetivamente tóxica, apresentando um coeficiente de correlação linear de $r^2 = 0,97$ (Figura 4.22A). Comparativamente, a correlação dos valores de Hg_{reativo} com os resultados de %IRB (Figura 4.22B) não foi significativa com $r^2 = 0,37$. A análise de significância da regressão mostrou que a correlação entre Hg_{AA} e %IRB existe e segue uma relação linear, em que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi $\gg F_{\text{crítico}(1,7)}$ tabelado, sendo $F_{\text{calculado}} = 282,0$. Para a correlação entre Hg_{reativo} e %IRB, o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}(1,8)}$, indicando que a regressão não é significativa com $F_{\text{calculado}} = 4,9$, podendo-se afirmar que não há uma correlação linear entre esses dois parâmetros. Nem sempre, porém, uma regressão dada como significativa pelo teste F é útil para realizar previsões. Assim, uma forma prática para descartar essa hipótese é que o valor de $F_{\text{calculado}}$ seja de, pelo menos, 10 vezes o valor da distribuição F tabelado. Por isso, valores muito altos de $F_{\text{calculado}}$ são os mais desejáveis, como no caso do valor calculado para Hg_{AA} em função da %IRB.

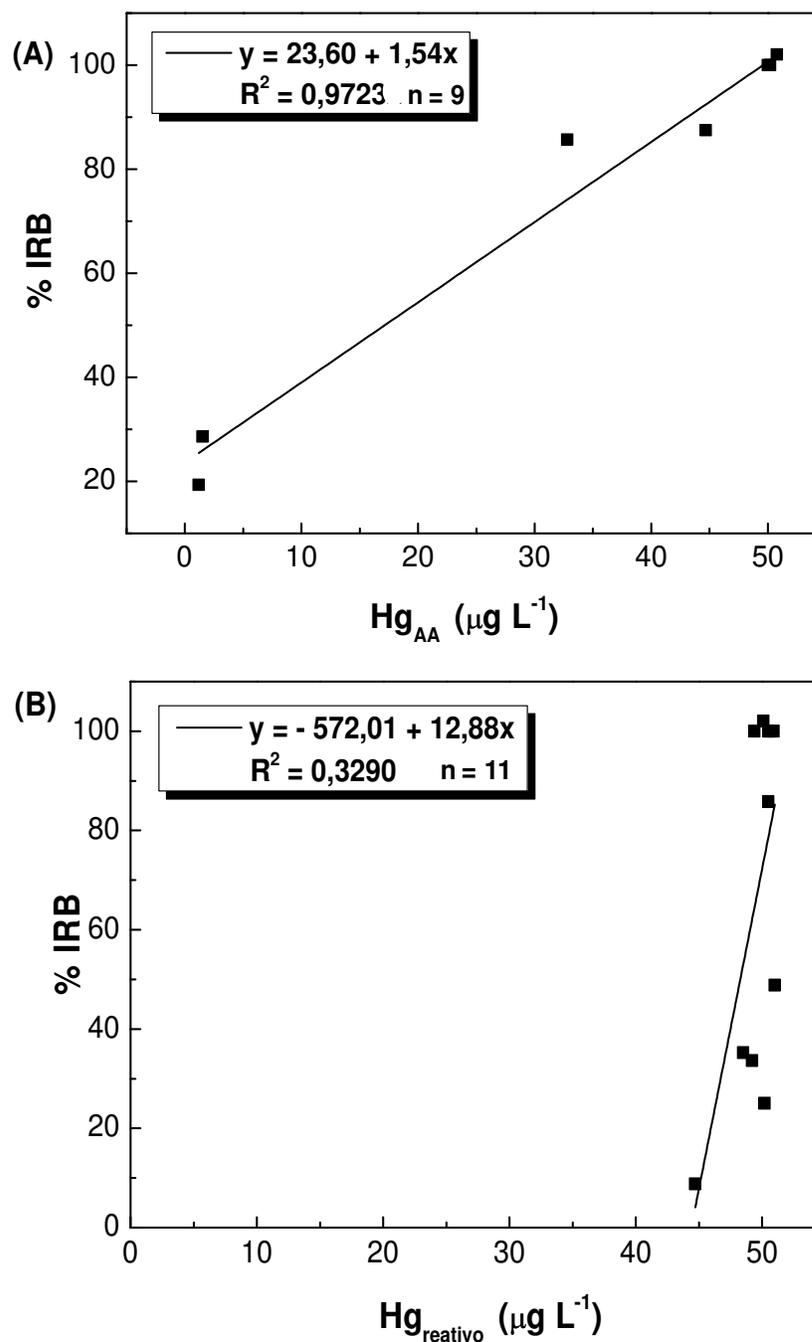


Figura 4.22: Correlação da porcentagem de inibição da respiração bacteriana (%IRB) em relação aos resultados analíticos de Hg redutível por (A) AA e (B) por SnCl₂ nos testes de toxicidade realizados com os ligantes (Cys, AH, Hys e NTA) em diferentes razões Hg:Ligante, apresentados neste trabalho, sendo o Hg_{total} = 50 µg L⁻¹.

Na Figura 4.23A e B estão apresentados os resultados percentuais da ICB nos ensaios biológicos com *E. coli* (FIA-turbidimétrico) e da porcentagem de imobilidade das *D. similis*, respectivamente, nas amostras de águas naturais. Tais resultados foram apresentados frente às proporções percentuais de recuperação do Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$, calculadas em relação ao Hg total adicionado em cada amostra. Nessas condições, os resultados de Hg_{AA} e as respostas biológicas foram correlacionáveis.

O coeficiente de correlação linear para cada condição das amostras naturais analisadas foi de $r^2 = 0,88$ para *E. coli* e $r^2 = 0,65$ para *Daphnia* em função dos valores de Hg_{AA} , frente aos valores de $r^2 = 0,56$ para *E. coli* e $r^2 = 0,68$ para *Daphnia* relacionados com os valores de $Hg_{reativo}$. A análise de significância da correlação da concentração de Hg_{AA} em função da %ICB (*E. coli*) foi $F_{calculado} \gg F_{crítico(1,3)}$, mostrando que a correlação é significativa com $F_{calculado} = 262,7$. Por outro lado, a correlação do Hg_{AA} em função da resposta com a *Daphnia*, obteve-se o valor de $F_{calculado} < F_{crítico(1,6)}$, indicando que essa correlação tem uma menor probabilidade de ocorrer. Porém, deve-se considerar a proximidade entre os dois valores $F_{calculado} = 4,58 < F_{crítico(1,6)} = 5,99$. A mesma análise foi realizada para as concentrações de $Hg_{reativo}$. Tanto em relação aos resultados com a *E. coli* quanto aos da *Daphnia*, a correlação não foi significativa, sendo $F_{calculado} = 2,61 < F_{crítico(1,2)} = 18,51$ para *E. coli* e, $F_{calculado} = 4,05 < F_{crítico(1,6)} = 5,99$ para *Daphnia*.

Nesse contexto, pode-se inferir que a concentração de Hg_{AA} expressa a concentração de Hg que realmente afeta os organismos aquáticos nessas águas, visto que a inibição do crescimento bacteriano e a imobilidade da *Daphnia* deram-se em amostras que menos influenciaram os valores de Hg_{AA} , isto é, amostras que apresentaram uma porcentagem de recuperação em torno de 100% do Hg adicionado. O comportamento inverso ocorreu para amostras com menores concentrações de Hg_{AA} , as quais foram menos afetadas pelo efeito tóxico do Hg total adicionado. Para os valores de $Hg_{reativo}$ não foi encontrada correlação entre a resposta analítica e os testes de toxicidade. Desta maneira, os valores de Hg_{AA} mostram-se concordantes com a biodisponibilidade do mercúrio em diferentes amostras, sendo elas manipuladas ou naturais.

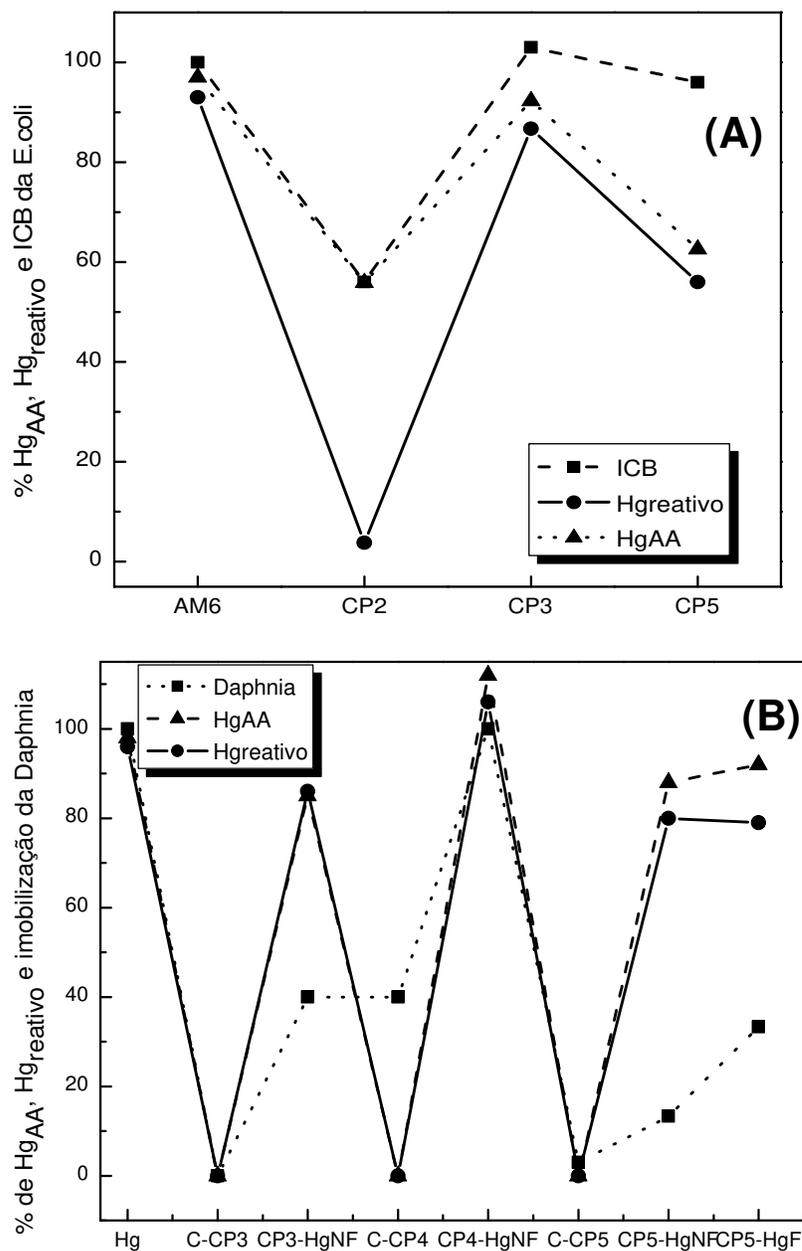


Figura 4.23: Porcentagem de recuperação do Hg adicionado nas amostras de águas naturais redutível por AA (Hg_{AA}) e por $SnCl_2$ ($Hg_{reativo}$) frente aos valores de (A) % de inibição do crescimento bacteriano (ICB) dos testes de toxicidade com *E. coli* por turbidimetria com $50,0 \mu g L^{-1}$ de Hg em amostras não filtradas (NF); (B) % de imobilidade para *Daphnia* com $25,0 \mu g L^{-1}$ e Hg, nas mesmas amostras, sendo (F) amostras filtradas.

4.7. Proficiência do LQA para análise de Hg_{total} em material biológico e em água por CVAAS

A avaliação da fidedignidade dos resultados gerados de Hg_{total} quantificados por CVAAS em amostras de peixes e de águas provenientes da calibração interlaboratorial traz informação importante relacionada ao protocolo que envolve a determinação de mercúrio no LQA, tais como: precisão, exatidão, estabilidade do equipamento, qualidade dos reagentes, padrões utilizados na curva analítica e o uso de técnicas limpas para análise de Hg. Resultados satisfatórios em um exercício interlaboratorial refletem a minimização de erros e de contaminação durante uma análise.

O período de participação no programa de proficiência de Hg realizado pela Canadian Food Inspection Agency durante o desenvolvimento deste trabalho refere-se a dezembro de 2004 até março de 2006, resultando um total de 48 determinações em triplicata. Os resultados da calibração foram enviados pela Agência na forma de relatório, contendo o valor dos z-escores para cada amostra de cada laboratório (participaram desta calibração 44 laboratórios, sendo que este número variou a cada trimestre) com a seguinte interpretação:

- a) $|z| = 2$ Satisfatório
- b) $2 < |z| < 3$ Questionável
- c) $|z| = 3$ Insatisfatório

Os resultados do LQA apresentaram índice z satisfatórios ($|z| < 2$) em todas as campanhas (Apêndice III).

A calibração interlaboratorial pelo Programa de Ensaio de Proficiência pelo SENAI-CETIND (PEP) em água, também apresenta a qualidade dos resultados pelo índice z (z-score). Nas duas campanhas, o LQA obteve índice satisfatório ($|z| < 2$) (participaram dessa calibração 16 laboratórios) (Apêndice III).

CONCLUSÕES
E
PERSPECTIVAS

5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O protocolo proposto neste trabalho para avaliação das espécies de mercúrio potencialmente tóxicas presentes em águas naturais traz uma considerável contribuição analítica, principalmente pela inovação da proposta de desenvolver um método operacional que não reporte apenas um dado analítico de concentração, mas sim uma grandeza associada à biodisponibilidade desse analito por meio de uma calibração balizada na resposta biológica. Aliado a isso, uma nova técnica analítica foi validada, apresentando suas respectivas figuras de mérito tais como repetibilidade, sensibilidade e calibração com os resultados biológicos avaliados estatisticamente, o que proporcionou resultados satisfatórios em termos determinísticos, concernente ao analito, e probabilísticos em relação às respostas biológicas.

A otimização analítica proporcionou uma série de vantagens relacionadas à praticidade operacional do protocolo no que diz respeito ao fácil manuseio, com reagente de baixo custo e não tóxico, além da minimização de resíduos pela pouca quantidade de amostra utilizada e o uso apenas de ar e solução de ácido ascórbico em pequenas quantidades, os quais dispensam um tratamento mais sofisticado do resíduo gerado. O uso do espectrofotômetro de absorção atômica do vapor frio acoplado a um sistema FIA com amostragem discreta, utilizados na determinação do Hg redutível por AA, contribuiu para leituras rápidas e precisas em uma faixa linear de trabalho de 0,5 a 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg. Convém ressaltar que a faixa de determinação analítica do protocolo mostrou-se condizente com as concentrações de Hg reportadas na literatura, as quais provocam toxicidade aguda para bactérias, algas e microinvertebrados, representantes primários da cadeia trófica aquática. Essa operacionalidade aliada ao balizamento com as respostas biológicas vai de encontro à premissa das repostas rápidas, menor custo, reprodutibilidade e especificidade, buscados na avaliação da toxicidade de um analito, nesse caso, do Hg.

O ácido ascórbico (AA), neste trabalho, foi tido como um agente redutor brando e seletivo para as espécies mercuriais devido às particularidades de sua reação de oxirredução com o Hg, após a otimização analítica. Essa seletividade foi vista nos

resultados de Hg_{AA} obtidos nas soluções contendo Hg e diferentes ligantes e Hg em águas naturais, em que os valores de Hg_{AA} determinados foram condizentes com as constantes de formação dos complexos formados entre o Hg e os ligantes estudados e com os fenômenos relacionados à complexação e a adsorção do Hg pela matéria orgânica dissolvida e particulada nas amostras naturais. Esses últimos, foram demonstrados pela correlação negativa dos valores de Hg_{AA} com o material em suspensão, carbono orgânico e carbono inorgânico nessas amostras. Certamente, essa característica de redução branda e seletiva foi o principal fator para que os valores de Hg_{AA} apresentassem correlação com a concentração biodisponível do Hg nos testes de toxicidade.

No que concerne à avaliação dos resultados analíticos frente às respostas biológicas da bactéria *E. coli*, nas duas condições analisadas (solução com os ligantes e águas naturais), concluiu-se que os valores de Hg_{AA} podem ser diretamente relacionados com o efeito tóxico apresentado nos testes de toxicidade, confirmados pelos valores do coeficiente de correlação linear entre $r^2 = 0,88$ e $0,97$ (bastante expressivos para testes biológicos) e pela análise de variância dos resíduos da correlação, a qual foi significativa para uma representação linear dos dados.

Na avaliação das respostas obtidas nos testes de toxicidade com a *Daphnia*, essa correlação não foi significativa, pois a análise dos resíduos indica que a variância total da correlação pode estar diretamente relacionada à variância do erro. Porém, esse resultado pode não ser descartado, considerando que os valores usados no teste F estiveram próximos, sugerindo que para um organismo superior sejam necessários mais estudos para validar o procedimento proposto. Ressalta-se que a *Daphnia* tem um mecanismo particular de interação com o Hg, MOD, MS e pH entre outras características do ambiente aquático.

A análise comparativa entre os resultados obtidos de Hg_{AA} e $Hg_{reativo}$ foi útil para elucidar questões sobre o uso do parâmetro operacional $Hg_{reativo}$ para representar a parcela de mercúrio biodisponível. Verificou-se que o $Hg_{reativo}$, correspondeu ao estoque de Hg total contido nas amostras com os diferentes ligantes independente de suas concentrações e nas amostras naturais com baixas concentrações do metal, ao mesmo

tempo em que seus valores não apresentaram correlação com as respostas dos testes de toxicidade estudados neste trabalho. Portanto, não seria uma ferramenta útil na interpretação da biodisponibilidade do Hg nessas amostras.

Este trabalho ainda contribuiu com a padronização de um teste de toxicidade com *E.coli* pelo método turbidimétrico, demonstrando sua aplicabilidade em amostras de águas naturais.

Nesse contexto, é importante uma abordagem sobre a visão determinística dos vários protocolos usados para avaliação ecotoxicológica. Especificamente para as espécies mercuriais no ambiente aquático, onde estão envolvidas várias rotas de interações entre os constituintes do meio, pondera-se até que ponto valores obtidos por métodos operacionais, muitas vezes drásticos, podem interpretar tais interações.

Concernente as perspectivas para pesquisas futuras, tem-se o estudo da aplicabilidade desse protocolo visando à proteção da vida aquática, onde pode ser utilizado como uma ferramenta em estudos de avaliação de risco, para uma carga de Hg, em sistemas aquáticos. Tal uso foi demonstrado nas amostras de águas da Amazônia, as quais não foram capazes de “neutralizar” o efeito tóxico de uma carga adicional do metal. Nesse aspecto, é interessante uma abordagem do uso desse protocolo na avaliação da concentração de mercúrio lábil / biodisponível em uma carga de efluente baseado nas concentrações de Hg preconizadas pela Resolução CONAMA 357 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg total para descarga de efluente), considerando que apenas a aplicação do teste de toxicidade nesses efluentes não especificaria o agente tóxico.

De maneira geral, o trabalho contribuiu para um aprimoramento em termos de calibração com os resultados da toxicidade aguda das espécies mercuriais. Outros estudos poderiam ser direcionados para uma calibração com teste de toxicidade crônica, ou ainda, com outros organismos da cadeia trófica aquática que não foram abordados nessa pesquisa.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). (2004). *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustácea)*, procedimento NBR 12713:2004. Rio de Janeiro.

Ahmad, M., Ta, G.C., Heng, L.Y. (2005). *Fabrication of alkaline phosphatase biosensor for Hg²⁺ determination*. Trabalho apresentado em: 2005 Asian Conference on sensors and International Conference on new Techniques on Pharmaceutical and Biomedical Reserch Procedures, Malaysia, Artigo complete, 0-7803-9370-8/05, p. 99-102.

Alsop, G.M., Waggy, G.T., Conway, R.A. (1980). Bacterial inhibition test. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52: 452-2456.

Amyot, M., Lean, D.R.S., Mierle, G. (1997). Photochemical formation of volatile in high Artic Lakes. *Toxicol. Environ. Chem.*, 16: 2054-2063.

Andrews, J.M. (2005). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 60-76.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (1998). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998.

APHA – American Public Health Association. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19 ed. Part 8000 (Toxicity), Part 9000 (Microbiological examination), Part 10000 (Biological examination).

Apostoli, P., Cornelis, R., Duffus, J., Hoet, P., Lison, D., Templeton, D. (2006). *Elemental speciation in human health risk assessment*. Geneva: Environmental Health Criteria 234. World Health Organization. 158p.

ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry. (1999). *Toxicological Profile for Mercury*. Atlanta: Division of Toxicology / Department of Health and Human Services. 611p.

ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry. (2007). *Priority Hazardous Substances*. [Acesso em 05 fev. 2009] Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov>.

Baird, C. (2002). *Química Ambiental*. 2. ed. T. Bookman. Cap. 6 e 7.

Barbosa, A.C. (1997). Mercury in Brazil: present or future risks?. *Ciência e Cultura J. Braz. Assoc. Advanc. Sci.*, 49(1/2): 111-116.

- Barbosa, A.C., Souza, J., Dórea, J.G., Jardim, W.F., Fadini, P.S. (2003). Mercury determinations in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 45: 235-246.
- Barrocas, P.R.G. (2004). *Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor*. Tese de Doutorado. The Florida State University, College of Arts and Sciences.
- Barros Neto, B. (2007). *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 3. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 480p.
- Battke, F., Ernst, D., Halbach, S. (2005). Ascorbate promotes emission of mercury vapour from plants. *Plant Cell & Environment*, 28(12): 1487-1495.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J. Microbial. Methods*, 25: 225-232.
- Bellin, I. C. (2006). *Interação entre íons Hg(II) e substâncias húmicas extraídas de diferentes solos da Bacia do Médio Rio Negro, Amazônia*. Tese de Doutorado. Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).
- Bier, O. (1985). *Capítulo 24 em Microbiologia e Imunologia*, 24. ed. São Paulo: Companhia Melhoramentos São Paulo.
- Bisinoti, M.C. (2005). *Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na bacia do rio negro, Amazônia*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Bisinoti, M.C., Jardim, W.F. (2003). Production of organic mercury from Hg⁰: experiments using microcosms. *J. Braz. Chem. Soc.*, 14(2): 244-248.
- Bisinoti, M.C., Sargentini, E., Jardim, W.F. (2007). Seasonal behavior of mercury species in waters and sediments. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(3): 544-553.
- Bitton, G., Dutka, B. (1986a). *Toxicity testing using microorganisms*. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton. v.1, p.1-57.
- Bitton, G., Dutka, B. (1986b). *Toxicity testing using microorganisms*. CRC Press, Inc. Boca Raton: Florida. v.2, 202p.

Bitton, G., Koopman, B., Agami, O. (1992). MetPADtm: a bioassay for rapid of heavy metal toxicity in wastewater. *Water Environ. Res.*, 64: 834-836.

Bitton, G. (2005). *Toxicity detection technology*. [Acesso em 13 fev. 2009] Disponível em: <http://www.ees.ufl.edu/homepp/bitton/default.asp>

Blackstone, S., Hurley, R.J., Hughes, R.E. (1974). Some inter-relationships between vitamin C (*L*-ascorbic acid) and mercury in the guinea-pig. *Food Chem. Toxicol.*, 12: 511-516.

Bloom, N.S. (1994). Influence of analytical conditions on the observed “reactive mercury” concentrations in natural freshwaters. In: Watras, C.J, Huckabee, J.W. *Mercury pollution – integration and synthesis*. Florida: Lewis Publishers, p.541-552.

Boening, D.W. (2000). Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40: 1335-1351.

Bruns, R.E., Scarminio, I.S., Neto, B.B. (2007). *Como fazer experimentos*. Editora da UNICAMP, São Paulo. Cap. 1, 2 e 5.

Butler, E.A., Swift, E.H. (1972). *Quantitative measurements and chemical equilibria*. São Francisco: W.H. Freeman and Company, p.1-719.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. (1992). *Águas: rios e reservatórios (variáveis de qualidade da água)*. São Paulo. [Acesso em 13 fev. 2009] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/variaveis.asp>.

CFR – Code of Federal Regulations. (2009). *Title 40: Protection of Environment*. v.21, Part 131 – Water Quality Standard, Subpart D, § 131.36. Disponível em: <http://ecfr.gpoaccess.gov>

Coichev, N., Fornaro, A. (1998). Ácido *L*-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Quím. Nova*, 21(5): 642-650.

Coichev, N., Moya, H. D. (2006). Kinetic studies of the oxidation of *L*-ascorbic acid by tris(oxalate)cobaltate in the presence of CDTA metal ion complexes. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17(2): 364-368.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005). Resolução CONAMA nº 357/2005. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento

dos corpos de águas superficiais e as condições e padrões de lançamento de efluentes, p.1-23.

Creutz, C. (1981). The complexities of ascorbate as a reducing agent. *Inorg. Chem.*, 20: 4449-4452.

Davies, M.B. (1992). Reactions of *L*-ascorbic acid with transition metal complexes. *Polyhedron*, 11(3): 285-321.

Davies, M.B., Austin, J., Partridge, D.A. (1991). *Vitamin C: Its chemistry and biochemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry Paperbacks, 154p.

Diamond, J.M., Klaine, S.J., Bitcher, J.B. (2006). Implications of pulsed chemical exposures for aquatic life criteria and wastewater permit limits. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 5132-5138.

Díez, S., Bayona, J.M. (2008). Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta*, 77: 21-27.

Dirks, M.J., Davis, D.R., Cheraskin, E., Jackson, J.A. (1994). Mercury excretion and intravenous ascorbic acid. *Archives of Environ. Health*, 49(1): 49-52.

Divine, K.K., Ayala-Fierro, F., Barber, D.S., Carter, D.E. (1999). Glutathione, albumin, cysteine, and cys-gly effects on toxicity and accumulation of mercuric chloride in LLC-PK₁ cells. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 57: 489-505.

Duffus, J.H., Nordberg, M. e Templeton, D.M. (2007). Glossary of terms used in toxicology 2nd edition. IUPAC recommendation: Chemistry and human health division. *Pure Appl. Chem.*, 79(7): 1153-1344.

EEC - European Economic Community. (2000). Directive 2000/60/EC - OJ L 327 12/2000, establishing a framework for community action in the field of water policy.

EPA – US Environmental Protection Agency. (1994). *Method 245.1: Determination of mercury in water by cold vapor atomic absorption spectrometry*. Revision 3.0, p.18. Disponível em: http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/245_1.pdf

EPA – US Environmental Protection Agency. (1997). *Mercury study report to congress – Fate and transport of mercury in the environment*. v.3, p.376. Disponível em: http://www.newmoa.org/prevention/topichub/22/Hg_Report_Vol_3_Fate&Transport_of_Hg_in_Environment.pdf

EPA – US Environmental Protection Agency. (2002). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. EPA-821R02012, 5ª ed. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscience/methods/wet/disk2/>

EPA – US Environmental Protection Agency. (2006a). *EPA's roadmap for mercury*, p.79. Disponível em: <http://www.epa.gov/mercury/roadmap.htm>

EPA - US Environmental Protection Agency. (2006b) *National Recommended Water Quality Criteria*. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqctabl/>

Fadini, P.S. (1999). *Comportamento biogeoquímico do mercúrio na Bacia do Rio Negro (AM)*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Fadini, P.S., Jardim, W.F. (2000). Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles. *Analyst*, 125(3): 549-551.

Farah, C.R.T. (2001). Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um sistema FIA condutométrico. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Farré, M., Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal. Chem.*, 22(5): 299-310.

Fitzgerald, W.F., Mason, R.P., Vandal, G.M., Dulac, F. (1994). Air-water cycling of Mercury in lakes. In: Watras, C., Huckabee, J.W. *Mercury pollution: Integration and synthesis*. California: Lewis Publishers. Chap. 2, p.203-220.

Florence, T. M. (1992). Trace element especiation by anodic-stripping voltammetry. *Analyst.*, 117(3): 551-553

Gasca, A., Heras, A.M., Ruiz, J.J. (1981). Reduccion del acido dehidro-D-ascorbico sobre electrodo de mercúrio. *Anales de Química*, 77: 344-347.

Gill, G., Bloom, N.S., Cappellino, S., Driscoll, C., Mason, R., Rudd, J.W. (1999). Sediment-water fluxes of mercury in Lavaca Bay, Texas. *Environ. Sci. Technol.*, 33(5): 663-669.

Gilmour, C.C., Henry, E.A. (1991). Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ. Pollut.*, 71: 131-169.

- Gimenez, S.M.N. (1994). *Ensaio de toxicidade aguda usando E. coli como organismo-teste*. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Golding, G. R., Kelly, C.A., Loewen, R.S., Loewen, P.C., Rudd, J.W.M, Barkay, T. (2002). Evidence for facilitated uptake of Hg (II) by *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* under anaerobic and aerobic conditions. *Limnol. Oceanogr.*, 47(4): 967-975.
- Gooding, J.J., Chow, E., Finlayson, R. (2003). Biosensors for detecting metal ions: new trends. *Aust. J. Chem.*, 6: 159-162.
- Guimarães, E.S., Lacava, P.M., Magalhães, N.P. (2004). Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia similis* na água de captação no Rio Paraíba do Sul e processada na estação de tratamento de água do município de Jacareí - SP. *Rev. Bras. Eng. Sanit. Amb.*, 9(2): 124-129.
- Halbach, S. Battke, F., Ernst, D., Fleischmann, F. (2008). Phytoreduction and volatilization of mercury by ascorbate in *Arabidopsis thaliana*, *European beech* and *Norway spruce*. *Applied Geochemistry*, 23: 494-502.
- Hall, G.E.M., Pelchat, J.C., Pelchat, P., Vaive, J.E. (2002). Sample collection, filtration and preservation protocols for the determination of "total dissolved" mercury in waters. *Analyst*, 127: 674-680.
- Han, S., Gill, G.A. (2005). Determination of mercury complexation in Coastal and Estuarine Waters using Competitive Ligand Exchange Method. *Environ. Sci. Technol.*, 39(17): 6607-6615.
- Horvat, M. (1996). Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: Baeyens, W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O. Kluwer A. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Netherlands: Publishers, p.1-31.
- Hudec, I. (1991). A comparison of population from the *Daphnia similis* group (Cladocera: Daphniidae). *Hydrobiologia*, 225(1): 9-22.
- Jaffe, R., Lu, X. (2001). Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Res.*, 15(7): 1793-1803.
- Jahanbakht, S., Livardjani, F., Ruhl, E., Jaeger, A., Lugnier, A. (1998). An experimental ecotoxicological model and its application to the behavioral study of inorganic mercury (HgCl₂) in the environment. *Analisis*, 26(10): 377-380.

-
- Janssen, C.R., Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Allen, H.E. (2003). Environmental risk assessment of metals : tools for incorporating bioavailability. *Environ. International*, 38: 793-800.
- Jardim, W.F., Canela, M.C. (1997). The fate of Hg-O in natural waters. *J. Braz. Chem. Soc.*, 8(4): 426-426.
- Jardim, W.F., Gimenez, S.M.N., Canela, M.C. e Moraes, S.G. (1993). Acute toxicity of Hg⁰ and Hg²⁺ ions to *Escherichia coli*. *Chem. Speciation Bioavailability*, 5(3): 97-100.
- Jardim, W.F., Pasquini, C., Guimarães, J.R., Faria, L.C. (1990). Short-term toxicity test using *Escherichia Coli*: monitoring CO₂ production by flow injection analysis. *Water Res.*, 24(3): 351-354.
- Jay, J.A., Najera, I., Lin, C., Kohbodi, G.A. (2005). Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells. *Environ. Sci. Technol.*, 39(9): 3116-3120.
- Jiang, G., Shi, J., Feng, X. (2006). Mercury pollution in China. *Environ. Sci. Technol.*, 5: 3673-3678.
- Joyce, R.M. (1984). Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories. *Science*, 224(4648): 449 – 452.
- Karlson, A.G., Washington, J.A., Warren, E. (1972). Stability of barium sulfate turbidity standards. *Appl. Microbiol.*, 24(6): 1013.
- Kazakevicienė, B., Valincius, G., Niaura, G., Talaikytė, Z., Kazemekaitė, M., Razumas, V., Plausinaitis, D., Teiserskienė, A., Lissauskas, V. (2007). Mediated oxidation of ascorbic acid on a homologous series of ferrocene-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, 23: 4965-4971.
- Kehring, H.A., Malm, O. (1999). Methylmercury in fish as a tool for understanding the Amazon mercury contamination. *Appl. Organomet. Chem.*, 13: 689-696.
- Kelly, C.A., Rudd, J.M., Holoka, M.H. (2003). Effect of pH on mercury uptake by an aquatic bacterium: implications for Hg cycling. *Environ. Sci. Technol.*, 37(13): 2941-2946.
-

- Kuswandi, B., Nuriman, Dam, H. H., Reinhoudt, D.N. (2007). Development of a disposable mercury ion-selective optode based on trityl-picolinamide as ionophore. *Anal. Chim. Acta*, 591(2): 208-213.
- Lamborg, C.H., Tseng, C., Fitzgerald, W., Balcom, P., Hammerschmidt, C. (2003). Determination of the mercury complexation characteristics of dissolved organic matter in natural water with "reducible Hg" titration. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 3316-3322.
- Leite, J. V., Morita, D. M. (1999). Teste de toxicidade para avaliação do impacto de despejos industriais em sistemas biológicos de tratamento de esgoto. *Rev. Bras. Eng. Sanit. Amb.*, 4(3): 142-151.
- Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potencial measurements. *Anal. Chem.*, 44(6): 1038-1039.
- Lindqvist, O. (1994). Atmospheric cycling of mercury an overviwm. In: Watras, C., Huckabee, J.W. *Mercury pollution: Integration and synthesis*. California: Lewis Publishers. Chap. 1, p.181-185.
- Lindqvist, O., Xiao, Z.F., Strömberg, M.D. (1994). Photochemical behavior of inorganic mercury compounds in aqueous solution. In: Watras, C., Huckabee, J.W. *Mercury pollution: Integration and synthesis*. California: Lewis Publishers. Chap. 4, p.581-591.
- Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F. (2002). *Avaliação do Potencial Tóxico de Mercúrio em Águas Naturais* (Parte II). Campinas: IQ-UNICAMP. Relatório Científico Projeto FAPESP 02/03795-0, p.1-28.
- Loomis, T.A. (1978). *Essentials of Toxicology*. 3ª ed. Philadelphia: Lea & Febiger. Chap. 4, p.45-79.
- Loux, N. T. (1998). An assessment of mecury-species-dependent binding with natural organic carbon. *Chem. Speciation Bioavailability*, 10(4): 127-136.
- Malm, O. (1998). Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ. Res.*, 77(2): 73-78.
- Manahan, S.M. (2002). *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. 3ª ed. Florida: Lewis Publishers. Chap. 5-7 e 10, p.97-164 e 211-231.
- Mehrotra, U.S., Agrawal, M.C., Mushran, S.P. (1969). Kinetics of the reduction of hexacyanoferrate (III) by ascorbic acid. *J. Phys. Chem.*, 72: 1996-1999.

- Melamed, R., Boas, V.C. (2002). *Mecanismo de interação físico-química e mobilidade do mercúrio em solos, sedimentos e rejeito de garimpo de ouro*. Bahia: Centro de Tecnologia Mineral – CETEM e Ministério de Ciência e Tecnologia. 48p. Série Tecnologia Ambiental
- Micarone, R.C.M., Bueno, M.I.M.S., Jardim, W.F. (2000). Compostos de mercúrio, revisão de método de determinação, tratamento e descarte. *Quim. Nova*, 23(4): 487-495.
- Miller, J.C., Miller, J.N. (1993). *Statistics for Analytical Chemistry*. 3. ed. New York: Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 233p.
- Mohapatra, D., Mohanty, L., Mohanty, R., Mohapatra, P. (1997). Biototoxicity of mercury to *Chlorella Vulgaris* as influenced by amino acids. *Acta Biol. Hung.*, 48(4): 497-504.
- Morris, O.P. and Russel G. (1973). Effect of chelation on toxicity of copper. *Mar. Pollut. Bull.*, 4: 159-160.
- Mukherjee, R., Dhar, B.B., Banerjee, R. (2006). Electron transfer between ascorbic acid and a (I-oxo) diiron(III,III) complex: An example of chloride inhibition. *Polyhedron*, 25: 1367–1372
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (1995). *Manual of Clinical Microbiology*, 6. ed. Washington: American Society for Microbiology.
- Mushran, P.S., Mehrotra, R.M., Sanahi, R. (1975). Kinetics and mechanism of oxidation of ascorbic acid by mercury(II) chloride. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 37: 1753-1755.
- Neto, V.P., Brondi, S.G. (2006). Avaliação da qualidade da água de represas destinadas ao abastecimento do rebanho bovino da EMBRAPA pecuária sudeste. Trabalho apresentado em *XIII Internacional Conference of Young Scientists – ICYS*, São Carlos. Resumo expandido, p. 1-41.
- Neubecker, T. A., Allen, H.E. (1983). The measurement of complexation capacity and conditional stability-constants for ligands in natural-waters. *Water Res.*, 17: 1-14.
- Paraquetti, H.M., Ayres, G.A., Almeida, M.D., Molisani, M.M., Lacerda, L.D. (2004). Mercury distribution, speciation and flux in the Sepetiba Bay tributaries, SE-Brazil. *Water Res.*, 38: 1439-1448.

Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. (2005). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Inter.*, 32(2): 265-268.

Pasquini, C., Jardim, W.F., Faria, L.C. (1988). Adaptation of a Cold Vapor Mercury Analyser to Flow Inject Analysis. *J. Automat. Chem.*, 10: 188-191.

Passos, C.J.S., Mergler, D., Fillion, M., Lemire, M., Mertens, F., Guimarães, J. R.D., Philibert, A. (2007). Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. *Environ. Res.*, 105: 183-193.

Pelczar, M., Reid, R., Chan, E.C.S. (1980). *Microbiologia*. São Paulo: McGraw – Hill do Brasil.

Poissant, L., Zhanga, H.H., Canário, J., Constant, P. (2008). Critical review of mercury fates and contamination in the Arctic tundra ecosystem. *Sci. Total Environ.*, 400(1-3): 173-211.

Pompei, A.M., Jardim, W.F. (1999). *Avaliação do Potencial Tóxico de Mercúrio em Águas Naturais*. (Parte I). Campinas: IQ-UNICAMP. Relatório Científico Projeto FAPESP 99/02212-6, p.1-20.

Porcella, D.B. (1994). *Mercury in the environment: biogeochemistry*. In: Watras, C., Huckabee, J.W. *Mercury pollution: Integration and synthesis*. California: Lewis Publishers. Chap. 1, p.3-20.

Powell, K., Brown, P.L., Byrne, R.H., Gajda, T., Hefter, G., Sjoberg, S., Wanner, H. (2005). Chemical speciation of environmentally significant heavy metals with inorganic ligands. *Pure Appl. Chem.*, 77(4): 739-800.

Ravichandran, M. (2004). Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. *Chemosphere*, 55: 319-331.

Ribo, J.M., Yang, J.E., Huang, P.M. (1989). Luminescent bacteria toxicity assay in the study of mercury speciation. *Hydrobiologia*, 188-189(1): 155-162.

Rocha, J.C., Sargentini Jr., E., Zara, L.F., Rosa, A.H., Santos, A., Burba, P. (2003). Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro)*/Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). *Talanta*, 61: 699-707.

- Rocha, J.C., Sargentini Jr., E., Zara, L.F., Rosa, A.H., Santos, A., Burba, P. (2000). Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro) – A possible process of the mercury cycle in Brazil. *Talanta*, 53(3): 551-559.
- Ruzic, J. (1982). Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta*, 140(1): 99-113.
- Sarma, S.S., Peredo-Alvarez, V.M., Nandini, S. (2007). Comparative study of sensitivities neonates and adults of selected cladoceran (Cladocera: crustacean) species to acute toxicity stress. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 42(10): 1449-1452.
- Sawyer, D.T., Chiericato, G. Jr., Tsuchiya, T. (1982). Oxidation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by superoxide ion in aprotic media. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(23): 6273-6278.
- Sharma, K, V., Caroli, S., Milazzo, G. (1978). *Tables of standard electrode potential*. New York: Wiley.
- Sharma, P.D., Agrawal, A., Mishra, S.K. (1992). Kinetics and mechanism of electron transfer reactions: reduction of mercury (II) chloride by L-ascorbic acid in acid perchlorate and chloride media. *Transition Met. Chem.*, 17: 343-347.
- Sillén, G., Martell, A. (1964). *Stability constants of metal-ion complexes*. London: London the Chemical Society Burlington House, Section II: organic ligands, n 17.
- Silva, G.S. (2004). *Dinâmica biogeoquímica do mercúrio na Bacia do Rio Negro (AM) e fluxos na interface água/atmosfera*. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Silva, L.S., Vicenzi, R., Peixoto, C.R.M. (2007). Efeito do íon malanato no processo de oxidação do ácido ascórbico por oxigênio molecular catalisado pelo Cu(II). *Eclética Quim.*, 32(2): 35-40.
- Smith, R.S. (2002). *World Water Day 2001: Pollution from industry, mining and agriculture*. Geneva: Water, Sanitation and Health reviewed by PCS/ OED/ WSH/ WHO, p.14.
- Sary, J., Kratzer, K. (1988). Radiometric determination of stability constants of mercury species complexes with L-cysteine. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 126(1): 69-75.

Stein, E.D., Cohen, Y., Winer, A.M. (1996). Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 26(1): 1-43.

Stevens, R.W. (1982). Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I – Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clin. Chem.*, 28(4): 578-588.

Sunda, W., Guillard, R.R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 34: 511-529.

Swanson, H.K., Johnston, T.A., Schindler, D.W., Bodaly, R.A., Whittle, D.M. (2006). Mercury Bioaccumulation in Forage Fish Communities Invaded by Rainbow Smelt (*Osmerus mordax*). *Environ. Sci. Technol.*, 40(5): 1439-1446.

Szakács, O., Lasztity, A., Horváth, Z.S. (1980). Breakdown of organic mercury compounds by hydrochloric acid-permanganate or bromide monochloride solution for determination of mercury by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 121: 219-224.

Taurianinen, S.M., Virta, M.P.J., Karp, M.T. (2000). Detection bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. *Wat. Res.*, 34(10): 2661-2622.

Tomiyasu, T., Matsuyama, A., Eguchi, T., Marumoto, K., Oki, K., Akagi, H. (2008). Speciation of mercury in water at the bottom of Minamata Bay, Japan. *Marine Chemistry*, 112: 102–106.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2002). *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.

Tsui, M., Wang W. (2006). Acute toxicity of mercury to *Daphnia magna* under different conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 40: 4025-4030.

Tur'yan, Y.I., Kohen, R. (1995). Formal redox potentials of the dehydro-L-ascorbic acid/L-ascorbic acid system. *J. Electroanal. Chem.*, 380: 273-277.

USGS – US Geological Survey. (2008). *Health and Environment – Mercury*. [Acesso em 30 mar. 2009] Disponível em: http://energy.er.usgs.gov/health_environment/mercury/.

Utgikar, V.P., Chaudhary, N., Koeniger, A. (2004). Toxicity of metals and mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.*, 38: 3651-3658.

- Vitkun, R.A., Poluéktov, N.S., Zelyukova, Y. V. (1974). Ascorbic acid as a reducing agent in the flameless atomic – absorption determination of mercury. *J. Analiticheskoi Khimii*, 29(4): 691-694.
- Wang, Q., Kim, D., Dionysio, D.D., Sorial, G.A., Timberlake, D. (2004). Source and remediation for mercury contamination in aquatic systems – a review. *Environ. Pollut.*, 131: 323-336.
- WHO – World Health Organization / International Program on Chemical Safety. (1989). Mercury: environmental aspects. Geneva: Environmental Health Criteria 86, p. 13.
- WHO – World Health Organization / UNEP – United Nations Environment Programme. (1997). Water pollution control: a guide to the use of water quality management principles, 1. ed. Geneva. p. 1-526.
- WHO – World Health Organization. (2004). Guidelines for drinking-water quality. 3. ed., vol 1, Chap. 8, p. 145-195.
- Wren, C.D., Stephenson, G.L. (1991). The effect of acidification on the accumulation and toxicity of metals to freshwater invertebrate. *Environ. Pollut.*, 71: 205-241.
- Wu, F.C., Bai, Y.C., Liu, C.Q., Li, W., Guo, J.Y., Fu, P.Q., Xing, B.S., Zheng, J. (2008). Ultraviolet absorbance titration for determining stability constants of humic substances with Cu(II) and Hg(II). *Anal. Chim. Acta*, 616: 115-121.
- Yang, Yu., Jiang, J., Shen, G., Yu R. (2008). An optical sensor for mercury ion based on the fluorescence quenching of tetra-(p-dimethylaminophenyl) porphyrin. *Anal. Chim. Acta*, 636(1): 83-88.
- Yin, Y., Liang, J., Yang, L., Wang, Q. (2007). Vapour generation at a UV/TiO₂ photocatalysis reaction device for determination and speciation of mercury by AFS and HPLC-AFS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 22(3): 330-334.
- Zalups, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.*, 52(1): 113-144.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6): 1875-1881.

APÊNDICES

Apêndice I

Dados referentes às medidas de CO₂ nos testes de toxicidade com a bactéria *Escherichia coli*.

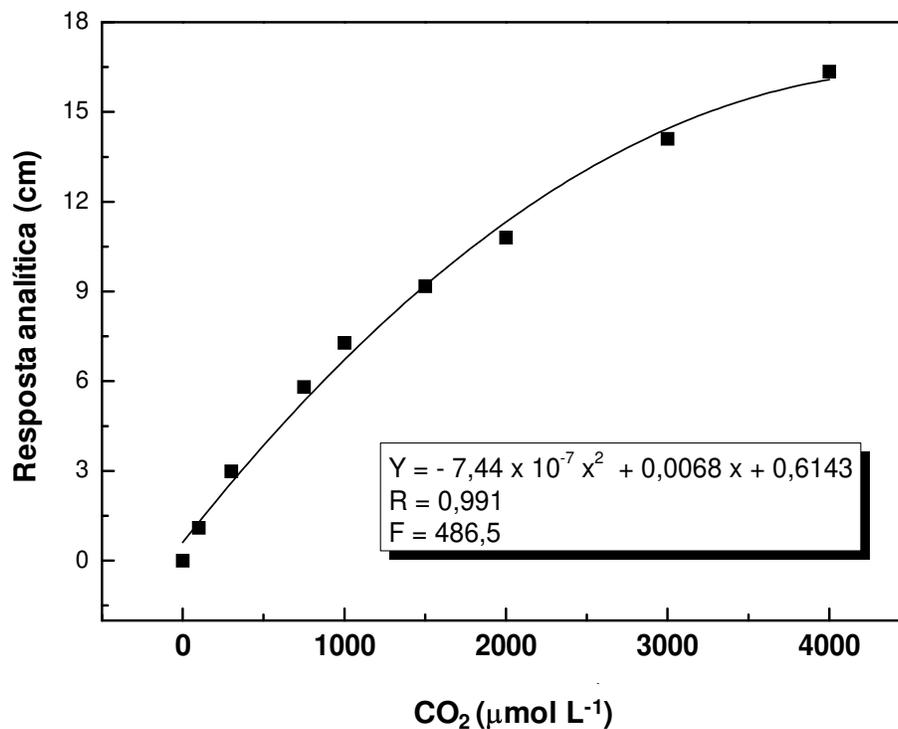


Figura 7.1: Curva analítica representativa para a determinação de CO₂ nos testes de toxicidade respirométrico com a bactéria *Escherichia coli*, usou-se curva polinomial para o cálculo da concentração de CO₂ nas amostras dos testes de toxicidade.

Apêndice II

Dados referentes à escolha do comprimento de onda no teste de toxicidade turbidimétrico. A escolha do comprimento de onda adequado para medida da turvação do meio de cultura neste trabalho foi realizado a partir da leitura de 5 padrões de sulfato de bário, 0,5, 1, 2, 3 e 4 da escala de McFarland, em três comprimentos de onda diferentes: 420, 550 e 600 nm (Figura 7.2).

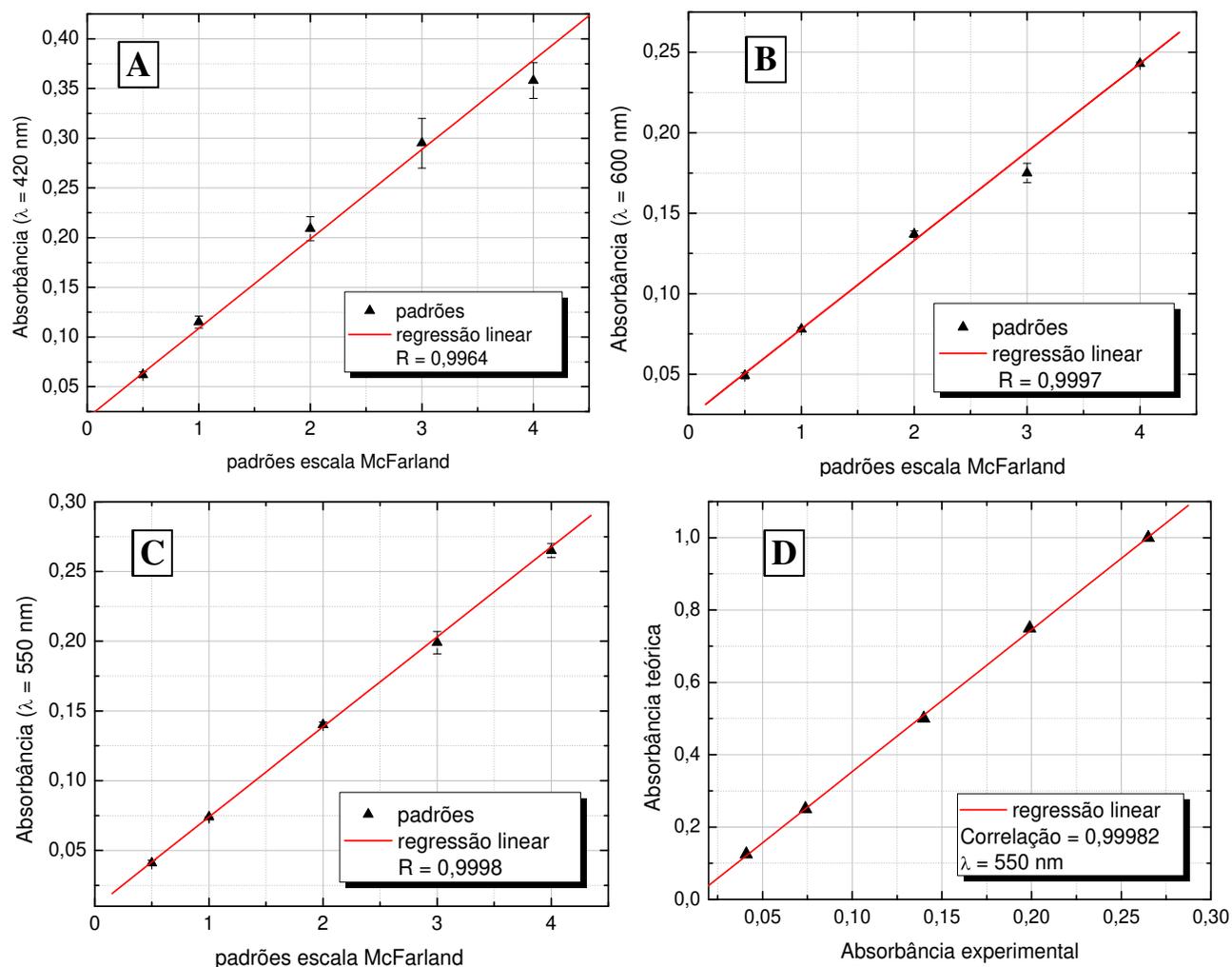


Figura 7.2: Leituras de absorbâncias dos padrões da escala de McFarland nos comprimentos de onda (A) 420, (B) 600 nm, (C) 550 nm e (D) correlação entre a leitura teórica (Murray *et al.*, 1995) e experimental (neste trabalho) para o comprimento de onda de 550 nm. Trabalho feito com o grupo de POA da FEC/UNICAMP.

Os resultados mostram que a absorvância aumenta com diminuição do comprimento de onda. Verifica-se que os resultados de absorvância que apresentaram menor desvio padrão ($n = 5$) e melhor correlação entre os valores teórico e experimental foram as leituras realizadas no comprimento de onda igualdo a 550 nm. Desta forma, adotou-se este comprimento de onda para realização dos ensaios de toxicidade.

Apêndice III

Dados referentes aos exercícios de calibração interlaboratorial.

Tabela 7.1: Resultados do exercício de calibração interlaboratorial para Hg_{total} realizado pela Canadian Food Inspection Agency em amostras de peixes, alguns resultados representativos por ano.

Ano	Amostra	Valor designado ($\mu g L^{-1}$)	Índice Z
DEZ/2004	352	$0,37 \pm 0,05$	0,92
	353	$0,30 \pm 0,04$	- 1,06
	354	$0,19 \pm 0,03$	- 0,44
	355	$0,57 \pm 0,01$	0,67
JUNH/2005	360	$0,35 \pm 0,05$	0,25
	361	$0,60 \pm 0,09$	- 0,81
	362	$0,32 \pm 0,06$	- 0,41
	363	$0,514 \pm 0,01$	- 0,09
MAR/2006	372	$0,50 \pm 0,07$	- 1,26
	373	$0,78 \pm 0,14$	- 1,44
	374	$0,36 \pm 0,07$	- 0,68
	374	$0,23 \pm 0,04$	- 1,03

Tabela 7.2: Resultados do exercício de calibração interlaboratorial para Hg_{total} realizado pelo SENAI-CETIND (PEP) em conjunto com o Programa Brasileiro de Metrologia em Química, em amostras de água.

Ano	Amostra	Valor designado ($\mu g L^{-1}$)	Índice Z
2006	G4A002-06	2,12	0,18
	G4B002-06	3,60	- 0,80
2008	G4A005-08	2,56	- 0,16
	G4B005-08	3,43	0,14