

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Renan Buque Pardiniho

**AVALIAÇÃO DA MIC-DV PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE
PEIXE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO DE
VAPOR FRIO EM FRASCO ÚNICO**

Santa Maria, RS
2021

Renan Buque Pardino

**AVALIAÇÃO DA MIC-DV PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO EM
FRASCO ÚNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Pardinho, Renan Buque

AVALIAÇÃO DA MIC-DV PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO EM FRASCO ÚNICO / Renan Buque Pardinho.- 2021.
125 p.; 30 cm

Orientador: Érico Marlon de Moraes Flores

Coorientador: Rodrigo Cordeiro Bolzan

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. MIC-DV 2. Peixe 3. Frasco único 4. DV-CVG-ICP-MS
5. DV-CVG-AAS I. Flores, Érico Marlon de Moraes II.
Bolzan, Rodrigo Cordeiro III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, RENAN BUQUE PARDINHO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Renan Buque Pardino

**AVALIAÇÃO DA MIC-DV PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO EM
FRASCO ÚNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Aprovada em 15 de Fevereiro de 2021:



Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)




Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM)



Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin (UFSM)



Prof. Dr. Luiz Frederico Rodrigues (PUC-RS)

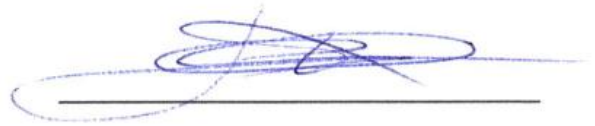


Prof. Dr. Sergio Roberto Mortari (UFN-RS)

Santa Maria, RS
2021

Declaração

A pesquisa descrita nesta tese foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta tese (ou partes dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.



Renan Buque Pardino

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA), pela oportunidade de execução deste trabalho.

À ex-presidenta Dilma Rousseff, na época em que ingressei no doutorado, presidia o governo federal democraticamente eleita, sendo deposta por um golpe político em 2016.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de dedicação profissional e pelas oportunidades de crescimento profissional.

Aos membros da banca por participarem como examinadores desta tese, e pelas valiosas contribuições que as fizeram no âmbito do trabalho.

Aos Profs. Drs, Cezar Augusto Bizzi, Edson Irineu Muller, José Neri Gottfried Paniz, Paola de Azevedo Melo, Rodrigo Cordeiro Bolzan pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Em especial, ao Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler pela amizade, ensino e conversas ao longo de toda a minha caminhada na pós-graduação.

Aos colegas e funcionários do LAQIA/CEPETRO, em especial a Paula Dalla Vecchia e Samuel R. Weachter pelo convívio, amizade e colaboração. E a todos os colegas que contribuíram na execução prática e teórica deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGQ, em especial ao Ademir, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Em especial a Andréa Cristina Buque Pardini, Gilson Pereira Pardini e Rayan Buque Pardini por me apoiarem indubitavelmente em todas as minhas escolhas e decisões, e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando mais ninguém acreditava.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA MIC-DV PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO DE VAPOR FRIO EM FRASCO ÚNICO

AUTOR: Renan Buque Pardiniho

ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Neste trabalho a combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis (MIC-DV) foi avaliada para a decomposição de tecido de peixe para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e Hg em sistema de injeção em fluxo com geração de vapor frio acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FI-CVG-ICP-MS). Adicionalmente, foi proposto um sistema de geração química de vapor em frasco único (DV-CVG) acoplado as técnicas de ICP-MS e espectrometria de absorção atômica (AAS) para a determinação de Hg. Para o desenvolvimento do método empregando a MIC-DV, foram avaliados os seguintes parâmetros: composição da solução absorvedora (HNO_3 e HCl), concentração de HNO_3 como solução absorvedora (0,25, 0,5, 1, 3, 5, 7 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$), massa de amostra (10, 15, 20, 25 e 30 mg), volume de solução absorvedora (1, 3, 5 e 7 mL) e ciclos sucessivos de combustão (2 e 3 vezes). Para a ignição da amostra na MIC-DV, foram pipetados $40 \mu\text{L}$ de NH_4NO_3 10 mol L^{-1} em disco de papel filtro, o qual foi posicionado no suporte de quartzo e o conjunto foi inserido nos frascos descartáveis. Antes do fechamento, os frascos foram purgados com O_2 durante 60 s com vazão de 4 L min^{-1} e submetidos a irradiação da micro-ondas por 30 s. Após a decomposição por MIC-DV, os digeridos foram armazenados em geladeira até a quantificação. Os resultados obtidos por MIC-DV foram comparados com os obtidos pelos métodos da combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD). O método proposto foi aplicado para 5 amostras de tecido de peixe e para o material de referência certificado (CRM) de fígado de peixe (DOLT4) nas seguintes condições otimizadas: 5 mL de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 como solução absorvedora usando 10 mg de massa de amostra com uma queima. Considerando o sistema desenvolvido para a determinação de Hg (DV-CVG), este utiliza apenas a tampa do próprio frasco descartável com quatro orifícios, os quais foram necessários para a introdução de HCl , NaBH_4 , gás de arraste e para o carreamento da fase gasosa de dentro do frasco até a técnica de determinação. Este sistema foi acoplado à técnica de ICP-MS e AAS, sendo chamado de DV-CVG-ICP-MS e DV-CVG-AAS. A concordância para os elementos As, Cd, Cr, Hg, Mn, Se e V nas 5 amostras e CRM avaliados após a decomposição por MIC-DV, não apresentaram diferença significativa (ANOVA) quando comparados com os métodos de referência e valores certificados. Os limites de quantificação (LQs) da MIC-DV para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V foram 0,02, 0,05, 0,50, 0,10, 0,19, 0,7, 0,18, $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para As, Cd e Hg, os LQs foram inferiores ao limite máximo exigido pelo MERCOSUL para tecido de peixe. A DV-CVG-ICP-MS que utiliza a tampa adaptada apresentou LQ inferior quando comparado com o FI-CVG-ICP-MS usado como referência. Os LQs do sistema com a tampa adaptada acoplado a ICP-MS e AAS foram de 0,025 e $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Tanto o método da MIC-DV quanto os sistemas DV-CVG desenvolvidos neste trabalho, apresentaram baixo custo (desconsiderando a técnica utilizada), simplicidade de operação, segurança para o operador, uso reduzido de reagentes e utilizados para o controle de qualidade de contaminantes inorgânicos como As, Cd, Cr, Hg, Mn, Se e V.

Palavras-chave: MIC-DV; Peixe; Frasco único; DV-CVG-ICP-MS; DV-CVG-AAS.

ABSTRACT

EVALUATION OF MIC-DV FOR DECOMPOSITION OF FISH TISSUE AND SYSTEM DEVELOPMENT FOR COLD VAPOR GENERATION IN DISPOSABLE VESSEL

AUTHOR: Renan Buque Pardino
ADVISOR: Ph.D. Érico Marlon de Moraes Flores

In this work, microwave-induced combustion in disposable vessel (MIC-DV) was evaluated for the decomposition of fish tissue for the subsequent determination of As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se and V by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and Hg in a flow injection system with cold vapor generation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (FI-CVG-ICP-MS). In addition, a chemical vapor generation system in a disposable vessel (DV-CVG) was proposed, coupled with ICP-MS and atomic absorption spectrometry (AAS) techniques for the determination of Hg. For the development of the method using MIC-DV, the following parameters were evaluated: composition of the absorbing solution (HNO_3 and HCl), concentration of HNO_3 as an absorbing solution (0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7 and 14.4 mol L^{-1}), sample mass (10, 15, 20, 25 and 30 mg), absorbing solution volume (1, 3, 5 and 7 mL) and successive digestion cycles (2 and 3 times). For the ignition of the sample in the MIC-DV, $40 \mu\text{L}$ of NH_4NO_3 10 mol L^{-1} were pipetted into a filter paper disc, which was positioned in the quartz holder and the set was inserted in disposable vessel. Before closing, the vessel were purged with O_2 for 60 s at a flow rate of 4 L min^{-1} and inserted into the microwave oven for irradiation for 30 s. After decomposition by MIC-DV, the digested were stored in a refrigerator until quantification. The results obtained by MIC-DV were compared with those obtained by the methods of microwave-induced combustion (MIC) and microwave assisted wet decomposition (MAWD). The proposed method was applied to 5 samples of fish tissue and to the certified reference material (CRM) of fish liver (DOLT 4) under the following optimized conditions: 5 mL of 0.5 mol L^{-1} of HNO_3 as an absorbing solution using 10 mg of sample mass with one combustion. Considering the system developed for the determination of Hg (DV-CVG), it uses only the lid of the disposable vessel itself with four holes, which were necessary for the introduction of HCl , NaBH_4 , carrier gas and for carrying the gas phase from inside the vessel to the determination technique. This system was coupled with the ICP-MS and AAS technique, being called DV-CVG-ICP-MS and DV-CVG-AAS. The agreement for the elements As, Cd, Cr, Hg, Mn, Se and V in the 5 samples and CRM evaluated after the decomposition by MIC-DV, did not show significant difference (ANOVA) when compared with the reference methods and certified values. The MIC-DV limits of quantification (LOQs) for As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se and V were 0.02, 0.05, 0.50, 0.10, 0.19, 0, 7, 0.18, $0.02 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. For As, Cd and Hg, the LOQs were below the maximum limit required by MERCOSUL for fish tissue. The DV-CVG-ICP-MS that uses the adapted cover presented a lower LOQ when compared to the FI-CVG-ICP-MS used as a reference. The LOQs of the system with the adapted lid coupled to ICP-MS and AAS were 0.025 and $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively. Both the MIC-DV method and the DV-CVG systems developed in this work, presented low cost (disregarding the technique used), simplicity of operation, safety for the operator, reduced use of reagents and used for the quality control of inorganic contaminants such as As, Cd, Cr, Hg, Mn, Se and V.

Keywords: MIC-DV; Fish; Single vessel; DV-CVG-ICP-MS; DV-CVG-AAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sistemas utilizados no método da MIC-DV. a) Suporte de quartzo e suas medidas em mm; b) Sistema de purga de oxigênio no frasco e c) Rotor metálico para impedir a interação da radiação micro-ondas com a solução absorvedora. Adaptada de Duarte²² *et al.*.....46
- Figura 2. Sistema de análise em fluxo com geração química de vapor acoplado a ICP-MS para a determinação de Hg. A - 1) separador gás-líquido; 2) confluência; 3) comutador e 4) bomba peristáltica. B - 1) frasco descartável; 2) bomba peristáltica.52
- Figura 3. Representação da tampa adaptada para o sistema de CVG em frasco único. Figura A) item 1: conector *luer slip* para introdução de NaBH₄; item 2: conector *luer slip* para introdução do gás de arraste (argônio); item 3: conector *luer slip* para a introdução do HCl; item 4: conector *luer lock* para carrear a fase gasosa, gerada na reação de redução do Hg, com o auxílio do gás de arraste, até o equipamento usado para a determinação de Hg e item 5: válvula três vias com conexões *luer lock* e *luer slip*. Figura B) tampa com válvula três vias acoplada e pronta para uso.58
- Figura 4. Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados.....60
- Figura 5. Avaliação das soluções absorvedoras (■) HNO₃ e (■) HCl para a determinação de Hg por FI-CVG-ICP-MS em tecido de peixe após decomposição por MIC-DV. Condição: 20 mg de amostra, 5 mL de solução absorvedora (resultados em concordância (%), n = 5).65
- Figura 6. Avaliação da concentração de HNO₃ como solução absorvedora para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 20 mg de amostra, 5 mL de solução absorvedora, n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.....72
- Figura 7. Avaliação da massa de amostra para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após

	decomposição por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora, n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.	74
Figura 8.	Determinação de C em solução (mg L ⁻¹) por ICP-OES no digeridos da avaliação de massa de amostra por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora, n = 5.	76
Figura 9.	Avaliação do volume de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 10 mg de massa de amostra e n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.	79
Figura 10.	Avaliação de combustões sucessivas para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ como solução absorvedora, 10 mg de massa de amostra e n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.	81
Figura 11.	Avaliação de combustões sucessivas para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 10 mg de massa de amostra e n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.	83
Figura 12.	Imagens do sistema DV-CVG-ICP-MS. A) imagem da tampa com a indicação dos respectivos orifícios para introdução de NaBH ₄ (1), gás de arraste (2) e orifício carreador da fase gasosa (3) até o plasma. As figuras B, C e D são imagens de diferentes ângulos do sistema DV-CVG-ICP-MS.	93
Figura 13.	Avaliação da concentração de NaBH ₄ para a determinação de Hg por CVG-ICP-MS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ com 0,05 µg L ⁻¹ de Hg e vazão do gás de arraste de 1,04 L min ⁻¹ , n = 5.	95

Figura 14. Avaliação da concentração de HNO ₃ em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO ₃ com 0,05 µg L ⁻¹ de Hg como solução, 0,8 mL de NaBH ₄ 0,09% em 1% de NaOH e vazão para o gás de arraste de 1,04 L min ⁻¹ , n = 5.	97
Figura 15. Avaliação do volume injetado de NaBH ₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ com 0,05 µg L ⁻¹ de Hg, NaBH ₄ 0,09% em NaOH 1% e vazão do gás de arraste de 1,04 L min ⁻¹ , n = 5.....	99
Figura 16. Avaliação da concentração de HCl em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ com 0,05 µg L ⁻¹ de Hg e 1,2 mL de NaBH ₄ 0,09% em NaOH 1%, n = 5.	101
Figura 17. Avaliação da vazão do gás de arraste (argônio) em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ com 0,05 µg L ⁻¹ de Hg, 1,2 mL de NaBH ₄ 0,09% em NaOH 1% e 1,2 mL de HCl 3 mol L ⁻¹ , n = 5.	103
Figura 18. Imagens do sistema de DV-CVG-AAS. Figura A) item 1: Tampa modificada com 4 orifícios: três para introdução de gás de arraste, NaBH ₄ , HCl e um para carreamento dos gases até cela de quartzo; item 2: bomba peristáltica para introdução de NaBH ₄ e item 3: bomba peristáltica para introdução de HCl. Figura B) item 1: cela de quartzo; item 2: tampa modificada com um frasco descartável contendo 5 mL de digerido.	105
Figura 19. Avaliação da concentração de NaBH ₄ para a determinação de Hg por CVG-AAS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ com 4 µg L ⁻¹ de Hg, 1,2 mL de HCl 3 mol L ⁻¹ e 1,00 L min ⁻¹ de vazão para o gás de arraste, n = 5.	106
Figura 20. Avaliação do tempo de introdução de HCl para a determinação de Hg por CVG-AAS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	

com $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, introdução de 1,2 mL de NaBH_4 1,0% em NaOH
1% e de HCl 3 mol L^{-1} e $1,00 \text{ L min}^{-1}$ de vazão para o gás de arraste,
n = 5. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições operacionais para a determinação dos elementos por ICP-MS.	53
Tabela 2.	Resultados para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas 5 amostras de tecido de peixe decompostas por MAWD e MIC (média \pm desvio padrão, n = 3).....	62
Tabela 3.	Concentração de As, Cr, Cu, Hg, Mn, Se e V ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos brancos em diferentes concentrações de HNO_3 e condições após decomposição por MIC-DV (média \pm desvio padrão, n = 5). Os valores de LQ são pertencentes a técnica de ICP-MS. Os valores entre parênteses na frente dos elementos ($\mu\text{g L}^{-1}$), correspondem a concentração dos analitos nos digeridos de MIC-DV para a amostra A usando 20 mg em 5 mL de digerido.....	68
Tabela 4.	Resultados para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas 5 amostras de tecido de peixe e CRM (Dolt 4) decompostas por MAWD (n = 3), MIC (n = 3) e MIC-DV (n = 5). Os elementos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V foram determinados por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS (média \pm desvio padrão).	87
Tabela 5.	Valores de LQ para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) para os métodos de MAWD, MIC e MIC-DV. Determinação de As, Cd, Cr, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e de Hg por FI-CVG-ICP-MS.....	88
Tabela 6.	Valores de LQ para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) depois de diferentes processos de descontaminação. Determinação de As, Cd, Cr, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e de Hg por FI-CVG-ICP-MS.	90
Tabela 7.	Resultados para Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$) em 5 amostras de tecido de peixe e CRM (Dolt 4) decompostas por MAWD (n = 3), MIC (n = 3) e MIC-DV (n = 5), posteriormente determinados por FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-ICP-MS em frasco único e DV-CVG-AAS em frasco único.....	109
Tabela 8.	Valores de LQ para Hg por FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-ICP-MS, DV-CVG-AAS, CVG-AFS e AM. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>atomic absorption spectrometry</i>
DMA	Analisador direto de mercúrio, do inglês <i>direct mercury analyser</i>
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica, do inglês <i>atomic fluorescence spectrometry</i>
CVG	Geração química de vapor, do inglês <i>chemical vapor generation</i>
DV-CVG	Geração química de vapor em frasco descartável, do inglês <i>disposable vessel chemical vapor generation</i>
DV-CVG-AAS	Espectrometria de absorção atômica acoplado a geração química de vapor em frasco único, do inglês <i>disposable vessel chemical vapor generation atomic absorption spectrometry</i>
DV-CVG-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado a geração química de vapor em frasco único, do inglês <i>disposable vessel chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
FI-CVG-ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado a geração química de vapor por sistema de análise em fluxo, do inglês <i>flow injection chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
FI-CVG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor com sistema de injeção em fluxo, do inglês <i>flow injection chemical vapor generation atomic absorption spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
MAWD	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted wet digestion</i>
MERCOSUL	Mercado comum do sul
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês <i>microwave-induced</i>

combustion

MIC-DV

Combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis, do inglês *microwave-induced combustion in disposable vessel*

NIST

Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês *National Institute of Standards and Technology*

WHO

Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1	CONTAMINAÇÃO DE METAIS EM PEIXES	31
2.2	ARSÊNIO, CROMO, MERCÚRIO, MANGANÊS, SELÊNIO E VANÁDIO: ASPECTOS GERAIS	32
2.2.1	Mercúrio	32
2.2.2	Arsênio	33
2.2.3	Selênio	34
2.2.4	Cromo, Manganês e Vanádio	35
2.3	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO ELEMENTAR	37
2.3.1	Métodos de decomposição por via úmida	37
2.4	MÉTODOS DE COMBUSTÃO PARA O PREPARO DE AMOSTRAS	38
2.4.1	Combustão em fornos tipo mufla	39
2.4.2	Decomposição em tubos de combustão	39
2.4.3	Decomposição em sistema dinâmico de combustão e Wickbold	40
2.4.4	Frasco de Schöniger	41
2.4.5	Bomba de combustão	42
2.4.6	Combustão iniciada por micro-ondas	42
2.4.7	Combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis	44
2.5	TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS	46
2.5.1	Geração química de vapor	47
2.5.2	Analizador de mercúrio	48
2.5.3	Espectrometria de absorção atômica	49
2.5.4	Técnicas com plasma indutivamente acoplado	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	51
3.2	REAGENTES, SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E GASES	53

3.3	PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO	55
3.4	AMOSTRAS E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS	55
3.5	PRÉ-TRATAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	55
3.5.1	Decomposição dos tecidos de peixe por MAWD.....	56
3.5.2	Decomposição dos tecidos de peixe por MIC	56
3.5.3	Combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis	56
<i>3.5.3.1</i>	<i>Avaliação dos valores de branco do sistema da MIC-DV.....</i>	<i>57</i>
3.6	DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR EM FRASCO ÚNICO EM BATELADA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg.....	58
3.7	DETERMINAÇÃO DE Hg POR FI-CVG-ICP-MS	59
3.8	ACOMPLAMENTO DAS TÉCNICAS DE ICP-MS E AAS AO SISTEMA DE GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR EM FRASCO ÚNICO	59
3.9	FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E PARÂMETROS AVALIADOS.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1	DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXE PELOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA (MAWD E MIC).....	61
4.2	AVALIAÇÃO DO MÉTODO DA MIC-DV EM SISTEMA PURGADO PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS.....	63
4.2.1	Avaliação de HNO₃ e HCl como solução absorvedora para posterior determinação de Hg.....	64
4.2.2	Avaliação dos brancos para cada concentração da solução absorvedora	66
4.2.2	Avaliação da concentração de HNO₃ como solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V.....	71
4.2.3	Avaliação da massa de amostra para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V	73

4.2.4	Avaliação do volume de solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V.....	78
4.2.5	Avaliação de combustões sucessivas para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V	81
4.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO DA MIC-DV EM TECIDO DE PEIXE PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se E V.....	85
4.4	AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE CVG POR BATELADA EM FRASCO ÚNICO PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR ICP-MS	92
4.4.1	Avaliação da concentração de NaBH₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS.....	94
4.4.2	Avaliação da concentração de HNO₃ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS.....	96
4.4.3	Avaliação do volume introduzido de NaBH₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS.....	98
4.4.4	Avaliação da decomposição de tecido de peixe por MIC e MIC-DV para a posterior determinação de Hg em sistema de CVG por batelada em frasco único por ICP-MS.....	99
4.4.4.1	<i>Avaliação da concentração de HCl para a posterior determinação de Hg por ICP-MS em sistema de CVG por batelada em frasco único.....</i>	<i>101</i>
4.4.4.2	<i>Avaliação da vazão do gás de arraste/nebulização para a posterior determinação de Hg em sistema de CVG por batelada em frasco único por ICP-MS.....</i>	<i>102</i>
4.5	AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE CVG POR BATELADA EM FRASCO ÚNICO PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR AAS	104
4.5.1	Avaliação da concentração de NaBH₄ em sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por AAS.....	105

4.5.2	Avaliação do tempo de introdução de HCl no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por AAS.....	106
4.6	DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXE POR MIC E MIC-DV PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR DV-CVG-AAS E DV-CVG-ICP-MS.....	108
4.7	COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-AAS E DV-CVG-ICP-MS.....	110
5	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

O peixe está entre os alimentos mais consumidos no mundo, sendo uma fonte de nutrientes essenciais para o organismo humano, tais como ferro, cálcio, fósforo entre outros. Por outro lado, este alimento também pode ser uma fonte de intoxicação por elementos tóxicos para o ser humano, dependendo do nível trófico, havendo uma grande probabilidade de biomagnificação.¹⁻⁴ O mercúrio possui grande importância, principalmente por ter sido causador de muitos casos de intoxicação graves em seres vivos.⁵ A toxicidade deste elemento é variável, pois depende da forma em que ele se encontra no ambiente.⁶ As formas do mercúrio mais comumente encontradas podem ser classificadas em espécies inorgânicas e orgânicas. As espécies orgânicas são mais recorrentes, dentre elas o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), sendo estas mais tóxicas que as espécies inorgânicas (Hg^0 e Hg^{2+}).^{5, 6} O mercúrio é encontrado naturalmente no ar, água e solo, porém devido à fontes antropogênicas, seu comportamento em ambientes aquáticos tem sido muito estudado.⁷ Este elemento é bioacumulado facilmente em peixes que se encontram no topo da cadeia trófica. As espécies mais comumente encontradas nesses animais são as espécies orgânicas, devido à metilação do mercúrio em organismos vivos.⁸ Com isso, o consumo de peixes torna-se uma das principais fontes de contaminação de Hg para o ser humano. Após desastres ambientais como o famoso caso de Minamata no Japão⁵, muitos órgãos como a Organização Mundial da Saúde (WHO)⁶ e o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL)⁹, estabeleceram limites de concentração de mercúrio para ingestão diária para seres humano⁶, bem como limites de concentração de mercúrio permitidos em alimentos como peixes, crustáceos e moluscos para exportação.⁹

Além do Hg, outros elementos estão presentes em tecidos de peixe elevadas concentrações. Pode-se citar o arsênio que, por sua vez, pode ser bioacumulado nos peixes. Sua toxicidade é maior por parte das espécies inorgânicas (As(III) e As(V)), causando sérios danos ao sistema nervoso, doenças de pele, fígado e rins.² Entretanto, quando presente em peixes, o As é convertido, majoritariamente arsenobetaína (AsB), que é facilmente excretada pela urina e considerada não tóxica aos seres humanos.² O selênio, por sua vez, tem função essencial no organismo dos seres

humanos, desde que em baixa concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$). Caso a concentração esteja acima do considerado ideal, as funções exercidas por este elemento tornam-se prejudiciais ao organismo.¹⁰⁻¹² Outros elementos como Cr, Mn e V são também importantes, apresentando espécies com ação tóxica (Cr(III) ou Cr(VI)) ou pela elevada concentração no organismo (Mn e V).¹²⁻¹⁴

Para avaliação da concentração de elementos em peixes ou qualquer outra amostra, um procedimento analítico rigoroso é necessário e envolve algumas etapas importantes, entre elas o preparo da amostra.^{15, 16} Para a determinação de Hg, a sequência analítica possui alguns cuidados especiais quando comparado com outros elementos, principalmente em função da formação de espécies voláteis na etapa de preparo de amostra.^{16, 17} Assim, na etapa de preparo de amostra são necessários alguns cuidados, como por exemplo, evitar uso de sistemas abertos para a decomposição e armazenamento dos digeridos em geladeira. Neste caso, entre os métodos de preparo de amostras mais utilizados, destacam-se a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD) em sistemas fechados,^{15, 16} e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC).^{18, 19} Considerando o método de MIC, este é baseado na combustão da amostra orgânica, que ocorre após a radiação micro-ondas interagir com um papel filtro em formato de disco umedecido com NH_4NO_3 . Esse papel filtro, juntamente com a amostra, é posicionado em um suporte de quartzo que, por sua vez, é inserido em um frasco de quartzo que é pressurizado com 20 bar de oxigênio. Após a combustão, os analitos são absorvidos em uma solução ácida ou alcalina (dependendo do analito e da técnica a ser utilizada).^{16, 18, 20} Nesse método, também é possível usar amostras com alto teor de matéria inorgânica com o auxílio de celulose para a volatilização dos analitos, sendo então absorvidos por uma solução adequada.²¹ Recentemente, a MIC foi simplificada em um sistema empregando frascos descartáveis, a qual foi denominada combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis (MIC-DV), onde são usados frascos de polipropileno (PP) e um suporte de quartzo. Na MIC-DV, pode-se usar até 30 mg de amostras, diferentemente da MIC que, dependendo da matriz, pode-se usar até 1 g de amostra. Quando comparada com a MIC, a grande vantagem da MIC-DV é o custo extremamente baixo, por usar frascos descartáveis e um forno micro-ondas doméstico.²²

Os métodos de decomposição têm como objetivo transformar a amostra em uma forma adequada à posterior etapa de determinação. Para a determinação dos elementos, muitas técnicas são empregadas atualmente, como espectrometria de absorção atômica (AAS), técnicas eletroanalíticas (voltametria), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para Hg, também há analisadores que não necessitam de etapa de preparo de amostra, por utilizarem amostragem direta.²³⁻³⁰ O Hg pode ser também determinado usando a geração química de vapor (CVG) acoplado a técnicas como CVG-AAS, CVG-ICP-MS e CVG-AFS. Geralmente, para a conversão de Hg para Hg^{2+} , é usado um reagente fortemente redutor (NaBH_4 ou SnCl_2) em meio ácido (normalmente HCl).³¹ Esses reagentes reduzem as formas de mercúrio a Hg^0 , o qual é separado da solução aquosa usando um separador gás-líquido. Esta derivatização, aliada à técnica de determinação como AAS, ICP-MS e AFS, tem sido comumente empregada.^{32, 33}

Assim, dentre os métodos e técnicas mencionadas anteriormente, este trabalho teve como objetivo desenvolver um estudo sistemático para a avaliação da MIC-DV para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V em tecido de peixe. Após o desenvolvimento do método para todos os elementos mencionado, foi proposta uma modificação no sistema de CVG para a determinação de Hg, de modo a utilizar o frasco descartável da MIC-DV na etapa de determinação, acoplado-o com as técnicas de ICP-MS e AAS para a determinação de Hg. Os parâmetros avaliados para o método da MIC-DV foram: tipo de solução absorvedora, concentração de solução absorvedora, massa de amostra, volume de solução absorvedora e combustões sucessivas. Na modificação do sistema de CVG em frasco descartável foram avaliadas a concentração de NaBH_4 , concentração de HCl, vazão da bomba peristáltica, vazão do gás de arraste e tempo de introdução de HCl. Essas otimizações foram feitas para as técnicas de AAS e ICP-MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO DE METAIS EM PEIXES

O peixe é um alimento largamente consumido em todo o mundo, sendo, em algumas culturas, a principal fonte de proteína. Essa importância na alimentação humana deve-se à presença de alguns compostos em sua estrutura, como alto teor de proteína, baixo teor de gorduras saturadas e presença de ácidos graxos como o ômega 3, que auxiliam na redução dos níveis de colesterol, a incidência de cardiopatias, derrames e parto prematuro, além de aumentar a imunidade do organismo. Por outro lado, todos esses benefícios são desconsiderados caso esses animais tenham sido expostos à águas poluídas e ambientes contaminados.^{1, 5}

Peixes que habitam ambientes contaminados podem bioacumular uma ampla quantidade de contaminantes, entre esses destacam-se os metais tóxicos.¹ Entretanto, o acúmulo destes metais nos peixes é dependente de vários fatores tais como, o tecido do peixe, a espécie do peixe (nível trófico) e a qualidade da água. A bioacumulação de elementos tóxicos nos peixes ocorre de duas maneiras no ambiente aquático, naturalmente (por exemplo, processos geológicos) ou antropogênicos (por exemplo, mineração). O descarte de resíduos contendo esses elementos em ambientes aquáticos, provocado por atividades antropogênicas, é muito superior aos observados por processos naturais. Essa poluição antropogênica em águas de superfície (por exemplo, lagoas, lagos e rios) pode ser causada, principalmente, pelo aumento das atividades agrícolas e industriais juntamente com a expansão urbana próxima a esses locais.³⁴ Cabe salientar que, elementos tóxicos podem ser muito prejudiciais, mesmo em baixa concentração, quando ingerido por um longo período de tempo, porém os metais essenciais também podem produzir efeitos tóxicos quando a ingestão do metal é excessivamente elevada.^{4, 10, 35}

2.2 ARSÊNIO, CROMO, MERCÚRIO, MANGANÊS, SELÊNIO E VANÁDIO: ASPECTOS GERAIS

2.2.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento da classe dos metais, pertencente ao grupo 12 e período 6 da tabela periódica, sendo o único metal na forma líquida em condições normais de pressão e temperatura.^{5, 17, 36} Ele pode ser encontrado naturalmente no meio ambiente (ar, água e solo),^{8, 37, 38} sendo no solo associado a outros elementos como, por exemplo, o enxofre, formando o mineral cinabre (HgS), composto de cor vermelha ou preta encontrado em elevada quantidade na Espanha e Itália.¹⁷ Há relatos que a exploração deste mineral iniciou há cerca de 2 mil anos nas minas de Almaden (Espanha). O mercúrio metálico é obtido a partir do aquecimento deste minério e subsequente condensação.¹⁷

Além de sua forma metálica, o mercúrio também se encontra na forma de espécies inorgânicas e orgânicas, associado a outros elementos.³⁸ Na forma de espécies inorgânicas, é possível encontrar o Hg em três estados de oxidação, sendo o primeiro, na forma elementar (Hg⁰), encontrado como líquido ou gás (mais comumente na forma gasosa). O segundo estado de oxidação é o íon mercurioso (Hg₂²⁺) sendo pouco estável nessa forma e, por último, a forma mais estável como íon mercúrico (Hg²⁺). Por outro lado, quando ligado covalentemente a espécies orgânicas, este elemento pode ser encontrado na forma de vários compostos, sendo as espécies orgânicas mais comuns o metilmercúrio ([CH₃Hg]⁺) e o dimetilmercúrio ((CH₃)₂Hg). É importante salientar que as espécies orgânicas de mercúrio são mais tóxicas que as espécies inorgânicas.^{8, 38-41}

Desta forma, nos ambientes aquáticos, os peixes que se encontram no topo da cadeia trófica (peixes carnívoros) acabam por bioacumular mercúrio em seus tecidos na forma metilada e essa bioacumulação é mais elevada do que em peixes que se encontram na base da cadeia trófica (herbívoros).^{8, 38} Por esse fato, a contaminação de Hg em peixes se tornou uma questão mundialmente importante para a saúde humana, devido a muitos casos de intoxicação ao ser humano por ingestão de peixes

contaminados com Hg.^{5, 6} O caso mais famoso de intoxicação de mercúrio nos seres humanos foi na Baía de Minamata, no sudoeste do Japão, na década de 1950. Uma fábrica de fertilizantes e PVC, da Chisso Corporation, usava sulfato de mercúrio e cloreto de mercúrio como catalisadores na síntese do ácido acético e cloreto de vinila, respectivamente. Esses resíduos foram despejados nas águas desta baía, comprometendo toda a biota desta área. Os peixes oriundos desta baía eram a principal fonte de alimento para a população local, se tornando a maior fonte de exposição ao mercúrio para essas pessoas. Esse fato acabou criando o nome da “doença de Minamata” em razão da mudança comportamental tanto dos animais como os seres humanos causados pela intoxicação por mercúrio.⁵

Desta forma, a WHO, estabeleceu limites diários de ingestão deste elemento, sendo $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ por semana para espécies inorgânicas e $3,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ por semana para espécie orgânica (metilmercúrio).³⁹ Com isso, muitos países estabeleceram legislações que limitam a concentração de Hg em peixes.⁶ No Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), órgão que regulamenta as exportações entre os maiores países da América do Sul, há legislação para alimentos provenientes de sistemas aquáticos (peixes, moluscos e crustáceos), sendo a concentração permitida para comercialização entre $0,5$ e $1 \mu\text{g g}^{-1}$.⁹ Entretanto, como pode ser visto, há uma diferença entre as taxas de absorção de mercúrio dependendo de suas espécies. Porém, essas legislações especificam e limitam apenas a concentração de mercúrio total (somatório entre as espécies inorgânicas e orgânicas). Desta forma, para poder determinar a concentração de mercúrio nesses alimentos, há a necessidade de métodos de preparo de amostra para a posterior determinação de Hg.

2.2.2 Arsênio

O arsênio é um metaloide onipresente e potencialmente tóxico distribuído na crosta terrestre, solo, sedimentos, ar, águas naturais e organismos vivos. A contaminação ocorre de maneira natural, por meio de reações climáticas, atividade biológica e vulcânica e de maneira antropogênica, como processos de mineração, uso de pesticidas/herbicidas e queima de combustíveis fósseis.

Independente de todas essas possíveis fontes de contaminações, quando presente na água, o arsênio pode ocorrer em vários estados de oxidação e formas químicas. Estas formas químicas de arsênio, nomeadamente espécies de arsênio, influenciam na disponibilidade biológica para os organismos. Após a introdução nos sistemas aquáticos ele pode bioacumular facilmente em algas, peixes e moluscos por diferentes rotas tróficas, podendo assim acarretar contaminação na alimentação dos seres humanos. O ciclo biogeoquímico marinho do As é um tanto quanto complexo, apresentando implicações na toxicidade dos organismos marinhos. Cabe destacar, que esses organismos marinhos possuem uma capacidade de bioacumulação muito grande de As. Entretanto, há uma diferença na toxicidade das espécies de As, sendo as orgânicas menos tóxicas que as espécies inorgânicas. Dentre as espécies inorgânicas, as mais comuns são o arsenito (As(III)) e o arsenato (As(V)) e, entre as orgânicas, as mais comuns são o monometil arsênio (MMA) e o dimetil arsênio (DMA).^{2, 42}

Desta forma, o ser humano pode ser exposto a essa fonte de contaminação facilmente, uma vez que os peixes, sejam eles de água doce ou salgada, são fontes de proteínas e sinônimos de alimentação saudável. Contudo, a espécie majoritariamente presente nesses organismos marinhos é o Arsenobetaina (AsB), espécie com pouca toxicidade a humano, sendo facilmente excretado pelo organismo humano por meio da urina.²

2.2.3 Selênio

O selênio (Se) é um elemento essencial nos organismos vivos, sendo o 30º elemento de ocorrência natural mais abundante na crosta terrestre. A presença desse elemento na crosta terrestre é estimada em 0,05-0,5 mg kg⁻¹. O teor de selênio na maioria dos solos é de 0,4 mg kg⁻¹ (média mundial) com concentrações de até 1200 mg kg⁻¹ em regiões como nos EUA, Canadá, Colômbia, Reino Unido, China e Rússia. Além da presença natural, há ocorrência de forma antropogênica, sendo, frequentemente, liberado no meio ambiente por meio de mineração, agricultura, resíduo petroquímico e industrial. Por ser encontrado no solo e água, o selênio pode ser mobilizado para a cadeia alimentar, por meio, das raízes de plantas ou organismos aquáticos, causando

preocupação com possíveis impactos ambientais de longo prazo. As contaminações antropogênicas somada à ocorrência natural, pode se tornar um problema social, pois há estudos que relatam que, mesmo em baixas concentrações, o Se tem potencial para biomagnificação por meio da cadeia alimentar, afetando a saúde humana pela exposição alimentar.^{4, 10, 11}

Este elemento tem função essencial para o organismo do ser humano, mas também pode ser tóxico dependendo da faixa de concentração no organismo. Caso a concentração ingerida for de 3 a 5 vezes maior do que a faixa ideal no organismo, a atividade desempenhada será tóxica. Da mesma forma que a falta de Se na dieta tem um papel comprometedor para a saúde humana, o excesso também tem seus efeitos nocivos. Por isso, é recomendada a ingestão de 30 a 55 µg de Se por dia por ser humano adulto. Como pode ser notado, a faixa entre a concentração essencial e a tóxica é pequena. Entre as reações tóxicas geradas pela alta concentração de Se no organismos, pode ser citado, diabetes, carcinogênese, doenças cardiovasculares e esclerose lateral amiotrófica.^{11, 28}

2.2.4 Cromo, Manganês e Vanádio

O cromo (Cr) pode estar presente nas formas divalente (Cr(II)), trivalente (Cr(III)) e hexavalente (Cr(VI)), sendo o Cr(III) e Cr(VI) as formas mais predominantes e estáveis. O cromo é um dos poluentes ubíquos mais comuns no meio ambiente, como mencionado anteriormente, ele está presente de forma natural, porém, as ocorrência antropogênicas são muitas, estando presente nos efluentes de indústrias têxteis, de curtumes, mineração, galvanoplastia, tingimento, impressão, impressão fotográfica, produtos farmacêuticos, fabricação de aço inoxidável, indústrias de manufatura de borracha, entre outras. Uma vez já introduzido em um sistema biológico, o Cr é, geralmente, encontrado na forma trivalente, sendo relatado como um elemento essencial em mamíferos, uma vez que assume um papel eficaz no metabolismo da glicose, lipídios e proteínas. Devido à baixa permeabilidade na membrana celular, a não corrosividade e muito menos tendência a biomagnificar na cadeia alimentar, a toxicidade de cromo trivalente é muito baixa.^{3, 12}

Por outro lado, o cromo hexavalente é considerado mais tóxico, devido à sua fácil permeabilidade através da membrana celular. O cromo hexavalente possui duas formas principais de oxi-ânion CrO_4^{2-} e CrO_7^{2-} que estão envolvidos na transformação reversível entre si em meio aquoso. Após entrar na célula, o cromo hexavalente se reduz rapidamente a sua forma trivalente, sendo complexado com macromoléculas intracelulares. A fácil permeabilidade e biotransformação do cromo hexavalente, é a responsável por sua toxicidade e atividade mutagênica. Além dessas características, esta espécie é relatada como potencial carcinogênico e teratogênico.^{3, 12}

O manganês é um elemento muito presente na sociedade atual. Seu emprego principal é no setor siderúrgico - produção de ligas metálicas. Além de ser empregado no setor siderúrgico ele é um elemento essencial para a saúde humana, ativador de enzimas envolvidas nas funções catalíticas e reguladoras e componente de metaloenzimas.⁴³ No organismo humano, o superóxido dismutase (SOD) é responsável pela metabolização dos radicais livres nas mitocôndrias, e a arginase (produzida no fígado) participa do ciclo da uréia, meio de eliminação do íon amônio (NH_4^+). Além, de ser essencial na síntese do colesterol e da dopamina.⁴³ A exposição aguda ao Mn pode causar disfunção do sistema nervoso. A exposição crônica a níveis muito altos resulta em dano neurológico permanente, o que foi observado em ex-mineradores de manganês e trabalhadores de fundição.¹³

Por outro lado, o vanádio (V) é um oligoelemento amplamente distribuído na natureza. Após o molibdênio, o vanádio é o segundo metal de transição mais abundante no oceano. O vanádio existe em muitos estados de oxidação, sendo V^{5+} o mais comum em água de mar. Somente os estados de oxidação V^{3+} , V^{4+} e V^{5+} estão envolvidos, no entanto, em sistemas biológicos, onde o vanádio tem distribuição limitada como mineral essencial nos organismos como esguichos e cogumelos do mar. Devido à presença em organismos marinhos, estudos demonstraram que V pode ser tóxico para plantas, peixes, invertebrados, animais selvagens e humanos. Em seres humanos o excesso de V_2O_5 pode aumentar a possibilidade de ocorrência de câncer. Além de elevada concentração de forma natural, há ainda as ocorrências antropogênicas que podem causar transformações importantes nos ambientes, sendo a combustão de resíduos de óleos e carvão, uma das principais fontes de V. Como

resultado desta ocorrência, a concentração de V sedimentar nos locais de queima do combustível (ou seja, áreas próximas a refinarias de petróleo, planta petroquímica, instalações movidas a combustível, área de mineração) é geralmente muito maior que a abundância natural.^{14, 44}

2.3 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

2.3.1 Métodos de decomposição por via úmida

O preparo de amostra para a posterior determinação elementar é um procedimento necessário e indispensável, dependendo da técnica de determinação que será usada. Para as técnicas de determinação que necessitam de um sistema de introdução de amostra na forma líquida ou gasosa, a decomposição da amostra faz-se necessária. Em relação ao Hg, devido às características de volatilidade, o preparo de amostra torna-se uma das etapas críticas.^{15, 16} Para evitar perdas pela volatilização de mercúrio e outros elementos que podem formar espécies voláteis, sistemas fechados são os mais utilizados. A decomposição utilizando o aquecimento convencional em sistema fechado, também foi muito utilizada na década de 1990 para contornar as perdas em sistemas abertos.^{23, 45} A decomposição com aquecimento convencional em sistemas abertos do tipo bloco digestor pode ser feita utilizando um simples condensador de refluxo (“*cold finger*”). Esse método, utilizado há décadas, utiliza um tubo de vidro refrigerado por água, sendo este adaptado na parte superior do tubo de decomposição. O tubo refrigerado possibilita o refluxo do ácido usado para oxidação/redução da amostra, além da condensação das espécies voláteis, evitando possíveis perdas por volatilização desses analitos. Esse sistema possui como vantagem a possibilidade de refluxo do ácido, não havendo a necessidade de adicionar reagentes auxiliares para a decomposição da amostra, como normalmente é feito em sistemas abertos.⁴⁶ Por outro lado, uma desvantagem é a alta concentração de ácido residual nos digeridos, que pode resultar em interferências na etapa de determinação ou na

necessidade de diluição dos digeridos. A elevada concentração de ácido nos digeridos são comumente relatadas como fontes interferências na etapa de determinação.⁴⁷⁻⁴⁹

O método mais utilizado atualmente e considerado o estado da arte quando se fala em preparo de amostra, é a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) em sistema fechado.^{16, 18} Este método é, normalmente, utilizado em sistemas fechados. Apesar de haver aplicações para sistemas abertos, o sistema fechado mais eficiente quando comparado ao sistema aberto. O aquecimento ocorre a partir da interação entre a radiação micro-ondas e a solução por meio dos fenômenos de migração iônica e rotação de dipolo.

Para a decomposição de amostras empregando a radiação micro-ondas, normalmente são empregado ácidos concentrados ou diluídos⁵⁰⁻⁵², como por exemplo, ácido nítrico^{53, 54}, ácido clorídrico⁵⁵ e ácido fluorídrico.^{56, 57} Outro reagente utilizado para a decomposição de amostras é o peróxido de hidrogênio.^{58, 59} Há, ainda, trabalhos na literatura com o uso de soluções alcalinas para a decomposição de amostras.⁶⁰ Por outro lado, a quantidade de massa de amostra digerida é um dos fatores limitantes em sistemas fechados, de modo a evitar exceder a pressão limite dos frascos. Além da decomposição empregando a radiação micro-ondas, o método de extração assistida por micro-ondas também é bastante relatado na literatura.^{16, 18} Este método é comumente empregado utilizando ácidos diluídos combinados com algum tipo de solvente orgânico.⁶¹

2.4 MÉTODOS DE COMBUSTÃO PARA O PREPARO DE AMOSTRAS

Métodos de decomposição por via úmida podem não ser tão eficientes para algumas matrizes, como por exemplo, carvão, petróleo, polímeros e grafite.¹⁶ Essa ineficiência está relacionada, principalmente, com a resistência desses materiais às reações de decomposição com ácidos concentrados, mesmo combinado a elevadas temperaturas. Isso resulta, muitas vezes, em uma decomposição ineficiente e com elevado teor de carbono nos digeridos, podendo causar interferências na etapa de determinação.⁶²⁻⁶⁵

Porém, por essas amostras conterem elevado teor de carbono, são adequadamente decompostas empregando métodos de combustão. A reação de combustão pode ocorrer a partir de diversas maneiras. Entre as formas mais utilizadas para início da combustão destacam-se, o uso de ignitores por calor e lâmpadas com emissão com comprimento de onda na faixa do infravermelho.^{16, 18} A seguir será discutido brevemente alguns métodos de combustão já publicados na literatura.

2.4.1 Combustão em fornos tipo mufla

Este sistema é considerado o mais simples entre os métodos de combustão para amostras de matriz orgânica. O princípio deste método é baseado na queima da matéria orgânica presente na amostra em temperaturas entre 450 e 550 °C sob atmosfera do ar. Após a decomposição e volatilização da matéria orgânica, resulta um resíduo inorgânico, majoritariamente composto por óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos e outros compostos inorgânicos não voláteis. Entretanto, podem ocorrer reações que convertam os analitos em compostos voláteis, como é o caso de alguns cloretos.^{66, 67} Essas perdas tornam-se mais acentuadas quanto maior a temperatura usada. Porém, como a oxidação completa da matéria orgânica depende da temperatura do sistema, essa limitação do método é difícil de contornar.^{16, 68}

Entre os analitos com maior probabilidade de perdas por volatilização, utilizando este método, podem ser listados o As, Br, Cl, F, Ge, Hg, I, P, S, Sb, Se e Tl. Entre as vantagens deste método estão a possibilidade da utilização de elevada massa de amostra, não necessita de uso de ácidos concentrados, é um método seguro para o operador e o digerido final, geralmente, possui compatibilidade com as técnicas de determinação. As desvantagens são a perda de analitos por volatilização, como já mencionado anteriormente, elevado risco de contaminação e a dificuldade de dissolução de alguns resíduos inorgânicos.^{16, 18}

2.4.2 Decomposição em tubos de combustão

Este sistema geralmente é usado para a posterior determinação de carbono, enxofre, halogênios, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. A combustão ocorre dentro de um tubo de quartzo, no qual é inserido um gás carreador que leva os compostos voláteis até um compartimento de coleta para posterior determinação do analito.¹⁶ Este sistema de combustão pode ter pequenas mudanças no procedimento dependendo do analito que será determinado. É importante ressaltar que existem analisadores automáticos no mercado, que possuem um tempo relativamente baixo (minutos) para determinar carbono, hidrogênio e nitrogênio.^{16, 69}

2.4.3 Decomposição em sistema dinâmico de combustão e Wickbold

O sistema dinâmico de combustão, faz uso de lâmpadas que emitem na faixa do infravermelho, gerando calor suficiente para a amostra entrar em combustão. A amostra, na forma de comprimido, é acondicionada em suporte de quartzo, sendo este suporte inserido dentro de uma pequena câmara de combustão, juntamente a uma tira de papel, que auxilia a ignição da amostra. A câmara de combustão é acoplada a um sistema de resfriamento com nitrogênio líquido e, também, há um orifício para a entrada da vazão contínua de oxigênio. O processo de combustão da amostra dura cerca de 10 a 20 s, dependendo da quantidade de amostra e característica da mesma. Como uma singularidade deste método, amostras orgânicas voláteis não podem ser decompostas, isto ocorre devido ao fato delas volatilizarem antes e durante o momento em que a radiação infravermelha é emitida na câmara de combustão. Este sistema dinâmico de combustão já foi empregado para amostras biológicas, solos e rochas, não sendo mais comercializado até o presente momento.^{16, 70, 71}

O método de combustão de Wickbold tem como princípio a queima da amostra em uma chama de oxigênio e hidrogênio. Devido à elevada temperatura, superior a 2000 °C, a combustão é completa e tanto amostras líquidas como gasosas podem ser introduzidas diretamente na chama. Por outro lado, amostras sólidas necessitam passar por uma etapa de pirólise antes da introdução na chama. Após a introdução da amostra na chama, seja ela sólida, líquida ou gás, os produtos gerados serão condensados por um sistema de resfriamento com água, e succionadas em um tubo por meio de uma

diferença de pressão, que posteriormente serão absorvidos em uma solução compatível com a técnica de determinação do analito. Nesse sistema, algumas vantagens são a queima de até 10 g de amostra e possibilidade de determinar elementos que sofram perdas por volatilização em outros sistemas como As, Sb e Se.⁷² Uma aplicação importante a ser destacada é a possibilidade de determinação de Hg, sendo este sistema de combustão passível a um acoplamento com a técnica de determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor com sistema de injeção em fluxo (FI-CVG-AAS).⁷³

2.4.4 Frasco de Schöniger

Baseado no método desenvolvido em 1892 por Hempel, em 1955, Schöniger fez algumas alterações para que este pudesse ser usado em decomposição de amostras biológicas e orgânicas para posterior determinação de elementos em baixa concentração.¹⁶ Esse sistema faz uso de um frasco de vidro em formato normalmente cônico. A amostra é, geralmente, suportada em uma cesta de platina, conectada à tampa do frasco por um fio também de platina. Para posicionar a amostra dentro deste cesto, ela precisa ser inserida com o auxílio de um envoltório, podendo ser de papel, o qual é colocado dentro da cesta que, por sua vez, é posicionada dentro do frasco com uma solução absorvedora, de modo que fique suspensa e não tenha contato direto com a solução. Esses frascos, normalmente, são de borossilicato com paredes reforçadas, sendo o volume, geralmente, de 500 mL, o que permite, a combustão de cerca de 50 a 60 mg de amostra.^{19, 69, 74}

Dentre as vantagens deste método, pode-se destacar a simplicidade do processo que, aliada à rapidez de decomposição e por ser em sistema fechado, minimiza perdas por volatilização e contaminações. Cabe destacar, ainda, a adequabilidade do tipo de solução absorvedora para diferentes analitos ou técnicas de determinação que será utilizada. Por outro lado, entre as desvantagens, está a queima incompleta da amostra pela falta de oxigênio, formando resíduos (fuligem). É importante mencionar que o frasco de combustão de Schöniger é muito usado em laboratórios que fazem uso deste método para análises de rotina. Sua importância é tal, que se encontra recomendado

como método oficial para diversas análises de fármacos, além de possuir sistema disponível para comercialização.^{16, 18, 74}

2.4.5 Bomba de combustão

A bomba de combustão assemelha-se a uma bomba calorimétrica onde se utiliza um frasco de aço que é pressurizado com oxigênio. A bomba de combustão utiliza amostras na forma de comprimidos, porém neste caso a ignição ocorre por meio de uma descarga elétrica aplicada na amostra por dois eletrodos de platina. Após a combustão, há a liberação de vapores que são absorvidos por uma solução, sendo esta solução compatível com a técnica de determinação. Com a amostra na forma de comprimido inserida no copo de ignição e a solução absorvedora introduzida no interior do frasco da bomba de combustão o sistema é fechado e pressurizado com oxigênio com pressões que variam de 20 a 30 bar.^{19, 75, 76}

Devido à resistência da bomba metálica, e à possibilidade de pressurização com oxigênio sob altas pressões, é possível a combustão de massas de amostras elevadas (aproximadamente 500 mg ou mais). Dependendo das características das amostras, também é possível utilizar aditivos que auxiliam a combustão (álcool,⁷⁶ óleos,⁷⁷ entre outros) melhorando a eficiência do processo. Dentre as desvantagens, é possível destacar a contaminação para alguns elementos como Fe, Cu e entre outros durante o processo de combustão.¹⁶ Isto ocorre pelo material ter composição metálica, sendo acentuado esse processo quando são utilizadas soluções absorvedoras ácidas. A dificuldade na etapa de limpeza e o refluxo podem ser consideradas as maiores desvantagens.^{16, 19}

2.4.6 Combustão iniciada por micro-ondas

Em 2003 foi desenvolvido um método de preparo de amostra empregando a radiação micro-ondas, originalmente em sistema fechado, denominado combustão iniciada por micro-ondas (MIC).⁷⁸ Esse sistema foi patenteado e, posteriormente, comercializado por uma empresa Austríaca. Este método foi tão difundido que, em

2016, o *National Institute of Standards and Technology* (NIST)⁷⁹ publicou um artigo destacando as vantagens da MIC para o método de decomposição de matrizes de difícil decomposição como por exemplo, carvão, para a posterior determinação de enxofre.

Este método consiste na combustão da amostra iniciada a partir da radiação micro-ondas, podendo ser em sistema fechado ou aberto, em atmosfera com alta concentração de oxigênio. Para o procedimento da MIC, utiliza-se um suporte de quartzo contendo a amostra, geralmente na forma de comprimido, o qual é colocado em frasco de quartzo com que pode suportar até 80 bar de pressão.^{20, 67} Para o início da combustão, é utilizado um disco de papel filtro colocado na base do suporte de quartzo, sendo umedecido com 50 µL de uma solução de nitrato de amônio. A amostra é posicionada acima deste disco de papel. Após a incidência da radiação micro-ondas no papel com nitrato de amônio, há a liberação de uma grande quantidade de calor e essa energia liberada promove uma série de reações em cadeia. Devido ao excesso de oxigênio no sistema, o papel entra em combustão muito rapidamente, normalmente em cerca de 10s que, por sua vez, propaga-se para a amostra.^{16, 18-20}

Após a combustão, pode ser aplicada uma etapa de refluxo com uma solução absorvedora, ácida ou básica e, até mesmo água, dependendo dos elementos de interesse.¹⁶ Atualmente, a MIC está estabelecida como um método adequado para a posterior determinação de halogênio em diversas amostras.⁷⁹ Para esses analitos, há a necessidade do emprego de uma solução absorvedora básica como, por exemplo, hidróxido de amônio.⁸⁰ Por outro lado, para a determinação de metais e não metais recomenda-se o uso de uma solução absorvedora ácida. Por ser considerado um método robusto, a MIC já foi empregada em diversos tipos de amostras como, materiais biológicos⁶⁷, solos^{81, 82}, combustíveis⁸³, polímeros⁸⁴, petróleo⁸⁵, nanotubos de carbono⁸⁰ e carvão.⁶⁶ Porém, quando verifica-se a utilização desse método para a posterior determinação de mercúrio, a MIC foi empregada para amostras de polímeros⁸⁶, solo²¹, castanha⁸⁷, tecido de peixe⁸⁸, fármacos⁸⁹, resíduos eletrônicos⁹⁰, nanotubos de carbono⁹¹ e grafite.⁹² Estes trabalhos comprovam a aplicabilidade da MIC para diversas matrizes e diferentes analitos.

A MIC também pode ser aplicada à matrizes com composição majoritariamente inorgânica.^{21, 82} A utilização da MIC, nestes casos, foi possível devido à mistura de

celulose monocristalina nas amostras. Com isso, há uma modificação no método da MIC, sendo denominada volatilização por combustão iniciada por micro-ondas. Devido a amostra não conter ou conter baixo teor de matéria orgânica, ela não entrará em combustão. Neste caso, a celulose entra em combustão fornecendo calor suficiente para que os analitos sejam volatilizados e em seguida absorvidos pela solução.^{16, 18, 21, 81} Picoloto *et al.*²¹ utilizaram, pela primeira vez, a MIC como um método de volatilização para a posterior determinação de Hg, em amostras de solos com alto teor de material inorgânico.

Entre as vantagens da MIC, pode ser destacada a elevada eficiência na decomposição de amostra com elevado teor de carbono, possuir etapa de refluxo, diferentemente da bomba de combustão, possuir baixos valores de branco, baixos teores de carbono residual, emprego de até 1 g de amostra, obtenção de digeridos com soluções compatíveis com diferentes técnicas de determinação, sendo possível aplicação para a determinação de metais e não metais, entre outras.^{16, 18-20}

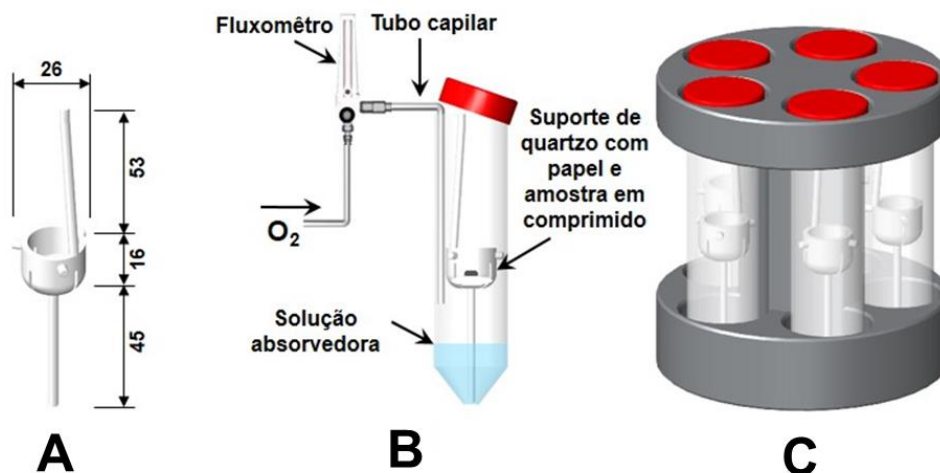
2.4.7 Combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis

Pelas vantagens mencionadas anteriormente, a MIC pode ser considerada um método robusto. Contudo, seu alto custo de aquisição é uma desvantagem, visto que um sistema completo de combustão, considerando o forno de micro-ondas, frascos e suportes de quartzo pode passar, facilmente, de US\$ 35.000,00. Neste sentido, Duarte *et al.*²² desenvolveram a combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis (MIC-DV), utilizando um forno de micro-ondas doméstico e frascos de polipropileno, de modo a garantir o baixo custo desse método. Esse método, além de possuir o mesmo princípio que a MIC para a ignição da amostra (uso de papel filtro e iniciador de combustão), tem como base o uso do princípio do frasco único.⁹³ Este princípio foi inicialmente proposto por Sperling 1988⁹³, e consistiu em realizar as etapas de decomposição da amostra e determinação no mesmo frasco. Não havendo a necessidade de se usar um frasco na etapa de decomposição e outro frasco para armazenar o digerido para a etapa de quantificação. Ao longo do tempo outros trabalhos foram feitos baseados neste princípio.⁹⁴⁻⁹⁶

No método da MIC-DV os materiais utilizados foram, em sua maioria, descartáveis ou de baixo custo. Por exemplo, os frascos utilizados são de polipropileno, (volume de 50 mL) com tampas de polietileno de alta densidade. Devido às limitações físicas dos materiais, o suporte de quartzo utilizado neste método não possui o mesmo modelo do suporte usado na MIC convencional. Para a MIC-DV o suporte de quartzo foi modificado, de forma a possuir uma borda mais elevada e aparadores para proteger a parede do frasco da chama da combustão e do excesso de calor, evitando que o frasco derreta ou perca resistência mecânica.

Outro problema constatado no desenvolvimento desse método, foi a evaporação da solução absorvedora contida dentro do frasco. A solução, ao interagir com a radiação micro-ondas, aquecia e evaporava, umedecendo o papel contendo o iniciador prejudicando, assim, a combustão da amostra. Uma forma de contornar esse problema foi utilizar um rotor metálico, para proteger completamente a solução da radiação micro-ondas, impedindo a interação das micro-ondas com a solução absorvedora. Outra limitação é o material do frasco, polipropileno, este material possui uma resistência mecânica menor quando comparado com o frasco de quartzo usado na MIC convencional. Assim, a pressão interna do sistema torna-se uma limitação. A forma de introdução do oxigênio no frasco ocorre por meio de um capilar que é introduzido no frasco e possibilita a inserção do oxigênio por um tempo de 60 s. Na Figura 1 é possível visualizar o sistema de MIC-DV, com o suporte modificado.

Figura 1. Sistemas utilizados no método da MIC-DV. a) Suporte de quartzo e suas medidas em mm; b) Sistema de purga de oxigênio no frasco e c) Rotor metálico para impedir a interação da radiação micro-ondas com a solução absorvedora. Adaptada de Duarte²² *et al.*.



Nesse método, o custo do sistema é extremamente baixo, sendo essa uma das principais vantagens. Outras vantagens são a simplicidade do procedimento para execução do método, a segurança por trabalhar a baixas pressões e agilidade no procedimento devido à simplicidade. No trabalho original²², os autores relatam que a melhor condição para a recuperação dos analito foi usando 20 mg de amostra, 5 mL de HNO₃ na concentração de 1 mol L⁻¹ como solução absorvedora e purga de oxigênio de 60 s. Nesse, que foi o primeiro trabalho publicado na literatura utilizando a MIC-DV, foram usados apenas CRMs como amostra. Cabe salientar que esse tipo de material é homogêneo e padronizado, desta forma, uma aplicação para amostra real e posterior determinação de outros analitos é de grande importância. Entretanto, há algumas desvantagens, como o uso de baixa massa de amostra e o pouco volume de digerido para a etapa de determinação e emprego para amostras de difícil decomposição.

2.5 TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS

Atualmente, muitas técnicas podem ser utilizadas para a determinação de elementos, entre as mais utilizadas são as técnicas eletroanalíticas⁹⁷, AAS,^{23, 27, 98-101}

GF AAS,^{102, 103} AFS,^{24, 104, 105} ICP-OES,^{28, 86} ICP-MS^{21, 26, 33, 106} e analisadores de mercúrio.¹⁰⁷ Entretanto, para a determinação de Hg, a maioria dessas técnicas utilizam uma etapa previa de geração de espécies voláteis para a determinação. O uso desse procedimento deve-se pelo efeito de memória do Hg em técnicas que utilizam a nebulização pneumática como forma de introdução de amostra, por exemplo, ICP-MS. Assim, o sistema de introdução de amostra para essas técnicas deve ser modificado para a introdução do analito na forma de gás. O procedimento mais comum é a redução de Hg^{2+} para Hg^0 .

2.5.1 Geração química de vapor

O mecanismo para a geração de espécies voláteis, normalmente, ocorre pela transferência de hidrogênio das espécies de borano (B-H) para o analito.^{108, 109} O hidrogênio ligado ao boro liga-se ao composto do analito formando um complexo que, com o excesso de hidrogênio, acaba favorecendo a reação para o deslocamento do composto ou átomo ligado ao analito em questão. Outro mecanismo proposto para geração do vapor de Hg é a redução de Hg para Hg^0 pelo NaBH_4 , sendo assim carregado até a técnica de determinação, podendo-se utilizar as técnicas AAS, AFS, ICP-OES e ICP-MS.³¹

Outra forma de geração química de vapor é substituir os reagentes redutores, pela emissão de radiação ultravioleta (UV), juntamente, com compostos orgânicos de baixo peso molecular. Esse procedimento também é bastante usado para oxidação de compostos, porém para a determinação de mercúrio a radiação UV é usada para fotoredução.¹¹⁰ Isso ocorre devido a grupamentos carbonil ou grupo amins que, ao interagir com a radiação UV, formam espécies fortemente redutoras.¹¹⁰ Entre os compostos orgânicos mais utilizados encontram-se os ácidos fórmicos e acéticos. O mecanismo desta reação é pela geração de radical nas espécies orgânicas a partir da emissão de radiação UV.

Com o radical ($\text{CH}_2\text{CO}^\bullet$) gerado após a incidência da radiação UV por meio da cisão hemolítica, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0 . É importante mencionar que, para os compostos orgânicos de mercúrio, há uma etapa anterior que é o procedimento de

desmetilação do composto pela radiação UV, deixando assim o mercúrio na forma iônica (Hg^{2+}) para posteriormente reagir com o radical, como mencionado anteriormente.¹¹⁰ Cabe salientar que, após a escolha de qualquer uma das formas para a geração de Hg^0 há a necessidade de um separador gás líquido e um gás de arraste (inerte) para transportar o mercúrio até ao local de detecção, cela de quartzo no caso da AAS, ou plasma no caso de ICP-OES ou ICP-MS.³¹

2.5.2 Analisador de mercúrio

Atualmente, há alguns analisadores de mercúrio comerciais por amostragem direta. Nesses sistemas ocorre a combustão da amostra em uma câmara de quartzo com um fluxo de oxigênio.¹¹¹ A amostra é suportada em uma barqueta, sendo esta introduzida na câmara de combustão, onde os analitos e os demais concomitantes voláteis, são volatilizados após a combustão. Após a câmara de quartzo, há um sistema de trapeamento utilizando ouro, que forma um amálgama em contato com o mercúrio. Este sistema possibilita a eliminação de muitos interferentes como halogênios, óxidos de nitrogênio⁹⁹ e enxofre. Após o trapeamento do Hg, o amálgama é aquecido, liberando o Hg para determinação por espectrometria de absorção atômica.

Esses analisadores possuem várias vantagens, como o uso de quantidade relativamente alta de amostra (até 1,5 g), resultados em até 5 minutos, não necessitam da etapa de preparo de amostra, as amostras podem estar no estado sólido, líquido e gás, baixo limite de detecção por usar CVG AAS como técnica de determinação (aproximadamente 0,001 ng) e possuem amostrador automático, o que facilita a operação. Dentre as desvantagens, podem ser listadas o elevado custo, entre 100 e 150 mil dólares e a possibilidade de determinar apenas mercúrio. Quando comparado com outras técnicas multi-elementares, como ICP-OES e ICP-MS, os analisadores de mercúrio acabam sendo desvantajosos, pois com valores similares ou um pouco superiores é possível adquirir equipamentos multi-elementares e que podem, também, ser utilizados para outras finalidades.¹¹¹

2.5.3 Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica é uma das técnicas mais empregadas para determinação de mercúrio, geralmente empregando sistemas de geração química de vapor (CVG AAS) que permite limites de detecção.^{23, 100} Nesse sistema, a amostra é misturada com ácido (HCl ou HNO₃) e um agente redutor (NaBH₄ e SnCl₂). Após a mistura da amostra com os reagentes, há a necessidade de um separador gás/líquido para que o vapor de mercúrio gerado seja transportado por um gás inerte até uma cela de quartzo, onde o mercúrio atômico absorverá a radiação emitida por uma lâmpada de cátodo oco (HCL), geralmente, no comprimento de onda de 253,7 nm. Por haver a separação do analito da matriz na CVG, há poucas interferências na etapa de determinação por essa técnica.^{31, 101}

Alguns trabalhos na literatura utilizaram a CVG acoplada a GF AAS, onde uma tela de Au é usada para o aprisionamento do Hg e posterior determinação deste analito.¹⁰³ Outras técnicas utilizadas para a determinação de mercúrio por absorção atômica são a AFS, espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS-AAS) e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite com fonte contínua de alta resolução (HR-CS-GF-AAS).^{25, 98} Cabe salientar que, a geração química de vapor auxilia a separação do analito da matriz, proporcionando maiores limites de detecção para o analito e evitando possíveis interferências.^{23, 100, 101}

2.5.4 Técnicas com plasma indutivamente acoplado

As técnicas de ICP-OES e ICP-MS estão baseadas na determinação de átomos e íons (ICP-OES) e apenas íons (ICP-MS) pelas suas emissões de energia e sua respectiva razão massa carga (m/z). Estas técnicas possuem, em sua constituição básica, o sistema de introdução de amostra, gás parcialmente ionizado, óptica (ICP-OES) e separador de massa (ICP-MS) e detector. Para a excitação, atomização e ionização dos elementos, utiliza-se um plasma indutivamente acoplado gerado a partir de argônio, podendo atingir temperaturas entre 6000 e 9000 K. Esta técnica possibilita a introdução de amostras sólidas, líquidas e gasosas. Atualmente a ICP-MS e ICP-OES

são as técnicas mais empregadas para a determinação multi-elementar. Estas técnicas possibilitam quantificar elementos em níveis de traços, e são comumente usadas após a utilização de um método de preparo de amostra. Cabe destacar que estas técnicas são as técnicas mais utilizadas por laboratórios de análise de contaminantes inorgânicos.

Dentre os analitos quantificáveis por essas técnicas, a determinação de Hg, normalmente utiliza-se a ICP-MS, por ser encontrado na maioria das amostras em baixa concentração. Esta técnica permite quantificar a concentração total de mercúrio, quando acoplada a um sistema de cromatografia a líquido, juntamente a uma coluna cromatográfica específica, possibilita a separação e quantificação das espécies de mercúrio na amostra, desde que utilize um preparo de amostra adequado e brando como, por exemplo, a extração.⁸⁸

Cabe salientar que as técnicas com plasma indutivamente acoplado utilizam, normalmente um sistema de nebulização pneumática, sendo composto por um nebulizador e uma câmara de nebulização. Este sistema de introdução de amostra para a determinação de mercúrio ocasiona efeito de memória para deste analito.^{112, 113} Geralmente, parte do Hg fica aprisionado dentro da câmara de nebulização, sendo necessário um tempo muito grande de lavagem entre uma leitura e outra. Porém, quando esse sistema de introdução de amostra é substituído para o sistema de derivatização do Hg como a CVG, a introdução do analito na técnica é por meio de vapor, dispensando o uso de um sistema de nebulização e evitando assim esses problemas na etapa de determinação, além de aumentar a sensibilidade da técnica para este analito.^{26, 113} Com o uso da CVG acoplado a essas técnicas, surge a possibilidade do emprego de análises em fluxo. Ao empregar essa técnica algumas vantagens são incorporadas à técnica como redução no consumo de reagentes e amostras, diminuição do manuseio de amostras e automação do sistema.^{114, 115}

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

As amostras foram cominuídas em um moinho de bolas planetário (modelo PM 200, Retsch GmbH Hann, Alemanha) equipado com dois frascos para moagem de aço inoxidável (modelo 01.462.0240, Retsch) e 8 bolas de 10 mm de diâmetro (modelo 05.368.0063, Retsch), também de aço inoxidável. Após a moagem, as amostras foram secas em uma estufa convencional com circulação de ar (modelo 400/2ND, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). As etapas de pesagem foram feitas em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil) com resolução 0,0001 g e carga máxima de 220 g. Para o preparo dos comprimidos usados na MIC e na MIC-DV foi usada uma prensa de aço (*Manual Hydraulic Press 15 Ton, Specac*, Inglaterra), operando em 1 ton min⁻¹.

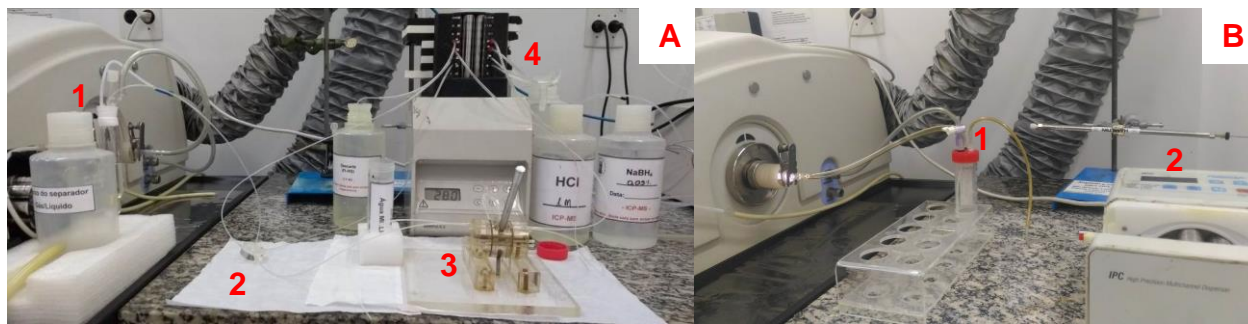
Como método de referência, foi usada à MAWD e a MIC em sistema fechado utilizando um forno de micro-ondas (modelo Multiwave 3000[®], Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com rotor de capacidade para oito frascos de quartzo (80 mL). Esse sistema pode operar com pressão máxima de até 80 bar, taxa de aumento de pressão de 0,8 bar s⁻¹ para a MAWD e MIC, além de temperatura máxima de 280 °C com potência máxima de irradiação de 1400 W.

Para MIC-DV foi utilizado um forno de micro-ondas doméstico (modelo BMK38LQBNA, Brastemp, Brasil) com um rotor de alumínio com capacidade de até 5 frascos. Para a introdução de oxigênio em sistema purgado, foi usado um manômetro (Key instruments, Hatfield, EUA) para controle de pressão e um regulador de vazão (faixa de controle de 0,2 a 6 L min⁻¹). Os suportes de quartzo para combustão das amostras foram confeccionados em quartzo de alta pureza (Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria).

Para a determinação dos analitos, foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, modelo ELAN[®] DRC II, PerkinElmer, Waltham, EUA) equipado com nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno. A

determinação de Hg foi feita empregando a técnica de ICP-MS hifenada a um sistema de geração química de vapor com injeção em fluxo (FI-CVG) como pode ser visualizado na Figura 2^a. Para o sistema de FI-CVG, uma bomba peristáltica de oito canais (Gilson MiniPlus 3, França) foi utilizada juntamente com tubos de Tygon™ para a propulsão das soluções através da tubulação de PTFE (i.d. = 0,8 mm), que foram interligadas por uma confluência de acrílico até o separador gás/líquido (L = 10 cm; i.d. 1,5 cm), o qual foi confeccionado no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As amostras foram injetadas através de um comutador que foi produzido pelos integrantes do próprio laboratório.²¹ Argônio de alta pureza (99,998%, White Martins, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma, bem como para os gases auxiliar e de nebulização.

Figura 2. Sistema de análise em fluxo com geração química de vapor acoplado a ICP-MS para a determinação de Hg. A - 1) separador gás-líquido; 2) confluência; 3) comutador e 4) bomba peristáltica. B - 1) frasco descartável; 2) bomba peristáltica.



Como uma alternativa ao sistema FI-CVG, foi usada a CVG em sistema de batelada em frascos de polipropileno (Figura 2B). Para este sistema, foram utilizadas duas bombas peristálticas de oito canais (Gilson MiniPlus 3), frasco de polipropileno (Sarstedt) com base cônica, volume de 50 mL, dimensões de 114 x 28 mm e tampa de polietileno de alta densidade com rosca. Esta tampa foi adaptada para prover a entrada e saída de gases e reagentes. Tubos de Tygon™ foram utilizados para propulsionar as soluções de NaBH₄ e HCl. Quando a CVG foi acoplada ao espectrômetro de absorção atômica, foi usada uma cela de quartzo, também confeccionada no laboratório de hialotecnica da UFSM.

Foi utilizado um espectrômetro de absorção com chama (modelo AAS Vario 6 Analytik Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de deutério para correção de fundo. Como fonte de radiação eletromagnética, foi utilizada uma lâmpada de catodo oco de Hg (Photron, Austrália) com emissão no comprimento de onda de 253,7 nm, corrente de 5,0 A e fenda espectral de 0,5 nm de largura. O teor de carbono em solução foi determinado utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV, PerkinElmer, Shelton, EUA), equipado com nebulizador pneumático do tipo GemCone[®] acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália) e tocha de quartzo com tubo injetor de alumina de 2,5 mm de diâmetro interno. Com condições operacionais de 1400 W de potência do gerador de radiofrequência, 15 L min⁻¹ de vazão de argônio principal, 0,2 L min⁻¹ de vazão de argônio auxiliar e 0,7 L min⁻¹ vazão de argônio como nebulizador. Para a determinação do carbono foi utilizada a vista axial e comprimento de onda espectral de 193,030 nm.¹¹⁶ Na Tabela 1 constam as condições operacionais do equipamento ICP-MS utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 1. Condições operacionais para a determinação dos elementos por ICP-MS.

Parâmetros	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência, W	1400
Vazão de argônio principal, L min ⁻¹	15
Vazão de argônio auxiliar, L min ⁻¹	1,2
Vazão de argônio do nebulizador, L min ⁻¹	1,10
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	Pt
Isótopos monitorados, m/z	⁷⁵ As, ¹¹⁴ Cd, ⁵³ Cr, ⁶⁵ Cu, ²⁰² Hg, ⁵⁵ Mn, ²⁰⁸ Pb, ⁸² Se e ⁵¹ V

3.2 REAGENTES, SOLUÇÕES DE REFERÊNCIA E GASES

A água utilizada neste trabalho foi previamente destilada, deionizada em coluna de troca iônica (condutividade máxima de 0,6 µS cm⁻¹) e purificada em um sistema de Milli-Q[®] (Milli-Q[®] Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Merck

Millipore, Billerica, EUA) com resistividade final de 18,2 M Ω cm. O ácido nítrico P.A. 65% (1,40 kg L⁻¹, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e ácido clorídrico P.A. 37% (1,19 kg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) foram destilados para obtenção de um grau de pureza mais elevado com sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR[®] 2.01E, Milestone, Bergamo, Itália).

Para a decomposição das amostras por MIC e MIC-DV, foi utilizada uma solução de nitrato de amônio (Merck) na concentração de 6 e 10 mol L⁻¹, respectivamente, como iniciador de combustão. Essa solução foi preparada a partir da dissolução do seu respectivo sal em água. As soluções absorvedoras foram preparadas a partir da diluição dos respectivos ácidos concentrados destilados (HNO₃ e HCl) em água. Discos de papel filtro (15 mm de diâmetro, 15,3 ± 0,3 mg) com baixo teor de cinza (Black Ribbon Ashless, Schleicher and Schuell) foram utilizados como suporte para adição do iniciador de combustão no sistema. O papel filtro foi previamente descontaminado com HNO₃ 5% por 40 min em banho de ultrassom (P12H, 37 kHz, 330 W, Elma Sonics), em seguida, foi lavado com água e seco em uma capela de fluxo laminar (CFLH, Veco).

A determinação de C por ICP-OES foi feita utilizando uma curva de calibração (10 a 500 mg L⁻¹) preparada a partir de uma solução de 10000 mg L⁻¹ de ácido cítrico P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) em água. Uma solução de referência de ítrio de 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 2% (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada como padrão interno para a determinação de C, sendo utilizada em uma concentração final 1 mg L⁻¹.

A determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V foi feita por ICP-MS, sendo o equipamento calibrado com uma curva de 0,05 a 10 μ g L⁻¹ em HNO₃ 5%. Os padrões para a curva de calibração foram preparados a partir de uma solução estoque de concentração 10 mg L⁻¹ dos analitos em HNO₃ 5% (SCP33MS, SCP Science, Quebec, Canadá). Na determinação de Hg por CVG-ICP-MS, o equipamento foi calibrado utilizando uma curva de calibração de 0,05 a 5 μ g L⁻¹ de Hg em HNO₃ 5%. Os padrões foram preparados a partir de uma solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ do analito em HNO₃ 5% (Titrisol[®], Merck Hg(NO₃)₂). Para a determinação de Hg por CVG-AAS, foi utilizada esta mesma solução estoque, porém a curva de calibração foi preparada nas concentrações de 1 a 20 μ g L⁻¹ em HNO₃ 0,5 mol L⁻¹. Para a reação de derivatização

por CVG, o NaBH_4 (Vetec, Brasil) foi preparado diariamente em meio de NaOH (Sigma-Aldrich) 0,1% (m/v) com concentração entre 0,01, 0,03, 0,05, 0,07, 0,09, 0,3, 0,5, 0,7 e 1% (m/v) e HCl com concentração entre 0,25, 0,5, 1,0 e 3,0 mol L^{-1} . Como reagente auxiliar nos procedimentos de MIC e MIC-DV foi utilizado oxigênio com pureza de 99,6% (White Martins).

3.3 PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Todos os materiais e vidrarias foram lavados e previamente descontaminados por imersão em solução de HNO_3 10% por, no mínimo, 24 h e lavados com água ultrapura imediatamente antes do uso. Os frascos de quartzo utilizados nos experimentos de decomposição por MIC e MAWD foram descontaminados com HNO_3 (14,4 mol L^{-1}) utilizando um programa de irradiação constituído de uma etapa de 10 min de irradiação, a 1000 W de potência, seguida por uma etapa de resfriamento. Após o fim do programa de irradiação, os frascos foram lavados com água. Os suportes de quartzos utilizados na MIC-DV foram descontaminados apenas com lavagem com H_2O .

3.4 AMOSTRAS E MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

As amostras de tecido de peixe foram compradas no comércio local (Santa Maria, RS, Brasil), sendo adquiridas as seguintes espécies: Atum comercial enlatado e *in natura* (*Thunnus albacares*) nomeadas como amostras A (enlatada), C e D, Pirarucu *in natura* (*Arapaima gigas*) nomeada como amostra B e Traíra *in natura* (*Hoplias spp.*) nomeada como amostra E. Para avaliar a exatidão dos métodos propostos e os de referência foi utilizado o CRM de tecido de peixe DOLT-4 (*Dogfish muscle*) fornecido pelo NRC – National Research Council Canadá.

3.5 PRÉ-TRATAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram liofilizadas (modelo LH2000/3, Brasil) e, em seguida, cominuadas em moinho de bolas durante 5 min. Posteriormente, as amostras foram

secas a 80 °C por 4 h e armazenadas em frascos de polipropileno. Antes de cada decomposição, as amostras foram secas a 70 °C por 2 h.

3.5.1 Decomposição dos tecidos de peixe por MAWD

Todas as amostras de tecido de peixe foram digeridas por MAWD. Cabe salientar que a MAWD foi utilizada como método de referência para a obtenção dos valores de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V nas amostras, a fim de comparar os valores obtidos após a decomposição por MIC-DV. Para a decomposição das amostras para a posterior determinação de Hg, foram pesados 250 mg de tecido de peixe, adicionados 6 mL de água régia invertida (combinação de HCl e HNO₃ concentrados na proporção de 1:3). Para a decomposição de todas as amostras para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V, foram pesados 250 mg e adicionados 6 mL de HNO₃ concentrado. O programa de irradiação utilizado para a decomposição foi: *i*) rampa de 10 min para chegar até 1000 W de potência, *ii*) tempo de permanência nessa potência de 10 min, *iii*) resfriamento por 20 min.

3.5.2 Decomposição dos tecidos de peixe por MIC

O procedimento de decomposição por MIC foi feito de acordo com Mesko *et al.*⁶⁷. Para tal, foram pesados 250 mg das amostras de tecido de peixe e do CRM DOLT-4 e, em seguida, prensados na forma de comprimido. Como solução absorvedora foi utilizado 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹. O programa de irradiação empregado foi de 1400 W por 5 min para combustão e etapa de refluxo, seguido de 20 min de resfriamento. Este método foi usado como método de comparação para a MIC-DV, proposto neste trabalho.

3.5.3 Combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis

Inicialmente, o método da MIC-DV foi desenvolvido em frascos descartáveis para a determinação de metais empregando o sistema purgado, ou seja, sem nenhuma

adaptação nos frascos e respectivas tampas. Para a avaliação da MIC-DV em sistema purgado, o método foi otimizado usando análise univariada dos dados. Assim, foi avaliada a composição da solução absorvedora (HNO_3 e HCl) para a determinação de Hg e dos demais elementos; a concentração da solução absorvedora, sendo que para a determinação de Hg foi avaliado o uso de HNO_3 e HCl nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 mol L^{-1} e, para a determinação dos demais elementos, foi avaliado o uso de HNO_3 nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 7 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$; a massa de amostra (10, 15, 20, 25 e 30 mg); o teor de carbono em solução após a avaliação da massa de amostra; o volume de solução absorvedora durante a queima (1, 3, 5 e 7 mL); ciclos sucessivos de combustão (2 e 3 vezes). Em todas essas avaliações, a introdução de oxigênio no sistema de combustão foi na forma de purga.

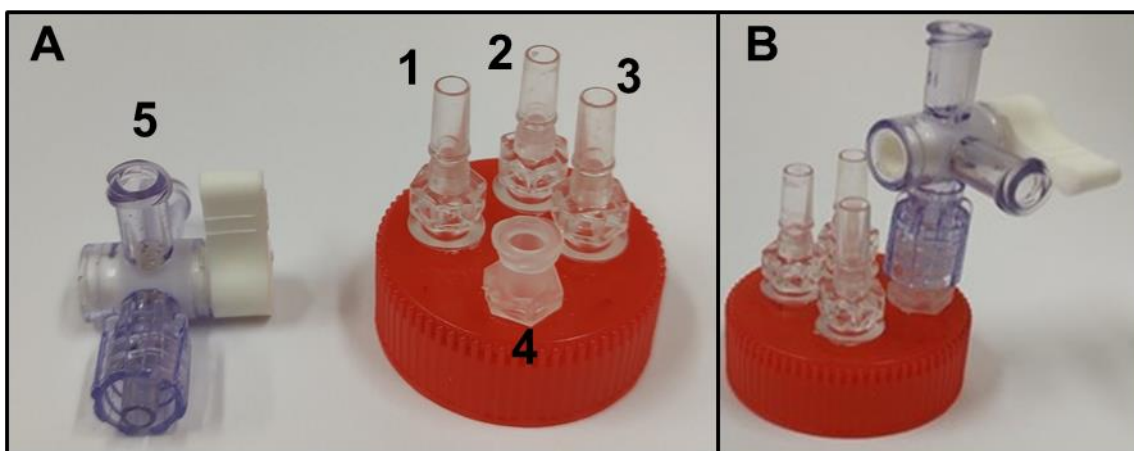
3.5.3.1 Avaliação dos valores de branco do sistema da MIC-DV

Esse estudo consistiu na verificação das possíveis contaminações que o sistema da MIC-DV pudesse estar exposto. Para tal, todos os materiais usados para o desenvolvimento deste método (frascos descartáveis, suporte de quartzo e papel filtro) foram testados. Para o experimento em que foi utilizado o suporte de quartzo, foi feito um procedimento de simulação de queima de amostra antes de cada teste, de modo a simular uma condição real de trabalho. O procedimento consistiu na determinação de As, Cr, Hg, Mn, Se e V nas soluções de HNO_3 nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 7 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ em três experimentos: *i)* apenas a avaliação da solução absorvedora sem contato com o frasco descartável e suporte, *ii)* solução absorvedora em contato com frasco descartável e *iii)* solução absorvedora em contato com frasco descartável contendo suporte de quartzo. Para todos os procedimentos mencionados acima, exceto para a soluções que não estiveram em contato com os materiais, o material em avaliação e a solução absorvedora foram submetidos ao aquecimento micro-ondas até atingir $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, foi feita uma agitação manual. Posteriormente, foi feita a determinação de As, Cr, Mn, Se e V por ICP-MS e a determinação de Hg por FI-CVG-ICP-MS.

3.6 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR EM FRASCO ÚNICO EM BATELADA PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg

Para o desenvolvimento deste sistema houve a necessidade de uma adaptação na tampa do frasco de polipropileno. Essa alteração consistiu na introdução de 4 conectores macho com conexão tipo *luer slip* na região central da tampa, na qual foram feitos quatro furos centrais passante com diâmetro de 4,3 mm como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3. Representação da tampa adaptada para o sistema de CVG em frasco único. Figura A) item 1: conector *luer slip* para introdução de NaBH_4 ; item 2: conector *luer slip* para introdução do gás de arraste (argônio); item 3: conector *luer slip* para a introdução do HCl ; item 4: conector *luer lock* para carrear a fase gasosa, gerada na reação de redução do Hg, com o auxílio do gás de arraste, até o equipamento usado para a determinação de Hg e item 5: válvula três vias com conexões *luer lock* e *luer slip*. Figura B) tampa com válvula três vias acoplada e pronta para uso.



O acoplamento deste sistema proposto com o equipamento de AAS ocorre por uma mangueira conectada entre o conector 3 e uma cela de quarto, a qual fica posicionada no mesmo sentido da fonte de radiação. Para a introdução do NaBH_4 e HCl por meio dos conectores 1 e 3, respectivamente, foi usada uma bomba peristáltica para cada reagente devido ao tempo e momentos de introdução diferentes. Em relação

ao acoplamento deste sistema com a técnica de ICP-MS, houve a necessidade do uso de uma válvula de três vias conectada no conector 3.

3.7 DETERMINAÇÃO DE Hg POR FI-CVG-ICP-MS

A determinação de Hg em todos os métodos empregados (comparativos e nas avaliações dos parâmetros da MIC-DV) foi feita usando a técnica de FI-CVG-ICP-MS. As condições usadas na etapa de derivatização (CVG) foram HCl 1 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,05% em NaOH 0,1% para estabilização da solução. Os isótopos monitorados foram o ²⁰⁰Hg e ²⁰²Hg, sendo o tempo de integração do sinal de 70 s.

3.8 ACOMPLAMENTO DAS TÉCNICAS DE ICP-MS E AAS AO SISTEMA DE GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR EM FRASCO ÚNICO

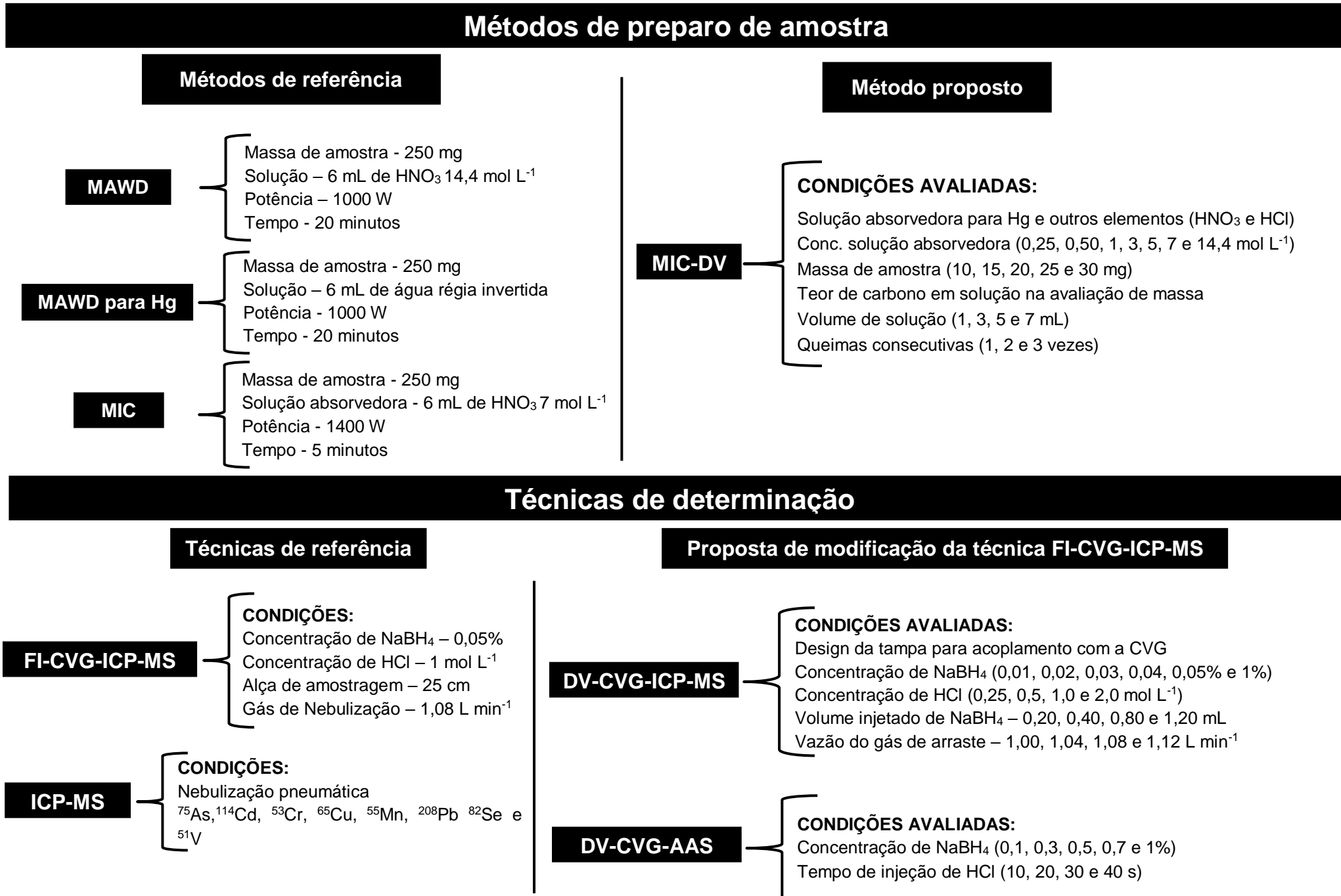
De forma a avaliar o uso das técnicas acopladas ao sistema de CVG em frasco único, alguns parâmetros foram estudados. No caso da ICP-MS, os seguintes parâmetros foram avaliados : concentração do agente redutor NaBH₄ (0,01, 0,03, 0,05, 0,07 e 0,09%), concentração de HCl (0,25, 0,5, 1,0 e 3,0 mol L⁻¹), volume de NaBH₄ (0,20, 0,40, 0,80 e 1,2 mL) e vazão do gás de arraste (1,00, 1,04, 1,08 e 1,12 L min⁻¹).

No caso do acoplamento com AAS, os parâmetros avaliados foram a concentração de NaBH₄ (0,3, 0,5, 0,7, 1,0%) e o tempo de injeção de 3 mol L⁻¹ de HCl (10, 20, 30 e 40 s). Nas avaliações feitas para o acoplamento com a técnica de AAS, o volume de NaBH₄ introduzido por amostra e vazão do gás de arraste foi fixado em 1,2 mL e 1,00 L min⁻¹, respectivamente.

3.9 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E PARÂMETROS AVALIADOS

Na Figura 4 está apresentado um fluxograma com todos os procedimentos experimentais e parâmetros avaliados para o método e modificação da técnica proposto.

Figura 4. Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DECOMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXE PELOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA (MAWD E MIC)

Para este trabalho foram utilizadas amostras de tecido de peixe de três espécies. É importante destacar que este é o primeiro trabalho feito usando amostras sólidas que não sejam CRM. As amostras de tecidos de peixe utilizadas neste trabalho foram decompostas pelos métodos MAWD e MIC e os digeridos quantificados por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS, a fim de comparar os resultados obtidos com o método proposto. O método de MAWD foi usado em duas condições, apenas com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e com água régia invertida para a determinação de Hg por FI-CVG-ICP-MS. O método da MIC foi aplicado, sendo usado HNO_3 7 mol L^{-1} para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS. Os valores determinados nos dois métodos foram comparados entre si utilizando o teste *t-Student*, com nível de confiança de 95%. Os resultados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas 5 amostras de tecido de peixe decompostas por MAWD e MIC (média \pm desvio padrão, n = 3).

Analitos	A		B		C		D		E	
	MAWD	MIC	MAWD	MIC	MAWD	MIC	MAWD	MIC	MAWD	MIC
As	4,49 \pm 0,12	4,51 \pm 0,17	0,295 \pm 0,042	0,304 \pm 0,042	4,55 \pm 0,14	4,58 \pm 0,09	4,63 \pm 0,10	4,85 \pm 0,21	0,189 \pm 0,051	0,142 \pm 0,011
Cd	< 0,12	< 0,10	< 0,12	< 0,10	< 0,12	< 0,10	< 0,12	< 0,10	< 0,12	< 0,10
Cr	2,19 \pm 0,02	1,99 \pm 0,18	0,792 \pm 0,112	0,896 \pm 0,057	0,310 \pm 0,013	0,322 \pm 0,017	0,342 \pm 0,040	0,385 \pm 0,072	0,637 \pm 0,051	0,648 \pm 0,025
Cu	3,71 \pm 0,12	3,38 \pm 0,36	0,678 \pm 0,045	0,729 \pm 0,050	1,35 \pm 0,27	1,39 \pm 0,09	1,19 \pm 0,09	1,43 \pm 0,26	0,900 \pm 0,061	0,833 \pm 0,023
Hg	0,338 \pm 0,004	0,345 \pm 0,016	1,07 \pm 0,01	1,09 \pm 0,01	2,73 \pm 0,19	2,69 \pm 0,15	2,42 \pm 0,07	2,68 \pm 0,17	1,69 \pm 0,09	1,84 \pm 0,10
Mn	1,91 \pm 0,19	1,62 \pm 0,18	0,615 \pm 0,031	0,642 \pm 0,106	0,263 \pm 0,019	0,222 \pm 0,025	0,289 \pm 0,024	0,253 \pm 0,054	1,82 \pm 0,19	1,91 \pm 0,09
Pb	< 0,15	< 0,2	< 0,15	< 0,2	< 0,15	< 0,2	< 0,15	< 0,2	< 0,15	< 0,2
Se	3,90 \pm 0,18	4,09 \pm 0,20	0,797 \pm 0,058	0,785 \pm 0,022	5,49 \pm 0,23	5,43 \pm 0,21	5,34 \pm 0,18	5,37 \pm 0,25	1,43 \pm 0,02	1,52 \pm 0,07
V	0,458 \pm 0,006	0,416 \pm 0,042	0,107 \pm 0,018	0,140 \pm 0,016	< 0,05	0,038 \pm 0,002	< 0,05	0,042 \pm 0,009	< 0,05	0,052 \pm 0,004

Como pode ser visualizado na Tabela 2, para os elementos As, Hg e Se, a concentração presente nas 5 amostras de tecido de peixes usadas nesse trabalho, foram relativamente elevadas em relação aos limites do MERCOSUL. Para as amostras A, C e D a concentração de As foi maior que o limite permitido pela legislação do MERCOSUL, limite esse de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ para peixes crus, congelados ou refrigerados. Ao se verificar a concentração de Hg para todas as amostras, somente a amostra A apresentou concentração de Hg inferior a permitida pela legislação do MERCOSUL. Esta legislação prevê duas classes de peixes com imposições de limites para a concentração de Hg. A primeira classe são os peixes chamados não predadores, com limite de $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$ e, a outra classe são os peixes chamados predadores, com limite de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Essa separação de classes existe devido a biomagnificação do Hg nesses animais.¹¹⁷ As amostras B, C, D e E são de peixes predadores e ambas apresentaram concentração de Hg superior ao limite permitido pela legislação para esta classe de peixes. No caso do Se, não há legislação vigente no Brasil para limite da concentração deste elemento em peixes. Entretanto, as amostras A, C, D e E apresentaram concentrações de Se acima de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, concentração essa considerada elevada para um elemento que se encontra em níveis traços em alimentos. Para Cd e Pb, os valores de concentração ficaram abaixo dos limites de quantificação (LQs) calculados para ambos os métodos. Para a avaliação do método da MIC-DV, foi escolhida a amostra A, pelo simples fato de ter uma quantidade maior de massa quando comparada com as outras amostras.

4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DA MIC-DV EM SISTEMA PURGADO PARA A DECOMPOSIÇÃO DE TECIDO DE PEIXE E POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS

Após a obtenção dos valores de referência para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V nas amostras de tecido de peixe, foram feitas as avaliações para a decomposição dessas mesmas amostras por MIC-DV. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: a composição, concentração e volume da solução absorvedora, a massa de amostra, a capacidade de queimas consecutivas e diferentes tipos de moagens. O

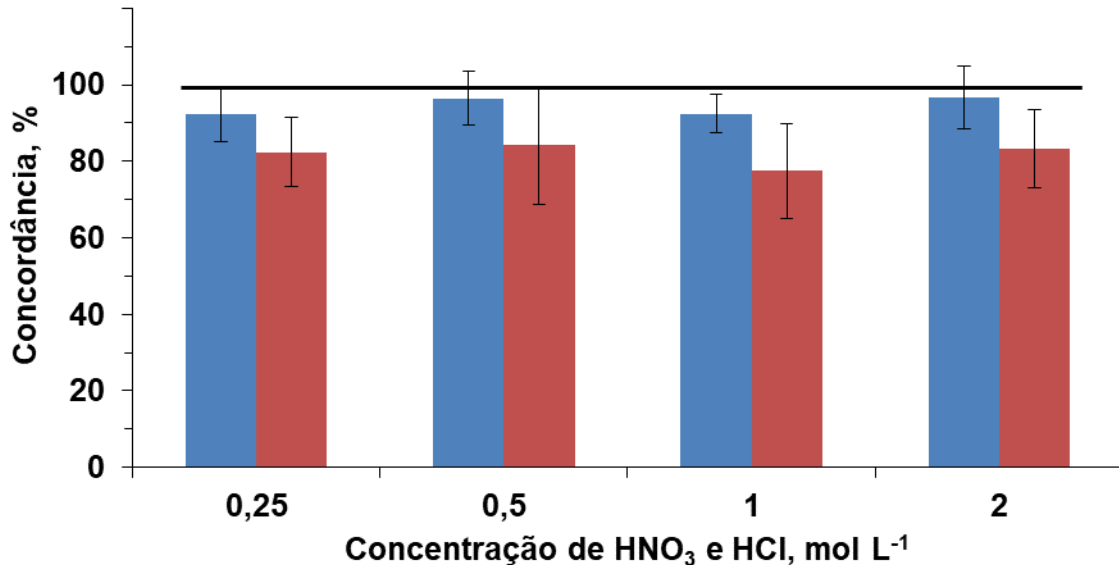
primeiro parâmetro avaliado foi a composição e a concentração da solução absorvedora para a determinação de Hg por FI-CVG-ICP-MS.

4.2.1 Avaliação de HNO₃ e HCl como solução absorvedora para posterior determinação de Hg

Para a determinação de Hg normalmente se utiliza um acoplamento na técnica diferente do empregado para a determinação dos outros analitos. A quantificação de Hg por FI-CVG-ICP-MS utiliza, normalmente, HCl para auxiliar na reação do NaBH₄ com Hg e formar a espécie volátil (Hg⁰). Desta forma, com o intuito de propor uma modificação no sistema para a determinação deste elemento, utilizando o princípio de frasco único e em batelada, além do HNO₃, foi avaliado o uso de HCl como solução absorvedora na etapa de preparo de amostra para a determinação desse elemento.

O intuito de se avaliar o HCl foi deixar o digerido (após etapa de decomposição) na mesma condição da solução usada para a calibração da técnica de determinação. Assim, os ácidos nítrico e clorídrico foram avaliados nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mol L⁻¹. Para a MIC-DV foram usados 20 mg de amostra e 5 mL de solução absorvedora, sendo essas, as condições otimizadas por Duarte *et al.*²². Os valores obtidos para esse estudo são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Avaliação das soluções absorvedoras (■) HNO₃ e (■) HCl para a determinação de Hg por FI-CVG-ICP-MS em tecido de peixe após decomposição por MIC-DV. Condição: 20 mg de amostra, 5 mL de solução absorvedora (resultados em concordância (%), n = 5).



De acordo com a Figura 5, ao se comparar os valores obtidos para Hg em cada concentração de HNO₃ usado como solução absorvedora, não foi observada diferença significativa entre os valores (teste de Tukey, com 95% de confiança). Esse fato se repetiu quando foram comparados os valores obtidos para Hg para cada concentração de HCl avaliada. Entretanto, quando os resultados de concentração de Hg foram comparados entre as soluções absorvedoras avaliadas, evidenciou-se um aumento na concentração deste elemento quando utilizada a solução de HNO₃. Contudo, quando se aplica o teste estatístico (teste de Tukey, com 95% de confiança), os resultados não apresentaram diferença significativa entre eles e isso deve-se ao elevado desvio padrão obtido entre as replicatas. Quando foi utilizado o HCl como solução absorvedora, foram observados desvios padrão relativos (RSD) entre 11 e 23% (Figura 4).

Considerando os resultados em concordância, para as soluções absorvedoras contendo diferentes concentrações de HNO₃, os valores obtidos foram na faixa de 92 e 97%. Por outro lado, ao se analisar as concordâncias obtidas para Hg usando o HCl como solução absorvedora, os valores variaram entre 76 e 83%. De forma a tentar compreender alguns motivos dessa diferença, pode-se elencar, primeiramente, que as

melhores concordâncias nos resultados obtidos para as soluções contendo HNO_3 podem ser oriundas da lixiviação do contato do HNO_3 com o resíduo da queima no suporte. A lixiviação pode ter sido mais efetiva com HNO_3 do que com HCl , devido a sua propriedade oxidante. Outro motivo a ser considerado é a possibilidade de formação de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ em solução, sendo esse produto mais solúvel que $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ favorecendo o aumento de sua concentração no digerido.¹¹⁸ Porém, indiferente do motivo, ficou evidente que os valores de concentração de Hg nas soluções contendo HNO_3 foram superiores aos obtidos nas soluções contendo HCl . Deste modo, o HNO_3 foi escolhido como sendo a melhor solução absorvedora para fixação do mercúrio para a continuidade dos experimentos.

4.2.2 Avaliação dos brancos para cada concentração da solução absorvedora

Antes de seguir os experimentos para o desenvolvimento do método, de modo a compreender e rastrear os valores dos brancos, foi avaliada a concentração dos analitos nos brancos de cada solução absorvedora que será usada no desenvolvimento do método (seção 4.2.3). Para tal, primeiramente foram avaliadas todas as variáveis isoladas, sendo *i*) somente a solução absorvedora (sem contato com o frasco descartável e suporte de quartzo), *ii*) 5 mL da mesma solução absorvedora em contato com o frasco descartável sem a presença do suporte de quartzo e, por fim, *iii*) as soluções absorvedoras em contato com o frasco descartável e o suporte de quartzo. As concentrações avaliadas foram nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 7 e 14,4 mol L⁻¹ de HNO_3 . É importante mencionar que nos procedimentos das avaliações *ii* e *iii*, após inserir o volume da respectiva solução absorvedora, os frascos foram introduzidos no forno de micro-ondas empregado nos experimentos, de modo a aquecer a solução interna até atingir a temperatura entre 35 e 40 °C. Temperatura esta, próxima ou igual a temperatura das soluções após o procedimento da combustão dos brancos e amostras da MIC-DV. Também, é importante salientar que os suportes de quartzo usados nessa avaliação são os mesmos desde o início do trabalho. Durante a etapa de determinação desses analitos, as soluções absorvedoras não tiveram contato com nenhum outro material, e as diluições necessárias para a etapa de determinação, foram feitas no

próprio balão volumétrico onde o procedimento foi feito. Os resultados obtidos dessa avaliação são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de As, Cr, Cu, Hg, Mn, Se e V ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos brancos em diferentes concentrações de HNO_3 e condições após decomposição por MIC-DV (média \pm desvio padrão, $n = 5$). Os valores de LQ são pertencentes a técnica de ICP-MS. Os valores entre parênteses na frente dos elementos ($\mu\text{g L}^{-1}$), correspondem a concentração dos analitos nos digeridos de MIC-DV para a amostra A usando 20 mg em 5 mL de digerido.

Testes	As (17,9)	Cr (8,76)	Cu (14,8)	Hg (1,35)	Mn (7,64)	Se (15,6)	V (1,83)
HNO_3 0,25 mol L^{-1}	< 0,01	< 0,1	<0,25	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,05
HNO_3 0,5 mol L^{-1}	< 0,01	< 0,1	<0,25	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,05
HNO_3 1 mol L^{-1}	< 0,01	< 0,1	<0,25	< 0,05	< 0,05	< 0,2	< 0,05
HNO_3 3 mol L^{-1}	0,022 \pm 0,003	0,240 \pm 0,265	<0,25	< 0,05	0,170 \pm 0,001	< 0,2	< 0,05
HNO_3 5 mol L^{-1}	0,016 \pm 0,004	0,191 \pm 0,015	<0,25	< 0,05	0,484 \pm 0,002	< 0,2	< 0,05
HNO_3 7 mol L^{-1}	0,014 \pm 0,010	0,287 \pm 0,331	<0,25	< 0,05	0,663 \pm 0,004	< 0,2	< 0,05
HNO_3 14,4 mol L^{-1}	0,024 \pm 0,011	< 0,1	<0,25	< 0,05	1,29 \pm 0,03	< 0,2	0,060 \pm 0,006
Frasco s/s 0,25 mol L^{-1}	0,026 \pm 0,023	0,613 \pm 0,058	1,58 \pm 0,22	0,052 \pm 0,018	0,322 \pm 0,176	< 0,2	< 0,05
Frasco s/s 0,5 mol L^{-1}	0,012 \pm 0,004	0,148 \pm 0,023	0,911 \pm 0,479	0,060 \pm 0,015	0,381 \pm 0,130	< 0,2	< 0,05
Frasco s/s 1 mol L^{-1}	0,011 \pm 0,001	0,279 \pm 0,040	0,900 \pm 0,213	< 0,05	0,277 \pm 0,058	< 0,2	< 0,05
Frasco s/s 3 mol L^{-1}	0,033 \pm 0,003	0,212 \pm 0,045	1,47 \pm 0,32	< 0,05	0,799 \pm 0,291	< 0,2	< 0,05
Frasco s/s 5 mol L^{-1}	0,036 \pm 0,012	1,65 \pm 0,15	1,56 \pm 0,46	0,088 \pm 0,075	0,973 \pm 0,496	< 0,2	0,056 \pm 0,009
Frasco s/s 7 mol L^{-1}	0,029 \pm 0,010	1,81 \pm 0,28	2,36 \pm 0,56	0,172 \pm 0,119	1,24 \pm 0,33	< 0,2	0,060 \pm 0,001
Frasco s/s 14,4 mol L^{-1}	0,094 \pm 0,047	4,03 \pm 1,12	2,48 \pm 1,25	0,268 \pm 0,068	2,96 \pm 0,46	0,334 \pm 0,250	0,181 \pm 0,027
Frasco c/s 0,25 mol L^{-1}	0,057 \pm 0,023	0,196 \pm 0,064	1,31 \pm 0,14	< 0,05	0,631 \pm 0,325	< 0,2	< 0,05
Frasco c/s 0,5 mol L^{-1}	0,082 \pm 0,044	0,271 \pm 0,078	1,11 \pm 0,32	< 0,05	0,423 \pm 0,217	< 0,2	< 0,05
Frasco c/s 1 mol L^{-1}	0,039 \pm 0,015	0,269 \pm 0,029	1,34 \pm 0,41	< 0,05	0,470 \pm 0,174	< 0,2	< 0,05
Frasco c/s 3 mol L^{-1}	0,041 \pm 0,003	0,486 \pm 0,202	3,28 \pm 0,91	0,068 \pm 0,020	1,57 \pm 0,63	< 0,2	< 0,05
Frasco c/s 5 mol L^{-1}	0,088 \pm 0,006	1,59 \pm 0,46	4,85 \pm 4,14	0,097 \pm 0,070	1,81 \pm 0,95	< 0,2	0,050 \pm 0,008
Frasco c/s 7 mol L^{-1}	0,384 \pm 0,248	1,95 \pm 0,164	5,56 \pm 1,49	0,133 \pm 0,075	3,04 \pm 0,95	0,622 \pm 0,226	0,101 \pm 0,023
Frasco c/s 14,4 mol L^{-1}	0,247 \pm 0,057	2,99 \pm 0,11	6,83 \pm 1,14	0,343 \pm 0,142	3,01 \pm 0,49	2,13 \pm 1,22	0,327 \pm 0,461

s/s: sem suporte; c/s: com suporte;

Na primeira avaliação feita sem o contato da solução absorvedora com o frasco e suporte (somente o HNO_3), ficou evidenciada a pureza do HNO_3 usado durante o desenvolvimento do trabalho, exceto para Mn. Observando os resultados mostrados na Tabela 3, para as soluções absorvedoras com concentrações mais baixas (0,25, 0,5, 1 e 3 mol L^{-1}) os valores dos elementos ficaram abaixo do LQ, exceto para Cr, cujo o valor de $0,240 \pm 0,265 \mu\text{g L}^{-1}$. Porém, para as subseqüentes concentrações (5, 7 e 14,4 mol L^{-1}) houve a presença de As, Cr e Mn em concentrações acima do LQ da técnica, exceto para Cr com 14,4 mol L^{-1} . Ademais, quanto maior a concentração da solução absorvedora, maior foi a concentração dos analitos determinados na solução. Esse fato, provavelmente, deve-se à presença destes elementos no próprio ácido nítrico. O HNO_3 concentrado, por sua vez, sofreu diluições para o preparo das demais soluções absorvedoras, diluindo, também, a quantidade do analito na solução. Este experimento comprova que o uso de ácidos mais diluídos proporciona uma vantagem para o método, diminuindo os valores de brancos.

Avaliando os resultados do segundo experimento, frasco sem suporte (s/s), onde a solução absorvedora em contato com o frasco foi aquecida entre 35 e 40 °C no micro-ondas, foi possível observar que, para todas as concentrações de solução absorvedora usadas na avaliação, os valores obtidos dos analitos ficaram acima do LQ, exceto para Hg, Se e V (Tabela 3). É importante destacar que este fato não foi observado na avaliação da solução absorvedora sem o contato com o frasco, como mencionado anteriormente.

Outro fato constatado, foi que a concentração dos analitos nas soluções seguiu a lógica do estudo anterior, tendo um aumento para as concentrações mais elevadas de solução absorvedora (5, 7 e 14,4 mol L^{-1}). Os valores obtidos para os analitos nestas concentrações (5, 7 e 14,4 mol L^{-1}) foram maiores que os valores obtidos nas soluções absorvedoras mais diluídas (0,25, 0,5, 1 e 3 mol L^{-1}). Nesta avaliação, ficou explícito o aumento da concentração dos analitos, provavelmente, por estarem adsorvidos na parede interna do material que foram confeccionados os frascos. Também, esse aumento pode ser proveniente do somatório da concentração dos analitos presentes no HNO_3 (utilizado para o preparo das soluções) e da presença destes elementos adsorvidos na parede interna do frasco. A diferença entre os valores obtidos nas

soluções absorvedoras mais diluídas para as mais concentradas, pode ser explicada pela capacidade de lixiviação dos analitos adsorvidos na parede do frasco, uma vez que o aumento da concentração do ácido na solução absorvedora, também aumenta a capacidade de lixiviação, podendo ser intensificado pela variável temperatura, a qual auxilia esse processo de possível lixiviação.

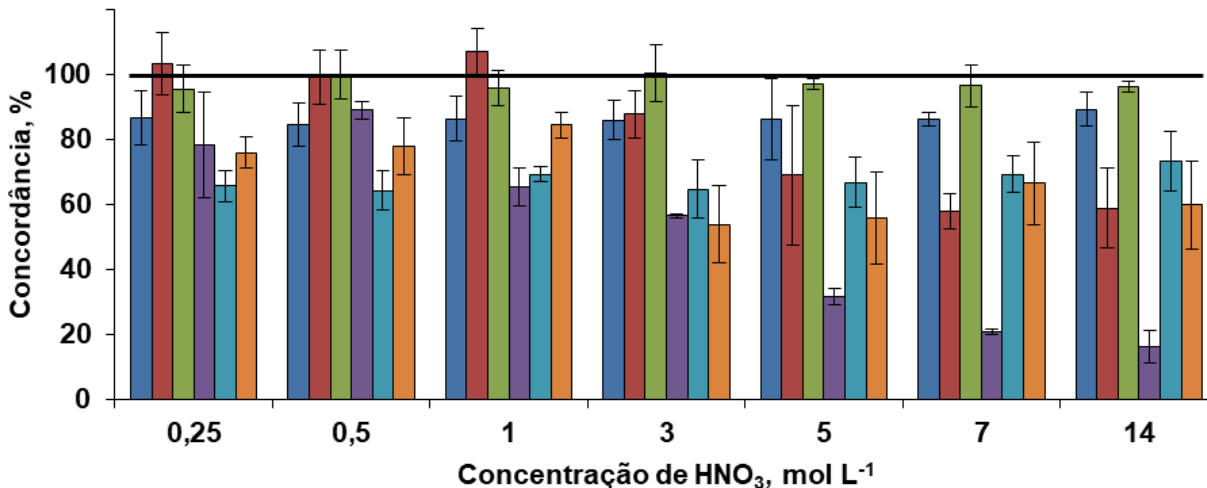
Antes de avaliar e discutir o terceiro e último experimento desta investigação, cabe destacar que, todo o procedimento realizado seguiu a mesma sequência dos experimentos anteriores, porém, com a adição do suporte de quartzo dentro do frasco juntamente com a respectiva solução absorvedora. Outro ponto importante que deve ser salientado é que, para evitar que os suportes fossem “descontaminados” durante estes sucessivos experimentos, todos os suportes, antes de cada procedimento, foram submetidos a um experimento de queima com amostra simulando o uso real deles. Após essa simulação, os suportes foram lavados apenas com água ultrapura (mesmo procedimento de descontaminação durante toda a avaliação do método).

Com relação aos resultados obtidos na terceira avaliação (Frasco c/s), foi possível observar que para, praticamente todos os elementos avaliados com as concentrações de 5, 7 e 14,4 mol L⁻¹, houve um aumento na concentração dos analitos para todas as soluções absorvedoras avaliadas, quando comparado com os experimentos anteriores. Com isso, foi possível constatar que as duas maiores fontes de contaminação para os elementos avaliados, possivelmente, são as paredes internas dos frascos e os suportes de quartzo. De modo a verificar a eficácia da lavagem dos suportes com água, foi feita uma limpeza dos suportes usando HNO₃. Para este experimento, comparou-se os valores dos brancos na condição de 5 mL de 0,5 mol L⁻¹ de HNO₃ com duas formas de descontaminação. Uma usando apenas água para a lavagem dos suportes e outra descontaminação com a imersão dos suportes em HNO₃ 50% e colocados em uma chapa de aquecimento para ebulição por 20 min (tempo cronometrado a partir do momento que o ácido entrou em processo de ebulição). Após este procedimento, os valores de brancos continuaram similares aos obtidos no experimento anterior (sem a descontaminação em HNO₃ 50%). Podendo assim, continuar a usar o procedimento de limpeza dos suportes com água.

4.2.2 Avaliação da concentração de HNO₃ como solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V

Como descrito no item 4.2.1, o uso de HNO₃ (0,25 a 2 mol L⁻¹) como solução absorvedora para Hg mostrou valores de concordância mais satisfatórios do que quando utilizada a solução contendo HCl. Neste sentido, o método desenvolvido buscou obter uma condição única de preparo de amostra para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V. Assim, para o desenvolvimento do método da MIC-DV para a decomposição de amostras de tecido de peixe e posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V, o primeiro parâmetro otimizado foi a concentração de HNO₃, sendo avaliadas as concentrações de 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 7 e 14,4 mol L⁻¹. Para estes analitos, não foi avaliado o uso de HCl como solução absorvedora, uma vez que a presença do Cl⁻ em sua formulação torna-se um interferente na etapa de determinação de As, Se e V por ICP-MS. Para a avaliação da solução absorvedora, os parâmetros de massa de amostra, volume de solução absorvedora e tempo de introdução de oxigênio foram mantidos constantes (20 mg, 5 mL e 1 min com vazão de 4 L min⁻¹, respectivamente).²² Os analitos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V foram determinados por ICP-MS, e Hg foi determinado pela técnica de FI-CVG-ICP-MS. Os resultados estão mostrados na Figura 6.

Figura 6. Avaliação da concentração de HNO_3 como solução absorvedora para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 20 mg de amostra, 5 mL de solução absorvedora, $n = 5$. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.



Observando a Figura 6 é possível verificar que, para a avaliação da concentração de HNO_3 foram obtidos valores de concordância satisfatórios apenas para Hg (96 a 100%), estando próximos aos do método de referência (MAWD) para todas as concentrações de HNO_3 avaliadas. Para os demais elementos, as concordâncias para as concentrações de 0,25 a 3 mol L^{-1} variaram entre 82 a 87%, 99 a 107%, 65 a 89%, 64 a 73% e 88% a 109%, para As, Cr, Mn, Se e V, respectivamente. As soluções de concentração 5, 7 e 14,4 mol L^{-1} apresentaram baixos valores de concordâncias para Cr, Mn Se e V (Figura 5). Em relação aos valores obtidos para Cd, Cu e Pb, estes não foram apresentados no gráfico, pois, nesta avaliação, estes valores ficaram abaixo dos LQs calculados para o método da MIC-DV. Os baixos valores de concentração para Cd e Pb já eram esperados, visto que para os métodos de referência, a concentração desses dois elementos também ficou abaixo dos valores de LQ calculados para os métodos de referência.

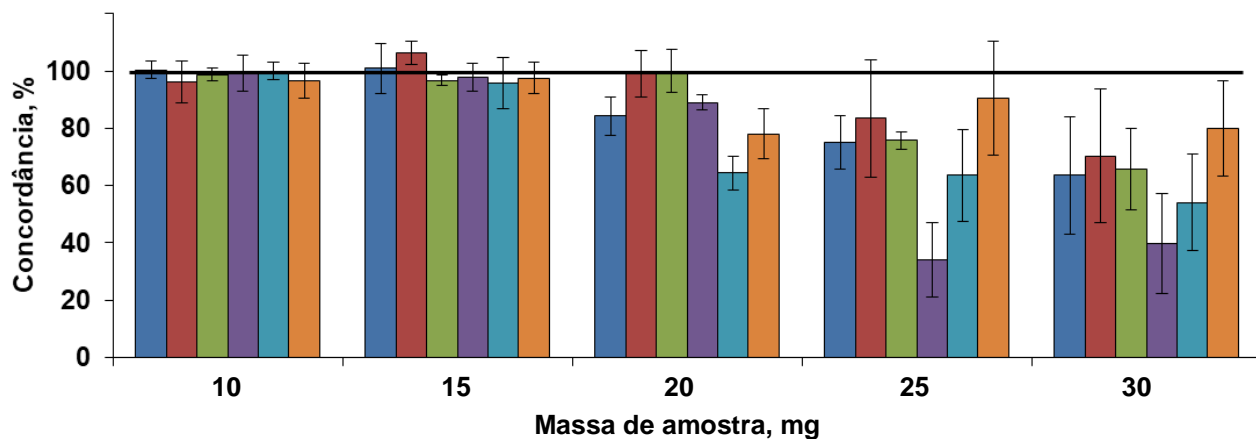
De um modo geral, essa súbita diminuição na concentração de Cr, Mn, Se e V com o aumento da concentração de HNO_3 como solução absorvedora, em um primeiro momento não estaria de acordo com os relatos da literatura, uma vez que vários

trabalhos que reportam o uso da MIC para este tipo de matriz apontam que, quando aumenta a concentração da solução absorvedora, as recuperações e concordâncias dos analitos são, geralmente melhores ou similares quando comparadas com as soluções absorvedoras com concentrações menores de HNO_3 .^{67, 87} As não concordâncias dos valores obtidos neste experimento, podem estar relacionado a necessidade de maiores investigações no método, como a avaliação da massa de amostra. Após esses estudos, selecionou-se a melhor solução absorvedora para os experimentos subsequentes deste trabalho, sendo a da concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser visualizado na Figura 6, a escolha desta solução foi motivada pelos satisfatórios valores de concordância para Cr e Hg, próximos de 100%, e os menores desvios padrões quando comparados com as concentrações de $0,25$, 1 e 3 mol L^{-1} para os outros analitos. Além dessa concentração estar de acordo com o estudo do comportamento dos brancos para este método (seção 4.2.2).

4.2.3 Avaliação da massa de amostra para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V

Após a escolha da concentração da solução absorvedora (HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), o próximo experimento avaliado foi a massa de amostra para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS. As massas de amostra avaliadas foram de 10, 15, 20, 25 e 30 mg com 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 7.

Figura 7. Avaliação da massa de amostra para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ como solução absorvedora, n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.

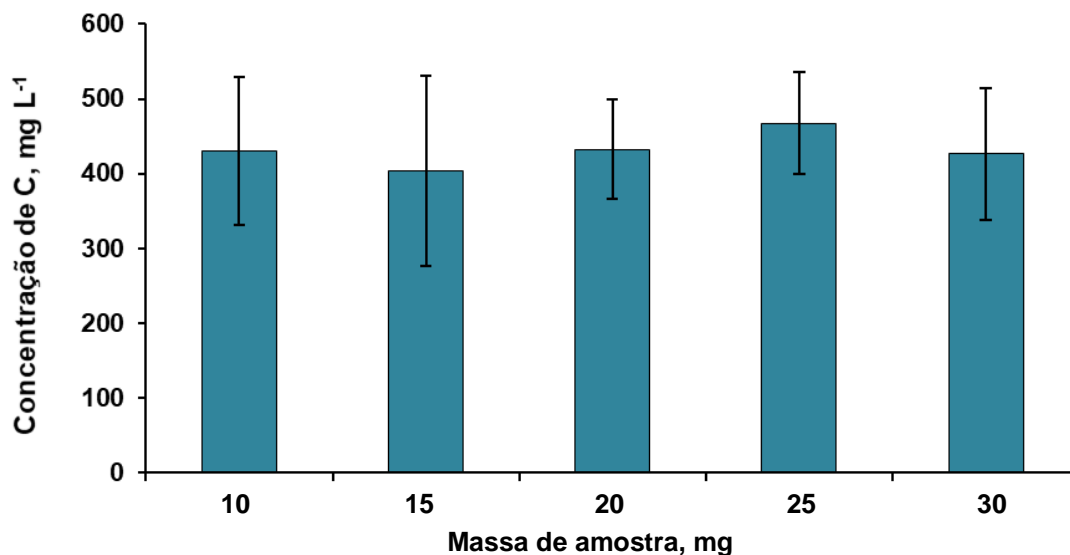


Como pode ser observado na Figura 7, a avaliação da massa de amostra para o método da MIC-DV foi uma avaliação extremamente importante, considerando a melhora na recuperação dos analitos e redução dos desvios padrões. Comprovando assim que, os valores de concordância obtidos para as soluções absorvedoras com concentrações de 5, 7 e 14,4 mol L⁻¹ de HNO₃, provavelmente, era devido à necessidade de avaliação da massa de amostra usada no método. Quando foram avaliadas massas de amostra menores (10 e 15 mg), as concordâncias para todos elementos foram entre 96 a 106% (Figura 7). Entretanto, quando foi avaliada a concentração da solução absorvedora com a massa de amostra de 20 mg, Cr e Hg obtiveram concordâncias próximas a 100%, seguido de As e Mn, com concordâncias de 84 e 89%, respectivamente. Porém, como pode ser observado para Se e V, as concordâncias não foram muito satisfatórias (menores que 78%). Por outro lado, ao se avaliar as massas de amostra maiores (25 e 30 mg) as concordâncias obtidas foram inferiores a 90% para todos os elementos. Os valores para Cd, Cu e Pb não foram apresentados no gráfico, pois ficaram abaixo dos LQs calculados para o método da MIC-DV.

Esse comportamento dos analitos observado na avaliação da massa de amostra para o método da MIC-DV (Figura 7), foi um comportamento similar ao da avaliação feita no primeiro trabalho publicado para este método.²² Neste primeiro trabalho, os autores reportam que as massas de amostra acima de 20 mg apresentaram valores de concordância inferiores aos obtidos para massas menores. Comportamento esse, praticamente idêntico aos resultados obtidos neste presente trabalho, mesmo tendo alguns elementos diferentes dos avaliados no trabalho publicado por Duarte *et al.*²²

Uma possível causa para esse comportamento pode ser a matriz presente nos digeridos. Interferências de matriz podem causar supressão nos resultados obtidos ou, até mesmo, acréscimo na concentração dos elementos que possuam um alto potencial de ionização, como é o caso do As, Cd e Se, na determinação por ICP-MS. Na literatura, tem sido citada a interferência de C sobre As. Quando há uma elevada concentração de carbono nos digeridos, ocorre uma transferência de carga do As para o C no plasma, ocasionando assim esse aumento de sinal para o As.⁶² Desta forma, de modo a elucidar esse comportamento dos analitos nos digeridos desta avaliação, foi determinada a concentração de carbono nos digeridos por ICP-OES, após os procedimentos de MIC-DV, nas condições com 10, 15, 20, 25 e 30 mg. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 8.

Figura 8. Determinação de C em solução (mg L^{-1}) por ICP-OES no digeridos da avaliação de massa de amostra por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora, $n = 5$.



Como pode ser observado na Figura 8, os valores obtidos para carbono nos digeridos em todas as condições avaliadas foram menores que 500 mg L^{-1} . De acordo com relatos na literatura^{50, 62}, 500 mg L^{-1} é a concentração limite de carbono em solução que não causa interferência na determinação de As e outros elementos com elevado potencial de ionização. Quanto aos digeridos possuir uma elevada carga de outros interferentes, que pudessem suprimir os valores obtidos na etapa de determinação por ICP-MS, testes de diluição foram feitos, para complementar esses resultados. Além do baixo teor de carbono em solução nos digeridos, os valores obtidos nos testes de diluição foram concordantes entre si. Considerando esses resultados, pode-se descartar que os valores obtidos nas avaliações das massas 20, 25 e 30 mg pudessem ser oriundos de problemas na etapa de determinação.

Conforme mencionado anteriormente, esses resultados obtidos para as massas de amostra mais elevadas (20, 25 e 30 mg) foram semelhantes aos obtidos no primeiro trabalho de MIC-DV publicado.²² Neste estudo, Duarte *et al.* fizeram um cálculo teórico para demonstrar que o oxigênio adicionado dentro do frasco descartável era suficiente para queimar a massa de amostra introduzida no sistema.¹¹⁹ Utilizando este cálculo, os autores mostraram que, para uma amostra hipotética, composta majoritariamente por

celulose, o excesso de oxigênio presente para realizar uma queima efetiva diminui quando se aumenta a massa de amostra. Para compreensão, os autores mostraram que com uma massa de 20 mg de celulose, o percentual de oxigênio em excesso dentro do frasco, após a combustão, é de 65%. Já para 30 mg, esse excesso de oxigênio cai para apenas 26%.

Infelizmente, devido à complexidade da amostra de tecido de peixe, não é possível fazer um cálculo para conhecer o valor aproximado do excesso de oxigênio presente no frasco após a combustão, uma vez que o tecido biológico é composto, majoritariamente, por proteínas e gorduras, que possuem moléculas de diferentes tamanhos e classificações. Neste caso, para a combustão total do tecido de peixe, provavelmente há necessidade de uma quantidade maior de oxigênio no frasco, sendo diferente da quantidade de oxigênio necessária para a combustão de uma amostra com 100% de celulose (amostra usada pelos autores).^{22, 119}

Devido ao método ser seguro para o operador, por trabalhar em baixas temperaturas e pressões e o frasco ser transparente, foi possível analisar visualmente o processo de queima dentro do frasco. Ao observar esse processo, notou-se uma turbulência na chama durante a queima em todas as massas avaliadas. Essa turbulência pode ser oriunda da emissão de outros gases durante a combustão, tais como CO, CO₂, entre outros, prejudicando a queima da amostra por diminuir o excesso de oxigênio dentro do frasco. Desta forma, esses outros gases competem o espaço interno do frasco com o oxigênio já presente. Assim, mesmo havendo oxigênio em excesso dentro do frasco, pode ser que esse oxigênio livre não consiga entrar em contato direto com a amostra, diminuindo assim, a energia envolvida no processo de combustão. Desta maneira, este fato pode ser a possível causa das baixas concordâncias nos resultados obtidos para a avaliação das massas de 20, 25 e 30 mg.¹¹⁹

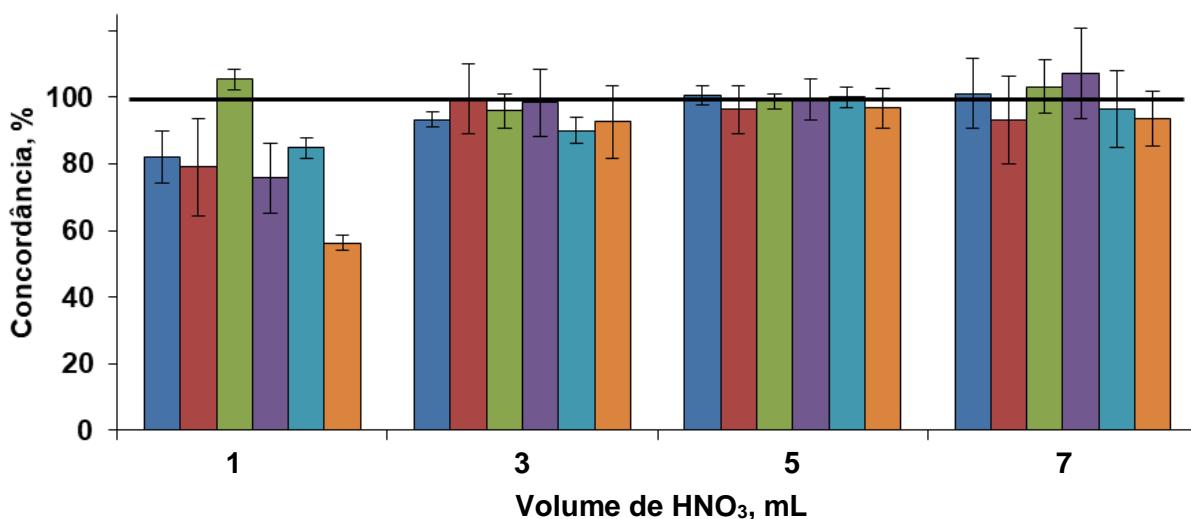
Uma forma de contornar isso seria inserir uma quantidade maior de oxigênio no frasco, pressurizando o sistema. Porém, o sistema trabalha sob pressão atmosférica, impossibilitando o aumento da quantidade de oxigênio dentro do frasco. Neste sentido, devido a impossibilidade de aumentar a quantidade de oxigênio dentro do frasco, diminuiu-se a massa de amostra utilizada. Além da necessidade de se ter uma

combustão mais efetiva, os desvios padrão auxiliaram também para selecionar assim a menor massa avaliada (10 mg). Com isso, após selecionar a concentração de solução absorvedora ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e a massa de amostra (10 mg), foi avaliada a variável volume de solução absorvedora. Cabe salientar que as próximas avaliações descritas foram feitas pela primeira vez no método da MIC-DV para amostras sólidas. No primeiro trabalho foram avaliadas, apenas, a concentração de solução absorvedora e a massa de amostra.

4.2.4 Avaliação do volume de solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V

Após a escolha da massa de amostra (10 mg), o próximo experimento avaliado foi a variação do volume de solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS. Os volumes avaliados foram de 1, 3, 5 e 7 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 9. Para os cálculos de concordância foram utilizados os valores obtidos pelo método MAWD. Cabe salientar que, para os elementos Cd, Cu e Pb, os valores obtidos na etapa de quantificação estavam abaixo ao LQ do método.

Figura 9. Avaliação do volume de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 10 mg de massa de amostra e $n = 5$. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.



Esse teste teve como objetivo verificar a possibilidade de alteração do volume de solução absorvedora utilizada no método. Havendo a possibilidade de diminuição do volume de solução, ocasionaria uma melhora no LQ do método, podendo auxiliar na determinação de elementos em menor concentração nas amostras, bem como, ter uma disponibilidade maior de oxigênio dentro do frasco devido ao aumento do espaço que possa ser ocupado por gases. Por outro lado, utilizando volumes maiores de solução absorvedora, poderia auxiliar na recuperação dos analitos, pois haveria a disponibilidade de mais solução para a absorção dos analitos. É possível visualizar na Figura 9, que usando 1 mL de solução absorvedora obteve-se concordância satisfatória apenas para Hg, sendo que para os demais elementos a concordância foi inferior a 85%. O fator que pode ter contribuído para esses resultados com baixa concordância, foi a pouca quantidade de solução absorvedora, prejudicando a absorção dos analitos após a queima. Para a avaliação contendo o volume de 3 mL de solução absorvedora, elementos como Hg, Cr e Mn obtiveram concordância superior a 93%. É possível observar, também, que para os elementos As, Se e V houve uma melhora nos resultados (concordância de 93, 90 e 93%, respectivamente), quando comparados com

a avaliação utilizando 1 mL de solução absorvedora. Isso, provavelmente, deve-se ao fato de haver uma quantidade de solução maior que o teste anterior.

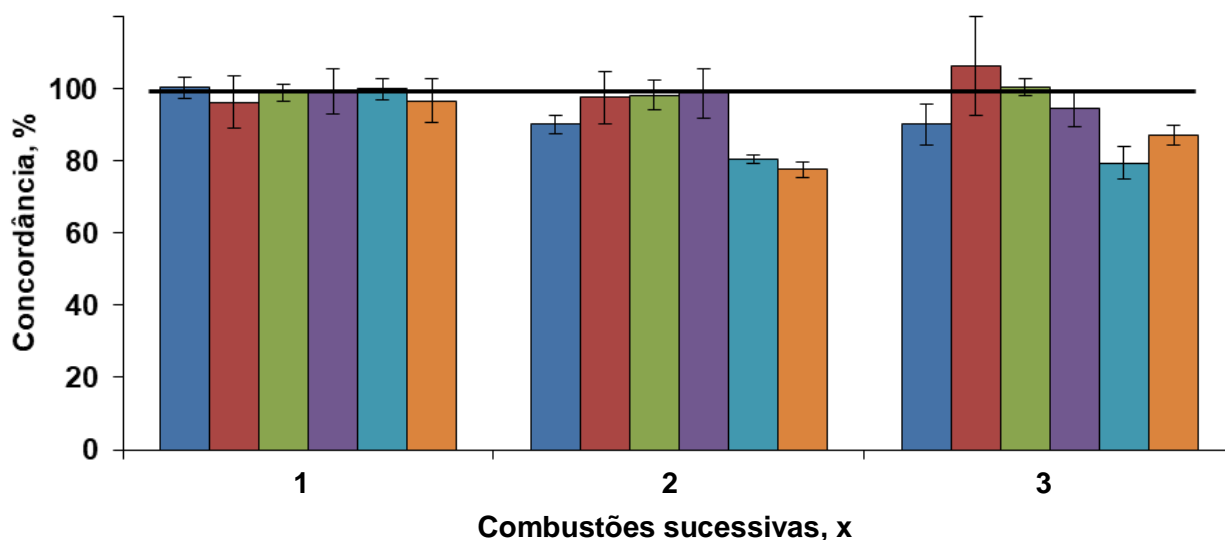
Entretanto, quando empregados 7 mL de solução absorvedora, os valores obtidos foram similares aos resultados do teste com 5 mL de solução. Contudo, quando foram avaliados os desvios padrão dos resultados obtidos entre os dois testes (5 e 7 mL de solução absorvedora), no teste com 7 mL os desvios padrão para todos os analitos, de modo geral, foram maiores que os obtidos com 5 mL de solução absorvedora. Isso, provavelmente, deve-se a dois fatores, o primeiro é a disponibilidade de oxigênio no frasco. Como evidenciado na avaliação da massa de amostra, a disponibilidade de oxigênio influencia, diretamente, na recuperação dos analitos. O teste com maior volume de solução absorvedora (7 mL), proporciona uma diminuição do volume disponível para ocupação de gases no interior do frasco, diminuindo a quantidade de oxigênio disponível no frasco para a combustão. O segundo fator é a distância entre a base do suporte e a solução absorvedora. Este fator também pode influenciar na recuperação dos analitos pois, quanto mais próxima a solução absorvedora estiver da base do suporte (onde ocorre a queima da amostra), o calor liberado durante a combustão pode ser transferido mais rapidamente para a solução, assim, a solução absorvedora evapora com mais facilidade prejudicando a eficiência de queima, podendo até extinguir a combustão.

Devido ao problema mencionado acima, volumes superiores a 7 mL de solução absorvedora não foram testados neste trabalho. Também, outro fator que impediu a avaliação de um volume maior de solução absorvedora foi a altura da parte inferior do rotor metálico usado no método, o qual tem a função de proteger a solução absorvedora do contato com a radiação micro-ondas. Esta proteção é importante, pois caso a micro-ondas interaja com a solução, esta poderá evaporar, umedecendo assim o papel e amostra, impossibilitando a ignição de ambos. Portanto, o volume mais adequado a ser utilizado, de acordo com as características dos suportes e rotor metálico usado no método, foram os volumes de 5 mL de solução absorvedora.

4.2.5 Avaliação de combustões sucessivas para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V

Após a avaliação do volume de solução absorvedora, o próximo experimento avaliado foi o número de combustões sucessivas realizadas com a mesma solução absorvedora para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS, sendo avaliadas 2 e 3 ciclos sucessivos de combustão. O procedimento desta avaliação consiste em, após as combustões, retirar o suporte de dentro do frasco, secá-lo com ar-comprimido e iniciar um novo procedimento para a próxima queima de amostra, sem trocar ou alterar a solução absorvedora do frasco, e mantendo os mesmos suportes para os mesmos frascos. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 10.

Figura 10. Avaliação de combustões sucessivas para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ como solução absorvedora, 10 mg de massa de amostra e n = 5. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.



Nesta avaliação de combustões sucessivas utilizando a mesma solução absorvedora (Figura 10) é possível observar que, na condição de duas combustões

sucessivas, apenas os elementos Cr, Hg e Mn obtiveram concordâncias de 98, 98 e 99%, respectivamente. Todos os outros elementos ficaram abaixo de 90% de concordância com o método de referência (MAWD). Para a avaliação com três combustões sucessivas, os dados obtidos se assemelham aos de duas queimas, exceto para Mn, o qual teve uma piora nos resultados. Entretanto, quando esse valor foi comparado com o valor obtido pelo método de referência (MAWD), não foi observado diferença significativa entre eles (teste *t-Student*, com 95% de confiança), podendo ser considerada uma variação normal do método.

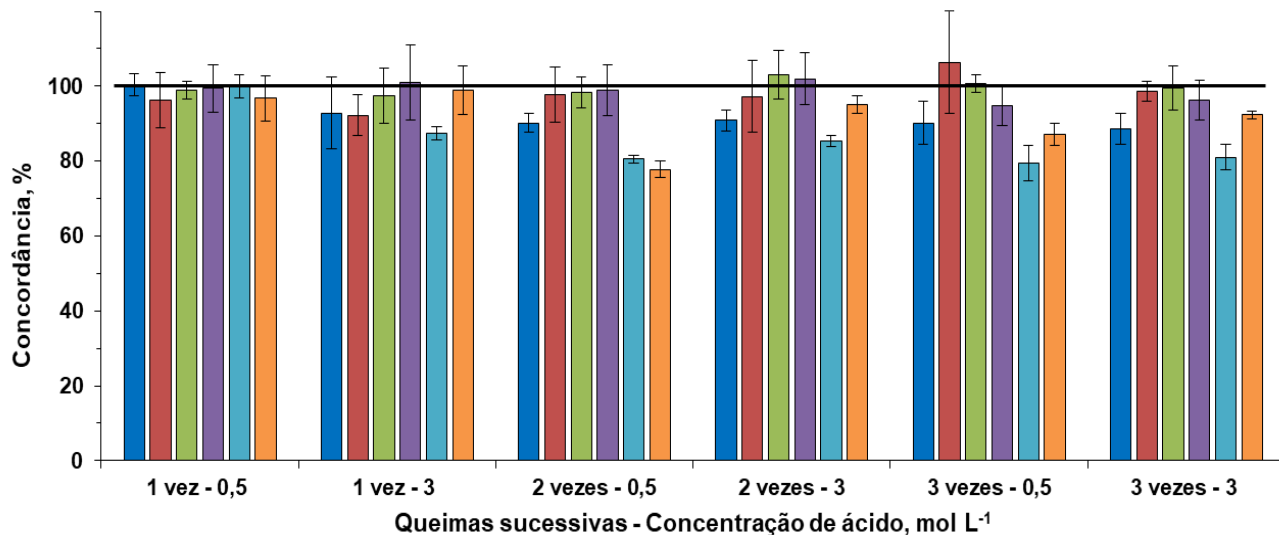
Para os demais elementos, As, Se e V, que não obtiveram uma concordância satisfatória quando comparado com o método de referência, há algumas possíveis justificativas para esses resultados. Uma delas seria a concentração diluída do HNO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) usado como solução absorvedora. Tal concentração poderia ser insuficiente para absorver todos os analitos após as combustões sucessivas. Outra possibilidade é a presença de muitos íons em solução, proveniente da decomposição da amostra, tal fato, poderia estar saturando o meio e dificultando a absorção desses elementos pela solução absorvedora. De modo a tentar elucidar esse raciocínio, foi feita novamente a avaliação do número de combustões sucessivas, porém, usando uma solução absorvedora com concentração maior de ácido (HNO_3 3 mol L^{-1}). Cabe mencionar que os elementos Cd, Cu e Pb estavam abaixo do LQ do método.

A concentração da solução absorvedora foi escolhida de acordo com os resultados obtidos na avaliação da concentração dessa solução (Figura 6), sendo o HNO_3 3 mol L^{-1} a solução com concentração mais elevada a ser utilizada que não apresentou valores de brancos elevados que afetassem a recuperação dos analitos. Desta forma, o mesmo procedimento da avaliação anterior foi adotado para a avaliação com HNO_3 3 mol L^{-1} como solução absorvedora. Para facilitar a comparação, os resultados estão mostrados na Figura 11, juntamente com os resultados da avaliação anterior (Figura 10).

Observando a Figura 11, de uma forma geral, os valores foram similares entre as avaliações feitas. Para os resultados usando uma queima, apenas o Se apresentou um resultado com diferença significativa (teste *t-Student*) entre as duas concentrações de solução absorvedora avaliada ($0,5$ e 3 mol L^{-1}). Porém, quando avaliados os desvios

padrão dos resultados obtidos da avaliação com HNO_3 3 mol L^{-1} , estes foram relativamente elevados se comparados com os obtidos na concentração de HNO_3 0,5 mol L^{-1} . Isso, provavelmente, é o reflexo da influência de uma concentração mais elevada de ácido nos valores de branco, como já discutido na Seção 4.2.2.

Figura 11. Avaliação de combustões sucessivas para a determinação de As(■), Cr(■), Mn(■), Se(■) e V(■) por ICP-MS e Hg(■) por FI-CVG-ICP-MS após decomposição por MIC-DV. Condição: 10 mg de massa de amostra e $n = 5$. Linha contínua (-) representa o valor de referência do método MAWD para cada analito.



Quando as combustões sucessivas de duas vezes foram avaliadas, os resultados se mostraram similares entre as concentrações de HNO_3 0,5 e 3 mol L^{-1} como solução absorvedora. Apenas os valores obtidos para V apresentaram diferença significativa ao ser aplicado o teste *t-Student* entre as avaliações com diferentes concentrações de solução absorvedora. Na avaliação usando HNO_3 3 mol L^{-1} , a concordância com o método de referência obtida para V foi de 95%, não apresentando diferença significativa quando aplicado o teste *t-Student*. Por outro lado, usando a concentração de HNO_3 0,5 mol L^{-1} , a concordância para V com o método de referência foi de apenas 77%. Com isso, usando a concentração de 3 mol L^{-1} e duas combustões sucessivas, foi possível quantificar 4 elementos com concordâncias satisfatórias quando

comparado com o método de referência, sendo Cr, Hg, Mn e V. Para a condição usando HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução absorvedora, apenas os elementos Cr, Hg e Mn apresentaram valores sem diferença significativa quando comparados com os valores do método de referência (MAWD).

Avaliando os resultados obtidos para três combustões sucessivas, foi possível verificar que, usando as concentrações de HNO_3 $0,5$ e 3 mol L^{-1} como solução absorvedora, os valores obtidos para V foram similares entre as duas concentrações. Novamente, apenas o V obteve uma leve melhora na concordância (92%) usando HNO_3 3 mol L^{-1} como solução absorvedora. Apesar desse pequeno aumento na concordância para V, ao se aplicar o teste estatístico *t-Student* entre as condições de HNO_3 $0,5$ e 3 mol L^{-1} , os valores não apresentaram diferença significativa entre eles. Com isso, da mesma forma que na avaliação anterior (2 combustões sucessivas), quando foi utilizado HNO_3 3 mol L^{-1} como solução absorvedora, apenas quatro elementos (Cr, Hg, Mn e V) obtiveram resultados iguais estatisticamente com o método de comparação.

Como mencionado anteriormente, esta avaliação teve como objetivo verificar a influência da concentração de HNO_3 como solução absorvedora utilizando combustões sucessivas no método da MIC-DV. Porém, ao final da avaliação, foi verificado que com o aumento da concentração de HNO_3 de $0,5$ para 3 mol L^{-1} , os elementos As, Se e V obtiveram resultados com diferença significativa quando comparado com o método de referência, indicando que o problema não é apenas a baixa concentração da solução absorvedora ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

De forma a tentar elucidar tal comportamento, foi medido o pH das soluções absorvedoras após as combustões sucessivas. Esta análise foi feita de modo a verificar se, por usar soluções diluídas, o pH após as queimas se alteravam, justificando assim, o motivo de não recuperar todos os analitos avaliados nesse trabalho. Entretanto, o pH das soluções se manteve constante, sendo determinado o pH de 1 para todas as soluções em todas as avaliações de combustões sucessivas. Com isso, possivelmente, a carga iônica presente na solução, após decomposição da amostra, seja um dos fatores que prejudique a recuperação dos elementos quando utilizado o método de combustões sucessivas na MIC-DV.

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DA MIC-DV EM TECIDO DE PEIXE PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se E V

Em posse dos resultados das avaliações feitas para a decomposição de tecido de peixe por MIC-DV e posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V, foram selecionadas, como condições ótimas para a decomposição, 10 mg de massa de amostra, 5 mL de HNO₃ na concentração de 0,5 mol L⁻¹ como solução absorvedora e apenas uma queima por solução absorvedora. Após selecionadas essas condições, o método foi aplicado para 5 amostras de peixes e 1 CRM (Dolt 4) e os resultados estão mostrados na Tabela 4. O CRM utilizado no trabalho foi decomposto apenas pelos métodos da MIC e MIC-DV.

Como pode ser observado na Tabela 4, todos os analitos que foram possíveis de determinar nos digeridos da MIC-DV para todas as amostras e CRM, não apresentaram diferença significativa (ANOVA) quando comparados com os outros métodos de referência (MAWD e MIC). Para Cu, em todas as amostras utilizadas neste trabalho, os valores determinados nos digeridos da MIC-DV ficaram abaixo do LQ do método. Considerando a concentração de Cu no CRM, foi possível quantificar este elemento nas soluções de decomposição por MIC-DV, entretanto o valor determinado não foi concordante com o valor certificado do CRM. Ainda sobre o Cu, outro ponto a ser destacado sobre a determinação deste elemento é que, observando a amostra A (Tabela 4), a concentração de Cu determinada nos digeridos dos métodos de MAWD e MIC foram superiores ao valor do LQ do método da MIC-DV. Contudo, os valores determinados nos digeridos da amostra A pela MIC-DV ficaram abaixo do LQ. Um dos motivos dessa baixa concordância para Cu, pode ser a forma complexa que este elemento se encontra no tecido de peixe, se a combustão da amostra na MIC-DV não é uma reação de combustão completa, elementos mais fortemente ligados à matriz não ficam totalmente disponíveis em solução. Apesar destes resultados com concordâncias não satisfatórias para Cu, não se pode afirmar que este elemento não possa ser determinado nos digeridos da MIC-DV, pois no primeiro trabalho de MIC-DV publicado,

este elemento apresentou concordâncias entre 93 e 108% para as amostras botânicas utilizadas.

Outro elemento que não foi possível determinar nos digeridos da MIC-DV foi o Pb, devido à baixa concentração deste elemento nas amostras e o LQ relativamente alto da MIC-DV (quando comparado aos outros métodos de referência). O comportamento do Cd foi similar ao do Pb, com as concentrações nas amostras abaixo do LQ do método. Porém, foi possível determinar Cd nos digeridos do CRM pela MIC-DV, uma vez que a concentração deste elemento no CRM estava acima do LQ. Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores certificados do CRM. Sendo assim, pode-se afirmar que Cd foi mais um elemento possível de determinar em tecido de peixe usando o método da MIC-DV. Cabe salientar que, para ambos os elementos, Cd e Pb, não foi possível a avaliação durante o desenvolvimento do método por MIC-DV, devido às concentrações estarem menores que o LQ do método.

Tabela 4. Resultados para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas 5 amostras de tecido de peixe e CRM (Dolt 4) decompostas por MAWD (n = 3), MIC (n = 3) e MIC-DV (n = 5). Os elementos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Pb, Se e V foram determinados por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS (média \pm desvio padrão).

Amostras	Métodos	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Pb	Se	V
A	MAWD	4,49 \pm 0,12	< 0,12	2,19 \pm 0,02	3,71 \pm 0,12	0,338 \pm 0,004	1,91 \pm 0,19	< 0,15	3,90 \pm 0,18	0,458 \pm 0,006
	MIC	4,51 \pm 0,17	< 0,10	1,99 \pm 0,18	3,38 \pm 0,36	0,345 \pm 0,016	1,62 \pm 0,18	< 0,2	4,09 \pm 0,20	0,416 \pm 0,042
	MIC-DV	4,51 \pm 0,13	< 0,10	2,11 \pm 0,16	< 3,2	0,334 \pm 0,008	1,90 \pm 0,12	< 0,7	3,90 \pm 0,12	0,443 \pm 0,028
B	MAWD	0,295 \pm 0,042	< 0,12	0,792 \pm 0,112	0,678 \pm 0,045	1,07 \pm 0,01	0,615 \pm 0,031	< 0,15	0,797 \pm 0,058	0,107 \pm 0,018
	MIC	0,304 \pm 0,042	< 0,10	0,896 \pm 0,057	0,729 \pm 0,050	1,09 \pm 0,01	0,642 \pm 0,106	< 0,2	0,785 \pm 0,022	0,140 \pm 0,016
	MIC-DV	0,286 \pm 0,013	< 0,10	0,800 \pm 0,058	< 3,2	1,08 \pm 0,05	0,639 \pm 0,072	< 0,7	0,792 \pm 0,070	0,127 \pm 0,018
C	MAWD	4,55 \pm 0,14	< 0,12	0,310 \pm 0,013	1,35 \pm 0,27	2,73 \pm 0,19	0,263 \pm 0,019	< 0,15	5,49 \pm 0,23	< 0,05
	MIC	4,58 \pm 0,09	< 0,10	0,322 \pm 0,017	1,39 \pm 0,09	2,69 \pm 0,15	0,222 \pm 0,025	< 0,2	5,43 \pm 0,21	0,038 \pm 0,002
	MIC-DV	4,55 \pm 0,05	< 0,10	< 0,5	< 3,2	2,51 \pm 0,16	0,242 \pm 0,020	< 0,7	5,14 \pm 0,21	0,035 \pm 0,004
D	MAWD	4,63 \pm 0,10	< 0,12	0,342 \pm 0,040	1,19 \pm 0,09	2,42 \pm 0,07	0,289 \pm 0,024	< 0,15	5,34 \pm 0,18	< 0,05
	MIC	4,85 \pm 0,21	< 0,10	0,385 \pm 0,072	1,43 \pm 0,26	2,68 \pm 0,17	0,253 \pm 0,054	< 0,2	5,37 \pm 0,25	0,042 \pm 0,009
	MIC-DV	4,74 \pm 0,09	< 0,10	< 0,5	< 3,2	2,52 \pm 0,14	0,293 \pm 0,019	< 0,7	5,35 \pm 0,22	0,045 \pm 0,003
E	MAWD	0,189 \pm 0,051	< 0,12	0,637 \pm 0,051	0,900 \pm 0,061	1,69 \pm 0,09	1,82 \pm 0,19	< 0,15	1,43 \pm 0,02	< 0,05
	MIC	0,142 \pm 0,011	< 0,10	0,648 \pm 0,025	0,833 \pm 0,023	1,84 \pm 0,10	1,91 \pm 0,09	< 0,2	1,52 \pm 0,07	0,052 \pm 0,004
	MIC-DV	0,155 \pm 0,020	< 0,10	0,628 \pm 0,031	< 3,2	1,76 \pm 0,12	1,78 \pm 0,12	< 0,7	1,41 \pm 0,06	0,049 \pm 0,002
Dolt 4	Referência	9,66 \pm 0,62	24,3 \pm 0,8	1,4	31,2 \pm 1,1	2,58 \pm 0,22	N.I.	0,16 \pm 0,04	8,3 \pm 1,3	0,6
	MIC	9,22 \pm 0,24	24,2 \pm 1,0	1,27 \pm 0,15	29,9 \pm 1,1	2,60 \pm 0,16	< 0,19	< 0,2	8,61 \pm 0,16	0,40 \pm 0,04
	MIC-DV	8,93 \pm 0,48	22,2 \pm 1,8	1,45 \pm 0,12	19,7 \pm 1,43	2,51 \pm 0,10	< 0,19	< 0,7	8,08 \pm 0,23	0,522 \pm 0,013

N.I.: Não informado

Os demais elementos, As, Cr, Hg, Mn, Se e V, determinados nos digeridos das amostras e CRM por MIC-DV, apresentaram resultados que não divergiram significativamente (ANOVA) quando comparados com os métodos de referência (MAWD e MIC). No que tange a possibilidade de quais elementos determinar pelo método da MIC-DV, o As, Cd, Cr, Hg, Mn, Se e V são os analitos que se pode afirmar serem possíveis de determinar nos digeridos de tecido de peixe da MIC-DV por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS. A determinação de Pb necessita de uma avaliação utilizando uma amostra que possua uma concentração maior que o LQ obtido para este elemento na MIC-DV.

Posteriormente, foram avaliados os LQs de todos os analitos após a decomposição por MIC-DV e quantificação por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS e comparados com os LQs dos métodos de MAWD e MIC, usados como métodos comparativos. Os valores obtidos para os LQs dos métodos de MAWD, MIC e MIC-DV para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V podem ser observados na Tabela 5.

Os valores de LQs expressos na Tabela 5 foram calculados de acordo com a fórmula $(\sigma \times 10) + \bar{x}$, onde σ é o desvio padrão obtido da medida de 10 replicatas do branco e \bar{x} é a média da medida desses brancos.

Tabela 5. Valores de LQ para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) para os métodos de MAWD, MIC e MIC-DV. Determinação de As, Cd, Cr, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e de Hg por FI-CVG-ICP-MS.

Analitos	MAWD	MIC	MIC-DV
As	0,08	0,01	0,02
Cd	0,12	0,10	0,05
Cr	0,28	0,15	0,50
Hg	0,03	0,03	0,10
Mn	0,15	0,17	0,19
Pb	0,15	0,20	0,70
Se	0,14	0,12	0,18
V	0,05	0,02	0,02

Como pode ser observado na Tabela 5, comparando os três métodos de preparo de amostra, os valores de LQ dos analitos, de maneira geral, não divergiram muito entre si. Dentre os valores mostrados na Tabela 5, cabe destacar que os LQs para As, Cd e V no método da MIC-DV são menores ou iguais aos da MAWD e MIC. Por outro lado, os valores dos LQs para Cr, Hg, Mn, Pb e Se, mesmo superiores aos dos métodos de MAWD e MIC, não foram muito discrepantes entre si. Como já mostrado e discutido anteriormente (Tabela 3), os frascos descartáveis onde são feitas as combustões, tem uma parcela de incremento nas concentrações desses elementos nos brancos.

Neste sentido, foi feito um estudo com o objetivo de melhorar o LQ para os elementos estudados neste trabalho. O experimento consistiu na “descontaminação” das paredes internas dos frascos de duas formas. A primeira foi introduzindo um volume de 50 mL (capacidade máxima do frasco) de HNO₃ 50%, aquecido a uma temperatura de 80 °C. Após, o frasco foi deixado em repouso por 24h. O segundo experimento consistiu na introdução da mesma quantidade e concentração de HNO₃ no frasco, porém, essa solução foi introduzida no frasco a temperatura ambiente e o frasco contendo a solução foi colocado na cavidade do forno de micro-ondas (utilizado para o desenvolvimento deste trabalho) e irradiados por cerca de 60 s, até a solução chegar a 80 °C. Neste segundo experimento, o tempo de contato desta solução com a parede interna do frasco foi de apenas 30 min.

Após a realização dessas duas etapas de “descontaminação” dos frascos, estes foram usados para a combustão dos brancos do método da MIC-DV e, posteriormente, os elementos foram determinados por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS. Na Tabela 6 são mostrados os LQs obtidos para o método da MIC-DV após os procedimentos de “descontaminação” dos frascos com seus respectivos valores de LQ obtidos antes deste procedimento.

Tabela 6. Valores de LQ para As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Se e V ($\mu\text{g g}^{-1}$) depois de diferentes processos de descontaminação. Determinação de As, Cd, Cr, Mn, Pb, Se e V por ICP-MS e de Hg por FI-CVG-ICP-MS.

Analitos	Frasco 1*	Frasco 2**	Frasco 3***
As	0,02	0,22	0,09
Cd	0,05	0,48	0,44
Cr	0,50	0,75	0,70
Hg	0,10	0,13	0,11
Mn	0,19	1,30	1,10
Pb	0,7	2,5	2,00
Se	0,18	0,49	0,39
V	0,02	0,06	0,03

*Frasco novo, sem nenhum processo de descontaminação;

**Frasco novo, descontaminado com HNO_3 50%, aquecido a 80 °C (aquecimento convencional) e tempo de contato com a parede interna de 24h;

***Frasco novo, descontaminado com HNO_3 50%, aquecido a 80 °C (aquecimento micro-ondas) e tempo de contato com a parede interna de 30min.

Como pode ser visto na Tabela 6, o objetivo do experimento em diminuir os valores dos LQs dos analitos não foi alcançado. Para os dois experimentos onde os frascos foram “descontaminados” (Frasco 2 e 3), todos os analitos apresentaram valores calculados de LQ superiores aos LQs que usaram frascos sem tratamento com HNO_3 (Frasco 1). Desta forma, aliando os resultados das Tabelas 3 e 6, os frascos usados no método da MIC-DV são fontes de incremento nos valores dos brancos, em virtude de uma contaminação oriunda do próprio material que são confeccionados os frascos ou durante o processo de fabricação dos mesmos.

Como já mencionado, os LQs do método da MIC-DV foram similares aos dos métodos comparativos, entretanto, há uma discussão a ser feita quanto a viabilidade do método para a quantificação de contaminantes inorgânicos em tecido de peixe. No Brasil há uma normativa do MERCOSUL⁹ que estabelece os limites máximos para As ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Cd ($0,05 \mu\text{g g}^{-1}$), Hg ($0,50 \mu\text{g g}^{-1}$) e Pb ($0,30 \mu\text{g g}^{-1}$) em tecido de peixes cru, congelados ou refrigerados. O método proposto neste trabalho apresentou LQs inferiores ou iguais aos limites máximos previstos pela normativa do MERCOSUL para os elementos As, Cd e Hg. Contudo, o Pb obteve LQ superior ao previsto pela

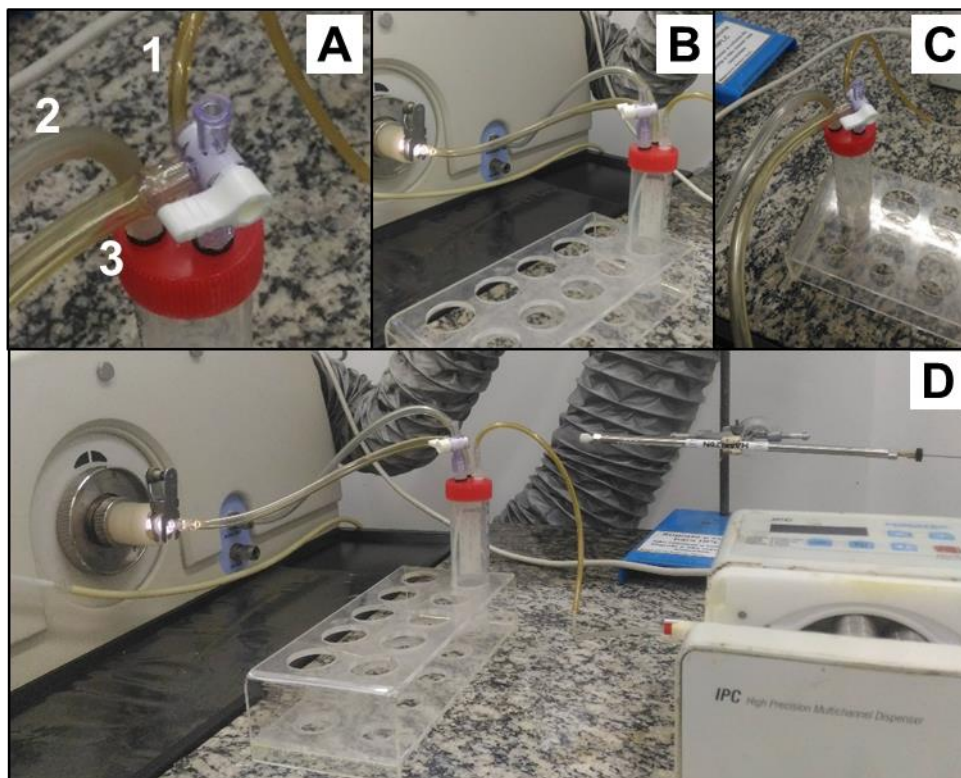
normativa, porém, há um ponto a ser considerado. A normativa menciona que os limites máximos permitidos são para amostras de peixes cru, congelados e refrigerados. Todavia, neste trabalho, o método proposto foi avaliado usando amostras liofilizadas o que faz com que o analito seja pré-concentrado na amostra se comparado a amostra *in natura*. Isso é importante mencionar, pois tecidos de peixe tem, em média, um percentual que pode variar entre 60 e 70% de água em sua composição. Portanto, como o método prevê o uso de 10 mg de amostra seca, pode-se converter o resultado para amostra úmida, assim esse valor seria equivalente a 25 mg de amostra *in natura*. Desta forma, ao refazer o cálculo de LQ considerando essa nova massa, o mesmo seria alterado de $0,70 \mu\text{g g}^{-1}$ para $0,28 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo inferior ao limite máximo para Pb, segundo a normativa. Com isso, há espaço para o método ser avaliado em amostras *in natura*, além da avaliação utilizando uma amostra com concentração de Pb acima do LQ do método atual (como já mencionado). Cabe ressaltar, que não foi avaliada a influência da água na amostra, uma vez que para todo o trabalho as amostras e CRM estavam secas.

Outras vantagens da MIC-DV frente aos outros métodos são o seu baixo custo, segurança para o operador, uso de soluções diluídas e, principalmente, a possibilidade de ser um método ser portátil e ter elevada frequência analítica. Em um teste realizado durante a execução deste trabalho, avaliou-se a quantidade de amostras que poderiam ser decompostas e levadas à etapa de quantificação, e o resultado foi surpreendente, foi possível digerir 7 amostras em quintuplicata (35 frascos) em apenas uma hora. Cabe salientar que a MIC-DV não necessita de etapas de descontaminação, como é o caso da MIC e MAWD, apenas uma lavagem dos suportes com água, uma vez que os frascos são descartáveis. Quanto à possibilidade de ser um método portátil, o operador necessita da presença de uma micro balança analítica, uma prensa manual, um pequeno cilindro de O_2 , todos os reagentes a disposição e um micro-ondas doméstico ao seu alcance.

4.4 AVALIAÇÃO DE SISTEMA DE CVG POR BATELADA EM FRASCO ÚNICO PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR ICP-MS

Após o método da MIC-DV ser aplicável para a decomposição de tecido de peixe e posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V, o trabalho teve um enfoque na determinação exclusiva de Hg. Como mencionado na seção 2.4.9, a MIC-DV foi desenvolvida seguindo alguns dos princípios do método de frasco único. Neste sentido, foi proposto uma modificação na técnica FI-CVG-ICP-MS no que tange o acoplamento da CVG e FIA. O objetivo desta modificação foi para que a MIC-DV fosse enquadrada em mais princípios do método de frasco único. Desta forma, o separador gás/líquido, comutador e a confluência foram substituídos por uma tampa de polietileno de alta densidade comercial (própria tampa do frasco descartável) com três orifícios, como pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12. Imagens do sistema DV-CVG-ICP-MS. A) imagem da tampa com a indicação dos respectivos orifícios para introdução de NaBH_4 (1), gás de arraste (2) e orifício carreador da fase gasosa (3) até o plasma. As figuras B, C e D são imagens de diferentes ângulos do sistema DV-CVG-ICP-MS.



O orifício 1 é utilizado para a introdução de NaBH_4 , o orifício 2 para introdução do gás de arraste/nebulização (argônio) e o orifício 3 para carrear a fase gasosa com o auxílio do gás de arraste/nebulização até o equipamento de ICP-MS e posterior determinação do analito. Como o gás de nebulização do equipamento foi o mesmo usado como gás de arraste do vapor contendo o Hg, uma válvula de três vias precisou ser instalada junto a tampa. Isso se fez necessário, pois, ao abrir o frasco sem fechar o orifício que levava o gás de arraste/nebulização até o plasma, o mesmo se extinguia. Sem esta válvula de três vias a modificação se tornaria inviável, pois todas as vezes que o frasco com amostra fosse substituído para quantificar outra replicata, o plasma do equipamento se extinguiria. Ao adicionar a válvula de três vias, isto não mais ocorria, pois era possível fechar o canal que levava o gás de arraste/nebulização até o equipamento, mantendo assim, o plasma ligado. Com essa modificação, o próprio

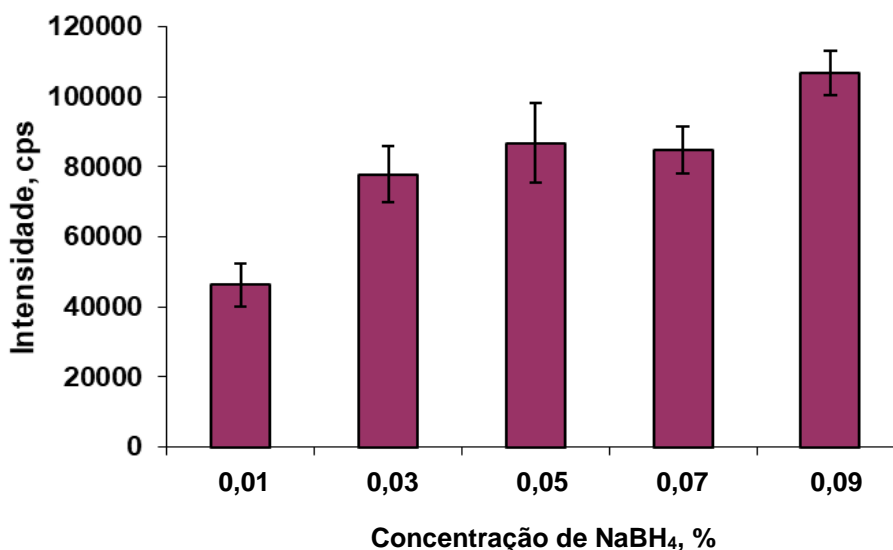
frasco contendo a solução com o analito torna-se o separador gás/líquido e o único trabalho a ser feito seria o de rosquear o frasco com amostra na tampa modificada. Com essa modificação o sistema de determinação deixaria de ser um sistema em fluxo e se tornaria um sistema em batelada.

4.4.1 Avaliação da concentração de NaBH₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS

A sensibilidade da técnica de geração química de vapor em frascos descartáveis acoplado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (DV-CVG-ICP-MS) para a determinação de Hg dependerá, principalmente, de duas variáveis, *i*) a quantidade de Hg gerado na forma de vapor (Hg⁰) e carregado até o plasma e *ii*) o quanto de energia o plasma do equipamento terá para ionizar o elemento e conduzi-lo até o detector. A concentração de NaBH₄ será um dos parâmetros mais importantes, pois, como já mencionado anteriormente, a reação da geração de Hg no estado vapor tem como reagente limitante a concentração de H₂ gerado no meio reacional, sendo o NaBH₄ o reagente responsável pelo fornecimento de hidrogênio para a formação de H₂. Neste sentido, após a modificação da tampa para o sistema de DV-CVG em batelada, o primeiro parâmetro a ser avaliado foi a concentração de NaBH₄.

As concentrações de NaBH₄ avaliadas nesse primeiro experimento foram 0,01, 0,03, 0,05, 0,07 e 0,09%, todas contendo 1% de NaOH para estabilização do reagente. As condições fixas para a avaliação foram 5 mL de solução de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ dentro do frasco descartável, volume total injetado de NaBH₄ de 0,8 mL em um tempo de 10 s e vazão do gás de arraste (argônio) de 1,04 L min⁻¹. A concentração de Hg utilizada para esta avaliação foi de 0,05 µg L⁻¹. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 13.

Figura 13. Avaliação da concentração de NaBH₄ para a determinação de Hg por CVG-ICP-MS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ com 0,05 µg L⁻¹ de Hg e vazão do gás de arraste de 1,04 L min⁻¹, n = 5.

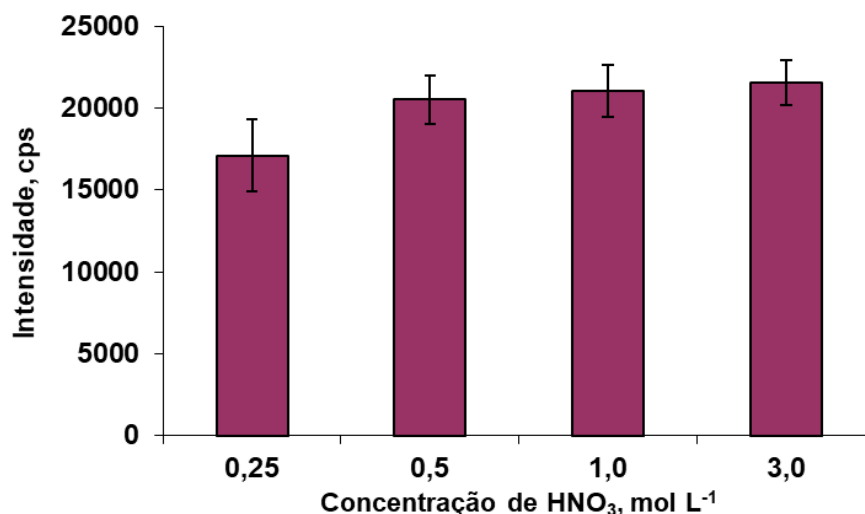


Como pode ser observado na Figura 13, a concentração de NaBH₄ 0,01% avaliada foi a condição onde obteve-se a menor intensidade para Hg. Já para as concentrações de 0,03, 0,05 e 0,07% os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa (ANOVA) quando comparados entre si. A concentração com o melhor resultado para este experimento foi a de NaBH₄ 0,09% em 1% de NaOH. Esse resultado já era esperado, uma vez que, quanto maior é a concentração de NaBH₄, maior é o fornecimento de hidrogênio para que a reação de geração de Hg no estado atômico aconteça. Um dado importante a ser mencionado é que a intensidade do branco aumentava conforme aumentava a concentração de NaBH₄. Isso ocorre pelo sistema ser em batelada e não ser possível introduzir H₂ no plasma durante todo o tempo de análise, fato esse que altera a energia do plasma, aumentando assim, o ruído do equipamento no momento da leitura. Desta forma, optou-se por não usar concentrações maiores que 0,09% de NaBH₄ no sistema. Assim, a concentração de NaBH₄ selecionada foi 0,09%.

4.4.2 Avaliação da concentração de HNO₃ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS

Após a avaliação das concentrações de NaBH₄, o próximo parâmetro avaliado foi a concentração de HNO₃, pelo fato de ser outro importante reagente na reação de formação do Hg⁰. As concentrações de HNO₃ avaliadas foram de 0,25, 0,5, 1,0 e 3,0 mol L⁻¹. Essas concentrações foram selecionadas por terem sido avaliadas como solução absorvedora nos experimentos do método da MIC-DV, e todas terem apresentado resultados de concordância satisfatórios para Hg. Deste modo, a escolha de qualquer uma dessas soluções não implicaria na necessidade de uma alteração ou de nova avaliação do método da MIC-DV para Hg. As condições fixadas para esta avaliação foram: volume de 5 mL de HNO₃, volume total injetado de NaBH₄ 0,09% em 1% de NaOH de 0,8 mL ao longo de 10s e vazão do gás de arraste de 1,04 L min⁻¹. A concentração de Hg para a avaliação foi de 0,05 µg L⁻¹. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 14.

Figura 14. Avaliação da concentração de HNO_3 em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO_3 com $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg como solução, 0,8 mL de NaBH_4 0,09% em 1% de NaOH e vazão para o gás de arraste de $1,04 \text{ L min}^{-1}$, $n = 5$.



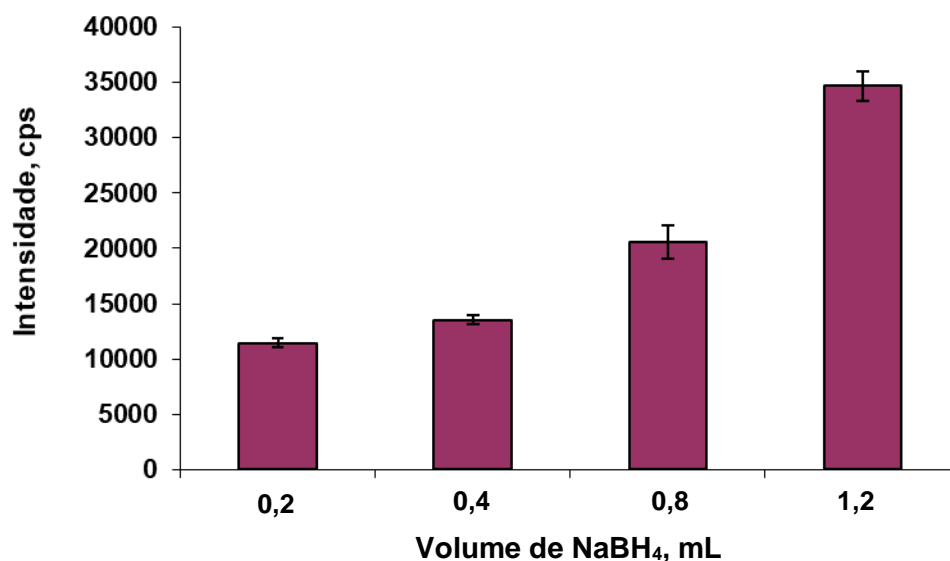
Como pode ser visualizado na Figura 14, a concentração de HNO_3 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou intensidade para Hg inferior as outras concentrações avaliadas ($0,5$, $1,0$ e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Tal resultado pode ser justificado pelo fato da reação de decomposição do NaBH_4 acontecer em meio ácido. Assim, quanto maior a concentração ácida do meio reacional, maior a quantidade de H_2 formado. Na comparação dos resultados das concentrações de $0,5$, $1,0$ e $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ avaliadas, não foi observada diferença significativa (ANOVA, com 95 % de confiança) entre elas, podendo ser utilizado qualquer uma dessas concentrações. Considerando a solução de HNO_3 de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, mesmo que o resultado para esta condição tenha sido inferior às demais, ainda é possível utilizar esta condição caso seja necessário. Como o método da MIC-DV foi otimizado usando a condição de HNO_3 de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e o objetivo desta modificação é a implementação do princípio de frasco único, optou-se em selecionar esta condição para seguir as avaliações.

4.4.3 Avaliação do volume introduzido de NaBH₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por ICP-MS

Após a avaliação das concentrações de HNO₃, o próximo parâmetro avaliado foi o volume de NaBH₄ a ser injetado no sistema. A bomba peristáltica usada para a introdução do mesmo, não informa o volume injetado e sim a velocidade de rotação. Deste modo, optou-se por realizar um experimento simples, em triplicata, para mensurar qual seria o volume de NaBH₄ injetado em cada estágio de velocidade da bomba. Este experimento foi feito por gravimetria, sendo utilizado um frasco pequeno para coleta da solução injetada. Antes da coleta o frasco foi pesado e sua massa anotada, para que após a coleta da solução, sua massa fosse subtraída da massa do frasco contendo a solução de NaBH₄. Após esse desconto, a conversão de massa para volume injetado foi feita pelo cálculo da densidade do NaBH₄ (1,074 g mL⁻¹ a 20 °C).

Assim, após esse experimento foram selecionados os volumes de 0,20, 0,40, 0,80 e 1,2 mL de NaBH₄, injetados pela bomba peristáltica, sendo esses volumes correspondentes a 0,0036, 0,0072, 0,014 e 0,022% de NaBH₄, respectivamente. Cabe salientar que esses foram os volumes totais de NaBH₄ introduzidos, e este volume foi injetado ao longo de 10 s contados a partir do momento que se iniciava a leitura no equipamento. As condições fixas para esta avaliação foram volume de 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, NaBH₄ na concentração de 0,09% em NaOH 1% ao longo de 10 s e vazão do gás de arraste de 1,04 L min⁻¹. A concentração de Hg para a avaliação foi de 0,05 µg L⁻¹. Os resultados desta avaliação podem ser observados na Figura 15.

Figura 15. Avaliação do volume injetado de NaBH₄ no sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ com 0,05 µg L⁻¹ de Hg, NaBH₄ 0,09% em NaOH 1% e vazão do gás de arraste de 1,04 L min⁻¹, n = 5.



Considerando os resultados apresentados na Figura 14, como era esperado, a condição que injeta o maior volume de NaBH₄ é a que se obteve o resultado com maior intensidade do sinal. Isso deve-se ao fato de o hidrogênio ser o reagente limitante da reação e o NaBH₄ ser o reagente que fornecerá o hidrogênio ao meio, desta forma quanto mais NaBH₄ for introduzido no meio, mais hidrogênio será gerado e, conseqüentemente, maior será a quantidade Hg⁰ produzido. Importante mencionar que a condição com 1,2 mL é a condição máxima de velocidade da bomba peristáltica usada nesse trabalho. Com isso, a condição que injeta 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% foi a selecionada como condição ideal.

4.4.4 Avaliação da decomposição de tecido de peixe por MIC e MIC-DV para a posterior determinação de Hg em sistema de CVG por batelada em frasco único por ICP-MS

Após essas avaliações, as amostras e o CRM usados neste trabalho foram digeridas novamente por MIC e MIC-DV para a determinação de Hg utilizando o

sistema de CVG modificado, acoplado a técnica de ICP-MS. As condições utilizadas para a determinação foram: introdução de 1,2 mL de NaBH_4 0,09% em NaOH 1% e vazão do gás de arraste de $1,04 \text{ L min}^{-1}$. A curva de calibração foi feita na faixa de concentração de 0,05 a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg em 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Todos os pontos da curva foram determinados em triplicata. Após a calibração, a exatidão da técnica foi avaliada determinando Hg no NIST SRM 1641d, e o resultado obtido não apresentou diferença significativa quando comparado com o valor certificado. Desta forma, a determinação de Hg nos digeridos da MIC foi feita para as amostras A, B, C, D e E e, também, no CRM Dolt 4. Todos os digeridos apresentaram concordância entre 95 e 104% quando comparados com os valores obtidos pelos métodos de referência, e o valor determinado no CRM foi concordante com o certificado.

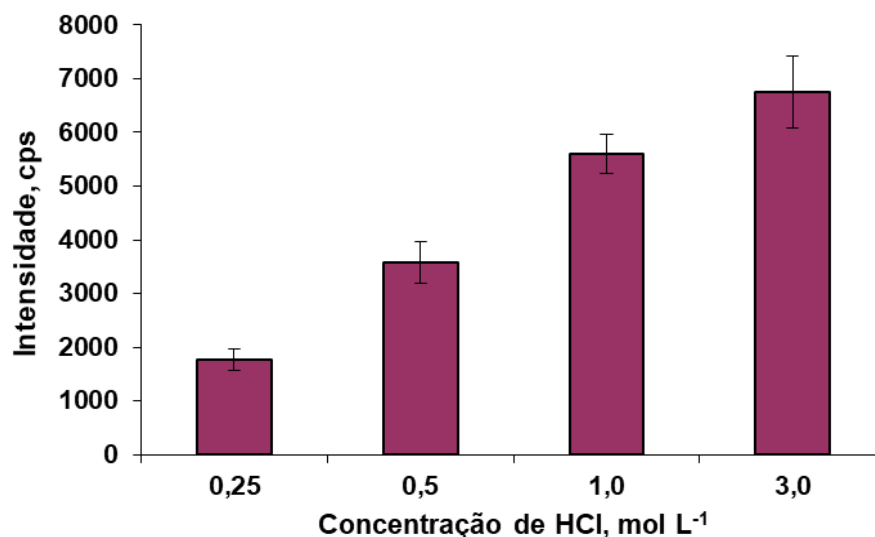
Entretanto, quando os digeridos da MIC-DV foram submetidos à determinação de Hg utilizando este sistema modificado, os valores de concordância para todas as amostras foram inferiores a 20%, quando comparados com os resultados obtidos pelos métodos de referência (MIC). Além das amostras, a quantificação de Hg nos digeridos do CRM obteve o mesmo comportamento. Desta forma, suspeitou-se que a reação de redução do Hg no frasco não estivesse acontecendo na mesma velocidade que os digeridos da MIC.

Em virtude deste resultado, e pela maioria dos trabalhos na literatura reportarem o uso de HCl para acidificar o meio reacional quando a CVG é usada para derivatização na determinação de Hg, foram feitos testes adicionando HCl em concentrações crescentes no digerido de uma das amostras. Como esperado, o sinal do analito teve acréscimo conforme aumentava a concentração de HCl. Neste sentido, foi proposta mais uma modificação na tampa usada neste sistema, sendo feito mais um orifício na mesma para a introdução do HCl no meio reacional, antes da introdução do NaBH_4 .

4.4.4.1 Avaliação da concentração de HCl para a posterior determinação de Hg por ICP-MS em sistema de CVG por batelada em frasco único

Como mencionado anteriormente, a tampa que antes possuía 3 orifícios passou a ter 4, de modo que fosse possível introduzir o HCl no frasco antes do NaBH₄, como pode ser visualizada na Figura 2 (item 3.6). Porém, como na bomba peristáltica utilizada neste trabalho não há a possibilidade de introdução individual de solução, foi necessário usar uma bomba para cada solução (HCl e NaBH₄). Para a introdução de HCl no meio reacional, o tempo de injeção e o volume injetado foram iguais a introdução do NaBH₄ (10 s e 1,2 mL). Com a modificação na tampa, o HCl foi injetado antes do NaBH₄ no meio reacional e, somente após o término da introdução do ácido, a leitura e a introdução do NaBH₄ eram iniciados. As concentrações de HCl avaliadas foram 0,25, 0,5, 1,0 e 3,0 mol L⁻¹ com introdução de 1,2 mL durante 10 s. As condições utilizadas para esta determinação foram 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, introdução de 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% em NaOH 1% de e vazão do gás de arraste de 1,04 L min⁻¹. Os resultados para esta avaliação podem ser observados na Figura 16.

Figura 16. Avaliação da concentração de HCl em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ com 0,05 µg L⁻¹ de Hg e 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% em NaOH 1%, n = 5.

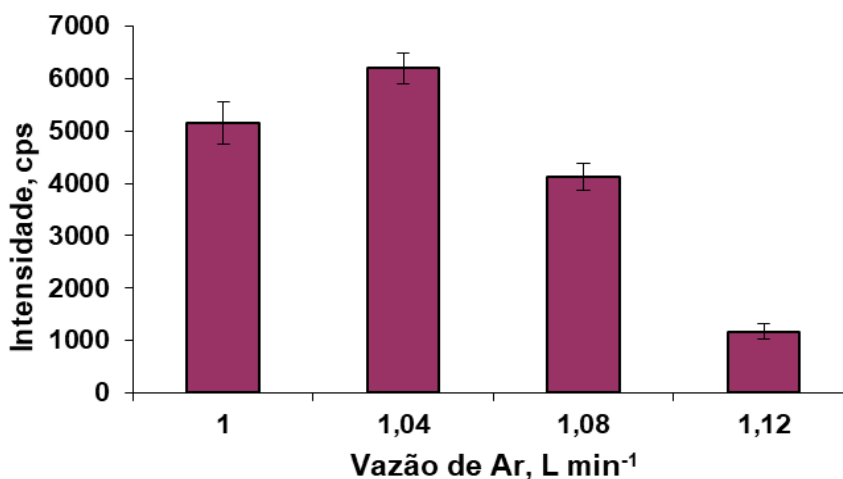


Observando a Figura 16, os resultados obtidos nesta avaliação apresentaram um comportamento já esperado, o aumento da concentração de HCl introduzido no sistema aumenta a intensidade do sinal do analito. Como já mencionado anteriormente (seção 4.3.4), esse comportamento obtido com o padrão foi visualizado, também, quando usados os digeridos de tecido de peixe por MIC-DV. Neste sentido, optou-se por selecionar a maior concentração de HCl avaliado neste experimento, de modo que essa escolha pudesse garantir a precisão e exatidão da técnica para a determinação de Hg quando tivesse um digerido com uma carga orgânica maior. Um ponto que cabe destacar é que, na MIC-DV, tem a possibilidade de usar HCl misturado com HNO_3 como solução absorvedora, descartando assim a necessidade de introdução do HCl na etapa de determinação. Porém, como já mencionado anteriormente, o trabalho teve como objetivo quantificar outros elementos como, por exemplo, o As, em que o Cl é um interferente na etapa de determinação pela técnica de ICP-MS. Ademais, considerando esses resultados, é possível afirmar que no sistema modificado é possível determinar Hg nos digeridos de tecido de peixe por MIC sem o uso de HCl. Por outro lado, essa condição não se aplicava aos digeridos do método da MIC-DV.

4.4.4.2 Avaliação da vazão do gás de arraste/nebulização para a posterior determinação de Hg em sistema de CVG por batelada em frasco único por ICP-MS

Após a avaliação da concentração de HCl a ser introduzido no meio reacional, optou-se por avaliar a vazão do gás de arraste (argônio), com o objetivo de se ter um entendimento maior sobre o comportamento desta modificação do sistema. As vazões avaliadas foram de 1,00, 1,04, 1,08 e 1,12 L min^{-1} de Ar. As condições utilizadas para a determinação foram 5 mL de HNO_3 0,5 mol L^{-1} e introdução de 1,2 mL de NaBH_4 0,09% em NaOH 1% e introdução de 1,2 mL de HCl 3 mol L^{-1} durante 10 s. Os resultados desta avaliação estão apresentados na Figura 17.

Figura 17. Avaliação da vazão do gás de arraste (argônio) em sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Condição: 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹ com 0,05 µg L⁻¹ de Hg, 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% em NaOH 1% e 1,2 mL de HCl 3 mol L⁻¹, n = 5.



Como observado na Figura 17, entre as vazões avaliadas, a vazão de Ar de 1,04 L min⁻¹ obteve a melhor resposta para o sinal do analito. Alguns fatores podem influenciar nesse aumento de sensibilidade como, por exemplo, a mudança da região da zona analítica do plasma para a captura dos íons gerados. Essa mudança da região analítica do plasma, normalmente, é ocasionada pela alteração na vazão do gás de nebulização do equipamento. Cabe destacar que o gás de nebulização é o mesmo que está sendo chamado de gás de arraste. Outro fator que também pode influenciar é a ineficiência no transporte do analito até o plasma, causado por alguma turbulência dentro do frasco ou ineficiência no transporte do analito até o equipamento. Desta forma, a vazão de Ar de 1,04 L min⁻¹ foi selecionada como a melhor condição para o sistema de CVG por batelada em frasco único para a determinação de Hg por ICP-MS. Cabe salientar, que esse valor poderá sofrer alterações de acordo com a verificação diária da sensibilidade do equipamento (*daily performance*).

Após as avaliações, as condições otimizadas do sistema foram 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, introdução de 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% em NaOH 1% e introdução de 1,2 mL de HCl 3 mol L⁻¹ durante 10 s com gás de arraste na vazão de 1,04 L min⁻¹. Na sequência, foi feita a determinação de Hg (empregando o sistema de CVG por batelada

em frasco único, com tampa de 4 orifícios) por ICP-MS nos digeridos das amostras de tecido de peixe e CRM decompostas por MIC e MIC-DV.

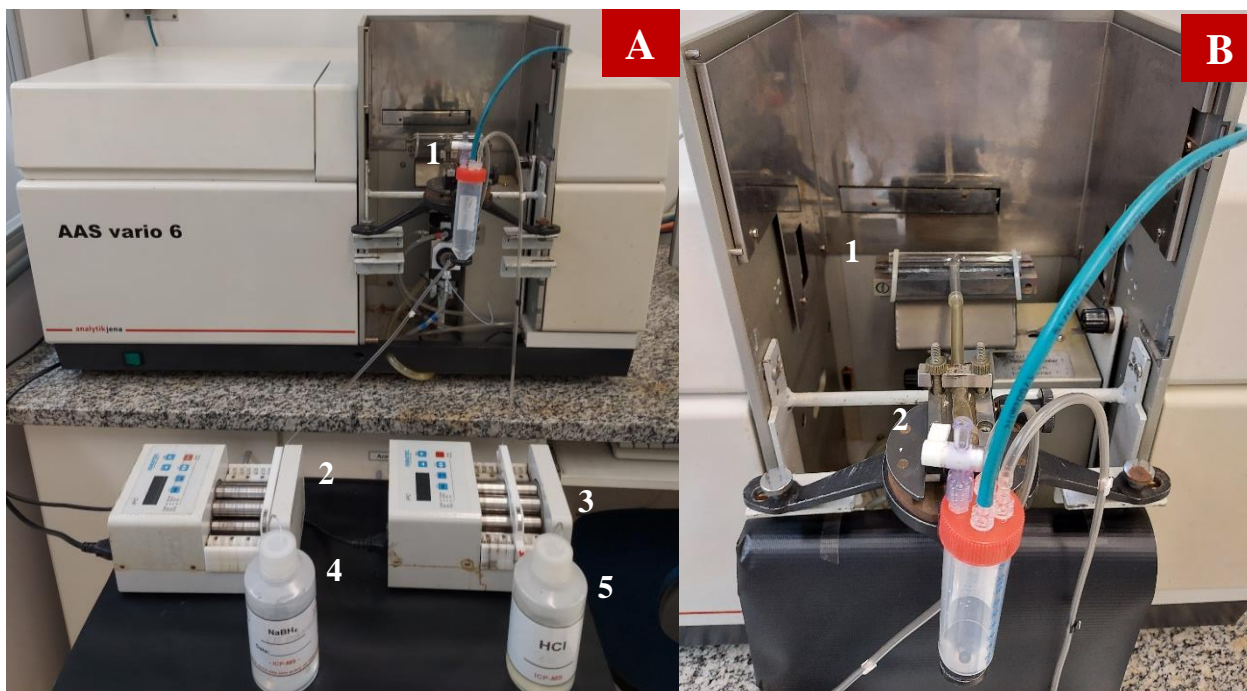
Entretanto, os resultados obtidos nessas determinações serão discutidos posteriormente em conjunto com os resultados da determinação das mesmas amostras e CRM usando o mesmo sistema da CVG acoplado a AAS.

4.5 AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE CVG POR BATELADA EM FRASCO ÚNICO PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR AAS

Após a avaliação do sistema de CVG por batelada em frasco único acoplado a técnica de ICP-MS, o mesmo sistema foi acoplado a técnica de AAS, uma técnica mais acessível financeiramente e de fácil operação. O sistema para CVG, nas condições otimizadas para a técnica de ICP-MS (5 mL de HNO_3 0,5 mol L^{-1} , introdução de 1,2 mL de NaBH_4 0,09% em NaOH 1% e introdução de 1,2 mL de HCl 3 mol L^{-1} durante 10 s e gás de arraste na vazão de 1,04 L min^{-1}), foi acoplado a técnica de AAS e avaliado com padrão de Hg^{2+} de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cabe mencionar que o sistema acoplado a AAS, fez o uso de uma cela de quartzo nas dimensões de 10,5 cm de comprimento e 9 mm de diâmetro interno, sendo posicionada em cima do queimador do equipamento, como pode ser visualizado na Figura 18.

Os resultados destes experimentos não apresentaram sinais mensuráveis, assim, novas avaliações foram necessárias. Entretanto, apenas duas avaliações foram feitas: a concentração de NaBH_4 e o tempo de HCl injetado. Essas avaliações, tiveram como foco, otimizar a reação de redução do Hg, pois, como é sabido, a técnica de AAS possui uma sensibilidade inferior quando comparado com a técnica de ICP-MS.

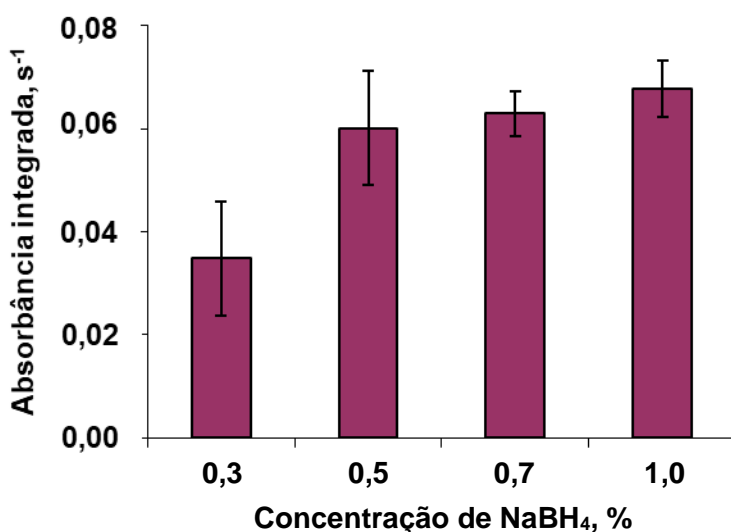
Figura 18. Imagens do sistema de DV-CVG-AAS. Figura A) item 1: Tampa modificada com 4 orifícios: três para introdução de gás de arraste, NaBH_4 , HCl e um para carregamento dos gases até cela de quartzo; item 2: bomba peristáltica para carregamento dos gases até cela de quartzo; item 3: bomba peristáltica para introdução de NaBH_4 e item 4: bomba peristáltica para introdução de HCl . Figura B) item 1: cela de quartzo; item 2: tampa modificada com um frasco descartável contendo 5 mL de digerido.



4.5.1 Avaliação da concentração de NaBH_4 em sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por AAS

Considerando a concentração de NaBH_4 a ser usada para a reação de redução do Hg no acoplamento do sistema de CVG em batelada com a técnica de AAS, as concentrações avaliadas foram 0,3, 0,5, 0,7 e 1,0%, todas em NaOH 1% para a estabilidade do reagente. O uso de concentrações mais elevadas de NaBH_4 no sistema acoplado a AAS, não apresentou aumento no ruído analítico do equipamento. As condições utilizadas para a determinação foram $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg em 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, introdução de 1,2 mL de HCl 3 mol L^{-1} durante 10s com gás de arraste na vazão de $1,00 \text{ L min}^{-1}$ (argônio). Os resultados obtidos para esta avaliação são mostrados na Figura 19.

Figura 19. Avaliação da concentração de NaBH_4 para a determinação de Hg por CVG-AAS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, 1,2 mL de HCl 3 mol L^{-1} e $1,00 \text{ L min}^{-1}$ de vazão para o gás de arraste, $n = 5$.



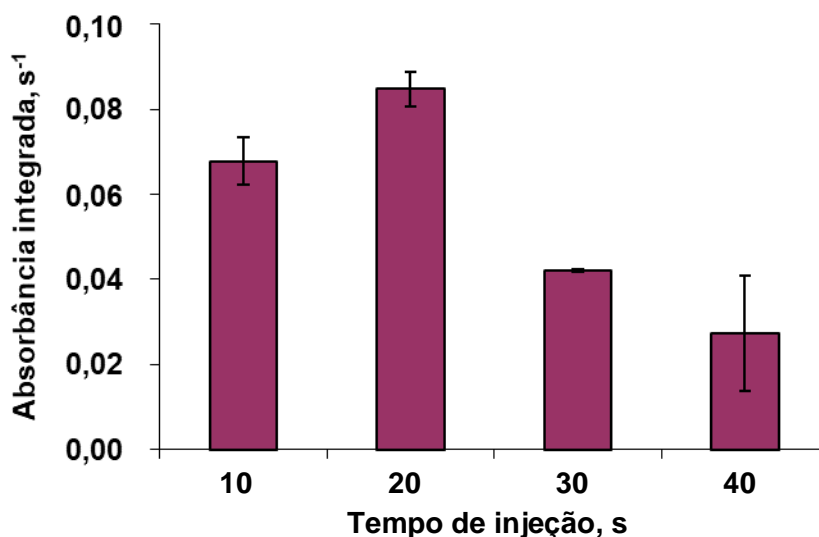
É possível visualizar no gráfico da Figura 19 o aumento da absorbância quando se utiliza o NaBH_4 mais concentrado. Esse resultado, como explicado nos tópicos anteriores, tem relação com a reação de redução do mercúrio, sendo que o NaBH_4 é o reagente que fornece o hidrogênio para o meio reacional. Com base nos resultados, a condição com NaBH_4 1,0% em NaOH 1% foi a condição selecionada para a próxima avaliação.

4.5.2 Avaliação do tempo de introdução de HCl no sistema de CVG por batelada em frasco único para posterior determinação de Hg por AAS

Com a concentração de NaBH_4 otimizada, o último parâmetro avaliado foi o tempo de injeção de HCl no meio reacional. Até o momento, o HCl era injetado no meio reacional por um tempo de 10 s. Neste experimento, foram avaliados os tempos de 10, 20, 30 e 40 s de injeção, que correspondem aos volumes de 1,2, 2,4, 3,6 e 4,8 mL, respectivamente. Contudo, as métricas de avaliação terão como critério o tempo e não

os volumes totais. As condições utilizadas para esta avaliação foram $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg em 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, introdução de 1,2 mL de NaBH_4 1,0% em NaOH 1%, introdução de HCl 3 mol L^{-1} e gás de arraste na vazão de $1,00 \text{ L min}^{-1}$. Os resultados obtidos nesta avaliação estão plotados na Figura 20.

Figura 20. Avaliação do tempo de introdução de HCl para a determinação de Hg por CVG-AAS em frasco único. Condição: 5 mL de HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, introdução de 1,2 mL de NaBH_4 1,0% em NaOH 1% e de HCl 3 mol L^{-1} e $1,00 \text{ L min}^{-1}$ de vazão para o gás de arraste, $n = 5$.



De acordo com os resultados obtidos nesta avaliação, mostrados na Figura 20, o tempo de 20 s de injeção de HCl no meio reacional foi a condição com maior sinal analítico. Quando comparado com a condição de 10 s, o tempo de 20 s de injeção, provavelmente, teve o aumento de sinal do analito devido a maior quantidade de HCl injetado no meio reacional, pois, como já mencionado anteriormente, o HCl auxilia na liberação do hidrogênio do NaBH_4 no meio reacional, favorecendo a redução do Hg. Porém, esse fato não foi observado para as condições com 30 e 40 s de injeção de HCl . Possivelmente, o que ocorre nessas duas condições, é o considerável aumento no volume da solução do meio reacional e, este aumento no volume, pode afetar negativamente a geração de Hg^0 , diluindo o analito em solução ou dificultando a reação do hidrogênio do NaBH_4 com o Hg contido no meio reacional. Com base nesses

resultados, a condição com 20 s de injeção de HCl 3 mol L⁻¹ no meio reacional foi selecionada como a condição otimizada nessa avaliação.

4.6 DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE TECIDO DE PEIXE POR MIC E MIC-DV PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg POR DV-CVG-AAS E DV-CVG-ICP-MS

Depois da otimização do sistema de CVG em frasco único, acoplado às técnicas de AAS e ICP-MS, as amostras de tecido de peixe e CRM, usadas para avaliação do método da MIC-DV neste trabalho, foram decompostas por MIC e MIC-DV para a posterior determinação de Hg por DV-CVG-AAS e DV-CVG-ICP-MS. Para a técnica de DV-CVG-AAS as condições utilizadas para a determinação foram 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, introdução de 1,2 mL de NaBH₄ 1,0% em NaOH 1% por 10 s, introdução de 2,4 mL de HCl 3 mol L⁻¹ por 20 s e gás de arraste na vazão de 1,00 L min⁻¹ (argônio). Além dessas condições reacionais, foi utilizado uma cela de quartzo de 10 cm de comprimento para o confinamento do analito. Na técnica de DV-CVG-ICP-MS as condições foram 5 mL de HNO₃ 0,5 mol L⁻¹, introdução de 1,2 mL de NaBH₄ 0,09% em NaOH 1%, introdução de 1,2 mL de HCl 3 mol L⁻¹ por 10 s e gás de arraste na vazão de 1,04 L min⁻¹ (argônio). Os resultados obtidos desta aplicação são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados para Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$) em 5 amostras de tecido de peixe e CRM (Dolt 4) decompostas por MAWD ($n = 3$), MIC ($n = 3$) e MIC-DV ($n = 5$), posteriormente determinados por FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-ICP-MS em frasco único e DV-CVG-AAS em frasco único.

Amostras	Métodos	FI-CVG-ICP-MS	DV-CVG-ICP-MS	DV-CVG-AAS
A	MAWD	$0,338 \pm 0,004$	ND	ND
	MIC	$0,345 \pm 0,016$	$0,331 \pm 0,014$	$0,347 \pm 0,021$
	MIC-DV	$0,334 \pm 0,008$	$0,321 \pm 0,023$	< 1,2
B	MAWD	$1,07 \pm 0,01$	ND	ND
	MIC	$1,09 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,08$	$1,09 \pm 0,12$
	MIC-DV	$1,08 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,10$	< 1,2
C	MAWD	$2,73 \pm 0,19$	ND	ND
	MIC	$2,69 \pm 0,15$	$2,52 \pm 0,06$	$2,67 \pm 0,10$
	MIC-DV	$2,51 \pm 0,16$	$2,60 \pm 0,17$	$2,62 \pm 0,17$
D	MAWD	$2,42 \pm 0,07$	ND	ND
	MIC	$2,68 \pm 0,17$	$2,67 \pm 0,18$	$2,75 \pm 0,24$
	MIC-DV	$2,52 \pm 0,14$	$2,77 \pm 0,11$	$2,51 \pm 0,09$
E	MAWD	$1,69 \pm 0,09$	ND	ND
	MIC	$1,84 \pm 0,10$	$1,74 \pm 0,18$	$1,85 \pm 0,12$
	MIC-DV	$1,76 \pm 0,12$	$1,88 \pm 0,15$	$1,70 \pm 0,10$
Dolt 4	Referência	$2,58 \pm 0,22$	-	-
	MIC	$2,60 \pm 0,16$	$2,48 \pm 0,16$	$2,67 \pm 0,11$
	MIC-DV	$2,51 \pm 0,10$	$2,44 \pm 0,12$	$2,46 \pm 0,40$

ND: Não determinado

Nos resultados mostrados na Tabela 7, pode-se observar que para todas as amostras e CRM os valores obtidos para Hg foram concordantes entre os métodos quantificados por diferentes técnicas, não apresentando diferença significativa (ANOVA, com 95% de confiança). As amostras A e B, após a decomposição por MIC-DV, ficaram com os valores abaixo do LQ para a técnica de DV-CVG-AAS, uma vez que o LQ desta técnica é maior que a concentração de Hg presente nas amostras.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que os dois sistemas propostos neste trabalho são possibilidades de técnicas a serem usadas pelos laboratórios para a

determinação de Hg. A sensibilidade do sistema estará atrelada a sensibilidade da técnica de determinação, assim a sensibilidade da DV-CVG-ICP-MS em frasco único sempre será maior que a sensibilidade da DV-CVG-AAS em frasco único. Na seção abaixo serão discutidos as vantagens e desvantagens que cada sistema possui frente a técnica usada como referência (FI-CVG-ICP-MS).

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-AAS E DV-CVG-ICP-MS

Inicialmente, em relação à utilização de materiais para a confecção dos sistemas, no FI-CVG utilizado neste trabalho, os materiais utilizados foram uma bomba peristáltica, comutador, confluência e um separador gás/líquido de vidro. Entre esses materiais, apenas a bomba peristáltica é um item disponível comercialmente. Os outros itens foram todos confeccionados na própria universidade (UFSM) pelo laboratório de pesquisa. É importante salientar essa informação, pois, desta forma, seria quase impossível este sistema escalar. Entretanto, existem geradores de vapor químico disponíveis comercialmente que possam ser escaláveis, contudo, isto dependerá do custo e funcionamento. Por outro lado, no sistema DV-CVG os itens usados são a própria tampa dos frascos, além de conectores disponíveis no mercado a baixo custo. O único item usado a mais é uma bomba peristáltica, uma vez que no sistema de FI-CVG é necessária apenas uma bomba. Este fato, por si só, já torna o sistema vantajoso com relação aos custos, pois, para muitos laboratórios, esse é o fator principal para usarem ou não uma nova técnica.

Entrando na comparação dos desempenhos analíticos, pode-se afirmar que ambos os sistemas são possíveis e fáceis de acoplar em outras técnicas. No que tange a sensibilidade de ambos os sistemas utilizados, é possível discutir com base nos LQs das técnicas. Claro que, se compararmos as sensibilidades do ICP-MS com o AAS, torna-se uma comparação injusta, porém, se levarmos em consideração os valores máximos permitidos pelas normativas do MERCOSUL, a discussão torna-se plausível. Os valores para os LQs das técnicas podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de LQ para Hg por FI-CVG-ICP-MS, DV-CVG-ICP-MS, DV-CVG-AAS, CVG-AFS e AM. Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Analito	FI-CVG-ICP-MS*	DV-CVG-ICP-MS*	DV-CVG-AAS*	CVG-AFS²⁴	AM¹⁰¹
Hg	0,05*	0,025*	1,2*	0,02**	0,01***

*Cálculo LQ: (10 mg de massa e 5 mL de volume)

**Cálculo LQ: (20 mg de massa e 10 mL de volume)

***Cálculo LQ: (10 mg de massa)

Segundo a normativa do MERCOSUL⁹, o limite máximo para Hg em amostras de peixe não-predadores é entre $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$ e para peixes predadores é $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$. Ao se comparar os LQs das técnicas mostrados na Tabela 8, é possível observar que, para todas as técnicas, exceto a DV-CVG-AAS, os LQs obtidos foram inferiores quando comparado com limite máximo proposto pela normativa. Com relação as técnicas usadas neste trabalho, percebe-se que o sistema proposto em frasco único acoplado a técnica de ICP-MS possui um LQ menor quando comparado ao sistema com FI-CVG, além de ser similar a técnica de CVG-AFS e ao analisador de mercúrio (AM).

Por outro lado, a DV-CVG-AAS obteve um LQ elevado quando comparado com todas as outras técnicas e, principalmente, com a normativa do MERCOSUL, sendo impossibilitada de atender a essa regulamentação. Entretanto, neste trabalho foi avaliada a possibilidade de se efetuar combustões sucessivas ao utilizar o método da MIC-DV. Para Hg foi obtido concordâncias estatisticamente iguais com os métodos de comparação nas condições com 2 e 3 combustões sucessivas e, os brancos dessas avaliações, foram similares aos brancos obtidos com apenas 1 queima. Desta maneira, pode-se calcular o LQ usando as massas teóricas das queimas de 2 e 3 vezes. Com isso, o LQ para o método da MIC-DV utilizando 3 combustões sucessivas passaria a ser de $0,40 \mu\text{g g}^{-1}$. Com esse resultado, o método da MIC-DV, utilizando a técnica de DV-CVG-AAS, torna-se possível de ser utilizada para o uso no controle da contaminação de Hg em amostras de peixe, por ter um LQ menor que o limite máximo permitido ($0,50 \mu\text{g g}^{-1}$). Ficou evidente que as vantagens buscadas no desenvolvimento dos sistemas propostos neste trabalho foram o baixo custo e a praticidade. De modo que qualquer laboratório use o sistema caso tiver interesse.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal, o desenvolvimento de um método de preparo de amostras, baseado na combustão iniciada por micro-ondas em frascos descartáveis (MIC-DV), para a decomposição de tecido de peixe para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se e V. Considerando as avaliações para a determinação destes analitos no digeridos do método da MIC-DV, pode-se concluir que, para a maioria deles foi possível a determinação por ICP-MS empregando a MIC-DV, com exceção de Cu. O método proposto é de baixo custo, escalável e extremamente seguro para o operador por trabalhar em condições de baixa temperatura e pressão. O método da MIC-DV avaliado neste trabalho, também, possibilitou a decomposição de 10 mg de tecido de peixe liofilizado para a posterior determinação de As, Cd, Cr, Mn, Se e V por ICP-MS e Hg por FI-CVG-ICP-MS, utilizando uma solução de HNO_3 0,5 mol L^{-1} e introdução de O_2 com uma vazão de 4 L min^{-1} durante 60s. Além dessas condições, o método também se mostrou viável para o uso de combustões sucessivas, que possibilitaram queimas de até 30 mg de tecido de peixe para a posterior determinação de Cr, Hg, Mn e V.

Além desses resultados, os LQs obtidos para As, Cd e Hg por ICP-MS foram menores que os limites máximos de contaminantes inorgânicos regulamentados pelas normativas do MERCOSUL para tecido de peixes. Com isso, o método pode ser utilizado para o controle de qualidade deste alimento por diversos laboratórios. Pois, além do método apresentar LQs menores que o limite máximo permitido, o método possui algumas vantagens frente aos métodos da MAWD e MIC como, por exemplo, o baixo o custo e a frequência analítica.

Ao se fazer uma comparação entre os custos da MIC-DV e os custos dos métodos de referência usados no desenvolvimento deste trabalho, essa diferença é extremamente significativa. Considerando os equipamentos de micro-ondas usados nesses métodos comparativos (MAWD e MIC), bem como com seus respectivos consumíveis, o valor de aquisição desses equipamentos, orçados no ano de 2019, foi de cerca de US\$ 200.000,00. Se fizermos o mesmo levantamento dos custos, considerando o método da MIC-DV, para o ano de 2020, o valor certamente não

ultrapassa US\$ 1.000,00 para a aquisição de todos os equipamentos e consumíveis. Outra vantagem é a possibilidade da capacidade do método em ser replicado a outros laboratórios rapidamente, pois envolve outros parâmetros, como a frequência analítica, segurança e custos. Esses parâmetros tornam o método muito vantajoso, pois, em um cenário de laboratório de análises químicas rotineiro, a possibilidade de usar métodos alternativos aos convencionais, não é baseada somente na frequência analítica e custos. Uma das características mais importantes deste método, é a sua simplicidade de uso e manuseio, bem como segurança de operação para quem estiver operando. Essa simplicidade é possível tornar ela tangível pelo número de etapas do método, contendo 4 etapas a menos que os outros métodos (troca de frascos, diluição e descontaminação).

Quanto a segunda parte do trabalho, em relação ao desenvolvimento de um sistema de CVG em frasco único (DV-CVG), pode-se afirmar ser um sistema simples com aplicabilidade em laboratórios de análises químicas rotineiras. Esse sistema desenvolvido possibilita o acoplamento em técnicas como AAS, ICP-MS, ICP-OES (mesmo não sendo avaliado neste trabalho), entre outras técnicas. Claro que, existem geradores de hidretos e vapor químico comerciais, porém o seu custo é maior e o manuseio mais complexos, além de utilizar materiais menos robustos, tais como vidrarias. O sistema de DV-CVG desenvolvido neste trabalho, tem a possibilidade de ser produzido comercialmente, principalmente se considerado as alterações propostas para a tampa, possibilitando a transferência dessa tecnologia desenvolvida a alguma empresa ou até mesmo a universidade. Essa discussão é extremamente válida, uma vez que as tecnologias desenvolvidas pelas universidades devem ter como objetivo trazer algum retorno para a sociedade.

Além do viés comercial, o sistema proposto tem vantagens analíticas frente ao sistema usado para comparação (FI-CVG). Quando acoplado a técnica de ICP-MS, o DV-CVG obteve desempenho de LQ melhor que o sistema comparativo. Outra vantagem é a economia de reagentes, pois os sistemas em fluxo acabam consumindo mais reagentes quando comparados aos sistemas em bateladas. A respeito da frequência analítica do sistema DV-CVG, esta foi semelhante ao sistema em fluxo, visto que todos os procedimentos analíticos para a etapa de determinação são os mesmos,

exceto o uso de outros frascos para a determinação, os quais não foram necessários. Claro que alguns pontos precisam ser melhorados, como a viabilidade do uso de duas bombas peristálticas. Mas isso é facilmente contornado com o uso de bombas que possuem controles individuais de canal.

A grande vantagem do sistema DV-CVG é que, ao ser usado em conjunto com o método da MIC-DV, pode ser enquadrado nos conceitos do método do frasco único, o qual toda a etapa de preparo de amostras e quantificação são feitos no mesmo frasco. Com isso, o método da MIC-DV, aliado ao sistema da DV-CVG, torna-se extremamente vantajoso em diversos parâmetros como: a simplicidade de operação, baixo custo, robustez dos materiais utilizados, segurança ao operador, pouca quantidade de reagentes e facilmente aplicável a laboratórios de análises químicas de rotina.

REFERÊNCIAS

1. Repula, C. M. M.; Campos, B. K. d.; Ganzarolli, E. M.; Lopes, M. C.; Quináia, S. P., Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. *Química Nova* **2012**, *35*, 905-909.
2. Kalantzi, I.; Mylona, K.; Sofoulaki, K.; Tsapakis, M.; Pergantis, S. A., Arsenic speciation in fish from Greek coastal areas. *Journal of Environmental Sciences* **2017**, *56*, 300-312.
3. Jordão, C. P.; Pereira, J. L.; Jham, G. N., Chromium contamination in sediment, vegetation and fish caused by tanneries in the State of Minas Gerais, Brazil. *Science of The Total Environment* **1997**, *207* (1), 1-11.
4. Lino, A. S.; Kasper, D.; Guida, Y. S.; Thomaz, J. R.; Malm, O., Mercury and selenium in fishes from the Tapajós River in the Brazilian Amazon: An evaluation of human exposure. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2018**, *48*, 196-201.
5. Ekino, S.; Susa, M.; Ninomiya, T.; Imamura, K.; Kitamura, T., Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* **2007**, *262* (1), 131-144.
6. WHO, *Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure*. Switzerland, 2008; p 167.
7. Lacerda, L. D., Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. *Química Nova* **1997**, *20*, 196-199.
8. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M., Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24* (5), 383-393.
9. MERCOSUL, Regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos (Revogação das res. GMC Nº 102/94 e Nº 35/96). In *Nº 12/11*, MERCOSUL, Ed. 2013; pp 1-18.
10. Lemly, A. D., Selenium poisoning of fish by coal ash wastewater in Herrington Lake, Kentucky. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *150*, 49-53.
11. He, Y.; Xiang, Y.; Zhou, Y.; Yang, Y.; Zhang, J.; Huang, H.; Shang, C.; Luo, L.; Gao, J.; Tang, L., Selenium contamination, consequences and remediation techniques in water and soils: A review. *Environmental Research* **2018**, *164*, 288-301.
12. Bakshi, A.; Panigrahi, A. K., A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. *Toxicology Reports* **2018**, *5*, 440-447.
13. Weber, A. A.; Sales, C. F.; Faria, F. S.; Melo, R. M. C.; Bazzoli, N.; Rizzo, E., Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2020**, *190*, 110165.
14. Liu, Y.; Liu, G.; Wang, J.; Wu, L., Spatio-temporal variability and fractionation of vanadium (V) in sediments from coal concentrated area of Huai River Basin, China. *Journal of Geochemical Exploration* **2017**, *172*, 203-210.
15. Arruda, M. A. Z., *Trends in Sample Preparation*. Nova Science Publishers: United Kingdom, 2007; p 304.

16. Krug, F. J., *Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar*. Edit SBQ: São Paulo, 2016; p 572.
17. Micaroni, R. C. C. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F., Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova* **2000**, *23*, 487-495.
18. Flores, E. M. M., *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. Elsevier: Oxford, 2014; p 400.
19. Flores, E. M. M.; Barin, J. S.; Mesko, M. F.; Knapp, G., Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2007**, *62* (9), 1051-1064.
20. Flores, E. M. M.; Barin, J. S.; Paniz, J. N. G.; Medeiros, J. A.; Knapp, G., Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (13), 3525-3529.
21. Picoloto, R. S.; Wiltche, H.; Knapp, G.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M., Mercury determination in soil by CVG-ICP-MS after volatilization using microwave-induced combustion. *Analytical Methods* **2012**, *4* (3), 630-636.
22. Duarte, F. A.; Waechter, S. R.; Pedrotti, M. F.; Pardino, R. B.; Flores, E. M. M.; Barin, J. S., Microwave-induced combustion in disposable vessels: a novel perspective for sample digestion. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (12), 8058-8063.
23. Araujo, K.; Colina, M.; Mazurek, R.; Delgado, J.; Ledo, H.; Gutierrez, E.; Herrera, L., Mercury determination by CV-AAS in wastewater and sewage sludge from a stabilization pond system. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1996**, *355* (3-4), 319-320.
24. Astolfi, M. L.; Protano, C.; Marconi, E.; Piamonti, D.; Massimi, L.; Brunori, M.; Vitali, M.; Canepari, S., Simple and rapid method for the determination of mercury in human hair by cold vapour generation atomic fluorescence spectrometry. *Microchemical Journal* **2019**, *150*, 104186.
25. Cárdenas Valdivia, A.; López Guerrero, M. M.; Vereda Alonso, E. I.; Cano Pavón, J. M.; García de Torres, A., Determination of As, Sb and Hg in water samples by flow injection coupled HR CS ETAAS with an in situ hydride generator. *Microchemical Journal* **2018**, *138*, 109-115.
26. Kenduzler, E.; Ates, M.; Arslan, Z.; McHenry, M.; Tchounwou, P. B., Determination of mercury in fish otoliths by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). *Talanta* **2012**, *93*, 404-10.
27. Kunert, I.; Komarek, J.; Sommer, L., Determination of mercury by atomic absorption spectrometry with cold vapour and electrothermal techniques. *Analytica Chimica Acta* **1979**, *106* (2), 285-297.
28. Santos, E. J.; Herrmann, A. B.; Frescura, V. L. A.; Curtius, A. J., Evaluation of slurry preparation procedures for the simultaneous determination of Hg and Se in biological samples by axial view ICP OES using on-line chemical vapor generation. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *548* (1), 166-173.
29. Miao, J.; Wang, X.; Fan, Y.; Li, J.; Zhang, L.; Hu, G.; He, C.; Jin, C., Determination of total mercury in seafood by ion-selective electrodes based on a thiol functionalized ionic liquid. *Journal of Food and Drug Analysis* **2018**, *26* (2), 670-677.

30. Lu, J.; Tong, X.; He, X., A mercury ion-selective electrode based on a calixarene derivative containing the thiazole azo group. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *540*, 111-117.
31. D'Ulivo, A., Mechanisms of chemical vapor generation by aqueous tetrahydridoborate. Recent developments toward the definition of a more general reaction model. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2016**, *119*, 91-107.
32. Jesus, A.; Sturgeon, R. E.; Liu, J.; Silva, M. M., Determination of mercury in gasoline by photochemical vapor generation coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* **2014**, *117*, 100-105.
33. Romanovskiy, K. A.; Bolshov, M. A.; Münz, A. V.; Temerdashev, Z. A.; Burylin, M. Y.; Sirota, K. A., A novel photochemical vapor generator for ICP-MS determination of As, Bi, Hg, Sb, Se and Te. *Talanta* **2018**, *187*, 370-378.
34. Moraes, D. S. d. L.; Jordão, B. Q., Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública* **2002**, *36*, 370-374.
35. Filippini, T.; Malavolti, M.; Cilloni, S.; Wise, L. A.; Violi, F.; Malagoli, C.; Vescovi, L.; Vinceti, M., Intake of arsenic and mercury from fish and seafood in a Northern Italy community. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *116*, 20-26.
36. Atkins, P.; Paula, J., *Atkins' Physical Chemistry*. OUP: Oxford, 2010; p 972.
37. Reis, A. T.; Duarte, A. C.; Henriques, B.; Coelho, C.; Lopes, C. B.; Mieirol, C. L.; Tavares, D. S.; Ahmad, I.; Coelho, J. P.; Rocha, L. S.; Cruz, N.; Monteiro, R. J. R.; Rocha, R.; Rodrigues, S.; Pereira, E., An international proficiency test as a tool to evaluate mercury determination in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *64*, 136-148.
38. Schmidt, L. Avaliação do comportamento de espécies de mercúrio em peixes após diferentes métodos de cocção. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
39. WHO, *Trace elements in human nutrition and health*. Switzerland, 1996; p 361.
40. Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F., O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. *Química Nova* **2004**, *27*, 593-600.
41. López-Antón, M. A.; Díaz-Somoano, M.; Ochoa-González, R.; Martínez-Tarazona, M. R., Analytical methods for mercury analysis in coal and coal combustion by-products. *International Journal of Coal Geology* **2012**, *94*, 44-53.
42. Juncos, R.; Arcagni, M.; Squadrone, S.; Rizzo, A.; Arribére, M.; Barriga, J. P.; Battini, M. A.; Campbell, L. M.; Brizio, P.; Abete, M. C.; Ribeiro Guevara, S., Interspecific differences in the bioaccumulation of arsenic of three Patagonian top predator fish: Organ distribution and arsenic speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *168*, 431-442.
43. Afonso, J. C., Manganês no Brasil: Descoberta, extração, consumo e comercialização numa perspectiva histórica. *Química Nova* **2019**, *42*, 1172-1183.
44. Sepe, A.; Ciaralli, L.; Ciprotti, M.; Giordano, R.; Funari, E.; Costantini, S., Determination of cadmium, chromium, lead and vanadium in six fish species from the Adriatic Sea. *Food Additives & Contaminants* **2003**, *20* (6), 543-552.
45. Foo, S. C.; Tan, T. C., Elements in the hair of South-east Asian islanders. *Science of The Total Environment* **1998**, *209* (2), 185-192.

46. Mester, Z.; Sturgeon, R., *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2003; p 1286.
47. Stewart, II; Olesik, J. W., Steady state acid effects in ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13* (12), 1313-1320.
48. Stewart, II; Olesik, J. W., The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively coupled plasma sample introduction. *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13* (11), 1249-1256.
49. Todolí, J.-L.; Mermet, J.-M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **1999**, *54* (6), 895-929.
50. Pardinho, R. B.; Dalla Vecchia, P.; Mendes, A. L. G.; Bizzi, C. A.; Mello, P. A.; Duarte, F. A.; Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure. *Food Chemistry* **2018**, *263*, 37-41.
51. Bizzi, C. A.; Nobrega, J. A.; Barin, J. S.; Oliveira, J. S. S.; Schmidt, L.; Mello, P. A.; Flores, E. M. M., Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *837* (0), 16-22.
52. Bizzi, C. A.; Barin, J. S.; Muller, E. I.; Schmidt, L.; Nobrega, J. A.; Flores, E. M. M., Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. *Talanta* **2011**, *83* (5), 1324-1328.
53. Barbosa, J. T. P.; Santos, C. M. M.; Peralva, V. N.; Flores, E. M. M.; Korn, M.; Nobrega, J. A.; Korn, M. G. A., Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry* **2015**, *175* (0), 212-217.
54. Mesko, M. F.; Picoloto, R. S.; Ferreira, L. R.; Costa, V. C.; Pereira, C. M. P.; Colepicolo, P.; Muller, E. I.; Flores, E. M. M., Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30* (1), 260-266.
55. Muller, A. L. H.; Oliveira, J. S. S.; Mello, P. A.; Muller, E. I.; Flores, E. M. M., Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. *Talanta* **2015**, *136*, 161-169.
56. Dondi, M.; Fabbri, B.; Mingazzini, C., Use of zirconium oxychloride to neutralize HF in the microwave-assisted acid dissolution of ceramic glazes for their chemical analysis by ICP-OES. *Talanta* **1998**, *45* (6), 1201-1210.
57. Álvarez, M. A.; Carrillo, G., Simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper, chromium, nickel, lead and thallium in total digested sediment samples and available fractions by electrothermal atomization atomic absorption spectroscopy (ET AAS). *Talanta* **2012**, *97* (0), 505-512.
58. Muller, E. I.; Muller, C. C.; Souza, J. P.; Muller, A. L. H.; Enders, M. S. P.; Doneda, M.; Frohlich, A. C.; Iop, G. D.; Anschau, K. F., Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. *Microchemical Journal* **2017**, *134*, 257-261.

59. Muller, E. I.; Souza, J. P.; Anschau, K. F.; Enders, M. S. P.; Muller, A. L. H.; Mortari, S. R.; Duarte, F. A., Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H₂O₂ in a single reaction chamber. *Analytical Methods* **2017**, *9* (4), 649-654.
60. Chen, S.-S.; Chou, S.-S.; Hwang, D.-F., Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺ addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1024* (1), 209-215.
61. Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; Silva, L. O. B.; Queiroz, A. F. S.; Souza, A. S.; Silva, E. G. P.; Santos, W. N. L.; Virgens, C. F., Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices — A review. *Microchemical Journal* **2015**, *121*, 227-236.
62. Grindlay, G.; Mora, J.; de Loos-Vollebregt, M.; Vanhaecke, F., A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2013**, *86*, 42-49.
63. Allain, P.; Jaunault, L.; Mauras, Y.; Mermet, J. M.; Delaporte, T., Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (14), 1497-1498.
64. Leclercq, A.; Nonell, A.; Torro, J. L. T.; Bresson, C.; Vio, L.; Vercouter, T.; Chartier, F., Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *885*, 33-56.
65. Leclercq, A.; Nonell, A.; Torro, J. L. T.; Bresson, C.; Vio, L.; Vercouter, T.; Chartier, F., Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *885*, 57-91.
66. Antes, F. G.; Duarte, F. A.; Mesko, M. F.; Nunes, M. A. G.; Pereira, V. A.; Muller, E. I.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion. *Talanta* **2010**, *83* (2), 364-369.
67. Mesko, M. F.; Moraes, D. P.; Barin, J. S.; Dressler, V. L.; Knapp, G.; Flores, E. M. M., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. *Microchemical Journal* **2006**, *82* (2), 183-188.
68. Mader, P.; Száková, J.; Čurdová, E., Combination of classical dry ashing with stripping voltammetry in trace element analysis of biological materials: Review of literature published after 1978. *Talanta* **1996**, *43*, 521-534.
69. Anderson, R. G.; Chapman, N. B., *Sample pretreatment and separation*. Wiley: Thames Polytechnic, London, 1987; p 632.
70. Knapp, G.; Raptis, S. E.; Kaiser, G.; Tölg, G.; Schramel, P.; Schreiber, B., A partially mechanized system for the combustion of organic samples in a stream of oxygen with quantitative recovery of the trace elements. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **1981**, *308* (2), 97-103.

71. Han, H. B.; Kaiser, G.; Tolg, G., Decomposition of biological materials, rocks and soils with simultaneous volatilization of trace elements in pure oxygen under dynamic conditions. *Analytica Chimica Acta* **1982**, *134*, 3-11.
72. Erber, D.; Quick, L.; Roth, J.; Cammann, K., Investigation of sample decomposition for the trace determination of arsenic, antimony and selenium in organic and inorganic materials using the Wickbold combustion method. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1993**, *346* (4), 420-425.
73. Erber, D.; Quick, L.; Winter, F.; Roth, J.; Cammann, K., The Wickbold combustion method for the determination of mercury under statistical aspects. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1994**, *349* (7), 502-509.
74. Hassan, H. N. A.; Hassouna, M. E. M.; Gawargious, Y. A., Spectrophotometric microdetermination of bismuth in organic compounds after oxygen-flask combustion. *Talanta* **1988**, *35* (4), 311-313.
75. Souza, G. B.; Carrilho, E. N. V. M.; Oliveira, C. V.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A., Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2002**, *57* (12), 2195-2201.
76. Narasaki, H., Determination of arsenic and selenium in fat materials and petroleum products by oxygen bomb combustion and automated atomic absorption spectrometry with hydride generation. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (13), 2481-6.
77. Nadkarni, R. A.; Pond, D. M., Application of ion chromatography for determination of selected elements in coal and oil shale. *Analytica Chimica Acta* **1983**, *146*, 261-266.
78. Barin, J. S. Determinação de metais e não-metals em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por microondas. Universidade Federal de Santa Maria, 2003.
79. Christopher, S. J.; Vetter, T. W., Application of Microwave-Induced Combustion and Isotope Dilution Strategies for Quantification of Sulfur in Coals via Sector-Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2016**, *88* (9), 4635-43.
80. Pereira, J. S. F.; Antes, F. G.; Diehl, L. O.; Knorr, C. L.; Mortari, S. R.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogen determination. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25* (8), 1268-1274.
81. Picoloto, R. S.; Wiltsche, H.; Knapp, G.; Mello, P. A.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M., Determination of inorganic pollutants in soil after volatilization using microwave-induced combustion. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2013**, *86*, 123-130.
82. Pereira, L. S. F.; Pedrotti, M. F.; Enders, M. S. P.; Albers, C. N.; Pereira, J. S. F.; Flores, E. M. M., Multitechnique Determination of Halogens in Soil after Selective Volatilization Using Microwave-Induced Combustion. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (1), 980-987.
83. Cruz, S.; Tirk, P.; Nora, F.; Schmidt, L.; Wiltsche, H.; Bizzi, C.; Knapp, G.; Flores, E. M. M., Feasibility of sulfur determination in diesel oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion using flame retardant. *Fuel* **2015**, *160*, 108-113.

84. Flores, E. M. M.; Muller, E. I.; Duarte, F. A.; Grinberg, P.; Sturgeon, R. E., Determination of Trace Elements in Fluoropolymers after Microwave-Induced Combustion. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (1), 374-380.
85. Pereira, J. S. F.; Pereira, L. S. F.; Mello, P. A.; Guimarães, R. C. L.; Guarnieri, R. A.; Fonseca, T. C. O.; Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion of crude oil for further rare earth elements determination by USN-ICP-MS. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *844*, 8-14.
86. Pereira, J. S. F.; Knorr, C. L.; Pereira, L. S. F.; Moraes, D. P.; Paniz, J. N. G.; Flores, E. M. M.; Knapp, G., Evaluation of sample preparation methods for polymer digestion and trace elements determination by ICPMS and ICPOES. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26* (9), 1849-1857.
87. Muller, A. L. H.; Muller, C. C.; Lyra, F.; Mello, P. A.; Mesko, M. F.; Muller, E. I.; Flores, E. M. M., Determination of Toxic Elements in Nuts by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Microwave-Induced Combustion. *Food Analytical Methods* **2013**, *6* (1), 258-264.
88. Schmidt, L.; Bizzi, C. A.; Duarte, F. A.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M., Evaluation of drying conditions of fish tissues for inorganic mercury and methylmercury speciation analysis. *Microchemical Journal* **2013**, *108*, 53-59.
89. Barin, J. S.; Tischer, B.; Picoloto, R. S.; Antes, F. G.; da Silva, F. E. B.; Paula, F. R.; Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29* (2), 352-358.
90. Mello, P. A.; Diehl, L. O.; Oliveira, J. S. S.; Muller, E. I.; Mesko, M. F.; Flores, E. M. M., Plasma-based determination of inorganic contaminants in waste of electric and electronic equipment after microwave-induced combustion. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2015**, *105*, 95-102.
91. Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.; Diehl, L. d. O.; Bizzi, C. A.; Flores, E. M. M., Comparison of sample digestion techniques for the determination of trace and residual catalyst metal content in single-wall carbon nanotubes by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2015**, *105*, 89-94.
92. Enders, M. S. P.; Souza, J. P.; Balestrin, P.; Mello, P. A.; Duarte, F. A.; Muller, E. I., Microwave-induced combustion of high purity nuclear flexible graphite for the determination of potentially embrittling elements using atomic spectrometric techniques. *Microchemical Journal* **2016**, *124*, 321-325.
93. Sperling, K. R., Determination of heavy metals in sea water and in marine organisms by graphite furnace AAS. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **1988**, *332* (6), 565-567.
94. Flores, E. M. M.; Saidelles, A. P. F.; Barin, J. S.; Mortari, S. R.; Martins, A. F., Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16* (12), 1419-1423.

95. Rocha, D. L.; Batista, A. D.; Rocha, F. R. P.; Donati, G. L.; Nobrega, J. A., Greening sample preparation in inorganic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *45*, 79-92.
96. Flores, E. M. M. Procedimento combinado para decomposição e determinação de elementos-traço por espectrometria de absorção atômica e desenvolvimento de gerador de hidretos em microescala. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
97. Ariño, C.; Serrano, N.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., Voltammetric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *990*, 11-53.
98. Ferreira, S. L. C.; Bezerra, M. A.; Santos, A. S.; Santos, W. N. L.; Novaes, C. G.; Oliveira, O. M. C.; Oliveira, M. L.; Garcia, R. L., Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *100*, 1-6.
99. Nunes, D. L.; Santos, E. P.; Barin, J. S.; Mortari, S. R.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M., Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2005**, *60* (5), 731-736.
100. Carrillo, F.; Bonilla, M.; Cámara, C., Determination of mercury in biological samples by a sensitized cold vapor atomic absorption technique. *Microchemical Journal* **1986**, *33* (1), 2-8.
101. Chapman, J. F.; Dale, L. S., A simple apparatus for the spectrometric determination of mercury by the cold vapour—atomic absorption technique. *Analytica Chimica Acta* **1978**, *101* (1), 203-206.
102. Sardans, J.; Montes, F.; Peñuelas, J., Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2010**, *65* (2), 97-112.
103. Duarte, F. A.; Bizzi, C. A.; Antes, F. G.; Dressler, V. L.; Flores, E. M. M., Organic, inorganic and total mercury determination in fish by chemical vapor generation with collection on a gold gauze and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2009**, *64* (6), 513-519.
104. Xia, H.; Li, C.; Chen, H., Green preparation of CuI particles in dielectric barrier discharge for colorimetric determination of trace mercury in comparison with atomic fluorescence spectrometric determination. *Microchemical Journal* **2019**, *146*, 1169-1172.
105. Zou, Z.; Deng, Y.; Hu, J.; Jiang, X.; Hou, X., Recent trends in atomic fluorescence spectrometry towards miniaturized instrumentation-A review. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1019*, 25-37.
106. Denmark, I. S.; Begu, E.; Arslan, Z.; Han, F. X.; Seiter-Moser, J. M.; Pierce, E. M., Removal of inorganic mercury by selective extraction and coprecipitation for determination of methylmercury in mercury-contaminated soils by chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1041*, 68-77.
107. Nakadi, F. V.; Garde, R.; da Veiga, M. A. M. S.; Cruces, J.; Resano, M., A simple and direct atomic absorption spectrometry method for the direct determination of Hg in dried

- blood spots and dried urine spots prepared using various microsampling devices. *J. Anal. At. Spectrom.* **2020**, *35* (1), 136-144.
108. D'Ulivo, A.; Dĕdina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q.; Welz, B., Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83* (6), 1283-1340.
109. D'Ulivo, A., Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media: A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2004**, *59* (6), 793-825.
110. Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G., Photo-induced chemical-vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30* (10), 1672-1684.
111. Instruments, M. https://www.mercury-instruments.de/pt-Mercury_Instruments_Products_AULA_254.html. (accessed Outubro).
112. Montaser, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Wiley-VCH: New York, 1998; p 964.
113. Gao, Y.; Liu, R.; Yang, L., Application of chemical vapor generation in ICP-MS: A review. *Chinese Science Bulletin* **2013**, *58* (17), 1980-1991.
114. Fernanda Giné, M.; Tuon, R. L.; Cesta, A. A.; Paula Packer, A.; Reis, B. F., Real-time simplex optimization of flow-injection systems for chemical analysis. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *366* (1), 313-318.
115. Cerdà, V.; Ferrer, L.; Portugal, L. A.; de Souza, C. T.; Ferreira, S. L. C., Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *98*, 1-18.
116. Cruz, S. M.; Schmidt, L.; Dalla Nora, F. M.; Pedrotti, M. F.; Bizzi, C. A.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion method for the determination of trace and ultratrace element impurities in graphite samples by ICP-OES and ICP-MS. *Microchemical Journal* **2015**, *123*, 28-32.
117. Kehrig, H. A.; Malm, O.; Palermo, E. F. A.; Seixas, T. G.; Baêta, A. P.; Moreira, I., Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara, Rio de Janeiro. *Química Nova* **2011**, *34*, 377-384.
118. Silva, L. A.; Martins, C. R.; Andrade, J. B. d., Por que todos os nitratos são solúveis? *Química Nova* **2004**, *27*, 1016-1020.
119. Schmidt, L.; Bizzi, C. A.; Rosa, F. C.; Cruz, S. M.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion: towards a robust and predictable sample preparation method. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41* (14), 6902-6910.