



UFSM

Dissertação de Mestrado

**ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO EM COGUMELOS POR
LC-CVG-ICP-MS: AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE
EXTRAÇÃO**

Camila Pilz

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO EM COGUMELOS POR
LC-CVG-ICP-MS: AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE
EXTRAÇÃO**

por

Camila Pilz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**ESPECIAÇÃO DE MERCÚRIO EM COGUMELOS POR LC-CVG-ICP-MS:
AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO**

elaborada por

Camila Pilz

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Valderi Luiz Dressler - Orientador (UFSM-RS)

Dra. Márcia Foster Mesko (UFPEL-RS)

Dr. Sergio Roberto Mortari (UNIFRA-RS)

Santa Maria, 31 de julho de 2009.

Dedico esta dissertação:

Aos meus pais, fonte de amor, carinho, incentivo, ajuda e compreensão.

Ao meu namorado Max, pelo apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler, orientador, por oportunizar a execução deste trabalho, pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade e pelo seu exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, co-orientador, pelos ensinamentos e contribuições na execução deste trabalho.

Aos membros da banca, professores doutores Sergio Roberto Mortari e Márcia Foster Mesko, pela disposição em ler e avaliar o presente trabalho, pelas preciosas sugestões e discussões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo.

Ao colega, Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte pelos ensinamentos e pelas valiosas sugestões durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, pelo convívio, amizade e colaboração, em especial, Camila de Lells Knorr, Clarissa Marques Moreira, Fabiane Regina Bartz, Fernando Cappelli Fontanive, Lucélia Hoehne, Marcelo de Medeiros, Márcia Bertê, Mariane Bueno Cansion e Vanessa Nicolini Manfroi pelo auxílio direto durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudo concedida.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, pela disposição demonstrada durante a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	<i>ix</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>xii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>xiv</i>
RESUMO.....	<i>xvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1. MERCÚRIO (Hg).....	25
2.1.1. Mercúrio em alimentos.....	26
2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO.....	27
2.2.1. Análise de especiação de mercúrio.....	28
2.2.2. Procedimentos utilizados para a extração de espécies de Hg.....	29
2.2.2.1. Extração convencional.....	30
2.2.2.1.1. Estabilidade das espécies de Hg.....	32
2.2.2.2. Extração assistida por ultrassom.....	33
2.2.2.3. Extração assistida por micro-ondas.....	36
2.3. TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg.....	38
2.3.1. Cromatografia a líquido.....	39
2.3.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.....	42
2.4. GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO.....	43

3. OBJETIVO.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	47
4.2. REAGENTES.....	50
4.3. MATERIAIS DIVERSOS.....	51
4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO SISTEMA LC-CVG-ICP-MS.....	52
4.4.1. Escolha da fase móvel.....	52
4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	52
4.5.1. Procedimento usado para a determinação de mercúrio total em cogumelos.....	54
4.5.2. Procedimento usado para a extração das espécies de Hg assistida por ultrassom.....	55
4.5.3. Procedimento usado para a extração das espécies de Hg assistida por micro-ondas.....	55
4.5.4. Procedimento usado para a extração convencional das espécies de Hg.....	56
4.6. AVALIAÇÃO DA MASSA DE AMOSTRA PARA A EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg.....	57
4.7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE L-CISTEÍNA PARA A EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg.....	57
4.8. AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	58

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	59
5.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-CVG-ICP-MS.....	60
5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS.....	60
5.1.2. Especiação de Hg por LC-CVG-ICP-MS.....	60
5.1.2.1. Escolha da fase móvel.....	61
5.1.2.2. Efeitos da concentração e vazão de NaBH ₄	66
5.1.2.3. Efeitos da concentração e vazão de HCl.....	67
5.1.2.4. Escolha da vazão do gás de arraste.....	67
5.2. DETERMINAÇÃO DE Hg TOTAL EM COGUMELOS.....	68
5.3. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE MERCÚRIO INORGÂNICO E METILMERCÚRIO EM COGUMELOS.	69
5.3.1. Extração assistida por ultrassom.....	69
5.3.2. Extração assistida por micro-ondas.....	76
5.3.3. Extração convencional.....	81
5.4. EFEITO DA MASSA DE AMOSTRA SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE Hg²⁺ E CH₃Hg⁺.....	85
5.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg.....	87
5.6. AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS AVALIADOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Hg EM COGUMELOS.....	89
5.7. PARÂMETROS DE MÉRITO.....	94
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema do sistema LC-CVG-ICP-MS.....	49
Figura 2.	Espécies de cogumelos comestíveis utilizadas para a análise de especiação de Hg.....	53
Figura 3.	Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg com coluna C ₁₈	61
Figura 4.	Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg quando a coluna C ₁₈ é nova (a) e após aproximadamente três meses de uso.....	63
Figura 5.	Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg (a) e perda da capacidade de separação (b) da coluna C ₁₈	64
Figura 6.	Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg com coluna C ₁₈	64
Figura 7.	Efeitos da concentração e vazão de NaBH ₄ sobre a intensidade das espécies de Hg, determinadas por LC-CVG-ICP-MS.....	66
Figura 8.	Efeitos da concentração e vazão de HCl sobre a intensidade das espécies de Hg, determinadas por LC-CVG-ICP-MS.....	67
Figura 9.	Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade dos sinais de Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺	68
Figura 10.	Efeito do US sobre a estabilidade de Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ em diferentes meios extratores.....	70

- Figura 11.** Cromatogramas referentes à aplicação de US (20% de amplitude) durante 1 min na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração..... 72
- Figura 12.** Efeito do tempo de aplicação de US (20% de amplitude) sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em L-cisteína 1,0% (m/v)..... 74
- Figura 13.** Cromatogramas referentes à aplicação de US a 20% de amplitude na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em solução de L-cisteína 1,0% (m/v)..... 75
- Figura 14.** Efeito da temperatura na extração auxiliada por radiação MW sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em diferentes soluções extratoras..... 77
- Figura 15.** Cromatogramas referentes à aplicação de MW a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração..... 79
- Figura 16.** Efeito do tempo de extração convencional sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em diferentes soluções extratoras..... 82
- Figura 17.** Cromatogramas referentes à extração convencional (repouso por 12 h a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) em solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração..... 83
- Figura 18.** Efeito da massa de amostra sobre a eficiência de extração das espécies de Hg..... 86

- Figura 19.** Efeito da concentração de L-cisteína sobre a eficiência de extração das espécies de Hg..... 88
- Figura 20.** Recuperações das espécies de Hg em cogumelo empregando os procedimentos de extração por US e convencional..... 90
- Figura 21.** Cromatogramas obtidos a partir de solução referência mista (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul), CRM e amostra (*Pleurotus eryngii*) (vermelho) (extração)..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS.....	48
Tabela 2.	Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de cogumelos.....	54
Tabela 3.	Parâmetros operacionais para o instrumento de LC.....	65
Tabela 4.	Concentração (ng g^{-1}) de Hg total nos cogumelos e no CRM (DOLT-3), obtida após a decomposição da amostra em forno de micro-ondas e determinação por CVG-ICP-MS ($n = 3$).....	69
Tabela 5.	Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM, extraídas a partir das soluções extratoras de HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L^{-1} , água e L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando US a 20% por 1 min ($n = 3$).....	73
Tabela 6.	Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo (<i>Agaricus bisporus</i>), extraídas com solução de L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando US a 20% de amplitude em diferentes tempos de sonicação ($n = 3$).....	76
Tabela 7.	Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM.....	80
Tabela 8.	Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM extraídos com HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L^{-1} , água e L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando extração convencional por 12 h a 25 °C ($n = 3$).....	84

- Tabela 9.** Concentrações (ng g^{-1}) das espécies de Hg em cogumelos e no CRM, obtidas pela extração em solução de L-cisteína 1,0% (m/v) (extração assistida por US e convencional) ou 1,5% (m/v) (extração assistida por MW) ($n = 3$)..... 91
- Tabela 10.** Parâmetros de mérito do método LC-CVG-ICP-MS para análise de especiação de Hg em cogumelo para os três procedimentos de extração estudados..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês, *atomic fluorescence spectrometry*.
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
3. APDC, pirrolidinaditiocarbamato de amônio, do inglês, *ammonium pirrolidindithiocarbamate*.
4. CRM, material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*.
5. CV-AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês, *cold vapor atomic absorption spectrometry*.
6. CV-AFS, espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio, do inglês, *cold vapor atomic fluorescence spectrometry*.
7. CVG, geração de vapor químico, do inglês, *chemical vapor generation*.
8. CVG-ICP-MS, geração de vapor químico acoplado à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry*.
9. DDTC, dietilditiocarbamato, do inglês, *diethyldithiocarbamate*.
10. EPA, Agência de Proteção Ambiental, do inglês, *Environmental Protection Agency*.
11. GC, cromatografia a gás, do inglês, *gas chromatography*.
12. GC-ECD, cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons, do inglês, *gas chromatography with electron capture detection*.
13. GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *graphyte furnace atomic absorption spectrometry*.
14. GHz, gigahertz.
15. G/L, separador gás/líquido.
16. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*.
17. ID, diluição isotópica, do inglês, *isotope dilution*.
18. IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*.
19. kHz, quilohertz, do inglês, *kilohertz*.

20. LC, cromatografia a líquido, do inglês, *liquid chromatography*.
21. LC-CV-AFS, cromatografia a líquido com geração de vapor frio acoplada à espectrometria de fluorescência atômica, do inglês, *liquid chromatography-cold vapor-atomic fluorescence spectrometry*.
22. LC-CVG-ICP-MS, cromatografia a líquido com geração de vapor químico acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *liquid chromatography-chemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry*.
23. LC-ICP-MS, cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*.
24. LC-UV-PCO-CV-AFS, cromatografia a líquido com oxidação ultravioleta pós-coluna com geração de vapor frio acoplado a espectrometria de fluorescência atômica, do inglês, *liquid chromatography-ultraviolet post-column oxidation-cold vapor atomic fluorescence spectrometry*.
25. LD, limite de detecção.
26. LQ, limite de quantificação.
27. M⁺, íon monovalente.
28. MHz, megahertz.
29. MIP-AES, espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês, *microwave inductively plasma optical emission spectrometry*.
30. m/v, massa/volume.
31. MW, radiação micro-ondas, do inglês, *microwave radiation*.
32. m/z, razão massa/carga.
33. OMS, Organização Mundial de Saúde.
34. PEEK, poli(etercetona).
35. PIC-A, fosfato de tetrabutílamônio.
36. PIC-B5, pentassulfonato de sódio.
37. RNA, ácido ribonucléico.
38. RSD, desvio padrão relativo, do inglês, *relative standard deviation*.
39. SIDMS, diluição isotópica acoplada a espectrometria de massa, do inglês, *sample isotope dilution mass spectrometry*.

40. SPE, extração em fase sólida, do inglês, *solid phase extraction*.
41. TBA, brometo de tetrabutilamônio.
42. TMAH, hidróxido de tetrametilamônio, do inglês, *tetramethylammonium hydroxide*.
43. TMFTM-PTFE, politetrafluoretileno modificado.
44. US, ultrassom, do inglês, *ultrasound*.
45. v/v, volume/volume.
46. W, watts.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados diferentes procedimentos de preparo de amostra de cogumelo comestível para a determinação de espécies de mercúrio inorgânico (na forma de Hg^{2+}) e orgânico (na forma de metilmercúrio - CH_3Hg^+). Para isso, foram avaliadas a extração convencional, a radiação micro-ondas (MW) e o ultrassom (US), combinados com diversos meios extratores (água, soluções de ácido clorídrico e L-cisteína). A cromatografia a líquido com geração de vapor químico acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-CVG-ICP-MS) foi usada para a determinação das espécies de Hg. O Hg total foi determinado por CVG-ICP-MS. A influência dos principais parâmetros envolvidos na extração das espécies de Hg, como a concentração das soluções extratoras, a temperatura na extração por MW, a amplitude de US e o tempo de extração foram investigados. A conversão das espécies de Hg foi observada em todas as condições, quando o HCl foi usado como meio extrator, além de que essas soluções não possibilitaram extrair quantitativamente o Hg das amostras. Entretanto, não foi observada conversão das espécies de Hg em água e na solução de L-cisteína 1,0% (m/v), porém as extrações não foram quantitativas quando a água foi usada como meio extrator. Extrações quantitativas foram obtidas quando L-cisteína 1,0% (m/v) foi usada para os procedimentos de extração convencional e assistida por US. As condições otimizadas para esses procedimentos (US 20% por 1 min e extração convencional por 12 h a 25 °C) proporcionaram eficiências de extração superiores a 86% para a soma das espécies de Hg, com desvio padrão relativo (RSD) menor que 8,0 e 13% para Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , respectivamente. Por outro lado, as extrações assistidas por MW não tiveram eficiências de extração satisfatórias, uma vez que a eficiência máxima obtida foi de 88% para a soma das espécies de Hg. Os limites de detecção obtidos para os procedimentos empregando US, MW e extração convencional foram 0,41 e 0,35 ng g^{-1} , 0,64 e 0,90 ng g^{-1} , e 1,41 e 0,11 ng g^{-1} , para Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , respectivamente. Os procedimentos de extração foram avaliados através de ensaios de recuperação das espécies de Hg, sendo que os mesmos ficaram na faixa de 89 a 109% para Hg^{2+} e 96 a 113% para CH_3Hg^+ . A exatidão foi avaliada pela análise de material de referência certificado (DOLT-3), cuja concordância dos resultados obtidos em relação aos valores certificados ficou na

faixa de 88 a 93% para CH_3Hg^+ e 95 a 102% para Hg total, respectivamente. A extração assistida por US foi considerada mais simples e rápida que os demais procedimentos, sendo, portanto, mais adequada para a extração das espécies de Hg em cogumelos comestíveis.

Palavras-chaves: especiação, mercúrio, metilmercúrio, LC-CVG-ICP-MS.

ABSTRACT

In this work, different sample preparation procedures for determining inorganic (in Hg^{2+} form) and organic mercury (in methylmercury form – CH_3Hg^+) in edible mushrooms were evaluated. Conventional, microwave (MW) and ultrasound (US) assisted extractions combined with water, hydrochloric acid and L-cysteine solutions were tested. Liquid chromatography-chemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-CVG-ICP-MS) was used for Hg species determination. Total Hg was determined by CVG-ICP-MS after sample decomposition. The influence of the main parameters on Hg species extraction, such as extraction solutions concentration, temperature, US amplitude and extraction time were investigated. Hg species conversion was observed in all conditions when HCl was used as extractor medium. Besides, Hg species extraction from the samples is not quantitative. No Hg species conversion was observed when water and 1.0% (m/v) L-cysteine solution were used. However, the extractions were not quantitative when water was used. Quantitative extractions were obtained only when 1.0% (m/v) L-cysteine was used as extraction solution for conventional and US assisted extractions. The optimized conditions for these procedures (US 20% for 1 min and conventional extraction for 12 h at 25 °C) provided extraction efficiencies higher than 86% for the sum of the Hg species, while only up to 88% of the Hg species were extracted when MW heating was used. The relative standard deviation (RSD) is lower than 8.0 and 13% for Hg^{2+} and CH_3Hg^+ , respectively. Detection limits for US, MW and conventional extractions (using L-cysteine) were 0.41 and 0.35 ng g^{-1} , 0.64 and 0.90 ng g^{-1} , and 1.41 and 0.11 ng g^{-1} for Hg^{2+} and CH_3Hg^+ , respectively. The procedures were evaluated using analyte recovery tests of Hg species and by analysis of certified reference material (DOLT-3). Recoveries in the range of 89 to 109% for Hg^{2+} and 96 to 113% for CH_3Hg^+ were obtained. The agreement of the obtained results for DOLT-3 were in the range of 88 to 93% for CH_3Hg^+ and 95 to 102% for total Hg, respectively. US assisted extraction was considered simpler and faster than the other procedures, being more suitable for Hg species extraction from edible mushrooms.

Keywords: speciation, mercury, methylmercury, LC-CVG-ICP-MS.

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é considerado um dos poluentes ambientais mais perigosos, cujos efeitos tóxicos dependem da sua forma química, cada qual com propriedades diferentes, as quais determinam sua distribuição e impacto biológico.¹

Os cogumelos são considerados indicadores de contaminação ambiental por Hg, e podem ser usados para avaliar o impacto da sua presença sobre a saúde humana. Alimentos, como os cogumelos comestíveis, podem conter altas concentrações de Hg, resultado da sua deposição natural, do cultivo em áreas poluídas ou como conseqüência do uso de pesticidas e fungicidas a base de Hg.²⁻⁴

Devido aos riscos à saúde causados pela exposição ao Hg, estudos sobre a mobilidade deste elemento através da cadeia alimentar proporcionam informações para o desenvolvimento de programas de vigilância, com o objetivo de aumentar a segurança dos produtos alimentícios e assim minimizar a exposição ao Hg. A legislação brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece uma concentração máxima de 0,01 mg kg⁻¹ para Hg em alimentos, incluindo os cogumelos comestíveis. Entretanto, ainda não há nenhuma referência na legislação em relação às espécies de Hg em alimentos, pois se sabe que os seus efeitos fisiológicos e as características toxicológicas do Hg estão estritamente relacionados com as espécies químicas do elemento. Portanto, a análise de especiação de Hg em cogumelos pode fornecer informações importantes sobre uma possível contaminação, e dessa forma aumentar a segurança no consumo desse alimento.^{5,6}

Embora todas as formas de Hg sejam tóxicas, os efeitos mais pronunciados sobre a saúde humana estão, geralmente, relacionados com o metilmercúrio (CH₃Hg⁺). Dessa forma, é importante a identificação e a quantificação das diferentes espécies do elemento. Porém, apesar de que tenham sido feitos grandes esforços para desenvolver métodos sensíveis e seletivos para a especiação de diversos elementos, a especiação de Hg ainda é problemática devido a dificuldades no preparo da amostra, principalmente devido à extração parcial das espécies da

amostra, além da possibilidade de conversão e degradação das mesmas durante essa etapa.¹

Diversos estudos sobre a conversão das espécies de Hg e a eficiência na extração das mesmas podem ser encontrados na literatura, em que diferentes meios extratores e procedimentos de extração foram testados.^{1,7} Soluções ácidas⁸⁻¹² e alcalinas^{7,9} são frequentemente utilizadas para este propósito. Além do mais, reagentes sulfurados como a L-cisteína, o tiosulfato e o 2-mercaptoetanol também são usados para a extração de Hg. A grande afinidade do elemento com o enxofre presente nestes compostos promove a extração das espécies de Hg da matriz da amostra.^{13,14}

O uso da extração assistida por micro-ondas (MW)^{11,15-17} e ultrassom (US)^{8,18} para o preparo de amostras também tem sido avaliado para diferentes matrizes biológicas. Ambos os procedimentos facilitam e aceleram a extração dos analitos. Nesses casos, a eficiência da extração do analito, sem perdas ou conversão das espécies, depende do tempo de irradiação, temperatura e características da amostra e dos meios extratores. Geralmente, estes métodos apresentam vantagens frente às extrações convencionais em termos de tempo, eficiência e consumo de reagentes.^{7,11,19}

A determinação das espécies de Hg requer normalmente o uso de técnicas hífenadas, como a cromatografia a gás (GC)^{16,20} e a cromatografia a líquido (LC)^{14,15}, acopladas a um detector seletivo e com boa sensibilidade.^{7,21,22} A maioria dos métodos por LC são baseados em separações por fase reversa, envolvendo o uso de uma coluna com fase ligada à sílica, e uma fase móvel contendo um solvente orgânico como o metanol, um reagente complexante, especialmente o 2-mercaptoetanol e/ou L-cisteína, em pH controlado.^{1,22}

Dentre as técnicas descritas na literatura, a LC hífenada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)^{11,13,14,17,23} é uma das mais utilizadas para a análise de especiação de Hg, porque a detecção por ICP-MS proporciona elevada sensibilidade, baixos limites de detecção (LD) e possibilita se obter informação isotópica. Adicionalmente, a geração de vapor químico (CVG) pode ser usada com a LC-ICP-MS, melhorando significativamente os limites de detecção.^{15,24,25}

Embora diversos procedimentos tenham sido propostos para a especiação de Hg em amostras biológicas, especialmente em peixes, pouco se conhece sobre as espécies de Hg em cogumelos comestíveis. Em vista do consumo relativamente elevado deste alimento e, conseqüentemente, da segurança alimentar, é justificável o desenvolvimento de métodos para a análise de especiação de Hg em cogumelos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura está dividida em três partes. Na primeira parte, são abordados os aspectos gerais sobre as características do Hg, assim como seus aspectos toxicológicos relacionado com os alimentos. Na segunda parte é abordado o emprego do tratamento de amostras para a análise de especiação de Hg em amostras biológicas, utilizando radiação micro-ondas, ultrassom e extração convencional. Na terceira parte, são apresentados os assuntos relacionados com a análise de especiação de Hg, abordando métodos de separação por cromatografia a líquido, assim como a técnica de detecção por ICP-MS para especiação de Hg.

Além disso, para facilitar a leitura, quando for feita a abordagem sobre as espécies inorgânicas e orgânicas de mercúrio, estas serão tratadas como mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e metilmercúrio (CH_3Hg^+), respectivamente, mesmo que outras espécies estejam presentes nas amostras. A concentração total de mercúrio também será abordada como Hg total.

2.1. MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) é conhecido e utilizado pelo homem há muito tempo, podendo ser destacada entre suas aplicações mais antigas a utilização como pigmento vermelho em pinturas rupestres, na forma de sulfeto de mercúrio (HgS), no tratamento de doenças de pele, na recuperação de metais nobres e para a extração de ouro por amalgamação.²⁶ Além disso, o elemento pode ser empregado como catalisador, na indústria de cloro-álcali e papel, em baterias, em tintas e em produtos farmacêuticos.^{27,28}

O Hg é encontrado sob diversas formas, sendo as principais o mercúrio elementar ou metálico (Hg⁰), o mercúrio inorgânico (Hg²⁺ e Hg₂²⁺) e diversas espécies orgânicas. O Hg⁰ é a forma mais volátil de Hg, possuindo elevada pressão de vapor (0,3 Pa a 25 °C) e baixa solubilidade em água. Dentre as espécies inorgânicas, os íons Hg₂²⁺ e Hg²⁺ são encontrados sob a forma de diferentes sais, apresentando, em geral, alta solubilidade em água e afinidade por diversos ligantes, especialmente compostos que contêm enxofre. Já as espécies orgânicas de Hg são formadas pela metilação das espécies inorgânicas, sendo o metilmercúrio (CH₃Hg⁺) e o dimetilmercúrio [(CH₃)₂Hg] as formas comumente encontradas no ambiente. Essas espécies químicas podem sofrer interconversão, contribuindo para o transporte e a distribuição do elemento e suas espécies na crosta terrestre.²⁹⁻³¹

Os efeitos tóxicos do Hg dependem da sua forma química. De maneira geral, a exposição aos compostos de Hg²⁺ pode causar vômito, diarreia intensa, cólica abdominal, convulsão, insuficiência renal e respiratória, coma e morte, além de sintomas neurológicos, como tremor, alterações na personalidade, inquietação, ansiedade, distúrbios do sono e depressão.^{32,33} O CH₃Hg⁺ está entre as formas mais tóxicas de Hg (sua toxicidade chega a ser de 10 a 100 vezes maior que o Hg²⁺) encontradas no ambiente, por ser uma neurotoxina que tem a tendência de bioacumular no organismo. Isso ocorre devido à sua alta lipossolubilidade, que faz que o composto tenha uma absorção gastrointestinal rápida e uma alta permeação nas membranas celulares, tornando-o capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta. Nas células, o composto se liga a grupos sulfidrílicos, inibindo a síntese de ácido ribonucléico (RNA) e proteínas, danificando, assim, o desenvolvimento cerebral.^{28,34-36}

2.1.1. Mercúrio em alimentos

A presença de Hg em alimentos constitui um risco à saúde humana, devido a sua toxicidade, a qual é potencializada pela bioacumulação e biomagnificação do elemento na cadeia alimentar.³⁷ Casos de contaminação por Hg levaram a um aumento dos programas de controle ambiental e alimentar no mundo. Entre esses casos estão a contaminação por Hg na Baía de Minamata (Japão, entre 1953 e 1960), ocorrido pela geração de CH_3Hg^+ como subproduto do processo de produção de acetaldeído, que levou à contaminação de peixes e humanos. Outros casos ocorreram no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala (em 1972) onde a utilização de grãos tratados com fungicidas à base de metil e etilmercúrio na confecção de pão caseiro foi a causa da contaminação da população.^{36,38-40}

Em geral, a principal forma de exposição às espécies de Hg é através do consumo de peixes, de frutos do mar e derivados. No entanto, devido ao seu uso na agricultura como fungicida e pesticida, os diferentes compostos de Hg podem contaminar outros alimentos como cereais, vegetais, frutas e cogumelos, além de produtos animais como carne, leite ou até mesmo ovos.^{34,41-43}

O consumo crescente de alimentos alternativos, como os cogumelos comestíveis, em geral, se deve ao seu alto valor nutricional e ao baixo teor de gordura. Porém, os cogumelos têm como característica a capacidade de bioacumular Hg, sendo comum o uso destes como bioindicadores de poluição. Portanto, devido a esta característica, é necessário que seja avaliada a concentração de Hg, bem como de outros elementos, em cogumelos comestíveis.^{2,3,44,45}

O acúmulo de Hg em cogumelos depende da espécie de cogumelo. Geralmente os gêneros *Agaricus*, *Macrolepiota* e *Boletus* acumulam maiores quantidades do elemento, que pode chegar a 10 mg kg^{-1} (em massa seca).⁴⁶ Nessas espécies, o Hg encontra-se complexado à proteínas de alto (como na espécie *Agaricus bisporus*) ou baixo (como na espécie *Pleurotus ostreatus*) peso molecular.⁴⁷ Entretanto, pouca informação se tem sobre a concentração de organometálicos em cogumelos, mas estudos mostraram que o CH_3Hg^+ é encontrado em concentrações inferiores a 16% em relação à concentração de Hg total.^{41,48}

Considerando que alimentos como grãos, vegetais e peixes fazem parte da alimentação humana, o monitoramento periódico desses produtos com relação às espécies tóxicas de Hg é de grande importância.²⁵ Devido aos riscos à saúde causados pela exposição ao Hg, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabeleceu uma dose de referência para CH_3Hg^+ de $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo/dia. Adicionalmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fixou uma dose máxima semanal de $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo/semana ($0,23 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo/dia) de CH_3Hg^+ . Contudo, a dose máxima aceitável de Hg em cogumelos ainda não foi estabelecida.^{5,49,50}

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece concentrações máximas para Hg em alimentos, incluindo os cogumelos comestíveis nas formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva, cuja concentração máxima permitida para Hg total é de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$.⁵¹⁻⁵³ Entretanto, não estabelece limites máximos para as espécies do elemento nesses produtos.

Diversos estudos sobre a determinação da concentração de Hg total em cogumelos têm sido feitos, como os trabalhos de Benbrahim *et al.*⁵⁴, Michelot *et al.*² e Falandysz e Bielawski⁵⁵, porém pouco se sabe sobre a determinação das espécies do elemento nessas amostras. Por isso, considerando que os efeitos mais pronunciados sobre o meio ambiente e a saúde humana são geralmente relacionados com o CH_3Hg^+ , o desenvolvimento de métodos para a análise de especiação em amostras ambientais, sobretudo em cogumelos comestíveis, é importante para determinar em quais níveis de concentração o elemento está presente.^{1,7}

2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

Tendo em vista sua elevada toxicidade, a determinação da concentração total de Hg não é suficiente para entender sua mobilidade, biodisponibilidade, o impacto ambiental e seu potencial risco à saúde humana. Portanto, a análise de especiação é importante para entender o metabolismo das espécies químicas do Hg e as biotransformações que ocorrem com o elemento na cadeia alimentar.^{36,37,56,57} Dessa forma, a informação sobre as espécies do elemento é importante tendo em vista que a toxicidade e a atividade biológica dependem do estado de oxidação ou das formas químicas, bem como de suas concentrações.⁵⁸

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)⁵⁹, o termo “especação” é definido como sendo as “atividades analíticas de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas do elemento em uma amostra”, em que o termo “espécie química” é entendido como “uma forma específica de um elemento com composição isotópica, estado de oxidação ou eletrônico, e/ou estrutura molecular ou complexo definidos”.

Com base na importância da determinação das espécies químicas de Hg, o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos para a determinação das diferentes espécies do elemento é importante, tanto para a caracterização da amostra como para uma estimativa dos seus riscos toxicológicos resultante das diferentes espécies. Embora melhorias na instrumentação tenham sido feitas nos últimos anos, a especação de Hg ainda é problemática, devido às limitações relacionadas com a extração parcial das espécies, além da possibilidade de conversão dessas durante o preparo da amostra. Esta, por sua vez, é uma das etapas de preocupação em análise de especação de Hg, porque os procedimentos disponíveis são geralmente trabalhosos, sujeitos a perdas de analito, contaminação e conversão de espécies.¹

2.2.1. Análise de especação de mercúrio

Os procedimentos para extrair as espécies de Hg de amostras biológicas devem permitir a extração completa dos analitos e, ao mesmo tempo, manter a integridade das espécies químicas do elemento.^{57,60,61} Algumas vezes, são necessárias etapas de pré-concentração, em função dos analitos estarem presentes em baixas concentrações na amostra. Entre as técnicas de pré-concentração estão os sistemas de “aprisionamento”, a formação de amálgamas e o uso de agentes complexantes, que são, muitas vezes, combinados com etapas de extração e/ou derivatização. Além disso, as amostras podem necessitar de etapas prévias de “*clean up*”, para a separação do analito das espécies potencialmente interferentes presentes na matriz da amostra, que em amostras biológicas são complexas devido à presença de diversos compostos, como por exemplo, hidrocarbonetos, polissacarídeos, lipídios, aminoácidos e glicerídios.^{56,61}

Adicionalmente, dependendo da técnica de determinação utilizada, uma etapa de derivatização dos analitos pode também ser necessária, no qual as

propriedades químicas e físicas, como o ponto de ebulição e a solubilidade, do analito são modificadas. Para compostos organometálicos, a derivatização dos analitos é comumente necessária para a separação por cromatografia a gás (GC), em que devem ser obtidas espécies voláteis e termicamente estáveis antes da separação. As formas de derivatização mais usadas são a geração de hidretos usando tetrahidroborato de sódio, e as reações de alquilação com tetraetilborato de sódio e tetra(n-propil)borato de sódio. As alquilações com o uso de reagentes de Grignard não são muito usadas, devido ao elevado tempo necessário e às muitas etapas envolvidas no procedimento.^{1,56,60,61}

Além disso, procedimentos de filtração, diluição, uso de solventes, ajuste de pH, separação de fases, moagem e/ou tamisação da amostra devem ser evitados ou usados o menos possível, devido a maior possibilidade de erro nos resultados quando do desenvolvimento do método de análise.⁵⁶

A extração das espécies de Hg em amostras biológicas é uma das etapas importantes no preparo de amostras para a análise de especiação, no qual os procedimentos analíticos envolvidos geralmente são trabalhosos, proporcionam baixa eficiência de extração do analito, além de haver a possibilidade de conversão das espécies ou perdas do elemento por volatilização, dependendo das condições empregadas. Acrescenta-se a estes problemas a possibilidade de contaminação da amostra, uso de grande quantidade de reagentes, que aumentam os valores de branco, piorando, assim, os limites de detecção da técnica utilizada para a determinação.^{18,56,57} Em alguns casos, especialmente nas amostras biológicas, algumas espécies do analito podem estar fortemente ligadas à matriz e, portanto, não serem extraídas, não permitindo a obtenção das informações sobre todas as espécies presentes na amostra.⁶¹

2.2.2. Procedimentos utilizados para a extração de espécies de Hg

A extração deve permitir que o analito seja separado da matriz da amostra sem que ocorra perda, contaminação ou conversão das espécies, com uma mínima manipulação da amostra.^{1,11,36} Esta etapa, portanto, deve permitir a solubilização dos compostos orgânicos de Hg, sem que ocorra a quebra da ligação C-Hg.¹⁸

Diversos procedimentos são usados para a extração das espécies de Hg. Entre eles, estão os métodos de lixiviação com ácidos, digestão alcalina e destilação. Porém, esses procedimentos geralmente são trabalhosos, levam a baixa eficiência de extração, alto consumo de reagentes, que geram uma grande quantidade de resíduos tóxicos, além de serem passíveis de fontes de erros, devido a contaminações e perdas de analito durante o pré-tratamento.^{6,9,14,36,62-64} Além disso, alguns procedimentos, como a extração alcalina, podem superestimar a concentração de CH_3Hg^+ em tecidos biológicos, devido a metilação do Hg^{2+} durante o procedimento de extração, que pode variar de 1,7 a 4,3%.⁶²

Adicionalmente, a extração com fluido supercrítico⁶⁵ e por ponto nuvem^{66,67} também têm sido utilizadas. No entanto, devido às extrações estarem restritas a compostos não polares, e às dificuldades de operação no equipamento de fluido supercrítico, estes procedimentos não são vantajosos para o uso rotineiro.⁶⁸

De acordo com as dificuldades apresentadas pelos procedimentos de extração das espécies de Hg, o uso das radiações micro-ondas (MW)^{11,15,64,69,70} e ultrassom (US)^{8,14,71} têm sido estudados, tendo em vista que estes procedimentos podem facilitar e acelerar a etapa de preparo de amostra. Com auxílio das radiações MW e US, a eficiência da extração dos analitos depende de fatores como a amplitude, o tempo de exposição e a temperatura, além das características do solvente usado. Essas técnicas podem ser vantajosas frente aos procedimentos convencionais de extração, em termos de tempo, eficiência, consumo de solvente e redução da contaminação.^{8,72,73}

As vantagens do uso das radiações MW e US para a extração de analitos em alimentos tornou essas técnicas muito utilizadas para o preparo dessas amostras, principalmente quando a lixiviação com ácidos é usada.⁶

2.2.2.1. Extração convencional

Neste trabalho, optou-se por usar a termo “extração convencional” para definir os procedimentos em que se utilizam reagentes (ácidos, bases, enzimas e complexantes) associados com o repouso da amostra ao abrigo da luz.

A extração convencional é um procedimento bastante utilizado em especiação, que pode ser feito usando diversos reagentes/solventes, entre os quais os ácidos (HCl , HNO_3 , ácido acético ou HBr)^{9,18,20,23,62,71,74}, bases (KOH em meio

metanol ou hidróxido de tetrametilamônio - TMAH)^{9,16,62,63,75} e enzimas.^{76,77} As extrações podem ser feitas ou auxiliadas por agentes complexantes, como a L-cisteína¹³, o 2-mercaptoetanol¹⁴, a tiouréia ou a mistura deles¹⁵, os quais tem o objetivo de aumentar a eficiência da extração.^{18,71}

O uso desse procedimento de extração pode resultar em uma completa solubilização da amostra, facilitando a transferência das espécies de interesse para a fase extratora, com a estabilização da ligação metal-carbono.⁶¹ No entanto, esse procedimento é relativamente moroso, além de poder formar soluções ricas em matéria orgânica e sais, formados durante a neutralização do extrato.^{20,56,61}

O método de Westöö⁷⁸ foi o primeiro trabalho proposto, e é o mais utilizado para a extração dos compostos orgânicos de Hg de amostras biológicas. Ele está baseado em sucessivas extrações das espécies de Hg com HCl diluído, seguido de re-extração com solventes orgânicos e agentes complexantes em meio aquoso. Após esse trabalho, novos procedimentos foram propostos, com pequenas modificações do original, para a extração dos compostos de Hg de amostras biológicas^{64,73-75,79-81}, especialmente com a adição de sais como KBr, KCl e NaCl para aumentar a eficiência da extração de Hg²⁺.^{11,14} Segundo Bramanti *et al.*⁸², a adição de NaCl, através da formação de cloro-complexos, previne a formação de hidróxidos de mercúrio insolúveis. No entanto, o uso de métodos baseados no procedimento de Westöö apresentam desvantagens, tais como o uso de solventes orgânicos, a manipulação intensa da amostra, que pode induzir a erros decorrentes de contaminação e perdas dos analitos, o tempo prolongado para eliminar compostos interferentes, além da condição cromatográfica usada por Westöö ser difícil de reproduzir.¹³

Além do uso de HCl, o HNO₃ e H₂O₂ também podem ser usados para extrair espécies de Hg de amostra de cabelo através da extração convencional, de acordo com o trabalho de Morton *et al.*⁸³ Uma solução contendo 2 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂ foi deixado em contato com a amostra durante uma noite para extrair espécies de Hg. As espécies foram determinadas por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). A eficiência de extração foi de 86%, resultados que foram comparáveis aos obtidos por decomposição em forno micro-ondas para Hg total, utilizando os mesmos reagentes.

Recentemente, estudos de substâncias extratoras a base de complexantes, como a L-cisteína, o 2-mercaptoetanol e a tiouréia têm sido sugeridas.^{13,14,82} De acordo com Bramanti *et al.*⁸², as soluções contendo Hg^{2+} e compostos sulfurados formam complexos (Hg-S) rapidamente, à temperatura ambiente. Hintelmann⁸⁴ observou que a L-cisteína pode evitar a ocorrência de metilação do Hg em sedimentos, provavelmente devido à formação de complexos com a L-cisteína.

Hight e Cheng¹³ usaram solução de L-cisteína 1,0% (m/v) para extrair espécies de Hg de amostras de peixe e de material de referência certificado (CRM), usando inicialmente agitação manual por 15-20 segundos e depois a solução foi deixada em repouso por 120 min em banho-maria a 60 °C. Observaram que as espécies de Hg foram mais facilmente extraídas do CRM do que da amostra de peixe, provavelmente pelo fato das proteínas da amostra estarem desnaturadas e o tamanho de partícula ser menor no CRM do que na amostra.

Uma das vantagens de usar o 2-mercaptoetanol como reagente extrator é a possibilidade de eliminar possíveis efeitos de memória na determinação de Hg em amostras biológicas, devido à forte complexação do elemento com o enxofre do agente complexante. Meng *et al.*¹⁴ verificaram tal afirmação ao determinar as espécies de Hg por LC-ICP-MS, mostrando que o sinal para Hg^{2+} retorna totalmente à linha base no mesmo tempo que o padrão interno ródio, quando o 2-mercaptoetanol é usado na solução extratora, enquanto que o uso de apenas a solução contendo HNO_3 2% (v/v) como meio extrator faz que o sinal para o elemento demore mais tempo para retornar a linha base em relação ao padrão interno.

2.2.2.1.1. Estabilidade das espécies de Hg

Em relação à estabilidade das espécies de Hg nas soluções extratoras contendo reagentes complexantes, diferentes fatores, tais como a concentração das espécies de Hg, a matriz da amostra, o material de acondicionamento, o pH, a temperatura e a luminosidade devem ser considerados.³⁶ Por exemplo, a estabilidade do complexo Hg-2-mercaptoetanol pode chegar a três dias, segundo o estudo de Margetínová *et al.*⁸⁵, que verificaram que é necessário manter o pH entre 3,0 e 5,0 para estabilizar os complexos por cerca de 10 h.

De acordo com estudos descritos na literatura, solução de L-cisteína pode tanto estabilizar como degradar espécies de Hg.^{13,86,87} Hight e Cheng¹³ estudaram a estabilidade dos compostos de Hg na solução extratora contendo L-cisteína 1,0% (m/v), e concluíram que o CH_3Hg^+ é estável por cerca de 24 h. Após este tempo, começa a ser perceptível que o CH_3Hg^+ é desmetilado, formando Hg^{2+} . O Hg^{2+} é estável por até 96 h, quando as soluções são armazenadas em frascos de polipropileno. Adicionalmente, os autores observaram que ambas as espécies estudadas são estáveis por até 96 h em solução de L-cisteína 0,02% (m/v).

Ahmed e Stoepler⁸⁶ e Goana e Valiente⁸⁷ também estudaram a estabilidade do Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , em solução de L-cisteína 1,0% (m/v), confirmando que o armazenamento de solução de CH_3Hg^+ em frasco de polipropileno nessa solução diminui o tempo de estabilidade da espécie. Isto não ocorre quando essa espécie é armazenada em frasco de vidro, no qual sua estabilidade é de aproximadamente 96 h. Segundo os autores, o motivo pelo qual o CH_3Hg^+ é desmetilado após um determinado tempo deve-se ao fato de que a L-cisteína é dimerizada com o passar do tempo e convertida a cistina. Dessa forma o CH_3Hg^+ , que é estável em L-cisteína é degradado quando a cistina é formada.

2.2.2.2. Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom (US) é eficiente para remover metais e compostos organometálicos de diferentes tipos de amostras e ocorre através da combinação das altas temperaturas (que resulta num aumento da solubilidade e difusão do analito) e pressões (que favorece a penetração do solvente nas partículas da amostra e o transporte do analito) com a energia oxidativa dos radicais (hidroxila e peróxido de hidrogênio para a água), que são formados durante a sonólise do solvente.^{68,88} O ultrassom é transmitido por qualquer substância sólida, líquida ou um gás por meio de propriedades elásticas, que é característica das ondas mecânicas. Em líquidos, essa transmissão produz ciclos de expansão e compressão da solução, caracterizados pela formação de bolhas ou cavidades, que crescem e implodem, um fenômeno conhecido como “cavitação”.⁸⁹ Durante esse processo, as moléculas voláteis, que estão dentro das bolhas de cavitação, podem sofrer reações por mecanismos térmicos, enquanto que as moléculas hidrofílicas podem formar radicais livres, ou mesmo serem decompostas via radicalar.¹⁹

O colapso das bolhas de cavitação, geradas pela ação do ultrassom gera microjatos e ainda ondas de choque. Quando em contato com uma amostra sólida, estes microjatos causam erosão na superfície da amostra e sua fragmentação, com o conseqüente aumento da transferência de massa e na eficiência da extração.⁷²

Na determinação de metais em amostras biológicas os elementos podem estar dentro da parede celular, que podem ser extraídos pelos efeitos combinados de ácidos diluídos e a energia do ultrassom. Nestas amostras, variáveis como a concentração de ácidos, o tamanho de partícula, o tempo e a amplitude das ondas ultrassônicas são importantes para que ocorra a extração completa dos analitos. No entanto, as condições para a extração devem ser cuidadosamente ajustadas, de modo a evitar a degradação dos compostos que serão determinados, especialmente as espécies organometálicas.^{19,68,90}

O tamanho de partícula em amostras biológicas tem grande influência sobre a exatidão e a precisão dos resultados obtidos com o tratamento da amostra.^{19,90} Estudos evidenciaram que extrações quantitativas com o auxílio de US para diversos elementos foram obtidas com um tamanho de partícula inferior a 50 μm .⁹¹ No entanto, diversos trabalhos foram feitos com amostras com tamanho de partícula inferior a 100 μm .^{8,90,92,93} No caso específico do mercúrio, extração quantitativa das suas espécies pode não ser a mesma, sendo, portanto, necessário a otimização das condições de extração para cada matriz específica.^{18,68}

Diversos trabalhos onde foi utilizada radiação US para a extração de espécies de Hg estão disponíveis na literatura. Segundo Houserová *et al.*³¹, a extração das espécies de Hg com o uso de US em amostra de peixe é influenciado pela concentração de L-cisteína, cuja eficiência é aumentada pela adição de HCl ao reagente. A extração ocorre, provavelmente, devido à liberação das espécies de Hg da ligação com as proteínas. No entanto, os autores observaram que essa associação não foi eficiente para extrair totalmente as espécies de Hg da amostra. Também observaram que a eficiência da extração por US aumenta com o aumento da concentração da solução de HCl, o que não foi observado quando estes testaram soluções de HCl em concentrações mais baixas. De acordo com esse estudo, o HCl mostrou-se mais eficiente na liberação das espécies de Hg das ligações com as proteínas, se comparados com outros agentes complexantes, devido a formação dos cloro-complexos.

Um procedimento para a determinação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , baseado na extração assistida por US em meio ácido foi proposto por Río-Segade e Bendicho.⁸ Nesse procedimento, o Hg^{2+} foi determinado no extrato ácido, contendo ambas as espécies de Hg, com o uso da redução seletiva utilizando cloreto estânico (SnCl_2), enquanto que o CH_3Hg^+ foi determinado separadamente nesse mesmo extrato, contendo apenas esta espécie, usando tetraidroborato de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Os resultados obtidos mostraram que o procedimento pode ser aplicado para tecidos de peixe, resultando em concentrações concordantes com a concentração de Hg total das amostras obtidas após decomposição em forno micro-ondas.

Krishna *et al.*¹⁸ avaliaram a eficiência de extração das espécies de Hg em amostras biológicas e ambientais utilizando a radiação US, para posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS), utilizando NaBH_4 como agente redutor. A concentração da solução extratora (HNO_3 e tiouréia), o tempo e a amplitude do US foram avaliados, utilizando os materiais de referência certificados IAEA350 (peixe), NIST-1633b (cinza de carvão), DORM-2 (músculo de peixe), DOLT-1 (fígado de peixe) e IAEA-336 (líquen). Os autores observaram que a eficiência de extração das espécies de Hg aumentou com o aumento das concentrações de HNO_3 e tiouréia, de modo que resultados quantitativos foram obtidos quando as soluções de HNO_3 5% (v/v) e tiouréia 0,02% (m/v), HNO_3 10% (v/v) e tiouréia 0,02% (m/v), e HNO_3 20% (v/v) e tiouréia 0,2% (m/v) foram usados para extrair as espécies de Hg de amostras de peixe, plantas e cinza de carvão, respectivamente. As eficiências de extração foram comparadas com os resultados obtidos por decomposição da amostra auxiliada por radiação micro-ondas. Dessa forma as condições otimizadas foram a amplitude de sonicação de 40% (para peixe e plantas) e de 50% (para carvão), e o tempo de sonicação em 3 min (para amostras de peixe e plantas) e 4 min (para carvão).

Além da extração das espécies de Hg, a radiação US pode ser usada para converter as espécies orgânicas de Hg, para posterior determinação como Hg^{2+} por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). Nesses trabalhos, a influência do tempo e da amplitude de sonicação sobre a conversão das espécies orgânicas de Hg é semelhante, sendo que a degradação completa desses analitos requer a presença de um meio contendo HCl.⁸⁹ Capelo *et al.*⁹⁴ observaram que as espécies orgânicas de Hg podem ser rapidamente oxidadas em amostras de

água pelo uso do US por 3 min, utilizando uma sonda de potência de 100 W com frequência de 20 kHz e utilizando amplitude de 40%, em meio de HCl 1,0 mol L⁻¹.

2.2.2.3. Extração assistida por micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, cuja frequência varia de 10 MHz a 3,0 GHz, que causam movimento molecular e rotação de dipolos e não afetam a estrutura molecular dos analitos, o que as caracteriza como uma radiação não ionizante.⁷² Dessa forma, a radiação micro-ondas utilizada em altas frequências (2,45 GHz) é fortemente absorvida por moléculas polares, como a água e os ácidos minerais, interagindo fracamente com compostos não polares ou fracamente polares.^{61,72}

A decomposição assistida por MW é um procedimento de preparo de amostras para a determinação de Hg total por diversas técnicas^{13,18,25,74,95}, devido à sua eficiência e rapidez, além da perda de Hg ser minimizada pelo fato de ser feito, geralmente, em frasco fechado.^{6,37,96,97} Os reagentes mais utilizados são o HNO₃ e o HCl, que podem ser acrescidos de H₂O₂ para auxiliar na dissolução de amostras de origem orgânica, como os alimentos.⁶

Diversos trabalhos descrevem o emprego da radiação MW para auxiliar na extração de espécies de Hg de amostras biológicas.^{13,18,25,75,95} Dentre eles, está o trabalho de Liang *et al.*⁷⁵, que estudaram um sistema automatizado, baseado no acoplamento da cromatografia a líquido, com decomposição da amostra por radiação MW e detecção por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS) para a determinação das espécies de Hg em peixe. O sistema está baseado na decomposição das espécies de Hg pós-coluna, auxiliada pela radiação micro-ondas (na presença de persulfato de potássio em meio de HCl) para aumentar a eficiência da conversão dos compostos orgânicos de Hg para Hg²⁺. Os autores avaliaram parâmetros que afetam a eficiência da decomposição e da separação dos compostos, sendo o método validado pelo uso de CRM (DORM-2), cujos resultados foram concordantes com o valor certificado.

A extração assistida por MW pode ser feita em sistemas abertos ou fechados. A extração em sistema aberto é geralmente feita em fornos com micro-ondas focalizadas.^{15,64} As extrações são feitas usando potências baixas, tipicamente 20 a 90 W e a pressão atmosférica, de modo que o tempo de exposição às MW deve ser

avaliado a fim de evitar perdas de analitos por volatilização.^{10,56,63} A extração com auxílio de MW em sistema fechado tem sido sugerida para contornar os problemas relacionados às perdas de Hg por volatilização.^{11,31,73} Dessa forma, a solução extratora, a massa de amostra, a temperatura e o tempo de irradiação de MW são parâmetros importantes que devem ser otimizados para se obter resultados quantitativos, sem que ocorra conversão das espécies.¹¹ Entre esses parâmetros, estudos mostraram que a temperatura e o tempo de exposição às MW têm maior influência sobre a extração dos analitos.^{73,85} Vásquez *et al.*⁷³ estudaram a eficiência da extração de CH_3Hg^+ em CRM (DORM-1 - músculo de peixe), utilizando a radiação MW em sistema fechado, para posterior determinação por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons (GC-ECD). As condições para a extração foram otimizadas de modo a obter uma maior eficiência na extração do analito, utilizando o mínimo de reagentes, menor tempo e temperatura. Os autores observaram que, para uma massa de amostra de 200 mg, a razão entre massa de amostra e volume da solução extratora foi o fator que mais influenciou na extração de Hg, cuja eficiência obtida foi melhor quando a razão massa de amostra/volume de reagente foi maior.

Um procedimento de extração assistida por MW, utilizando KOH metanólico a 25% (m/v) foi utilizado para extrair espécies de Hg de tecidos biológicos, com posterior detecção por cromatografia a líquido com oxidação ultravioleta pós-coluna com geração de vapor químico acoplado a espectrometria de fluorescência atômica (LC-UV-PCO-CV-AFS). As espécies orgânicas de Hg foram extraídas com KOH metanólico 25% (m/v), posteriormente extraídas com diclorometano, e re-extraídas com água para purificar o extrato alcalino. Este procedimento foi feito em forno de micro-ondas doméstico operado a potência de 90 W por 1 min. A exatidão do método foi verificada através da análise de CRM (TORT-2 e BCR 463), cujos resultados foram concordantes com os valores certificados.⁶³ Já Lin *et al.*²⁵ utilizaram a extração assistida por MW para extrair as espécies de Hg de cereais, no qual 1 g de amostra foi pesado e 10 mL da solução extratora contendo 2-mercaptoetanol 0,5% (v/v), em metanol 5% (v/v) foi adicionada. A mistura foi aquecida até temperatura máxima de 60 °C por 3 min, com rampa de aquecimento de 2 min, e as espécies de Hg foram determinadas por LC-CVG-ICP-MS, sendo que os resultados foram concordantes com a quantidade de Hg total, determinados por CVG-ICP-MS. Além disso, um procedimento para a extração de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ de tecido de peixe,

em meio extrator contendo HCl e NaCl, utilizando a radiação MW foi proposto por Reyes *et al.*¹¹ Diversos parâmetros foram avaliados, entre eles a composição da solução extratora, a massa de amostra, a temperatura de irradiação e o tempo de extração. Os autores observaram que as espécies de Hg foram extraídas com solução de HCl 5,0 mol L⁻¹ e NaCl 0,25 mol L⁻¹, com aquecimento por MW a 60 °C durante 10 min. A determinação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ foi feita por LC-ICP-MS e o Hg total por CVG-ICP-MS. Além disso, a análise por diluição isotópica (ID) foi usada para verificar a exatidão dos resultados e para avaliar possíveis conversões das espécies de Hg na amostra estudada. Os autores observaram que não houve conversão das espécies de Hg quando o método proposto foi usado em amostras biológicas.

Margetínová *et al.*⁸⁵ utilizaram a extração assistida por MW para extrair espécies de Hg de amostras ambientais, seguido de pré-concentração por extração em fase sólida (SPE), para posterior determinação por LC-CV-AFS. Para tanto, os autores avaliaram a eficiência de extração de diversas soluções, baseados no uso de soluções de HCl e HNO₃, em potência fixa de 500 W e temperatura de 45 °C por 10 min. Concluíram que o meio extrator mais apropriado para a extração de espécies Hg nessas amostras foi a mistura de HCl 3,0 mol L⁻¹, metanol 50% (v/v) e ácido cítrico 0,2 mol L⁻¹. Essa solução extratora também foi escolhida por auxiliar na solubilização do 2-mercaptoetanol, que foi utilizado para pré-concentrar a amostra em SPE. Dessa forma, com o procedimento proposto, foram obtidos resultados quantitativos para as espécies de Hg nessas amostras, de forma que não foi observada conversão de espécies durante o procedimento.

2.3. TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg

A análise de especiação de mercúrio geralmente utiliza o acoplamento entre uma técnica de separação, como a cromatografia a gás^{20,98} ou a líquido^{14,15,43,62,63,85} e um detector específico ou seletivo para o elemento.^{36,57,99} Os procedimentos de separação por LC geralmente baseiam-se em interações das espécies de Hg com agentes complexantes, como o 2-mercaptoetanol^{31,100}, a L-cisteína¹³, a mistura desses dois reagentes¹⁵, ou ainda, a ditizona e seus derivados, o dietilditiocarbamato (DDTC) e o pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC)¹⁰¹. Ainda podem ser usadas substâncias que apresentam interações de par iônico,

como o brometo de tetrabutilamônio (TBA) na presença de NaCl⁷⁵, fosfato de tetrabutilamônio (PIC-A) e pentanossulfonato de sódio (PIC-B5).¹⁰²

Entre as técnicas de detecção usadas em análise de especiação de Hg pode-se citar a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS)^{8,10,18,37,82,93}, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)^{21,74,103}, a espectrometria de fluorescência atômica (AFS)^{31,43,63,85,98,104,105}, a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-AES)¹⁰⁶ e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)^{11,14,15,62}, com a qual se pode obter informação isotópica.^{7,11,20,23} Essas técnicas podem ser hifenadas diretamente com o sistema de separação das espécies de Hg ou podem ser acopladas com a geração química de vapor (CVG), cujo objetivo, geralmente, é de melhorar o limite de detecção da técnica de detecção.^{8,10,15,25,74,93} O acoplamento da LC com a ICP-MS tem ganhado muita atenção nos últimos anos para a análise de especiação de Hg, devido a possibilidade de separar as espécies sem a necessidade de derivatização prévia, além de possibilitar a operação do equipamento a temperatura ambiente, à simplicidade do interfaceamento e à possibilidade da análise isotópica.¹¹

2.3.1. Cromatografia a líquido

A LC é uma técnica cromatográfica baseada em diferentes mecanismos de separação, podendo ser utilizadas diferentes fases móveis e fases estacionárias, e aplicada para a separação de diversos analitos biologicamente e ambientalmente importantes.¹⁰⁷ Quando acoplada com a técnica de ICP-MS deve-se levar em conta que fases móveis com alta concentração salina podem causar problemas de deposição de sais no cone de amostragem e *skimmer* do espectrômetro de massa, podendo alterar a sensibilidade da técnica. O uso de solventes orgânicos pode causar instabilidade no plasma ou até mesmo extingui-lo, devido ao carregamento excessivo do plasma com o solvente.^{58,102,108,109}

As colunas de fase reversa^{7,22} e as de troca iônica⁴⁰ podem ser utilizadas para a separação das espécies de Hg. Entretanto, a preservação das espécies de interesse influencia na escolha do mecanismo de separação e dos reagentes que serão utilizados em LC.^{57,110} Vallant *et al.*⁴⁰ usaram uma coluna trocadora de cátions para separar espécies de Hg em CRM's (DORM-2 e DOLT-3), após a extração das

espécies com solução de HCl 5,0 mol L⁻¹. A fase móvel foi composta por piridina 50 mmol L⁻¹, L-cisteína 0,5% (m/v) e metanol 5% (v/v), em pH 2,0, cuja separação das espécies de interesse ocorreu em menos de 10 min. Nesse tipo de cromatografia, a seletividade, o tempo de retenção e o grau de ionização dos analitos dependem do pH e a separação é baseada na “competição” entre os íons da fase móvel, os íons de interesse e a sua interação com a fase estacionária.¹⁰²

A separação das espécies de Hg por fase reversa é o mecanismo de separação mais comum em LC e consiste de uma fase estacionária não polar [normalmente grupos octadecil (C₁₈) ou octil (C₈)] ligada a um suporte sólido de sílica gel microparticulada. As fases móveis têm características mais polares, e os analitos são, então, particionados entre essas duas fases. A separação é normalmente conduzida com fases móveis contendo quantidades diferentes de solventes orgânicos para aumentar a seletividade entre as espécies. A retenção dos analitos é também influenciada pelo pH da fase móvel, que afeta a dissociação dos mesmos e também a sua interação com a fase estacionária.¹⁰⁷ As espécies de elementos ligadas covalentemente a compostos orgânicos são ideais para serem separadas por este mecanismo. Nesse caso, os analitos devem ser estáveis nas fases móveis contendo solventes orgânicos ou compostos ácidos. Além disso, o pH da fase móvel deve ser controlado, para que as separações sejam reprodutivas, necessitando-se muitas vezes do uso de tampões de pH.¹¹⁰

Diversos tipos de fases móveis foram usados em trabalhos de especificação de Hg, cuja composição baseia-se no uso de um agente complexante, um solvente orgânico e um tampão de pH. Os reagentes complexantes, como a L-cisteína e o 2-mercaptoetanol, ou agentes de par iônico são empregados na separação dos compostos de Hg por fase reversa para aumentar a eficiência da separação cromatográfica e para evitar a adsorção das espécies na fase estacionária.^{85,111} Além disso, a presença desses reagentes é importante para a separação dos compostos de Hg, quando se utiliza coluna C₁₈, devido à sua capacidade de estabilizar as espécies que serão determinadas.⁸⁵

O uso de metanol como constituinte da fase móvel é necessário para a separação das espécies e diminuir o tempo de retenção de cada uma delas. Foi demonstrado que os tempos de retenção das espécies de Hg diminuem com o aumento da concentração do reagente. No entanto, a separação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺

piora quando a concentração deste solvente é superior a 5% (v/v).²⁵ Vallant *et al.*⁴⁰ comprovaram essas afirmações em seu trabalho, concluindo que além das interações catiônicas, resultantes do uso da coluna catiônica para a separação das espécies de Hg, podem ocorrer interações entre a fase estacionária e os compostos pouco polares do elemento. Chang *et al.*¹⁷ observaram que a separação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ diminuiu quando a concentração de metanol foi maior do que 12% (v/v). Diferentemente da observação dos trabalhos mencionados, Margetínová *et al.*⁸⁵ utilizaram coluna C_{18} e fase móvel constituída por metanol 65% (v/v) para separar espécies de Hg contidas em amostras ambientais, cuja separação foi conseguida em 30 min para quatro espécies de Hg.

Shi *et al.*⁴³ separaram espécies de Hg em coluna C_{18} utilizando fase móvel contendo acetonitrila (10 mL), 2-mercaptoetanol (25 μL) e acetato de amônio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ (10 mL) em 500 mL de água. Enquanto que Cattani *et al.*⁷¹ usaram fase móvel contendo metanol 3% (v/v) ao invés de acetonitrila, seguido dos demais reagentes usados por Shi *et al.*⁴³, para separar as espécies de Hg em coluna C_{18} . Neste trabalho foi possível acoplar diretamente a coluna cromatográfica ao instrumento de ICP-MS, em virtude da baixa concentração de metanol, que, segundo os autores, não causou interferência na determinação de Hg.

Lin *et al.*²⁵ fizeram uso de uma fase móvel contendo 2-mercaptoetanol 0,5% (v/v) e metanol 5% (v/v) para a separação das espécies de Hg de cereais, utilizando para isso uma coluna C_8 .

Ainda pode ser utilizada fase móvel contendo dois agentes complexantes, como o 2-mercaptoetanol e a L-cisteína, como a utilizada por Chiou *et al.*¹⁵ Os autores observaram que apenas com o uso da L-cisteína não era possível separar completamente as espécies de Hg na coluna C_8 e apenas o uso de 2-mercaptoetanol proporcionava tempos de retenção muito longos, fato que os levou a usar a mistura de ambos os reagentes. Com isso conseguiram uma melhor separação, com menor de tempo de retenção dos analitos.

O uso da L-cisteína na fase móvel, no lugar de 2-mercaptoetanol, também é citado na literatura. Reyes *et al.*⁷ usaram uma fase móvel composta por L-cisteína 0,5% (m/v), piridina 50 mmol L^{-1} e metanol 5% (v/v) para determinar espécies de Hg em CRM (ERM-CE464; *Tuna Fish Tissue*), utilizando diversos meios de extração e posterior determinação por cromatografia a líquido acoplada a LC-SIDMS. Em outro

trabalho¹¹ foi utilizado a fase móvel anteriormente citada para a separação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em tecido de peixe em solução extratora de HCl e NaCl.

O uso de reagentes complexantes de Hg também pode provocar problemas na determinação das espécies, como o aumento da intensidade da linha base, resultante da contaminação do reagente usado. Palenzuela *et al.*⁹⁹ observaram isso no seu trabalho, demonstrando que uma concentração muito alta de L-cisteína aumenta a linha base, o que piora o limite de detecção (LD) do método. De acordo com Chang *et al.*¹⁷, o aumento da concentração de L-cisteína na fase móvel reduziu os tempos de retenção das espécies de Hg. No entanto, a linha base para o elemento aumentou com o aumento da concentração do reagente.

O emprego de fases móveis sem a presença de solventes orgânicos constitui uma alternativa para a determinação das espécies de Hg por ICP-MS, além de proporcionar uma boa separação cromatográfica das espécies. Fases móveis contendo 0,1% (m/v) de L-cisteína e 0,1% (m/v) de L-cisteína¹³ e L-cisteína 0,25% (m/v) em pH 4,7⁹⁹ foram usadas para a separação das espécies de Hg em amostras biológicas. Wan *et al.*²⁴ determinaram compostos orgânicos e inorgânicos de Hg em CRM (água do mar; NASS-4) por LC-CVG-ICP-MS, utilizando fase móvel contendo L-cisteína 0,5% (m/v). Recentemente, Rahman *et al.*²³ utilizaram fase móvel contendo L-cisteína 0,4% (m/v) para avaliar diferentes métodos de extração das espécies de Hg e suas transformações em cabelo humano.

2.3.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A concentração de contaminantes em alimentos é de grande interesse, devido ao perigo que estas substâncias representam à saúde humana. No sentido de assegurar a qualidade dos alimentos, o monitoramento dessas substâncias através de técnicas analíticas sensíveis, com capacidade multielementar e com a possibilidade de determinar espécies químicas tornou a ICP-MS a técnica de escolha para a determinação de elementos essenciais e tóxicos nesses produtos.¹¹⁴

O espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado é constituído por um sistema de introdução de amostra, o plasma indutivamente acoplado (ICP), que opera a temperaturas de 6000 a 9000 K e é mantido por um gerador de radiofrequência de 27 ou 40 MHz, a interface, o separador de massas, o

detector e um sistema de aquisição de dados.¹⁰⁸ O plasma é capaz de gerar íons positivamente carregados (M^+), os quais são amostrados pela interface e separados no espectrômetro de massa. A amostra, que geralmente está na forma líquida, é introduzida no plasma por um sistema de nebulização pneumática. No espectrômetro de massa, os íons M^+ são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e conduzidos até o detector.^{108,115-118}

Entre as características da técnica de ICP-MS estão a capacidade multielementar de análise, a possibilidade de determinação isotópica, relativamente poucas interferências espectrais e obtenção de baixos LD (na faixa de $ng\ g^{-1}$ ou $pg\ g^{-1}$). Estas características fazem com que a técnica seja atualmente uma das mais usadas como detector para a especificação de Hg.^{58,109,110}

2.4. GERAÇÃO DE VAPOR QUÍMICO

A geração de vapor químico (CVG) é um método de derivatização, que se baseia na formação de espécies voláteis a partir da reação de redução do Hg por reagentes redutores como o cloreto estânico ($SnCl_2$) e o tetraidroborato de sódio ($NaBH_4$).^{8,61} As principais vantagens de usar o CVG após a coluna cromatográfica é melhorar o limite de detecção da técnica e reduzir os efeitos de matriz da amostra.¹⁵

Na CVG, é importante considerar que a eficiência de geração de vapor de Hg pode não ser a mesma para todas as espécies do elemento presentes na amostra, resultando em intensidades de sinal diferentes para a mesma concentração de Hg das espécies.^{15,24,36,90} Além disso, a linha base para Hg pode aumentar quando a CVG é usada para a introdução de amostras no espectrômetro de massa, principalmente devido à contaminação do elemento nos reagentes utilizados na fase móvel e no próprio reagente; à melhor eficiência de transporte do analito com esse sistema de introdução de amostra, ou ainda ao efeito de memória resultante do sistema CVG.⁹⁹ Por isso, o uso de reagentes de alta pureza é importante no sentido de reduzir os limites de detecção da técnica.¹⁵

Durante a CVG com $NaBH_4$, empregando condições bem definidas, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0 , enquanto que o CH_3Hg^+ forma CH_3HgH . A especificação por CVG já foi considerada inadequada, porque a ligação Hg-H é instável. Porém, o tempo de meia vida do CH_3HgH é de cerca de duas horas, o que é suficiente para sua determinação, segundo Felippelli *et al.*¹¹²

Alguns cuidados devem ser tomados em relação às interferências neste método, como a de alguns metais de transição, metalóides e do cloreto, que podem, em certos casos, impedir a determinação das espécies de Hg. Nesses casos, a derivatização deve ser feita em atmosfera inerte e em meio ácido (pH 1,0 ou 2,0) para evitar a redução do CH_3Hg^+ para Hg^0 .¹¹³

Diversos trabalhos de determinação de Hg por CVG acoplados a detectores específicos estão disponíveis na literatura.^{8,15,31,43,74,82,95} Entre esses estudos, um sistema CVG para introdução de amostras utilizado para determinação de espécies de Hg por LC-ICP-MS foi descrito por Wan *et al.*²⁴

3. OBJETIVO

Levando-se em consideração o que foi exposto anteriormente, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de método para a especiação de Hg em cogumelo comestível. Para tal, foram avaliados diferentes procedimentos de preparo de amostra de cogumelo para a determinação de espécies de mercúrio inorgânico (na forma de Hg^{2+}) e orgânico (na forma de metilmercúrio - CH_3Hg^+) nesse material. A extração convencional, o uso de radiação micro-ondas e ultrassom, combinados com diversos solventes (água, soluções de ácido clorídrico e L-cisteína) foram testados como meios extratores. A LC-CVG-ICP-MS foi usada para a separação e quantificação das espécies de Hg, e o Hg total foi determinado por CVG-ICP-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é feita a descrição dos procedimentos empregados para a extração das espécies de mercúrio em amostras de cogumelos, assim como os procedimentos utilizados para a análise de especiação de Hg usando LC-CVG-ICP-MS. Também são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

4.1. INSTRUMENTAÇÃO

Para a separação das espécies de mercúrio foi utilizado um sistema cromatográfico, composto por uma bomba quaternária para LC (modelo Series 200, PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>, EUA) equipado com uma válvula injetora Rheodyne[®] (modelo 7725i, <http://www.rheodyne.com>, EUA), uma alça de amostragem de poli(etercetona) (PEEK), com capacidade de 200 μL , um degaseificador a vácuo (modelo Series 200 Vacuum Degasser, PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>, EUA) e uma coluna de fase reversa (Spherisorb[®] ODS2, 250 mm x 4 mm de diâmetro interno, 5 μm de diâmetro de partícula, Waters, <http://www.waters.com>, EUA). A vazão da fase móvel foi mantida em 1,0 mL min^{-1} , em condições isocráticas. A injeção das soluções na alça de amostragem do cromatógrafo foi feita com uma seringa (Henke-Sass Wolf GmbH, <http://www.henkesasswolf.de>, Alemanha) com capacidade para 1 mL. Foram utilizados tubos de PEEK (Upchurch Scientific, <http://www.upchurch.com>, EUA) com 254 μm de diâmetro interno para conectar a coluna cromatográfica com a bomba do LC.

A saída da coluna de LC foi conectada a um sistema contínuo de geração de vapor químico, sendo que uma bomba peristáltica de oito canais Gilson[®] (modelo Minipuls 3, <http://www.gilson.com>, França) foi utilizada para a propulsão das soluções, e tubos de Tygon[®] azul/verde (1,75 mm de diâmetro interno, <http://www.tygon.com>, França), vermelho/vermelho (1,14 mm de diâmetro interno, <http://www.tygon.com>, França) e polietileno (0,8 mm de diâmetro interno) foram utilizados para conduzir as soluções de HCl (solução carregadora) e de NaBH_4 (reduzora), respectivamente, a um separador gás-líquido. Adicionalmente, duas confluências de acrílico foram utilizadas para a construção do sistema de geração de vapor químico, uma para conectar a saída da coluna de LC e a solução carregadora, e outra, para conectar a mistura das soluções anteriores com a solução reduzora. O vapor das espécies de Hg gerado foi introduzido diretamente no equipamento de ICP-MS por um fluxo de argônio (99,998% de pureza, *White Martins*, <http://www.praxair.com>, Brasil), utilizado como gás de arraste. O controle da vazão de argônio foi feito através do *software* do equipamento de ICP-MS, uma vez que é o mesmo gás usado como gás de nebulização, quando o sistema de nebulização convencional é utilizado.

A determinação de mercúrio foi feita em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado da PerkinElmer SCIEX (modelo ELAN[®] DRC II, <http://www.perkinelmer.com>, Canadá), equipado com uma tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno e cones de níquel. A avaliação e os ajustes das principais condições de operação do equipamento de ICP-MS foram feitos diariamente, de modo a se obter a maior razão sinal/ruído para Hg (usando ²⁰²Hg). As condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais do sistema LC-CVG-ICP-MS.

Parâmetros	Condições
LC	
Coluna	C ₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm)
Fase móvel (L-cisteína), % (m/v)	0,1 (pH 4,0)
Vazão da fase móvel, mL min ⁻¹	1,0
Volume de injeção, µL	200
CVG	
Solução carregadora (HCl), mol L ⁻¹	1,0 (3,5 mL min ⁻¹)
Solução redutora (NaBH ₄), % (m/v)	0,25 (2,0 mL min ⁻¹)
Vazão do gás de arraste (Ar), L min ⁻¹	1,20
ICP-MS	
Potência de RF, W	1300
Gás do plasma, L min ⁻¹	15
Gás auxiliar, L min ⁻¹	1,2
Cone de amostragem e "Skimmer"	Ni
m/z monitorado	202
"Readings"	1422
"Dwell time", MS	250
Lente iônica	"Auto lens off"
Modo de medida	"Peak hopping"
Modo de operação do detector	"Dual"

Na Figura 1 está representado um esquema do sistema LC-CVG-ICP-MS utilizado neste trabalho.

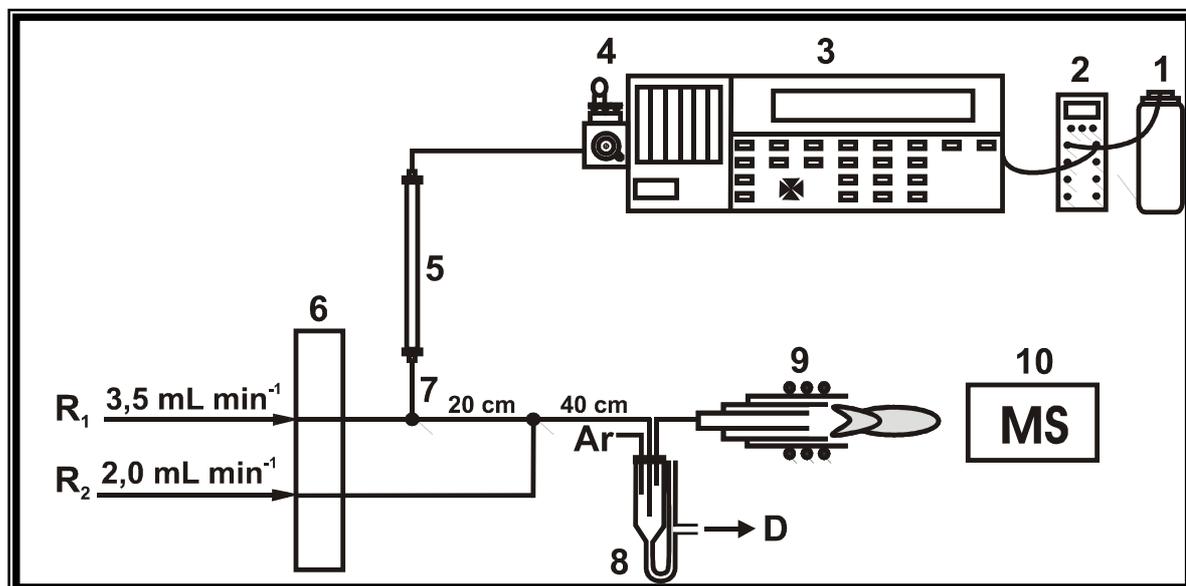


Figura 1. Esquema do sistema LC-CVG-ICP-MS. 1. Fase móvel; 2. Degaseificador a vácuo; 3. Bomba cromatográfica; 4. Injetor e alça de amostragem (200 μ L); 5. Coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 μ m), 6. Bomba peristáltica; 7. Confluências; 8. Separador gás-líquido (L = 10 cm; diâmetro interno = 1,5 cm); 9. Tocha e plasma; 10. Espectrômetro de massa, R_1 . Solução carregadora (HCl), R_2 . Solução redutora ($NaBH_4$).

Todas as pesagens foram feitas em balança analítica Shimadzu (modelo AY220, <http://www.shimadzu.com.br>, Filipinas) com resolução de 0,0001 g e tara máxima de 220 g. Uma centrífuga Nova Técnica (modelo NT 810, <http://www.novatecnica.com.br>, Brasil) com capacidade para 16 frascos de 15 mL ou 4 frascos de 50 mL foi utilizada para as centrifugações das soluções das amostras após as extrações. A secagem e a cominuição das amostras de cogumelos foram feitas em liofilizador Terroni (modelo LH2000/3, <http://terrioni.com.br>, Brasil) e moinho criogênico Spex Certiprep[®] (modelo 6750 Freezer/Mill, <http://www.spexcsp.com>, EUA). Após a cominuição, as amostras foram peneiradas em peneira com malha de 100 μ m de diâmetro de partícula.

Para os ajustes de pH das amostras foi utilizado um potenciômetro digital Metrohm (modelo 781 pH/Ion Meter, <http://www.metrohm.com.br>, Suíça) com resolução de 0,001 unidades de pH, equipado com um eletrodo de vidro combinado Metrohm (modelo 6.0258.010) e com sensor de temperatura.

A decomposição das amostras de cogumelos para a determinação de Hg total foi feita em forno de micro-ondas Milestone (modelo Ethos-1[®], <http://www.milestonesrl.com>, Itália). As extrações das espécies de mercúrio foram feitas em um equipamento de ultrassom Fisher Sonic Dismembrator[®] (Fisher Scientific, model 100, 20 kHz, 100 W, <http://www.fishersci.com>, EUA) equipado com uma sonda constituída de liga de titânio (Ti-6Al-4V) (Fisher Scientific, com ponta de 3,17 mm de diâmetro e 127 mm de comprimento), e um forno de micro-ondas Anton Paar (modelo Multiwave[®] 3000, <http://www.anton-paar.com>, Áustria).

4.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada, deionizada em uma coluna de troca iônica e posteriormente purificada em um sistema Milli-Q[®] (Millipore, <http://www.millipore.com>, EUA), com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm⁻¹. Os ácidos nítrico concentrado (P.A., 65%, 1,4 kg L⁻¹, Merck, <http://www.merck.de>, Alemanha) e clorídrico concentrado (P.A., 37%, 1,19 kg L⁻¹, Merck) foram purificados usando um sistema de sub-ebulição Milestone (modelo duoPUR[®] 2.01E, <http://www.milestonesrl.com>, Itália).

A solução estoque de Hg²⁺ (1000 mg L⁻¹) foi preparada a partir de uma solução Titrisol[®] (Merck, (Hg(NO₃)₂ Cat. N°1.09969, com 1000 ± 0,002 mg L⁻¹ de Hg em HNO₃ 2% (v/v)). A solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ foi preparada a partir da dissolução de CH₃HgCl (pureza de 98% (m/m), <http://www.sigmaaldrich.com>, EUA) em metanol e armazenada a 4 °C, ao abrigo da luz. Soluções estoque de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ contendo 1,0 mg L⁻¹ de Hg em HCl 1,0 mol L⁻¹ foram preparadas a partir das soluções estoque de 1000 mg L⁻¹. Estas soluções foram armazenadas (por no máximo 30 dias) a 4 °C e protegidas da luz. Soluções apropriadas de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição das soluções de 1,0 mg L⁻¹ de Hg em água.

As soluções de ácido clorídrico foram preparadas a partir da diluição do ácido concentrado em água. As soluções de tetrahidroborato de sódio (NaBH_4) (P.A., pureza mínima de 97%, Nuclear, <http://www.caq.com.br>, Brasil) foram preparadas diariamente pela dissolução do reagente sólido em solução de NaOH (pureza mínima de 99%, Vetec, <http://www.vetecquimica.com.br>, Brasil) 0,1% (m/v).

A fase móvel (L-cisteína 0,1% (m/v))¹³ foi preparada diariamente pela dissolução do reagente L-cisteína.HCl.H₂O (pureza mínima de 98%, Sigma Aldrich) em água. O pH da fase móvel foi ajustado com NH₄OH (concentração mínima 25% (v/v) de NH₃, Merck). Soluções tampão, com valores de pH $4,0 \pm 0,02$ (20 °C) e $7,0 \pm 0,02$ (20 °C), utilizadas para a calibração do potenciômetro, foram adquiridas da Merck (CertiPUR®).

Solução de metanol grau HPLC (pureza mínima de 99,9%, Carlo Erba, <http://www.carloerbareagenti.com>, Itália) a 20% (v/v) foi preparada pela diluição do solvente em água, e utilizada para a limpeza diária da coluna C₁₈.

4.3. MATERIAIS DIVERSOS

O separador gás-líquido (G/L) utilizado foi construído no Laboratório de Hialotecnica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Todos os materiais de vidro utilizados neste trabalho foram descontaminados por imersão em solução de HNO₃ 20% (v/v) por 24 h e, posteriormente, enxaguados com água.

Os extratos obtidos após as extrações foram acondicionados em frascos de polipropileno (Sarstedt, <http://www.sarstedt.com>, Alemanha) com fundo cônico, graduados, com capacidade máxima de 15 mL e/ou 50 mL.

O software WINFAAS (EUA) foi utilizado para a integração da área dos sinais cromatográficos.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Software®, Inc. (*InStat* 2.1). A comparação das médias foi feita através do cálculo do grau de confiança de Student (*t*), ao nível de confiança de 95%.

4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO SISTEMA LC-CVG-ICP-MS

O sistema LC-CVG-ICP-MS foi otimizado, tendo-se em vista a obtenção da melhor razão sinal/ruído para ^{202}Hg . A concentração da solução NaBH_4 foi variada entre 0,1 e 0,8% (m/v), mantendo-se a concentração de NaOH em 0,1% (m/v). A concentração de HCl (carregador) foi estudada entre 0,5 e 2,0 mol L^{-1} (v/v). Além disso, as vazões dos reagentes também foram avaliadas. Para tanto, variou-se a vazão do HCl entre 3,5 e 7,5 mL min^{-1} , e a vazão de NaBH_4 entre 2,0 e 4,0 mL min^{-1} . A influência da vazão de Ar sobre o sinal analítico do ^{202}Hg foi avaliada entre 1,0 e 1,2 L min^{-1} .

4.4.1. Escolha da fase móvel

O tipo de fase móvel foi avaliado levando-se em conta que essa influencia na separação das espécies de Hg . Dessa forma, baseado em trabalhos anteriores, soluções constituídas por 2-mercaptoetanol, metanol e acetato de amônio^{14,119}, L-cisteína e piridina⁴⁰ e solução de cisteína¹³ foram testadas como fases móveis. Estas fases móveis foram testadas em vista de que foram observados alguns problemas, tanto relacionados à separação cromatográfica das espécies de Hg , como em relação a deterioração da coluna.

Cada fase móvel foi avaliada variando-se a concentração dos reagentes, o pH e a vazão, de modo a obter a melhor condição de cada uma das fases móveis testadas, em termos de separação cromatográfica e tempo de retenção das espécies de Hg .

4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

Cinco espécies de cogumelos comestíveis, adquiridas no mercado local, foram utilizadas para este trabalho. Uma foto de cada uma destas espécies está mostrada na Figura 2.



Figura 2. Espécies de cogumelos comestíveis utilizadas para a análise de especiação de Hg. (a) *Agaricus bisporus*; (b) *Pleurotus citrinopileatus*; (c) *Pleurotus eryngii*; (d) *Pleurotus ostreatus*; (e) *Pleurotus djamor*.

As amostras de cogumelos foram liofilizadas⁸⁵ durante 24 h e cominuídas em um moinho criogênico. O programa utilizado para a cominuição consistiu de uma etapa de pré-congelamento da amostra por 1,5 min e uma etapa de moagem por 2,0 min. Após a cominuição, as amostras foram peneiradas para a obtenção de um tamanho de partícula inferior a 100 μm ^{8,17,90} e acondicionadas em frascos de vidro âmbar previamente descontaminados.

Devido à indisponibilidade de material de referência certificado (CRM) com características semelhantes ao da amostra estudada, tanto em relação à Hg total como para as diferentes espécies, a exatidão dos métodos de extração estudados foi verificada com o uso do CRM *dogfish liver* (DOLT-3), adquirido do *National Research Council of Canada* (<http://www.nrc-cnrc.gc.ca>, Canadá). Para isso, os mesmos procedimentos usados para o tratamento das amostras foram adotados para o CRM, porém, devido a maior concentração de Hg neste material foi utilizado uma massa menor (50 mg) em relação à usada para a extração de Hg em cogumelos (500 mg).

4.5.1. Procedimento usado para a determinação de mercúrio total em cogumelos

As amostras foram decompostas em forno de micro-ondas para a determinação de Hg total por CVG-ICP-MS. Cerca de 400 mg de amostra seca foram pesados e transferidos para o copo de politetrafluoretileno modificado (TFM™-PTFE) do forno de micro-ondas Ethos-1. Foi feita a adição de 8 mL de HNO₃ concentrado e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas para facilitar a decomposição da amostra. Após esta etapa, os frascos foram fechados e submetidos ao programa de aquecimento mostrado na Tabela 2, o qual foi adaptado de um procedimento recomendado pelo fabricante.¹²⁰

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno de microondas utilizado para a decomposição de cogumelos. Temperatura máxima: 176 °C; pressão máxima: 30 bar. (adaptado de 120).

Etapa	Tempo, min	Temperatura, °C	Potência, W
1	5	100	1000
2	2	100	1000
3	5	150	1000
4	2	150	1000
5	10	180	1000
6	5	180	1000
7	20	-	0

Após o resfriamento, a solução obtida foi transferida para um frasco de polipropileno com capacidade para 50 mL e o volume completado a 30 mL com água. Os brancos e o CRM foram preparados de maneira idêntica, porém usando apenas 50 mg do CRM.

4.5.2. Procedimento usado para a extração das espécies de Hg assistida por ultrassom

Soluções de HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L⁻¹ (adaptados de Ríó-Segade e Bendicho⁸, L-cisteína 1,0% (m/v) (adaptado de Hight e Cheng¹³) e água foram estudados como meios extratores das espécies de Hg. A solução de L-cisteína foi previamente purificada com NaBH₄ 0,1% (m/v) e colocada por cerca de 40 min em banho de ultrassom para a eliminação do excesso de reagente adicionado para a purificação. Essa prática foi adotada durante todo o trabalho, tendo-se em vista os altos valores de brancos obtidos em estudos preliminares. É importante mencionar que apenas esses reagentes foram utilizados por serem os mais indicados para extração de Hg.

O comportamento das espécies de Hg nesses meios foi avaliado utilizando-se soluções referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ na concentração de 1,0 µg L⁻¹ (como Hg), nas mesmas condições de extração. Essa concentração foi escolhida, tendo-se em vista que as concentrações de Hg presentes nas amostras, em solução, eram de, no máximo 1,0 µg L⁻¹.

Para os procedimentos de extração das espécies de Hg, cerca de 500 mg de amostra de cogumelo seco foram transferidos para frascos de polipropileno de 15 mL e foi feita a adição de 6 mL do meio extrator. Esta mistura foi submetida a tratamento com US por 1 min, sob diferentes amplitudes (10, 20 ou 30%). Após esta etapa, o pH da solução foi ajustado para 4,0 com NH₄OH concentrado ou solução a 10% (v/v) e o volume final completado para 15 mL com água. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm e filtrada através de um filtro de acetato de celulose com 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro, previamente à injeção no cromatógrafo a líquido. Os brancos e o material de referência certificado (50 mg) foram preparados de maneira idêntica.

4.5.3. Procedimento usado para a extração das espécies de Hg assistida por micro-ondas

As soluções de HCl⁸ 1,0; 3,0 e 6,0 mol L⁻¹, L-cisteína 1,0% (m/v)¹³ e água também foram usadas para a extração das espécies de Hg auxiliada por radiação micro-ondas, em sistema fechado. Cerca de 500 mg de amostra de cogumelo foi transferida para o copo de quartzo do forno de micro-ondas e 6 mL (volume mínimo de solução recomendado pelo fabricante do forno de micro-ondas¹²¹) da solução extratora foram adicionados. A potência de irradiação foi selecionada em 500 W⁸⁵, e o programa de irradiação consistiu de uma rampa de aquecimento de 5 min até atingir as temperaturas máximas de 60, 80, 100 ou 120 °C, permanecendo nessas temperaturas por mais 5 min, respectivamente. Após o resfriamento de 20 min, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno com capacidade de 50 mL. O pH foi ajustado para 4,0 com solução de NH₄OH concentrada ou a 10% (v/v) e o volume final completado para 15 mL com água. O extrato foi centrifugado por 10 min a 3000 rpm, diluído e filtrado através de filtro de acetato de celulose com tamanho médio de poro de 0,45 µm previamente à injeção no cromatógrafo a líquido.

O comportamento das espécies de Hg nos diferentes meios extratores estudados também foi avaliado nas mesmas condições de extração, utilizando-se apenas soluções referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ na concentração de 1,0 µg L⁻¹ (como Hg). O mesmo tratamento foi usado para extrair as espécies de Hg do material de referência certificado (50 mg) e para preparar os brancos.

4.5.4. Procedimento usado para a extração convencional das espécies de Hg

A extração convencional também foi avaliada, tendo em vista ser um método bastante utilizado para a extração de diversos elementos de amostras ambientais.^{14,23,83} Para isso, os mesmos meios extratores (soluções de HCl, L-cisteína e água) estudados anteriormente foram utilizados. Uma massa de 500 mg de amostra de cogumelo foi pesada em um frasco de polipropileno de 50 mL e 6 mL do reagente extrator foi adicionado. A mistura foi agitada manualmente por cerca de 1 min e deixada em repouso por 1, 6 e 12 h. Após os respectivos tempos de extração, o pH do extrato foi ajustado para 4,0 com soluções de NH₄OH concentrada

ou a 10% (v/v) e o volume completado para 15 mL com água. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 10 min a 3000 rpm, diluídas e filtradas com filtro de acetato de celulose com 0,45 µm de tamanho de poro previamente à determinação por LC-CVG-ICP-MS. Assim como nos estudos anteriores, o comportamento das espécies de Hg nos meios extratores estudados também foi avaliado nas mesmas condições de extração, utilizando-se apenas soluções referências de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ na concentração de 1,0 µg L⁻¹ (como Hg), e o mesmo tratamento foi usado para extrair as espécies de Hg do material de referência certificado (50 mg) e para preparar os brancos.

4.6. AVALIAÇÃO DA MASSA DE AMOSTRA PARA A EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg

A partir dos testes preliminares nas condições utilizadas foi verificado que a L-cisteína foi o melhor meio extrator. Desta forma, somente a eficiência de extração das espécies de Hg das amostras de cogumelo em meio extrator de L-cisteína 1,0% (m/v) foi avaliada para diferentes massas de amostra. Para isso, a massa de amostra foi variada entre 250 e 1000 mg, mantendo-se constante o volume do reagente extrator (6 mL) em virtude de este ser o volume mínimo recomendado pelo fabricante do forno de micro-ondas.¹²¹ Esse estudo foi aplicado para os três métodos de extração avaliados (extração assistida por ultrassom, micro-ondas e convencional).

4.7. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE L-CISTEÍNA PARA A EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg

A eficiência da concentração do meio extrator L-cisteína também foi avaliada. Para isso, a concentração foi variada entre 0,1 e 1,0% (m/v), utilizando-se para cada concentração estudada cerca de 500 mg de cogumelo e 6 mL da solução extratora, seguido dos mesmos procedimentos anteriormente descritos para o preparo da amostra. Esse estudo também foi aplicado para os três métodos de extração estudados (extração assistida por ultrassom, micro-ondas e convencional).

4.8. AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

A eficiência dos métodos de extração foi avaliada através de ensaio de recuperação das espécies de mercúrio (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) nas amostras e pela determinação de Hg total e CH_3Hg^+ no material de referência certificado (DOLT-3). Para o ensaio de recuperação, concentrações conhecidas das duas espécies foram adicionadas antes dos procedimentos de extração. A quantidade das espécies de Hg adicionadas foi escolhida em função das concentrações das espécies naturalmente presentes na amostra e das diluições feitas.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os tópicos relacionados aos procedimentos de preparo de amostra para especiação química de mercúrio por extração convencional, assistida por ultrassom e por radiação micro-ondas. Serão descritos os procedimentos de ajuste dos parâmetros relacionados ao sistema LC-CVG-ICP-MS e apresentados e discutidos os resultados obtidos para as espécies de Hg nas soluções de referência e nas amostras. Também serão discutidas as eficiências da extração de cada procedimento avaliado, empregando material de referência certificado e ensaios de recuperação.

5.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-CVG-ICP-MS

5.1.1. Ajuste do instrumento de ICP-MS

As determinações de Hg por ICP-MS foram feitas monitorando o ^{202}Hg , isótopo mais abundante do elemento, sendo que o instrumento de ICP-MS foi inicialmente ajustado no modo convencional de introdução de soluções (nebulização pneumática), com a finalidade de obter a máxima sensibilidade para o elemento, conforme descrito no item 4.1. (*Instrumentação*). Quando o sistema de LC-CVG foi acoplado ao instrumento de ICP-MS, a otimização de cada parâmetro foi feita separadamente, em que a vazão da fase móvel introduzida foi fixada em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a potência da radiofrequência em 1300 W. A vazão do gás de arraste (argônio) foi avaliada de $1,00$ a $1,20 \text{ L min}^{-1}$ e fixada em $1,20 \text{ L min}^{-1}$, considerando a vazão onde se obteve a melhor razão sinal/ruído para o ^{202}Hg .

5.1.2. Especificação de Hg por LC-CVG-ICP-MS

Diversos estudos sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em amostras biológicas, em diversos meios extratores estão disponíveis na literatura.^{11,13,122} No entanto, considerando que pouco se conhece sobre a matriz da amostra estudada, por precaução, todas as extrações foram avaliadas no mesmo dia do seu preparo.

A solução da saída da coluna C_{18} foi misturada, em linha, com a solução de HCl e do redutor, cuja finalidade é gerar espécies voláteis dos analitos. Após a separação das fases no separador G/L, os vapores foram introduzidos no ICP, conforme mostrado na Figura 1 (*Materiais e Métodos*). O tipo, a concentração e a vazão da fase móvel foram avaliados, de forma a obter a melhor separação e quantificação das espécies de Hg. Os resultados obtidos para estas otimizações serão apresentados nos próximos itens. O volume injetado de solução foi de $200 \mu\text{L}$ para todos os testes realizados. As otimizações foram feitas utilizando-se soluções de referência de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ na concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg), diluídas na fase móvel.⁵⁷

5.1.2.1. Escolha da fase móvel

A fase móvel influencia na separação das espécies de Hg, sendo, portanto, esse parâmetro primeiramente avaliado. Deve-se observar que a fase móvel deve ser compatível com a técnica empregada para a detecção (CVG-ICP-MS) das espécies. Por exemplo, a introdução direta no ICP de soluções com elevados teores de solventes orgânicos pode causar instabilidade do plasma ou sua extinção, bem como formar depósitos de carbono na interface do instrumento. Além disso, no caso do Hg, o carbono pode causar aumento da intensidade do sinal, possivelmente em função das recombinações (íons e elétrons) que acontecem no plasma para os elementos com elevado potencial de ionização como o Hg ($1007,0 \text{ kJ mol}^{-1}$).^{108,109} No caso da geração de vapor químico, o meio também pode influenciar nas reações, sendo que, de maneira geral, solventes orgânicos são prejudiciais.

Diversas soluções foram usadas como fases móveis em trabalhos anteriores de especificação de Hg.^{15,25,71} Dessa forma, foram testadas soluções contendo metanol, 2-mercaptoetanol e acetato de amônio, piridina e L-cisteína e, ainda, L-cisteína como fases móveis.^{13,14,40,99} Na Figura 3 são mostrados os cromatogramas obtidos a partir das soluções de referência de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ com as fases móveis contendo metanol, 2-mercaptoetanol e acetato de amônio.

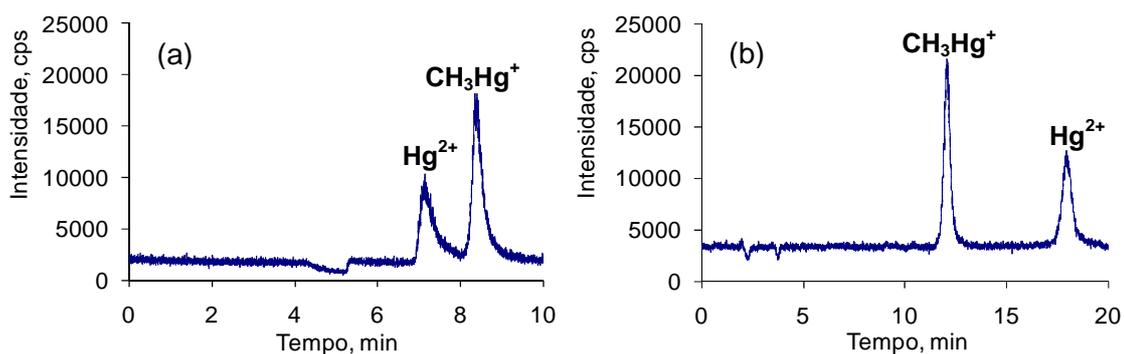


Figura 3. Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg com coluna C_{18} . Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo Hg^{2+} e CH_3Hg^+ $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg). (a) Metanol 50% (v/v), 2-mercaptoetanol $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,06 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; (b) metanol 3% (v/v), 2-mercaptoetanol $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8. Determinações feitas por LC-CVG-ICP-MS [NaBH_4 0,25% (m/v)].

Como pode ser observado na Figura 3, os cromatogramas apresentam separações distintas, em função das diferentes concentrações dos reagentes das fases móveis. As espécies de Hg do cromatograma (a) apresentam tempos de retenção relativamente curtos. No entanto, a separação das espécies não é muito boa. No cromatograma (b) as espécies de Hg são bem separadas, mas os tempos de retenção das espécies aumentaram consideravelmente em relação aos tempos de retenção obtidos no cromatograma (a).

Pode-se observar também, que os tempos de retenção das duas espécies de Hg mudam conforme a fase móvel utilizada. Segundo Harrington e Catterick¹²³, esse fato pode ser explicado porque o 2-mercaptoetanol (que está presente nas fases móveis dos cromatogramas (a) e (b)) afeta apenas a retenção do Hg^{2+} , não apresentando influência sobre o tempo de retenção do CH_3Hg^+ . No caso das fases móveis testadas nesse trabalho, o reagente que teve maior influência nos tempos de retenção dos analitos foi o metanol, cuja concentração foi alterada de 50% no cromatograma (a) para 3% no cromatograma (b). Desse modo, pode-se concluir que quanto menor a concentração desse solvente orgânico, maior serão os tempos de retenção das espécies de Hg, e melhor separação será conseguida. Pode-se observar também, que o metanol teve maior influência no tempo de retenção do Hg^{2+} , fazendo que o tempo passasse de 7,1 min (cromatograma (a)) para 18 min (no cromatograma (b)). Observações semelhantes obtiveram Harrington e Catterick, que concluíram que o aumento da concentração de metanol diminui o tempo de retenção das espécies de Hg, mas não influencia na separação das espécies.¹²³

Os experimentos iniciais deste estudo foram feitos com a fase móvel (a), após essa ser otimizada em termos de concentração de reagentes da fase móvel, pH e separação. No entanto, após aproximadamente três meses de uso contínuo da coluna C_{18} , a capacidade de separação dos compostos ficou comprometida, ou seja, não há mais separação dos analitos. Além disso, não foi possível fazer a regeneração da coluna de acordo com os procedimentos normalmente recomendados.¹²⁴ Na Figura 4(a) é mostrada a influência da fase móvel na separação das espécies de Hg e na Figura 4(b) a perda da capacidade de separação das mesmas pela coluna C_{18} após uso por aproximadamente três meses.

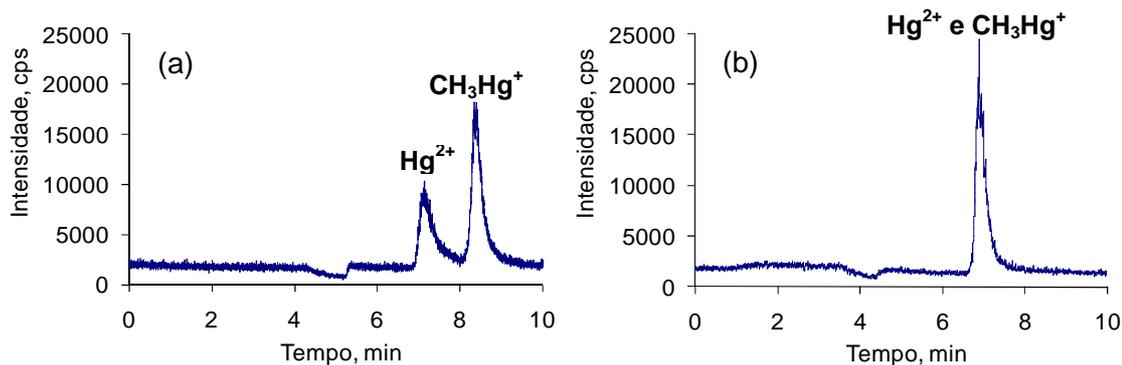


Figura 4. Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg quando a coluna C_{18} é nova (a) e após aproximadamente três meses de uso. Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (como Hg). Fase móvel: metanol 50% (v/v), 2-mercaptoetanol $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,06 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Determinações feitas por LC-CVG-ICP-MS [NaBH_4 0,25% (m/v)].

Após esta constatação, a fase móvel (b) (Figura 3) foi adotada para os estudos posteriores, após as devidas otimizações em relação a concentração de reagentes, pH e separação. Da mesma forma, a capacidade de separação da coluna C_{18} foi comprometida após aproximadamente 30 dias de uso contínuo. É importante ressaltar que não há relatos na literatura sobre estes problemas, especialmente usando esta fase móvel.¹²³ No entanto, acredita-se que essa perda da capacidade de separar as espécies de Hg possa ter sido provocada pela adsorção do 2-mercaptoetanol (ou de possíveis compostos formados), usado na fase móvel. Na Figura 5 está mostrada a influência da fase móvel sobre a separação das espécies de Hg e a perda da capacidade de separação das mesmas pela coluna C_{18} .

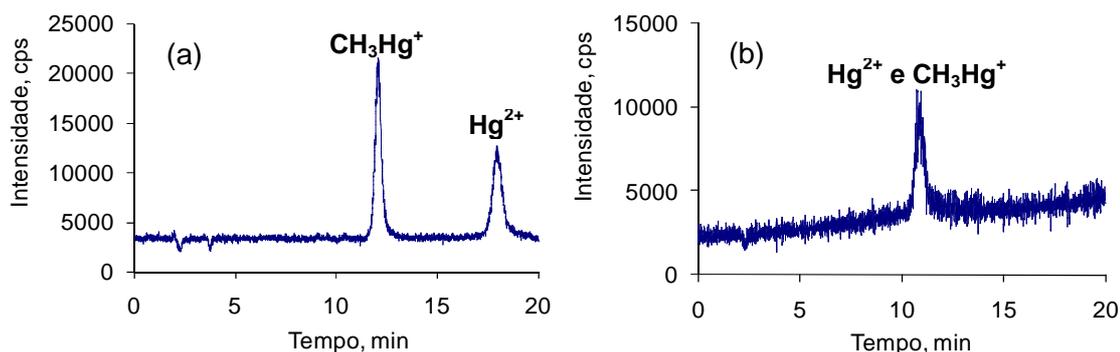


Figura 5. Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg (a) e perda da capacidade de separação (b) da coluna C_{18} . Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (como Hb). Fase móvel: metanol 3% (v/v), 2-mercaptoetanol $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$, acetato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8. Determinações feitas por LC-CVG-ICP-MS [NaBH_4 0,25% (m/v)].

Considerando que as fases móveis (a) e (b) da Figura 3 levaram a perda da capacidade de separação das espécies de Hg na coluna C_{18} , as fases móveis referentes aos cromatogramas (a) e (b) da Figura 6 foram testadas. Pode-se observar que os tempos de retenção das espécies de Hg foi reduzido consideravelmente em relação à fase móvel do cromatograma (b) da Figura 3.

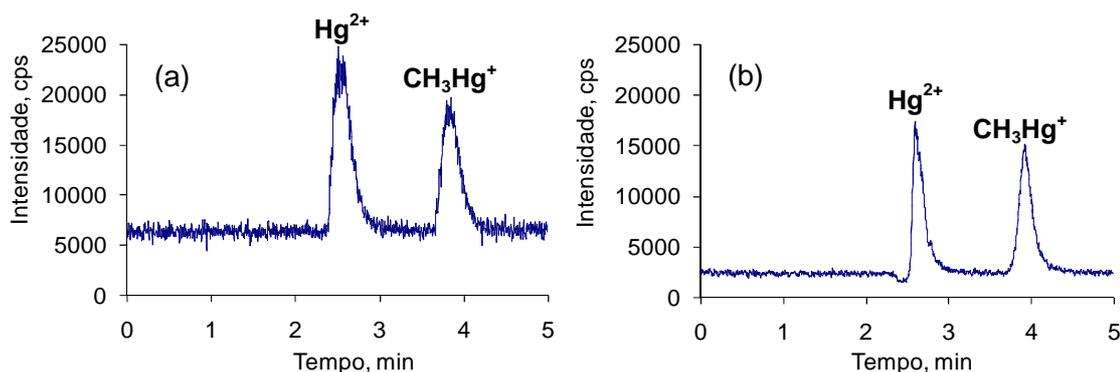


Figura 6. Influência da fase móvel na separação das espécies de Hg com coluna C_{18} . Cromatogramas obtidos a partir de soluções contendo Hg^{2+} e CH_3Hg^+ $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg). (a) L-cisteína $28,5 \text{ mmol L}^{-1}$, piridina 50 mmol L^{-1} , pH 3,5; (b) L-cisteína $5,7 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 4,0. Determinações feitas por LC-CVG-ICP-MS [NaBH_4 0,25% (m/v)].

Essas fases móveis são constituídas por L-cisteína, como reagente complexante, ao invés de 2-mercaptoetanol, o que pode explicar os baixos tempos de retenção dos analitos, que podem ser devido ao caráter hidrofílico do complexo Hg(L-cisteína) formado.¹⁵ Os dois cromatogramas mostram separações bastante semelhantes e baixos tempos de retenção dos analitos. Optou-se pela escolha da fase móvel referente ao cromatograma (b), por não ser necessário o uso de metanol, que além de evitar problemas relacionados ao uso de solventes orgânicos na fase móvel¹¹⁰ na etapa da geração de vapor com o NaBH₄, não teve influência na separação das espécies. Também, a piridina é considerada tóxica.

A fase móvel constituída por L-cisteína 0,1% (m/v), adaptada de Hight e Cheng¹³, levou a melhor separação dos compostos de Hg e não foi observado danos à coluna C₁₈. Em outros trabalhos^{23,99}, também foi utilizada essa fase móvel para a separação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺. Na Tabela 3 estão relacionados os parâmetros e as condições utilizadas para especificação de Hg em cogumelos comestíveis por LC-CVG-ICP-MS.

Tabela 3. Parâmetros operacionais para o instrumento de LC.

Parâmetros	Condições
Coluna	C ₁₈ Waters ODS2 (250 x 4 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula)
Fase móvel	L-cisteína 0,1% (m/v), pH 4,0
Forma de eluição	Isocrática
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de amostra	200 µL
Pressão	2000 psi

Depois de feitos os ensaios descritos anteriormente para a escolha das condições experimentais mais adequadas para a separação das espécies de Hg (Tabela 3), estas foram aplicadas para a quantificação das espécies de Hg nas amostras de cogumelos.

5.1.2.2. Efeito da concentração e vazão de NaBH₄

A concentração de NaBH₄ influencia na cinética da reação de geração de vapor químico das espécies de Hg, através da formação de Hg⁰ a partir de Hg²⁺ e CH₃HgH e/ou Hg⁰ a partir de CH₃Hg⁺.¹¹² Com o objetivo de melhorar os limites de detecção na determinação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ e prevenir a entrada de compostos orgânicos para o plasma, a saída da coluna C₁₈ foi conectada a um sistema de geração de vapor químico (Figura 1). Nesse caso, a influência da concentração de NaBH₄ foi avaliada na faixa de 0,05 até 0,8% (m/v), de modo a se obter as maiores intensidades de sinal a partir de soluções referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ 5,0 µg L⁻¹ (como Hg). As soluções foram preparadas na própria fase móvel. Os resultados estão mostrados na Figura 7. Foi observado que a maior intensidade para ambas as espécies de Hg foi obtida quando a concentração de NaBH₄ foi 0,8%. Porém, a partir de 0,5%, a instabilidade do plasma aumenta, possivelmente devido ao excesso de H₂ liberado durante a reação.¹⁰⁸ Dessa forma, a concentração de NaBH₄ escolhida para as determinações subseqüentes foi 0,25% (m/v).

A influência da vazão da solução de NaBH₄ foi variada de 2,0 a 4,0 mL min⁻¹, sendo que as maiores intensidades para ambas as espécies de Hg foram conseguidas com 2,0 mL min⁻¹. As intensidades das espécies de Hg para as diferentes concentrações e vazões testadas são mostradas na Figura 7.

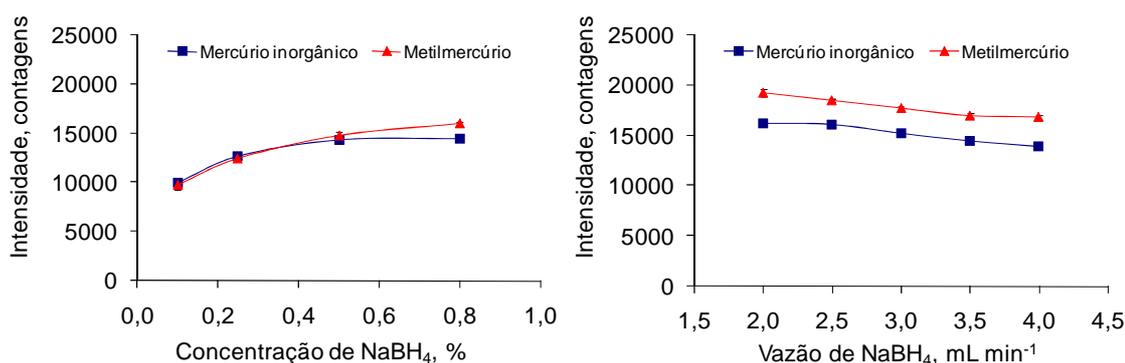


Figura 7. Efeitos da concentração e vazão de NaBH₄ sobre a intensidade das espécies de Hg, determinadas por LC-CVG-ICP-MS. Carregador da amostra: HCl 1,0 mol L⁻¹; vazão de HCl: 8,0 mL min⁻¹; vazão do gás de arraste: 1,10 L min⁻¹. Soluções de referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ em concentração de 5,0 µg L⁻¹ (como Hg) (n = 5).

De acordo com a Figura 7, as intensidades das espécies de Hg são diferentes. Chiou *et al.*¹⁵ atribuiu essa diferença devido à eficiência de geração de vapor químico das espécies de Hg.

5.1.2.3. Efeitos da concentração e vazão de HCl

A concentração de HCl foi variada de 0,5 até 2,0 mol L⁻¹, cujas intensidades do sinal para CH₃Hg⁺ não tiveram variação significativa. No entanto, para Hg²⁺ as intensidades do sinal mantiveram-se estáveis a partir de 1,0 mol L⁻¹, sendo assim escolhida essa concentração de HCl para as demais determinações. Adicionalmente, a vazão de HCl foi variada de 3,5 a 7,5 mL min⁻¹, sendo que as maiores intensidades para as espécies de Hg foram conseguidas em 3,5 mL min⁻¹. As intensidades das espécies de Hg para as diferentes concentrações e vazões testadas são mostradas na Figura 8.

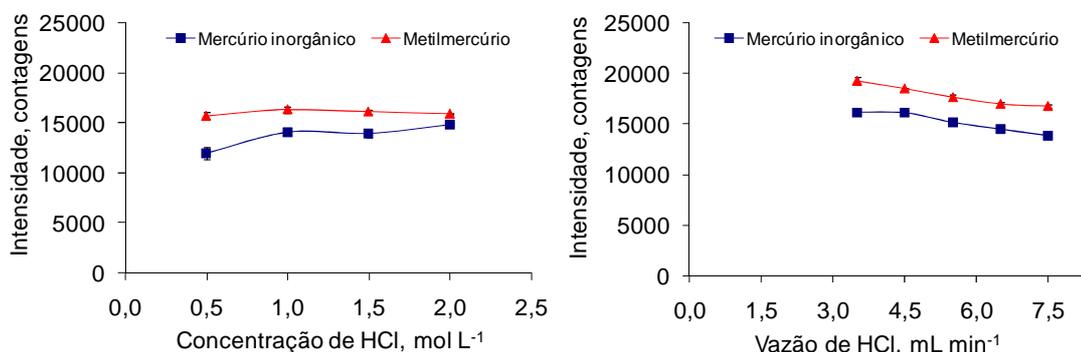


Figura 8. Efeitos da concentração e vazão de HCl sobre a intensidade das espécies de Hg, determinadas por LC-CVG-ICP-MS. NaBH₄: 0,25% (m/v); vazão de NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹; vazão do gás de arraste: 1,10 L min⁻¹. Soluções de referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ em concentração de 5,0 µg L⁻¹ (como Hg) (n = 5).

5.1.2.4. Escolha da vazão do gás de arraste

Na geração de vapor químico as espécies voláteis de Hg são carregadas com o auxílio de um gás de arraste do separador G/L até no plasma, este deve ser avaliado, pois ele influencia no carregamento desse vapor, bem como nas condições do plasma.¹⁰⁸ O gás de arraste utilizado foi o argônio, e a otimização da vazão deste

foi feita após o ajuste dos parâmetros do sistema LC-CVG-ICP-MS, anteriormente descritos. A vazão de argônio foi variada de 1,00 a 1,20 L min⁻¹, sendo o efeito mostrado na Figura 9.

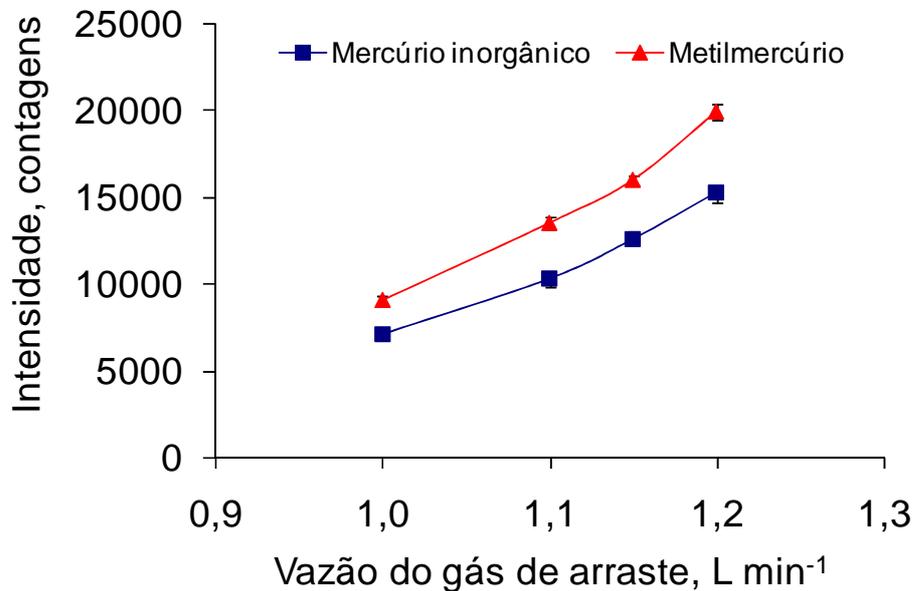


Figura 9. Influência da vazão do gás de arraste sobre a intensidade dos sinais de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺. NaBH₄: 0,25% (m/v); HCl : 1,0 mol L⁻¹ (v/v); vazão de NaBH₄: 2,0 mL min⁻¹, vazão de HCl: 3,5 mL min⁻¹. Soluções de referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ em concentração de 5,0 µg L⁻¹ (como Hg) (n = 5).

Como pode ser visto na Figura 9, as intensidades dos sinais para as duas espécies de Hg aumentaram com o aumento da vazão do gás de arraste. Sendo assim, a vazão de 1,20 L min⁻¹ foi selecionada para as determinações posteriores.

5.2. DETERMINAÇÃO DE Hg TOTAL EM COGUMELOS

As amostras de cogumelos foram decompostas em forno de micro-ondas, juntamente com o material de referência certificado (DOLT-3), conforme descrito no item 4.5.1. (*“Procedimento usado para a determinação de mercúrio total em cogumelos”*), e os valores obtidos para Hg total nessas amostras foram adotados como referência. As concentrações de Hg total determinadas nas amostras decompostas estão apresentadas na Tabela 4, juntamente com os valores para Hg total obtido no CRM.

Tabela 4. Concentração (ng g^{-1}) de Hg total nos cogumelos e no CRM (DOLT-3), obtida após a decomposição da amostra em forno de micro-ondas e determinação por CVG-ICP-MS ($n = 3$).

Amostra	Hg total
<i>Agaricus bisporus</i>	$39,9 \pm 2,0$
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	$28,9 \pm 1,2$
<i>Pleurotus eryngii</i>	$20,8 \pm 2,5$
<i>Pleurotus ostreatus</i>	$24,4 \pm 0,1$
<i>Pleurotus djamor</i>	$25,6 \pm 0,8$
DOLT-3*	3258 ± 85

*Valor certificado de Hg no DOLT-3: $3370 \pm 140 \text{ ng g}^{-1}$

De acordo com a Tabela 4, a concentração de Hg total nos cogumelos é baixa, estando abaixo da concentração máxima recomendada pela EPA e pela OMS.^{5,49,50}

De acordo com a Anvisa⁵¹, o limite máximo de concentração estabelecido para Hg em alimentos, incluindo cogumelos comestíveis, é de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Portanto, a concentração de Hg total encontrada para as amostras está acima da concentração máxima permitida. Mas levando-se em conta que essa concentração limite para Hg refere-se apenas aos cogumelos com obrigatoriedade de registro no órgão de saúde, de acordo com o Regulamento Técnico nº 6^{52,53}, excluem-se, dessa forma, os cogumelos comestíveis “*in natura*”, os quais foram usados para este trabalho.

5.3. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE MERCÚRIO INORGÂNICO E METILMERCÚRIO EM COGUMELOS

5.3.1. Extração assistida por ultrassom

A composição da solução extratora é um dos fatores que influenciam na eficiência de extração das espécies de Hg.¹⁴ Dessa forma, inicialmente, o comportamento das espécies de Hg em diferentes soluções extratoras (HCl 1,0; 3,0 e $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, L-cisteína 1,0% (m/v) e água) foi investigado, com o objetivo de avaliar possíveis conversões das espécies de Hg. Para isso, soluções referência contendo

Hg^{2+} e CH_3Hg^+ a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) foram preparadas em cada meio de extração e submetidas a diferentes amplitudes de US (10, 20 e 30%) por 1 min.^{8,18} A Figura 10 mostra o efeito da aplicação de US, nas diferentes amplitudes, sobre a estabilidade das espécies de Hg.

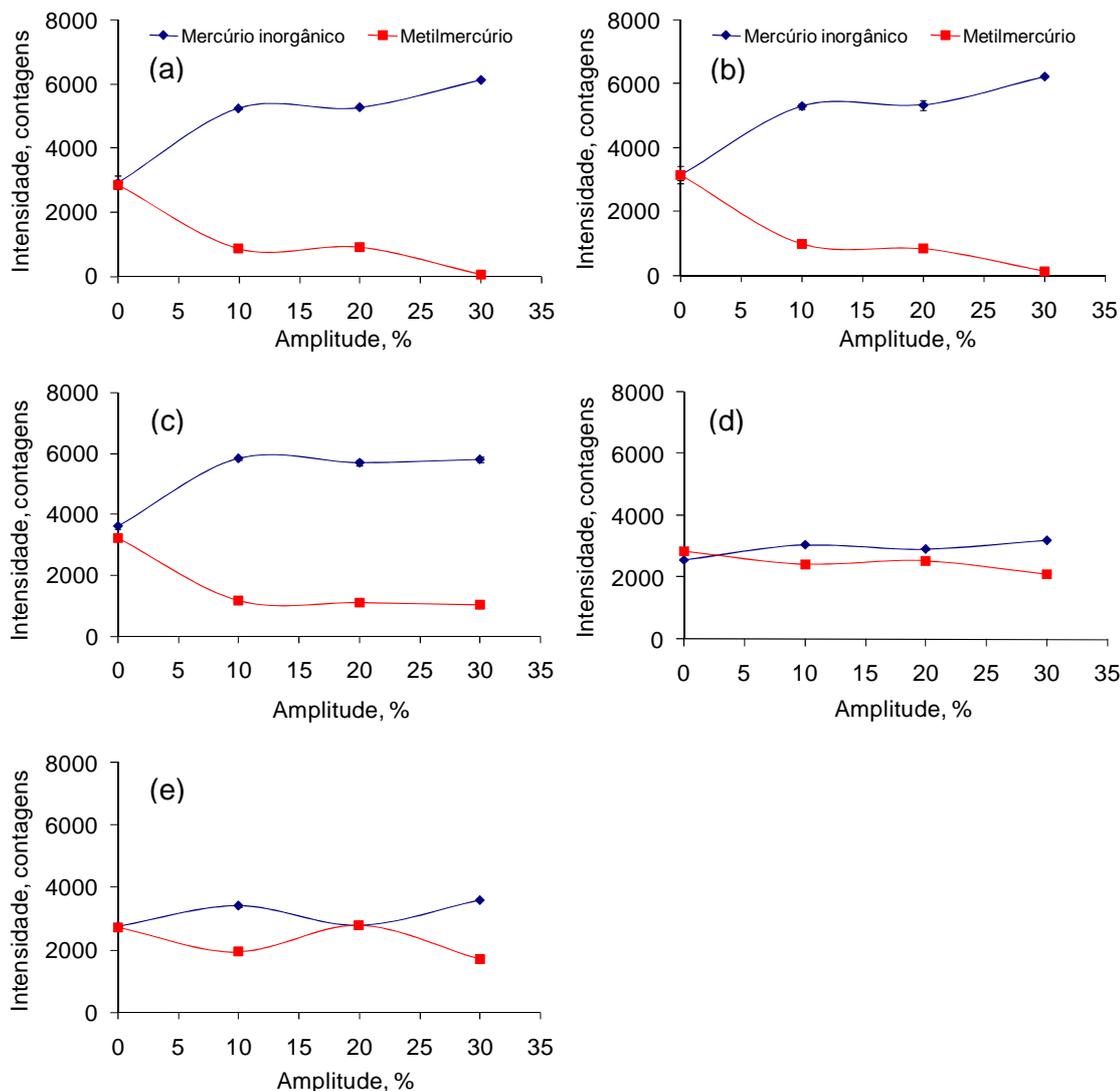


Figura 10. Efeito do US sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em (a) HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$; (b) HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$; (c) HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; (d) L-cisteína $1,0\%$ (m/v); (e) água. Volume das soluções extratoras: 6 mL , volume final: 15 mL , pH $4,0$, tempo de sonicação: 1 min , potência da sonda de US: 100 W ($n = 3$).

De acordo com a Figura 10, foi observado que nas soluções extratoras de HCl ocorreu conversão de CH_3Hg^+ para Hg^{2+} , de forma que em todas as concentrações de HCl testadas a intensidade do sinal de Hg^{2+} aumentou

proporcionalmente à diminuição da intensidade do sinal de CH_3Hg^+ . Por outro lado, não foi observada conversão das espécies de mercúrio em água e L-cisteína 1,0% (m/v). O ponto representado pela amplitude “0” corresponde aos testes sem o uso de US, sendo as mesmas preparadas nos meios extratores, com pH ajustado para 4,0 e as soluções aferidas a 15 mL. Pode-se observar também que os desvios-padrão são baixos.

A degradação de CH_3Hg^+ para Hg^{2+} por efeito do US também foi observada por Capelo *et al.*⁹⁴, que verificaram que a conversão completa de CH_3Hg^+ ocorreu em meio de HCl a partir de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, quando foi aplicado US com 30% de amplitude por 3 min. Os autores concluíram que o meio de HCl é necessário para que ocorra a degradação dos compostos de Hg em relação a outros reagentes, como H_2O_2 e HNO_3 , que promoveram uma degradação incompleta. O estudo ainda mostrou que a cinética de degradação é maior para o CH_3Hg^+ que para outros compostos orgânicos, como o fenilmercúrio, e segundo os autores, esse comportamento pode estar associado ao aumento da volatilidade do CH_3Hg^+ em relação ao fenilmercúrio, o que pode ter facilitado sua degradação nas bolhas de cavitação geradas pelo US. Outra hipótese mencionada pelos autores refere-se aos mecanismos de degradação do CH_3Hg^+ , que pode estar associado à combustão do composto dentro da zona gasosa ou da zona quente das bolhas de cavitação, assim como pelos radicais gerados.

É importante mencionar que as conversões das espécies de Hg, observadas na Figura 10, não estão de acordo com as observações de outros trabalhos^{7,9,64} nos quais foi usado banho de US para extrair Hg^{2+} e CH_3Hg^+ de amostras de peixe.^{7,64,82} Isto pode ser explicado pelo fato da energia liberada pela sonda de US ser, comumente, maior que a energia liberada no banho.¹⁹

Considerando que, de acordo com a Figura 10, as soluções referência das espécies de Hg testadas não sofreram conversão nos meios extratores água e L-cisteína, e levando-se em conta que o comportamento das espécies de Hg em solução aquosa e na amostra pode ser diferente, a eficiência de extração das soluções extratoras nos cogumelos e no CRM foi avaliada. Para isso, a amplitude de US escolhida foi de 20%, pois foi a que levou a menor variação das intensidades dos sinais das espécies de Hg, especialmente quando a água foi usada como solução extratora. Na Figura 11 estão mostrados os cromatogramas obtidos para as extrações de Hg nessas amostras.

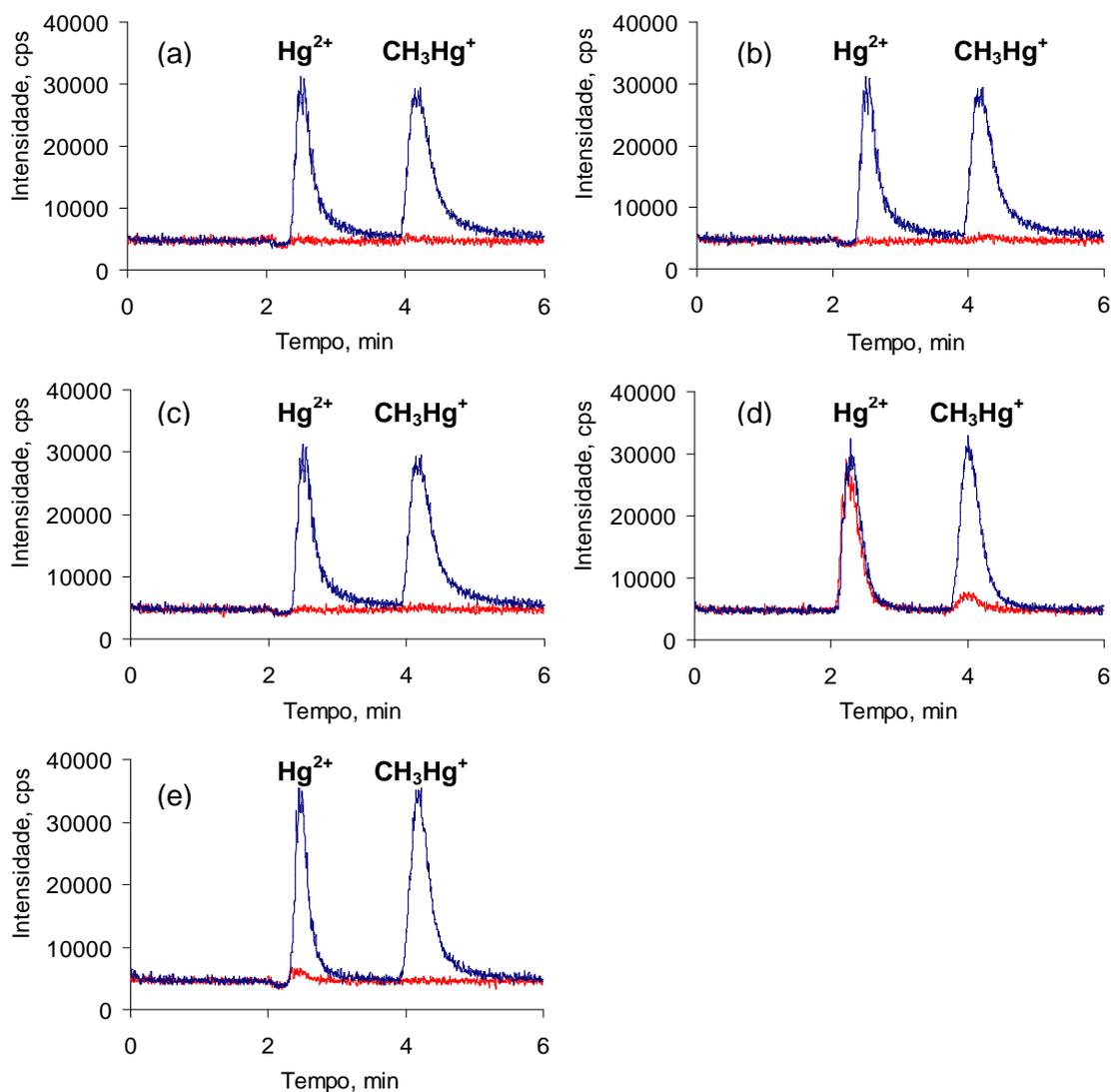


Figura 11. Cromatogramas referentes à aplicação de US (20% de amplitude) durante 1 min na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração. (a) HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$; (b) HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$; (c) HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; (d) L-cisteína 1,0% (m/v); (e) água. Massa de amostra: 500 mg, volume de solução extratora: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0.

De acordo com a Figura 11, apenas a L-cisteína 1,0% (m/v) (cromatograma d) extraiu quantitativamente as espécies de Hg da amostra, ao passo que para as outras soluções, as extrações não foram quantitativas. Isto pode ser observado nos cromatogramas (a), (b), (c) e (e). Na Tabela 5 são mostradas as concentrações das espécies de Hg obtidas após a extração com US na amostra estudada (*Agaricus bisporus*), assim como no CRM (DOLT-3), nas diferentes soluções extratoras.

Tabela 5. Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM, extraídas a partir das soluções extratoras de HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L^{-1} , água e L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando US a 20% por 1 min ($n = 3$).

Solução extratora	Amostra	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺ **	Hg _{total} ***
HCl 6,0 mol L^{-1}	<i>Agaricus bisporus</i>	<0,45	<1,07	-
	DOLT-3*	<0,45	538 ± 76	538 ± 76
HCl 3,0 mol L^{-1}	<i>Agaricus bisporus</i>	<0,44	<1,06	-
	DOLT-3	30,9 ± 16,0	137 ± 18	184 ± 24
HCl 1,0 mol L^{-1}	<i>Agaricus bisporus</i>	<0,44	<1,06	-
	DOLT-3	<0,44	62,0 ± 7,3	62,0 ± 7,3
L-cisteína 1,0% (m/v)	<i>Agaricus bisporus</i>	31,4 ± 0,1	4,82 ± 0,56	36,2 ± 0,57
	DOLT-3	1695 ± 30	1421 ± 46	3116 ± 55
Água	<i>Agaricus bisporus</i>	2,31 ± 0,20	1,15 ± 0,18	3,46 ± 0,27
	DOLT-3	21,7 ± 0,8	166 ± 7	188 ± 7

Hg_{total} (MW) *Agaricus bisporus*: 39,9 ± 2,0 ng g^{-1}

DOLT-3: 3258 ± 85 ng g^{-1}

* Valores certificados: Hg_{total} 3370 ± 140 ng g^{-1} ; CH₃Hg⁺ 1590 ± 120 ng g^{-1}

** Expresso como Hg²⁺

*** Soma da concentração de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺

De acordo com a Tabela 5, as eficiências das extrações das espécies de Hg nas soluções extratoras contendo HCl foram muito baixas, sendo que as concentrações de Hg obtidas para os cogumelos ficaram abaixo do LD para ambas as espécies determinadas. Essa baixa eficiência de extração de Hg, utilizando solução de HCl sob ação do banho de US por uma hora foi também observada por Gao *et al.*⁶⁴, quando determinaram Hg em amostra ambiental.

Por outro lado, a capacidade da L-cisteína em extrair Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ da amostra e do CRM possivelmente deve-se à alta afinidade do Hg ao grupo sulfidrila da L-cisteína.^{7,14,15} Além disso, segundo Meng *et al.*¹⁴, um meio extrator ácido facilita a extração das espécies de Hg nessas matrizes, o que está de acordo com o que foi observado no presente trabalho. Adicionalmente, o ajuste de pH após a extração dos analitos para posterior determinação por LC-CVG-ICP-MS foi facilitado, já que o pH final foi ajustado para 4,0.

De acordo com os resultados obtidos, a solução de L-cisteína 1,0% (m/v) como solução extratora e a radiação US em amplitude de 20% foram selecionadas para os estudos subsequentes.

Utilizando as condições estabelecidas anteriormente, o efeito do tempo de aplicação de US sobre o comportamento das espécies de Hg também foi avaliado. Para isso, tempos de extração entre 0,5 a 3 min foram testados. Todos os ensaios foram feitos em banho de água em temperatura ambiente (20 °C). A Figura 12 mostra o efeito do tempo de sonicação sobre as soluções de referência de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , em que se pode observar que não houve conversão das espécies de Hg nas soluções, nos tempos estudados.

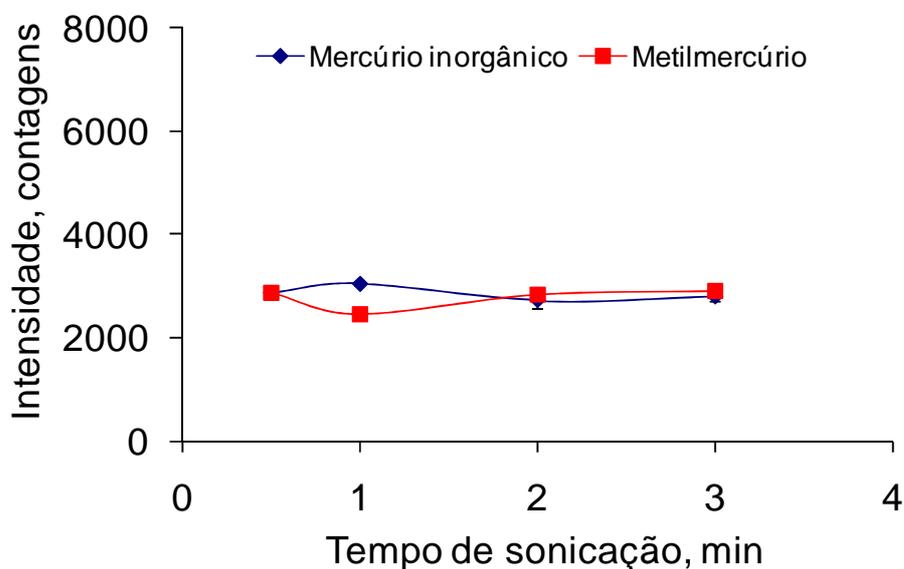


Figura 12. Efeito do tempo de aplicação de US (20% de amplitude) sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em L-cisteína 1,0% (m/v). Volume de L-cisteína: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0 (n = 3).

As eficiências das extrações das espécies de Hg, utilizando diferentes tempos de aplicação de US, foram também avaliadas na amostra *Agaricus bisporus*. Na Figura 13 está mostrada a sobreposição dos cromatogramas referentes à aplicação de US a 20% de amplitude na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) e para a extração das espécies de Hg da amostra, em diferentes tempos.

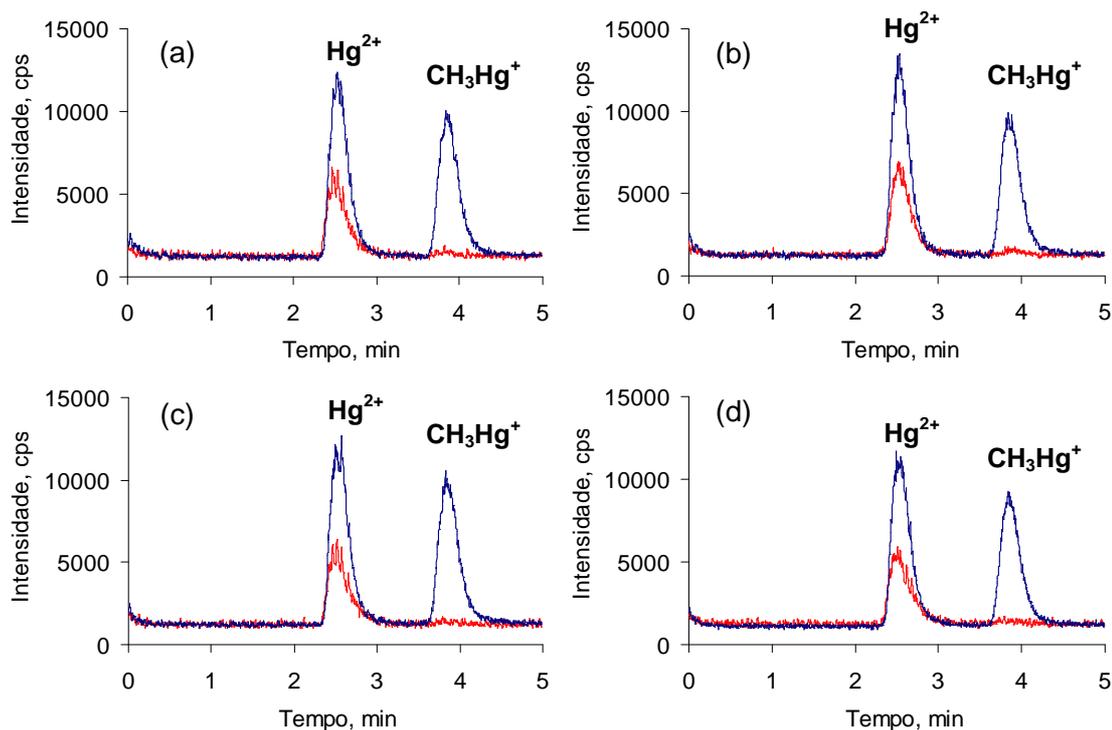


Figura 13. Cromatogramas referentes à aplicação de US a 20% de amplitude na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em solução de L-cisteína 1,0% (m/v). (a) 0,5 min; (b) 1 min; (c) 2 min; (d) 3 min. Massa de amostra: 500 mg, volume de L-cisteína: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0.

As concentrações das espécies de Hg, obtidas após a extração com US a 20% de amplitude no cogumelo *Agaricus bisporus*, nos diferentes tempos de sonicação são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo (*Agaricus bisporus*), extraídas com solução de L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando US a 20% de amplitude em diferentes tempos de sonicação (n = 3).

Tempo de extração (min)	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ²⁺ *	Hg total **
0,5	34,2 ± 1,8	3,58 ± 0,13	37,8 ± 1,8
1,0	37,1 ± 0,3	4,99 ± 0,41	42,1 ± 0,5
2,0	36,1 ± 2,2	4,16 ± 0,21	40,3 ± 2,2
3,0	36,2 ± 2,0	4,91 ± 0,25	41,1 ± 2,0

Hg total (MW) *Agaricus bisporus*: 39,9 ± 2,0 ng g^{-1}

* Expresso como Hg²⁺

** Soma da concentração de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺

De acordo com a Figura 11 e a Tabela 6, as eficiências das extrações das espécies de Hg foram quantitativas para todos os tempos de aplicação de US a 20% de amplitude. Além disso, foi feita avaliação estatística desses resultados (Teste *t*-Student, intervalo de confiança de 95%, $p < 0,05$), e verificou-se que não houve diferença significativa entre a soma das espécies de Hg e o valor de Hg total, determinado por CVG-ICP-MS nos tempos estudados. No entanto, devido à menor variação dos resultados, o tempo de extração de 1 min foi escolhido para os estudos posteriores.

5.3.2. Extração assistida por micro-ondas

A temperatura é um parâmetro importante na estabilidade e na extração das espécies de Hg, de modo que ela deve ser limitada para evitar perdas do analito por volatilização ou degradação das espécies.^{11,73} Dessa forma, a potência do forno de micro-ondas foi fixada em 500 W, e as demais condições foram ajustadas para se trabalhar com temperaturas máximas de 60, 80, 100 ou 120 °C, nas diferentes soluções extratoras (HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L⁻¹, L-cisteína 1,0% (m/v) e água), em sistema fechado.

O comportamento das espécies de Hg nessas soluções foi investigado, com o objetivo de avaliar possíveis conversões ou perdas das espécies. Para isso, soluções referência de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ contendo 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) foram submetidas à radiação MW até as temperaturas máximas mencionadas

anteriormente. A Figura 14 mostra o comportamento das espécies de Hg em relação à aplicação da radiação MW nas temperaturas testadas.

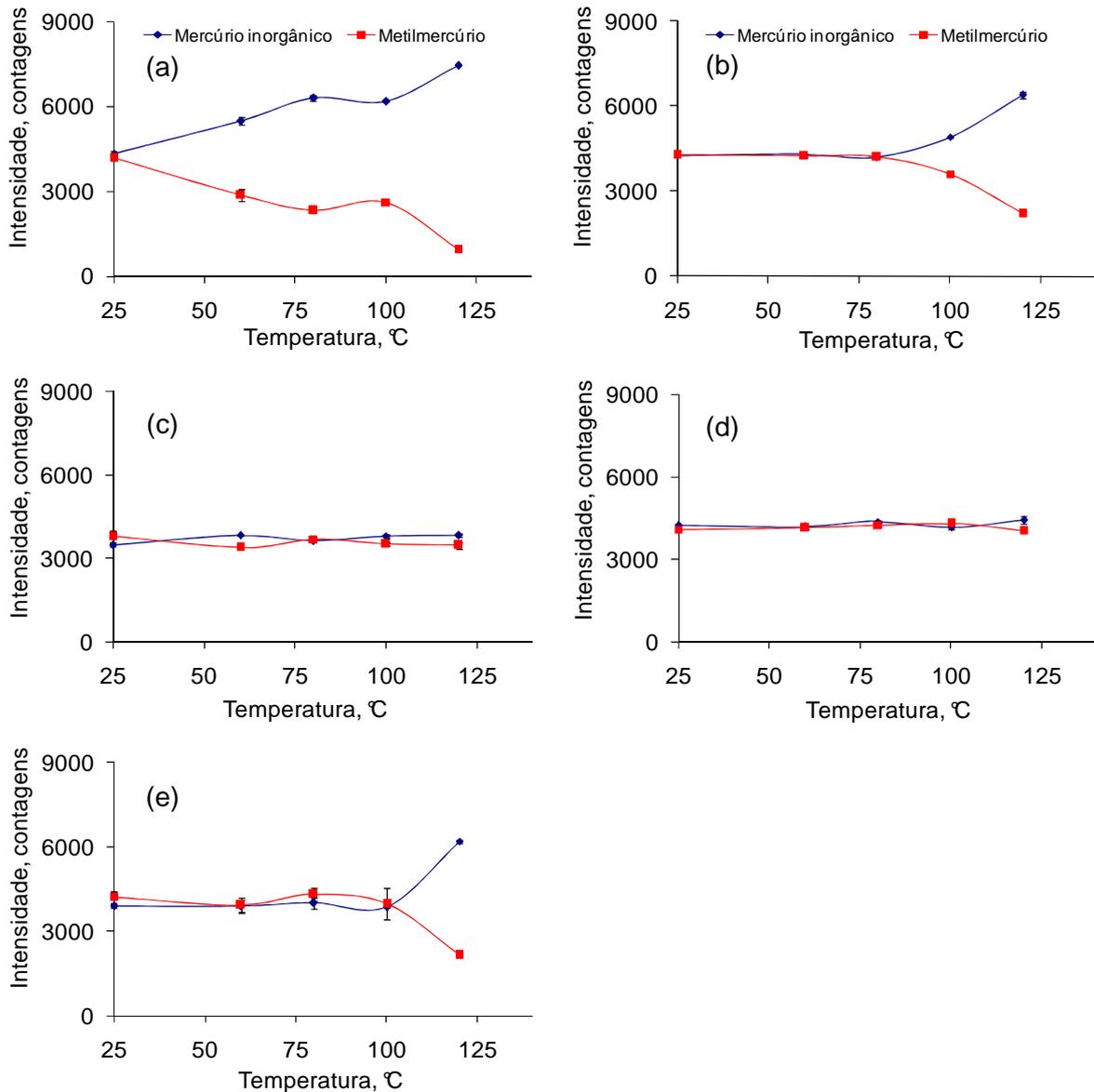


Figura 14. Efeito da temperatura na extração auxiliada por radiação MW sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em diferentes soluções extratoras. (a) HCl 6,0 mol L⁻¹; (b) HCl 3,0 mol L⁻¹; (c) HCl 1,0 mol L⁻¹; (d) L-cisteína 1,0% (m/v); (e) água. Volume das soluções extratoras: 6 mL; volume final: 15 mL, pH 4,0; aquecimento por MW em sistema fechado; tempo de aquecimento: 10 min, com rampa de 5 min (n = 3).

De acordo com a Figura 14, foi observado que em solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ ocorreu degradação de CH₃Hg⁺ em todas as temperaturas testadas. Já em HCl 3,0 mol L⁻¹ a conversão de CH₃Hg⁺ para Hg²⁺ ocorreu em temperaturas maiores que 100 °C, e em solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ as espécies de Hg são estáveis. Também foi observado que em água a conversão das espécies de Hg ocorreu somente a 120 °C e, nenhuma conversão ocorreu na solução de L-cisteína 1,0% (m/v).

Considerando os dados mostrados na Figura 14 para as espécies de Hg nas soluções de referência em água e L-cisteína, e levando-se em conta que o comportamento dessas espécies em solução aquosa e na amostra pode ser diferente, a eficiência de extração de Hg das amostras foi avaliada, fixando-se para tanto a temperatura em 100 °C e o tempo de irradiação das MW em 10 min. Esta condição levou a uma menor variação das intensidades dos sinais para as espécies estudadas, para ambas as soluções extratoras. Na Figura 15 é mostrada a sobreposição dos cromatogramas obtidos para os ensaios feitos com radiação MW sobre a solução de referência mista na concentração de 1,0 µg L⁻¹ (como Hg) e para a extração de Hg da amostra de cogumelo.

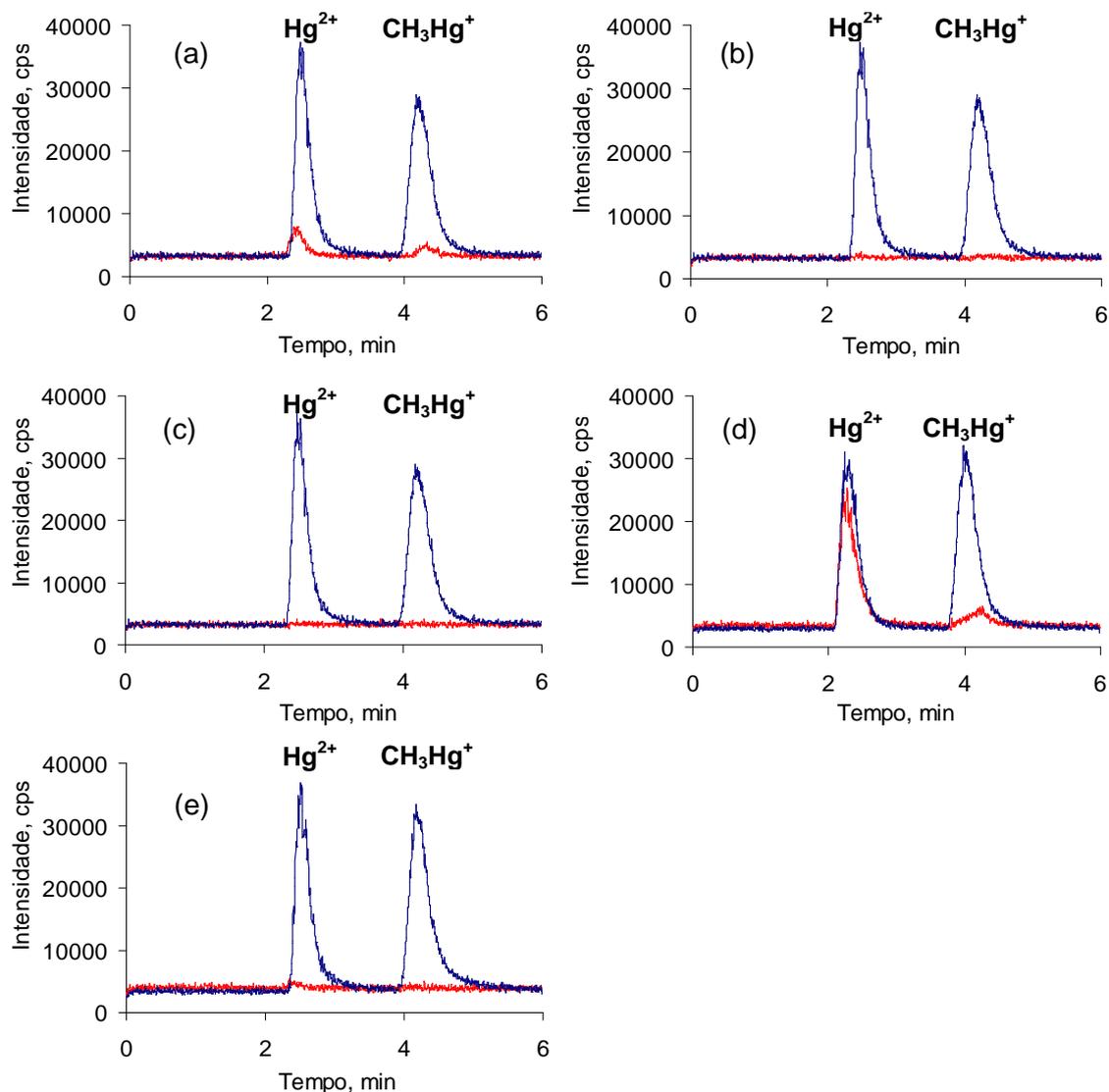


Figura 15. Cromatogramas referentes à aplicação de MW a 100 °C durante 10 min na solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração. (a) HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$; (b) HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$; (c) HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; (d) L-cisteína 1,0% (m/v); (e) água. Massa de amostra: 500 mg, volume de solução extratora: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0.

De acordo com a Figura 15, somente a solução de L-cisteína extraiu as espécies de Hg das amostras. A eficiência de extração das espécies de Hg da amostra de cogumelo (*Agaricus bisporus*) e do CRM (DOLT-3) nas diferentes soluções testadas pode ser verificada nos resultados mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM. Extrações assistidas por radiação MW até temperatura máxima de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min ($n = 3$).

Solução extratora	Amostra	Hg^{2+}	$\text{CH}_3\text{Hg}^{+**}$	$\text{Hg}_{\text{total}}^{***}$
HCl $6,0\text{ mol L}^{-1}$	<i>Agaricus bisporus</i>	$2,55 \pm 0,27$	$1,78 \pm 0,85$	$4,33 \pm 0,89$
	DOLT-3*	562 ± 5	421 ± 123	983 ± 123
HCl $3,0\text{ mol L}^{-1}$	<i>Agaricus bisporus</i>	$<0,38$	$<0,67$	-
	DOLT-3	187 ± 6	326 ± 9	513 ± 11
HCl $1,0\text{ mol L}^{-1}$	<i>Agaricus bisporus</i>	$<0,38$	$<0,66$	-
	DOLT-3	$<0,38$	$<0,67$	-
L-cisteína $1,0\%$ (m/v)	<i>Agaricus bisporus</i>	$24,9 \pm 0,5$	$6,14 \pm 0,54$	$31,0 \pm 0,7$
	DOLT-3	1714 ± 75	1462 ± 77	3176 ± 107
Água	<i>Agaricus bisporus</i>	$0,93 \pm 0,02$	$13,2 \pm 0,3$	$14,2 \pm 0,3$
	DOLT-3	$13,3 \pm 0,3$	$110 \pm 0,1$	$123 \pm 0,3$

Hg_{total} (MW): *Agaricus bisporus*: $39,9 \pm 2,0\text{ ng g}^{-1}$

* Valores certificados (DOLT-3): $\text{Hg}_{\text{total}} 3370 \pm 140\text{ ng g}^{-1}$; $\text{CH}_3\text{Hg}^+ 1590 \pm 120\text{ ng g}^{-1}$

** Expresso como Hg

*** Soma da concentração de CH_3Hg^+ e Hg^{2+}

De acordo com a Tabela 7, a extração assistida por MW em meio de HCl não proporcionou extrações quantitativas para ambas as espécies de Hg. Gao *et al.*⁶⁴ também obtiveram baixas eficiências de extração dessas espécies em amostras ambientais, utilizando HCl 6 mol L^{-1} como solução extratora.

Como se pode observar na Figura 15 e Tabela 7, a maior eficiência de extração das espécies de Hg foi obtida com a L-cisteína, o que pode estar relacionado com a capacidade de formação de complexos entre o Hg e o enxofre da L-cisteína. Esses complexos têm uma constante de formação maior que outros complexos formados com o Hg, como por exemplo, o cloreto.^{98,125}

Apesar de ser mencionado na literatura que o uso de solução de HCl é eficiente para a extração de Hg pela formação de cloro-complexos (como o HgCl_4^{2-}), que evitam a adsorção e a degradação das espécies de Hg^{98,125}, a eficiência de extração obtida no presente trabalho foi baixa, para todas as soluções de HCl estudadas. Possivelmente a maior eficiência de extração do Hg com a L-cisteína está relacionada com as constantes de formação dos complexos de Hg formados,

cujo valor do complexo de Hg com cloreto é 5,25, que é menor que a constante de formação do Hg com o enxofre, que é de 14,5.

Meng *et al.*¹⁴ também utilizaram a L-cisteína e verificaram que um meio levemente ácido é importante para obter extrações quantitativas das espécies de Hg em amostras biológicas. Já Aizpurúa *et al.*¹²⁶ observaram que a extração de Hg não é quantitativa em amostras de peixes em pH menor que 2,0, fato que foi atribuído ao inchamento do tecido muscular, quando o pH é diferente do ponto isoelétrico das proteínas do músculo.

De acordo com os resultados obtidos, a solução extratora de L-cisteína 1,0% (m/v) e o uso de radiação MW com aquecimento até no máximo de 100 °C por 10 min foram selecionadas para os estudos posteriores.

5.3.3. Extração convencional

A eficiência das extrações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ dos cogumelos e do CRM frente às soluções extratoras estudadas, bem como a estabilidade das espécies em solução referência foram avaliadas na extração convencional, por ser um método de extração bastante utilizado em análise de especiação.^{14,23,83} Para isso, o comportamento das espécies de Hg em HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L⁻¹, L-cisteína 1,0% e água foi investigado, utilizando soluções referência de ambas as espécies contendo 5,0 µg L⁻¹ (como Hg). Inicialmente as soluções foram agitadas manualmente por 1 min para misturar o meio extrator com a amostra, e, em seguida, as mesmas foram mantidas em repouso por 1, 6 e 12 h a temperatura de 25 °C. Na Figura 16 está mostrado o comportamento das espécies de Hg nas condições testadas.

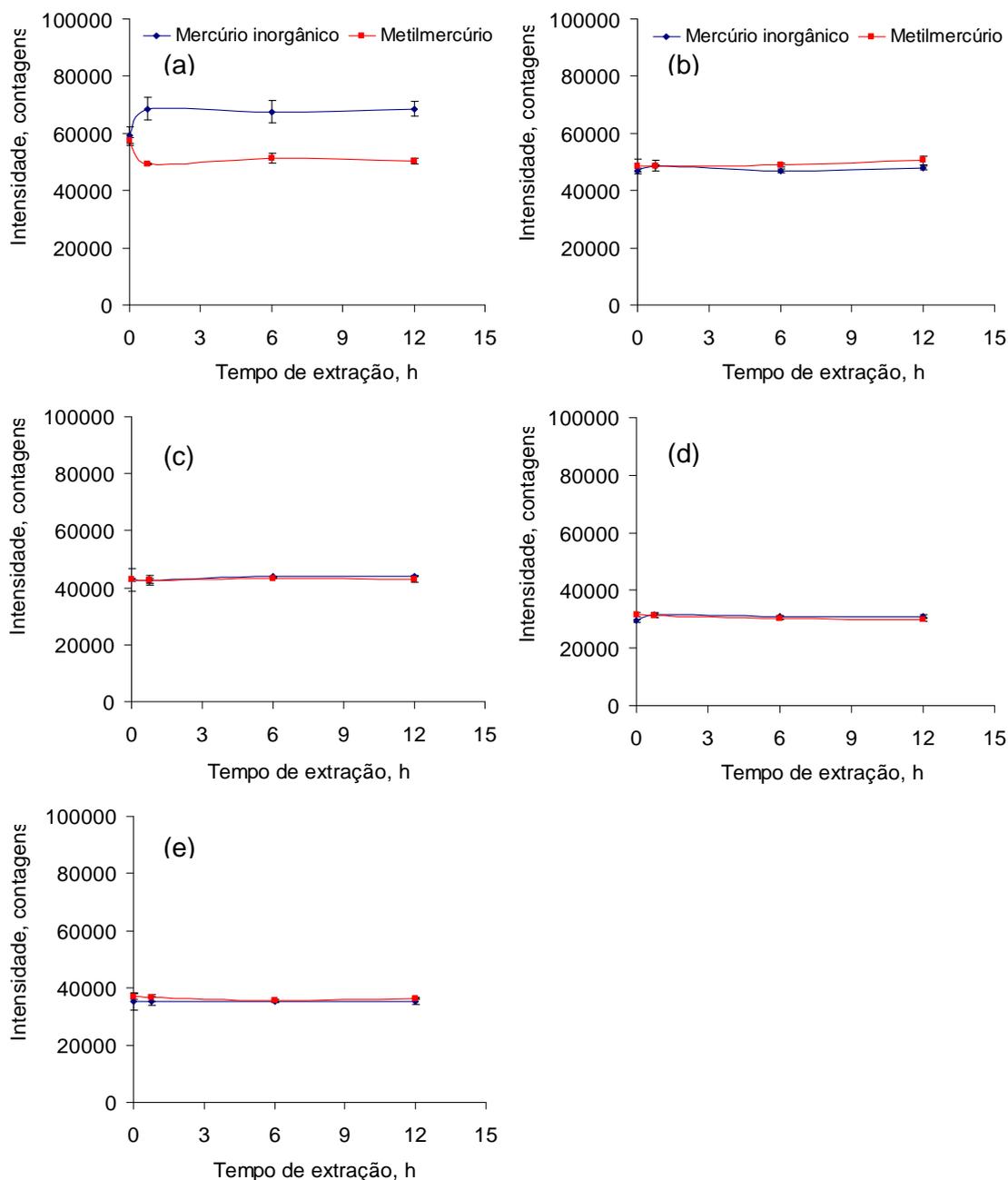


Figura 16. Efeito do tempo de extração convencional sobre a estabilidade de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em diferentes soluções extratoras. (a) HCl 6,0 mol L⁻¹; (b) HCl 3,0 mol L⁻¹; (c) HCl 1,0 mol L⁻¹; (d); L-cisteína 1,0% (m/v); (e) água. Volume das soluções extratoras: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0 (n = 3).

De acordo com a Figura 16, pode-se observar que o CH_3Hg^+ é degradado parcialmente apenas em HCl 6,0 mol L⁻¹, de modo que com as demais soluções extratoras não foi observada conversão das espécies de Hg.

Considerando que não houve conversão das espécies de Hg nos meios extratores estudados, e levando-se em conta que o comportamento dessas espécies em solução aquosa e na amostra pode ser diferente, a eficiência de extração das soluções extratoras foi avaliada nas amostras e no CRM. Dessa forma, baseado em trabalhos anteriores¹⁴, para alcançar uma extração quantitativa das espécies de Hg, fixou-se o tempo de extração em 12 h. Na Figura 17 estão mostrados os cromatogramas obtidos para a extração de Hg nessas amostras.

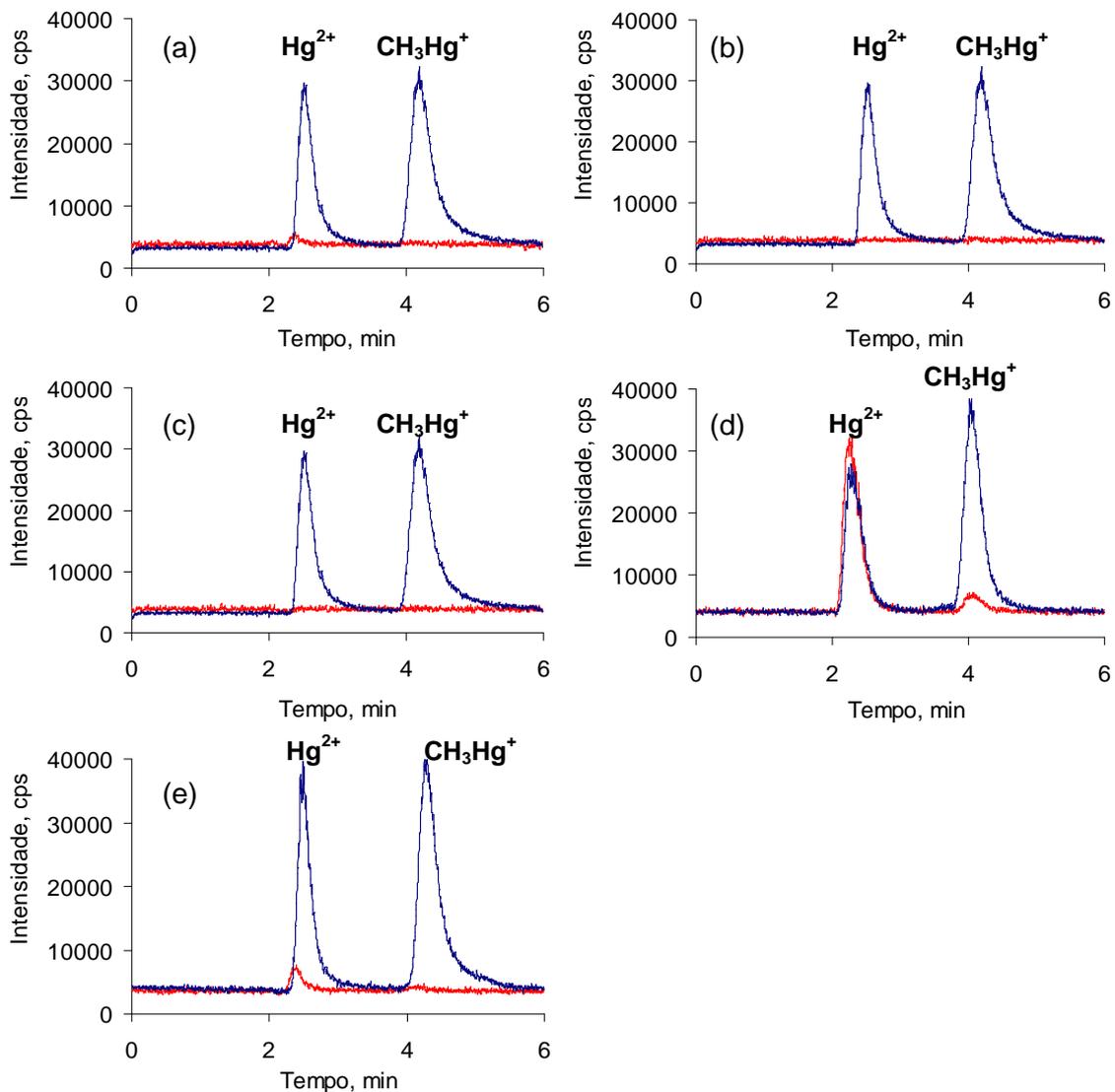


Figura 17. Cromatogramas referentes à extração convencional (repouso por 12 h a 25 °C) em solução referência mista $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul) e na amostra (extração) (vermelho) em diferentes meios de extração. (a) HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$; (b) HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$; (c) HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; (d) L-cisteína $1,0\%$ (m/v); (e) água. Massa de amostra: 500 mg, volume de solução extratora: 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0.

De acordo com a Figura 17, com a solução de L-cisteína também se obteve a melhor eficiência de extração das espécies de Hg. Nos outros meios extratores a eficiência de extração não foi quantitativa. Rahman *et al.*²³ também observaram baixa eficiência de extração ($79 \pm 4\%$) de espécies de Hg em cabelo, quando o meio extrator foi HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Na Tabela 8 são mostradas as concentrações das espécies de Hg obtidas para a amostra e CRM nas diferentes condições.

Tabela 8. Concentrações (ng g^{-1}) obtidas para as espécies de Hg em cogumelo e no CRM extraídos com HCl 1,0; 3,0 e 6,0 mol L^{-1} , água e L-cisteína 1,0% (m/v), utilizando extração convencional por 12 h a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$).

Solução extratora	Amostra	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺ **	Hg _{total} ***
HCl 6,0 mol L ⁻¹	<i>Agaricus bisporus</i>	< 1,39	< 0,63	-
	DOLT-3*	404 ± 18	352 ± 34	756 ± 38
HCl 3,0 mol L ⁻¹	<i>Agaricus bisporus</i>	<1,39	<0,63	-
	DOLT-3	<1,39	$72,6 \pm 5,4$	$72,6 \pm 5,4$
HCl 1,0 mol L ⁻¹	<i>Agaricus bisporus</i>	<1,39	<0,63	-
	DOLT-3	<1,39	$60,7 \pm 17,2$	$60,7 \pm 17,2$
L-cisteína 1,0% (m/v)	<i>Agaricus bisporus</i>	$34,7 \pm 1,3$	$4,21 \pm 0,07$	$38,9 \pm 1,3$
	DOLT-3	2081 ± 77	1384 ± 37	3465 ± 85
Água	<i>Agaricus bisporus</i>	$3,81 \pm 0,05$	$2,43 \pm 0,16$	$6,24 \pm 0,17$
	DOLT-3	$71,4 \pm 18,0$	199 ± 31	270 ± 36

Hg_{total} (MW): *Agaricus bisporus* $39,9 \pm 2,0 \text{ ng g}^{-1}$

* Valor certificado: Hg_{total} $3370 \pm 140 \text{ ng g}^{-1}$; CH₃Hg⁺ $1590 \pm 120 \text{ ng g}^{-1}$

** Expresso como Hg

*** Soma da concentração de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺

Bramanti *et al.*⁸² afirmaram que a complexação do Hg²⁺ com os grupos sulfidrila do complexante a temperatura ambiente não necessita de um tempo prolongado de contato antes da sua determinação. Por isso, a extração da amostra *Pleurotus eryngii*, nessas condições, em solução de L-cisteína 1,0% (m/v) foi testada. A concentração obtida para Hg²⁺ foi de $9,82 \pm 0,77$ e para CH₃Hg⁺ foi de $6,54 \pm 0,17 \text{ ng g}^{-1}$ (como Hg), resultando em uma eficiência de extração de 79% de Hg total (soma das espécies de Hg), em relação à concentração de Hg total

determinada por CVG-ICP-MS. Dessa forma, para essa amostra foi necessário um tempo de extração maior para que a eficiência da extração fosse maior.

De acordo com os resultados obtidos, a solução extratora de L-cisteína 1,0% (m/v) e 12 h de tempo de extração convencional foram selecionados para as determinações posteriores.

5.4. EFEITO DA MASSA DE AMOSTRA SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE Hg^{2+} E CH_3Hg^+

A eficiência de extração das espécies de Hg em diferentes massas de amostra foi avaliada, utilizando, para isso, a solução extratora de L-cisteína 1,0% (m/v), em virtude de essa proporcionar extrações quantitativas para os três procedimentos de extração avaliados, como foi mostrado nos experimentos anteriores. Na Figura 18 está mostrada o efeito da massa da amostra na extração das espécies de Hg, utilizando o mesmo volume de solução extratora. Os valores são comparados com a concentração total de Hg determinada por CVG-ICP-MS.

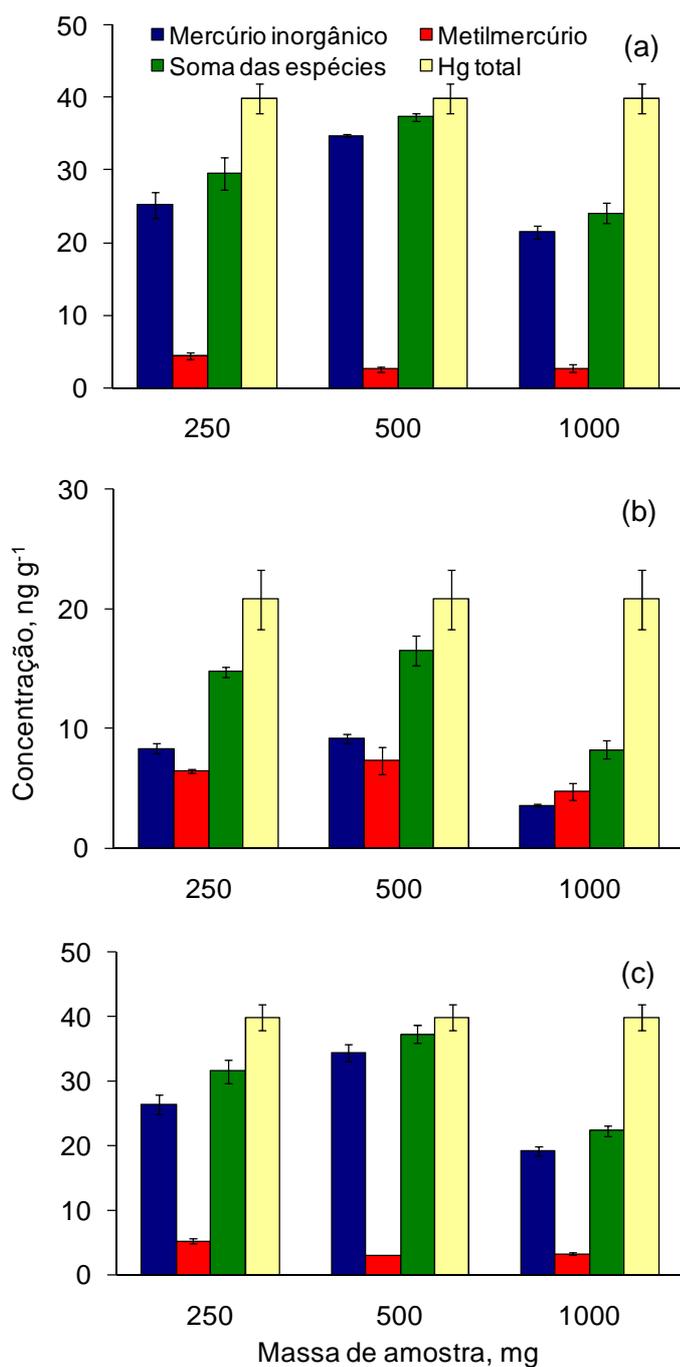


Figura 18. Efeito da massa de amostra sobre a eficiência de extração das espécies de Hg. Extração: (a) US 20% por 1 min; (b) MW 100 °C por 10 min; (c) convencional (reposo por 12 h a 25 °C). Volume de L-cisteína 1,0% (m/v): 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0 (n = 3). Nas extrações por US e convencional utilizou-se a espécie *Agaricus bisporus* como amostra. Na extração por MW utilizou-se a espécie *Pleurotus eryngii*. Hg total corresponde a $39,9 \pm 2,0 \text{ ng g}^{-1}$ para (a) e (c), e $20,8 \pm 2,5 \text{ ng g}^{-1}$ para (b).

De acordo com a Figura 18, a massa de amostra que proporcionou as melhores extrações para os três métodos avaliados foi de 500 mg. Embora que melhores extrações foram conseguidas com menores massas de amostra, os resultados inferiores obtidos para 250 mg de amostra podem estar relacionados a baixa concentração de Hg nas amostras, cujos valores ficaram muito próximos ao limite de detecção do método. Isto deve ter levado a um maior erro nestes resultados (os ensaios não foram repetidos para avaliar este efeito). Dessa forma, a massa de 500 mg foi selecionada para os estudos posteriores. Resultado semelhante foi encontrado por Hight e Cheng¹³, ao selecionar a melhor massa de amostra para determinar espécies de Hg em tecido de peixe. No entanto, o volume de solução extratora usado pelos autores foi de 50 mL, enquanto que no presente trabalho o volume foi de 6 mL.

5.5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE A EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Hg

O efeito da concentração de L-cisteína sobre a eficiência de extração das espécies de Hg também foi avaliado. Para isso, utilizou-se a melhor massa de amostra otimizada no item 5.4. (*“Efeito da massa de amostra sobre a eficiência de extração de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ ”*) (500 mg de amostra) e manteve-se o volume de extrator em 6 mL, variando-se apenas a concentração de L-cisteína. Na Figura 19 estão mostradas as concentrações das espécies encontradas nas amostras em função da concentração de L-cisteína, em comparação com a concentração de Hg total, determinados conforme o item 5.2.

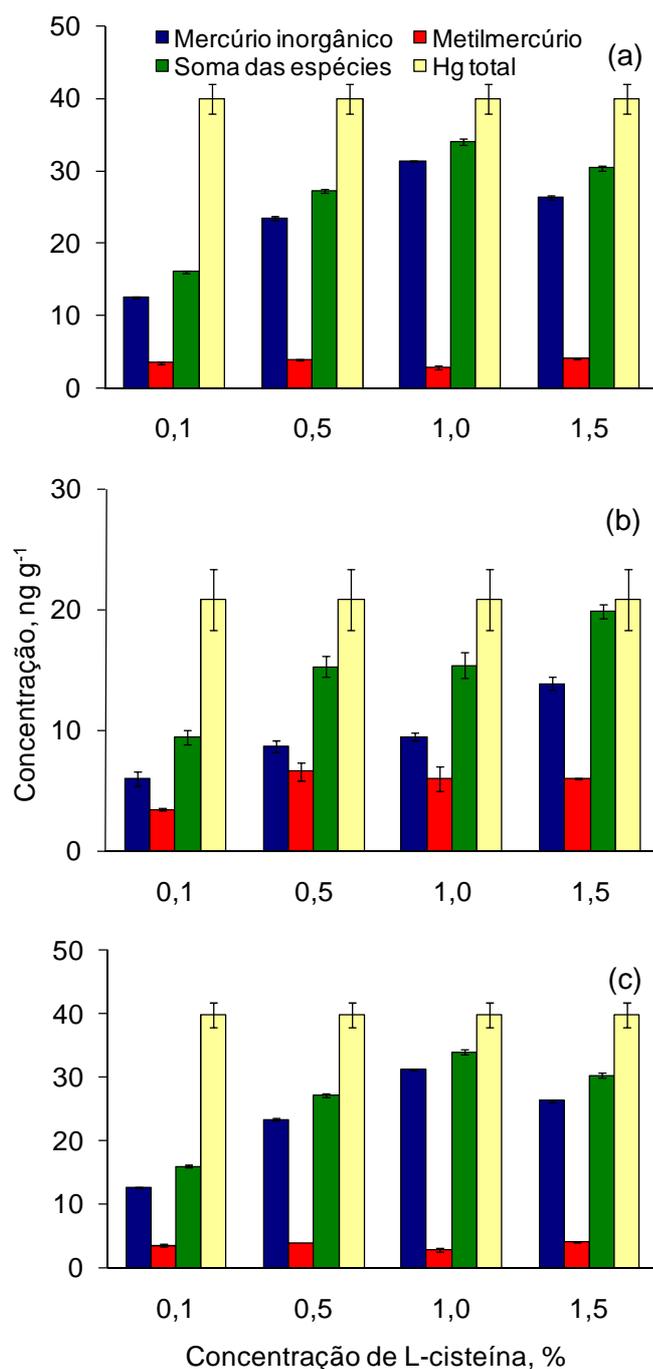


Figura 19. Efeito da concentração de L-cisteína sobre a eficiência de extração das espécies de Hg. Extração: (a) US 20% por 1 min; (b) MW 100 °C por 10 min; (c) convencional (repouso 12 h a 25 °C). Hg total: $39,9 \pm 2,0$ ng g⁻¹ para (a) e (c) e $20,8 \pm 2,5$ ng g⁻¹ para (b). Massa de amostra: 500 mg, volume de L-cisteína a 1,0% (m/v): 6 mL, volume final: 15 mL, pH 4,0 (n = 3). Nas extrações por US e convencional utilizou-se a espécie *Agaricus bisporus*. Na extração por MW utilizou-se a espécie *Pleurotus eryngii*.

De acordo com a Figura 19, a concentração de L-cisteína que proporcionou as melhores extrações para os procedimentos (a) e (c), utilizando massa de 500 mg de amostra foi 1,0% (m/v). No entanto, para o procedimento (b), que utiliza extração assistida por MW, a solução de L-cisteína 1,5% (m/v) extraiu com maior eficiência as espécies de Hg. Portanto, para os procedimentos (a) e (c) a solução de L-cisteína 1,0% (m/v) foi selecionada, enquanto que para o procedimento (b) a solução de L-cisteína 1,5% (m/v) foi usada para extrair as espécies de Hg nos estudos posteriores.

5.6. AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS AVALIADOS PARA A ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO DE Hg EM COGUMELOS

A eficiência dos procedimentos de extração estudados, bem como possíveis efeitos de matriz⁹⁹ foram avaliados através de ensaios de recuperação das espécies de Hg nas amostras e pela análise de material de referência certificado. Concentrações conhecidas de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ foram adicionadas antes da etapa de extração, com a finalidade de avaliar a influência dos procedimentos adotados sobre as espécies de Hg. A quantidade de Hg^{2+} adicionada foi feita de acordo com as concentrações de Hg total presentes nas amostras. A concentração de CH_3Hg^+ foi padronizada conforme a diluição adotada para cada amostra, de modo a se obter uma concentração final de $6,0 \text{ ng g}^{-1}$ (como Hg), uma vez que as concentrações de CH_3Hg^+ presentes nas amostras utilizadas neste trabalho são muito baixas. Na Figura 20 são mostrados os resultados dos ensaios de recuperação para as espécies de Hg nas amostras.

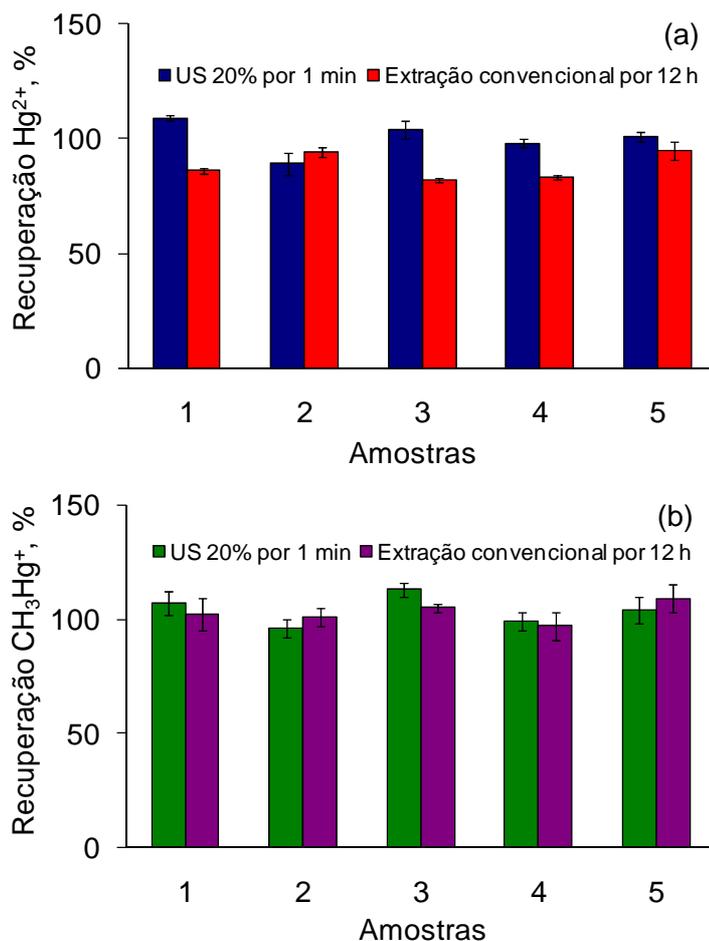


Figura 20. Recuperações das espécies de Hg em cogumelo empregando os procedimentos de extração por US e convencional. (a) Hg^{2+} ; (b) CH_3Hg^+ . Massa de amostra: 500 mg; volume de L-cisteína 1,0% (m/v): 6 mL; volume final: 15 mL; pH 4,0 (n = 3). Amostras: (1) *Agaricus bisporus*; (2) *Pleurotus citrinopileatus*; (3) *Pleurotus eryngii*; (4) *Pleurotus ostreatus*; (5) *Pleurotus djamor*.

Pode-se observar, segundo a Figura 20, que as recuperações para CH_3Hg^+ foram satisfatórias para todas as amostras, nos dois procedimentos de extração avaliados. No entanto, as recuperações para Hg^{2+} foram melhores (maiores que 97%) quando US foi usada para auxiliar no processo de extração, em relação à extração convencional por 12 h, que proporcionou recuperações na ordem de 88%.

Além dos ensaios de recuperação dos analitos, para avaliar a exatidão dos procedimentos de extração o CRM DOLT-3 foi analisado. As concentrações das espécies de Hg determinadas nos cogumelos, bem como no CRM são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações (ng g^{-1}) das espécies de Hg em cogumelos e no CRM, obtidas pela extração em solução de L-cisteína 1,0% (m/v) (extração assistida por US e convencional) ou 1,5% (m/v) (extração assistida por MW) ($n = 3$). Valores entre parênteses referem-se à eficiência de extração, em porcentagem, obtidos para as amostras em relação ao Hg_{total}

Amostra	US (20%, 1 min)			MW (100 °C, 10 min)			Extração convencional (repouso 12 h)			Decomposição
	$\text{CH}_3\text{Hg}^{+***}$	Hg^{2+}	$\text{Hg}_{\text{total}}^{***}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^{+***}$	Hg^{2+}	$\text{Hg}_{\text{total}}^{***}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^{+***}$	Hg^{2+}	$\text{Hg}_{\text{total}}^{***}$	Hg_{total}
<i>Agaricus bisporus</i>	$4,85 \pm 0,59$	$35,2 \pm 0,1$	$40,0 \pm 0,6$ (100%)	$7,73 \pm 0,30$	$22,5 \pm 0,1$	$30,2 \pm 0,3$ (76%)	$4,21 \pm 0,07$	$34,7 \pm 1,3$	$38,9 \pm 1,3$ (97%)	$39,9 \pm 2,0$
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	$7,20 \pm 0,96$	$19,1 \pm 1,0$	$26,3 \pm 1,4$ (91%)	$8,52 \pm 1,30$	$17,0 \pm 0,8$	$25,5 \pm 1,5$ (88%)	$5,36 \pm 0,47$	$20,2 \pm 1,4$	$25,6 \pm 1,5$ (88%)	$28,9 \pm 1,2$
<i>Pleurotus eryngii</i>	$7,31 \pm 0,33$	$10,6 \pm 0,6$	$17,9 \pm 0,5$ (86%)	$6,67 \pm 0,25$	$8,39 \pm 0,15$	$15,1 \pm 0,3$ (73%)	$4,65 \pm 0,51$	$18,6 \pm 0,7$	$23,2 \pm 0,9$ (111%)	$20,8 \pm 2,5$
<i>Pleurotus ostreatus</i>	$5,18 \pm 0,41$	$16,9 \pm 1,43$	$22,1 \pm 1,5$ (91%)	$3,20 \pm 0,34$	$11,3 \pm 0,4$	$14,5 \pm 0,5$ (59%)	$1,95 \pm 0,15$	$21,1 \pm 1,6$	$23,0 \pm 1,6$ (94%)	$24,4 \pm 0,5$
<i>Pleurotus djamor</i>	$5,38 \pm 0,32$	$17,9 \pm 1,1$	$23,3 \pm 1,2$ (91%)	$3,55 \pm 0,53$	$7,15 \pm 0,66$	$10,7 \pm 0,8$ (42%)	$2,50 \pm 0,33$	$22,5 \pm 0,8$	$25,0 \pm 0,9$ (98%)	$25,6 \pm 0,8$
DOLT-3 *	1441 ± 47 (91%)	1646 ± 58	3087 ± 75 (95%)	1482 ± 90 (93%)	1646 ± 93	3128 ± 129 (96%)	1403 ± 46 (88%)	1917 ± 97	3320 ± 107 (102%)	3258 ± 85

* Valor certificado: $\text{Hg}_{\text{total}} 3370 \pm 140 \text{ ng g}^{-1}$; $\text{CH}_3\text{Hg}^+ 1590 \pm 120 \text{ ng g}^{-1}$

** Expresso como Hg

*** Soma da concentração de CH_3Hg^+ e Hg^{2+}

De acordo com a Tabela 9, os valores obtidos para Hg total no CRM (DOLT-3) estão em concordância com o valor determinado por CVG-ICP-MS, assim como os valores obtidos para CH_3Hg^+ é concordante com o valor certificado, de acordo com teste estatístico (Teste *t*-Student, intervalo de confiança de 95%, $p < 0,05$). Pode-se observar, portanto, que a L-cisteína extraiu quantitativamente as espécies de Hg no CRM, sem haver conversão entre elas, nos três procedimentos avaliados.

De maneira geral, pode-se observar que as eficiências das extrações das espécies de Hg das amostras, utilizando os procedimentos de extração convencional e por US tiveram um melhor desempenho em relação ao uso de MW, onde a eficiência máxima de extração foi de 88% (para a espécie *Pleurotus citrinopileatus*). De acordo com o teste estatístico (Teste *t*-Student, intervalo de confiança de 95%), todos os valores de Hg total, obtidos a partir da soma das concentrações das espécies de Hg após extração assistida por MW, determinadas por LC-CVG-ICP-MS, são estatisticamente diferentes em relação ao Hg total determinado por CVG-ICP-MS. Dessa forma, a extração assistida por MW, nas condições usadas, não foi considerada adequada para a extração das espécies de Hg em cogumelos, apesar dos valores concordantes obtidos para o CRM.

Observou-se também, que as concentrações obtidas para CH_3Hg^+ com extração assistida US foram maiores em relação à extração convencional. No entanto, esse fato não comprova interconversão de Hg^{2+} para CH_3Hg^+ , uma vez que, de acordo com Falter *et al.*¹²⁷, a metilação em amostras biológicas é mais difícil de ocorrer. De acordo com a avaliação estatística para os resultados obtidos na extração convencional e por US (Teste *t*-Student, intervalo de confiança de 95%, $p < 0,05$) foi possível concluir que não há diferença significativa entre as concentrações obtidas para a soma das espécies de Hg em relação ao Hg total determinado por CVG-ICP-MS. Dessa forma pode-se afirmar que os procedimentos de extração convencional e por US são apropriados para extrair Hg^{2+} e CH_3Hg^+ de cogumelos, sendo que suas eficiências de extração foram sempre superiores que 86% (para a amostra de *Pleurotus eryngii*).

Apesar da constatação mencionada anteriormente, a extração assistida por US tende a ser mais rápida (1 min) que a extração convencional, possivelmente devido a maior agitação, enquanto que na extração convencional o tempo mínimo para preparo da amostra é de 12 h.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 9, as amostras de cogumelos possuem concentrações muito baixas de ambas as espécies de Hg, o que não traria problemas maiores para o consumo humano de acordo com o EPA⁴⁹ e com a OMS.^{5,50}

No Brasil, de acordo com a ANVISA, as concentrações de Hg total encontradas neste trabalho chegam a ser até quatro vezes mais elevadas que o permitido ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Mas lembrando, que de acordo com o Informe Técnico nº6 da ANVISA⁵², os cogumelos “in natura” são produtos que não têm obrigatoriedade de registro. Portanto, esses produtos podem ser considerados próprios para consumo, levando-se em conta os limites máximos para Hg de órgãos internacionais.^{5,49,50}

Os cromatogramas obtidos para as espécies de Hg nos cogumelos e para o CRM, para cada procedimento de extração avaliado são mostrados na Figura 21.

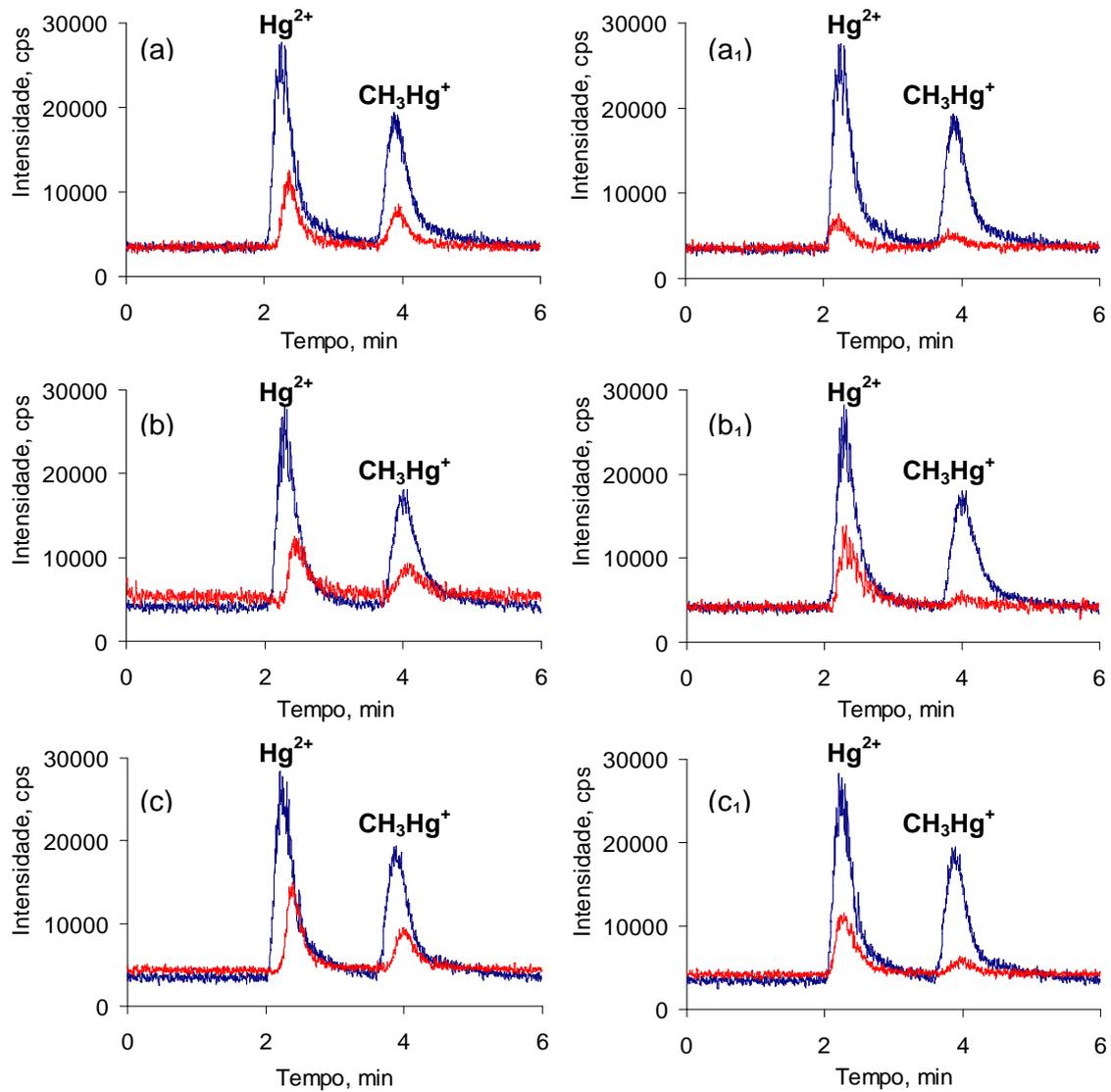


Figura 21. Cromatogramas obtidos a partir de solução referência mista (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (como Hg) (azul), CRM e amostra (*Pleurotus eryngii*) (vermelho) (extração). (a) DOLT-3 (diluição de 10 vezes) e (a₁) amostra (diluição de 2 vezes): extração assistida por US; (b) DOLT-3 (diluição de 10 vezes) e (b₁) amostra (diluição de 2 vezes): extração assistida por MW; (c) DOLT-3 (diluição de 10 vezes) e (c₁) amostra (diluição de 2 vezes): extração convencional. Fase móvel: L-cisteína 0,1% (m/v), pH 4,0.

5.7. PARÂMETROS DE MÉRITO

As duas espécies de Hg encontradas nas amostras de cogumelo foram separadas em 6 min, cujos tempos de retenção foram de $2,3 \pm 0,1$ para Hg^{2+} e $3,9 \pm 0,1$ min para CH_3Hg^+ , significando que a técnica de determinação

(LC-CVG-ICP-MS) é relativamente rápida. A concentração das espécies de Hg foi determinada por calibração externa (curva de calibração na faixa de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ como Hg), usando a área do sinal cromatográfico de ambas as espécies de Hg. Os limites de detecção foram calculados a partir do critério de 3σ , onde σ corresponde ao desvio padrão de cinco medições consecutivas do branco. Os parâmetros obtidos para a determinação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ nos cogumelos por LC-CVG-ICP-MS, empregando os três procedimentos de extração avaliados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros de mérito do método LC-CVG-ICP-MS para análise de especiação de Hg em cogumelo para os três procedimentos de extração estudados.

Parâmetro	Resultados	
	Hg^{2+}	CH_3Hg^+
US 20%, 1 min		
Desvio padrão relativo (RSD, n = 3), %	<8	<13
Limite de detecção (LD), ng g^{-1}	0,41	0,35
Limite de quantificação (LQ), ng g^{-1}	1,38	1,17
MW 100 °C, 10 min		
Desvio padrão relativo (RSD, n = 3), %	<6	<16
Limite de detecção (LD), ng g^{-1}	0,64	0,90
Limite de quantificação (LQ), ng g^{-1}	2,13	3,00
Extração convencional, repouso 12 h		
Desvio padrão relativo (RSD, n = 3), %	<8	<13
Limite de detecção (LD), ng g^{-1}	1,41	0,11
Limite de quantificação (LQ), ng g^{-1}	4,69	0,38

LD e LQ estimados a partir de 500 mg de amostra diluídos a 15 mL e injeção de 200 μL de solução.

6. CONCLUSÕES

De acordo com o objetivo proposto neste trabalho, foram avaliados procedimentos baseados no uso da extração convencional, do ultrassom e do micro-ondas para a extração de espécies de Hg em cogumelos comestíveis, para posterior determinação por LC-CVG-ICP-MS. De maneira geral, apenas as extrações com solução de L-cisteína 1,0% (m/v) extraíram quantitativamente as espécies de Hg das amostras e do CRM (DOLT-3). Isto pode ser atribuído às elevadas constantes de formação do complexo HgS, além da estabilização, por parte da L-cisteína, das espécies de Hg.

Nas otimizações iniciais do sistema LC-CVG-ICP-MS pode-se observar que a fase móvel desempenha um papel importante na separação das espécies de Hg, assim como para os seus tempos de retenção. No entanto, sua composição pode causar comprometimento na separação das espécies de Hg com o passar do tempo, possivelmente devido à adsorção dos reagentes complexantes, como o 2-mercaptoetanol, ou de possíveis compostos formados na coluna cromatográfica, resultantes da fase móvel ou da solução extratora.

Foi demonstrado que a aplicação de US converte facilmente o CH_3Hg^+ em Hg^{2+} em soluções de HCl (1,0, 3,0 e 6,0 mol L⁻¹), ao mesmo tempo que suas eficiências para extrair as espécies de Hg das amostras de cogumelo são baixas. O mesmo não ocorre quando o meio extrator é a água e a L-cisteína, cujas espécies de Hg são estáveis nestes meios, mas apenas a L-cisteína proporcionou extrações quantitativas para Hg.

Quando a radiação MW foi usada, as espécies de Hg foram estáveis em água, L-cisteína e HCl 1,0 mol L⁻¹ nas temperaturas máximas testadas (100 °C),

ao passo que nas soluções de HCl 3,0 e 6,0 mol L⁻¹ ocorreram conversões. A água e as soluções de HCl não extraíram quantitativamente as espécies de Hg das amostras, nem do CRM. Porém, as extrações das espécies de Hg das amostras com L-cisteína 1,5% (m/v) não foram satisfatórias, como esperado; ao contrário do CRM, onde a extração foi eficiente.

Da mesma forma que os procedimentos anteriores, na extração convencional, utilizando repouso da amostra na solução extratora por até 12 h a 25 °C, ocorreu conversão das espécies de Hg na solução de HCl 6,0 mol L⁻¹. Nos demais meios extratores não foram observados conversão por um período de até 12 h. Adicionalmente, as extrações das espécies de Hg foram quantitativas apenas em solução de L-cisteína 1,0% (m/v). Apesar de que tenha sido mencionado na literatura que apenas um curto tempo de contato da amostra com a solução extratora de L-cisteína seja suficiente para uma extração quantitativa de Hg, neste trabalho não foi comprovado tal afirmação, havendo, possivelmente, a necessidade de um tempo maior do 12 h para a extração.

Em resumo, a L-cisteína 1,0% (m/v) proporcionou extrações satisfatórias das espécies de Hg, tanto para a amostra, como para o CRM, podendo ser empregada a extração assistida por US ou a extração convencional.

Os valores obtidos para a determinação de Hg em cogumelos e no CRM foram superiores a 86% (em relação à concentração de Hg total determinada por CVG-ICP-MS) para os procedimentos de extração assistida por US e convencional (utilizando 500 mg de amostra, 6 mL de solução de L-cisteína 1,0% (m/v) e volume final de 15 mL). No entanto, para a extração por MW não foram obtidas extrações eficientes dos analitos, sendo que a maior eficiência de extração obtida foi de 88% (equivalente à soma das espécies de Hg) em relação ao Hg total determinado por CVG-ICP-MS. Dessa forma, pode-se afirmar que as extrações convencional e assistida por US são adequadas para a extração das espécies de Hg em cogumelos comestíveis, mas devido ao menor tempo necessário no preparo da amostra, a extração por US (1 min) é vantajosa em relação à extração convencional (12 h).

As concentrações de Hg encontrados em todas as amostras são baixas, indicando que os cogumelos analisados são próprios para o consumo, de acordo com legislações internacionais, uma vez que a ANVISA não determina limite máximo de Hg para cogumelos “in natura”.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M., Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 383-393.
2. Michelot, D.; Siobud, E.; Doré, J.; Viel, C.; Poirier, F., Update on metal content profiles in mushrooms - Toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation, *Toxicol.* 36 (1998) 1997-2012.
3. Cocchi, L.; Vescovi, L.; Petrini, L.E.; Petrini, O., Heavy metals in edible mushrooms in Italy, *Food Chem.* 98 (2006) 277-284.
4. Capar, S.G.; Mindak, W.R.; Cheng, J., Analysis of food for toxic elements, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 159-169.
5. Levenson, C.W.; Axelrad, D.M., Too Much of a Good Thing? Update on Fish Consumption and Mercury Exposure, *Nutr. Rev.* 64 (2006) 139-145.
6. Korn, M.G.A.; Morte, E.S.B.; Santos, D.C.M.B.; Castro, J.T.; Barbosa, J.T.P.; Teixeira, A.P.; Fernandes, A.P.; Welz, B.; Santos, W.P.C.; Santos, E.B.G.N.; Korn, M., Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - a review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2008) 67-92.
7. Reyes, L.H.; Rahman, G.M.M.; Fahrenholz, T.; Kingston, H.M.S., Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.
8. Río-Segade, S.; Bendicho, C., Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection–cold vapor technique, *J. Anal. At. Spectrom.* 14

- (1999) 263-268.
9. Ortiz, A.I.C.; Albarrán, Y.M.; Rica, C.C., Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.
 10. Kaercher, L.E.; Goldschmidt, F.; Paniz, J.N.G.; Flores, E.M.M.; Dressler, V.L., Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 705-710.
 11. Reyes, L.H.; Rahman, G.M.M.; Kingston, H.M.S., Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues, *Anal. Chim. Acta* 631 (2009) 121-128.
 12. Alp, O.; Ertas, N., Determination of inorganic and total mercury by flow injection vapor generation atomic absorption spectrometry using a W-coil atomizer, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 93-96.
 13. Hight, S.C.; Cheng, J., Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.
 14. Meng, W.; Weiyue, F.; Junwen, S.; Fang, Z.; Bing, W.; Motao, Z.; Bai, L.; Yuliang, Z.; Zhifang, C., Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 71 (2007) 2034-2039.
 15. Chiou, C.; Jiang, S.; Danadurai, K.S.K., Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1133-1142.
 16. Nevado, J.J.B.; Martín-Doimeadios, R.C.R.; Bernardo, F.J.G.; Moreno, M.J., Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 21-28.
 17. Chang, L.; Jiang, S.; Sahayam, A.C., Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 143-148.

18. Krishna, M.V.B.; Ranjit, M.; Karunasagar, D.; Arunachalam, J., A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS, *Talanta* 67 (2005) 70-80.
19. Júnior, D.S.; Krug, F.J.; Pereira, M.G.; Korn, M., Currents on Ultrasound-Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 305-321.
20. Hintelmann, H.; Nguyen, H.T., Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 360-365.
21. Flores, E.M.M.; Welz, B.; Curtius, A.J., Determination of mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite tube, and electrothermal atomization, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614.
22. Krupp, E.M.; Milne, B.F.; Mestrot, A.; Meharg, A.A.; Feldmann, J., Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1753-1764.
23. Rahman, G.M.M.; Fahrenholz, T.; Kingston, H.M.S., Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate methods for efficiencies, recoveries, and quantification of mercury species transformations in human hair, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 83-92.
24. Wan, C.; Cheen, C.; Jiang, S., Determination of Mercury Compounds in Water Samples by Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry With an In Situ Nebulizer/Vapor Generator, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 683-687.
25. Lin, L.; Chang, L.; Jiang, S., Speciation Analysis of Mercury in Cereals by Liquid Chromatography Chemical Vapor Generation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *J. Agr. Food Chem.* 56 (2008) 6868-6872.
26. World Health Organization, Regional Office for Europe, *Air Quality Guidelines*, 2nd ed., Copenhagen, Denmark, 2000, 15 p.
27. Uría, J.E.S.; Sanz-Medel, A., Inorganic and methylmercury speciation in environmental Samples, *Talanta* 47 (1998) 509-524.

28. Craig, P.J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons Ltd., 2nd ed., Chichester, England, 2003, 415 p.
29. World Health Organization, Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects, *Concise International Chemical Assessment Document 50*, Geneva, 2003, 68 p.
30. Mason, R.P.; Benoit, J.M., Organomercury compounds in the environment in: Craig, P.J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons Ltd., 2nd ed., Chichester, England, 2003, 415 p.
31. Houserová, P.; Matejicek, D.; Kubán, V.; Pavlicková, J.; Komárek, J., Liquid chromatographic - cold vapour atomic fluorescence spectrometric determination of mercury species, *J. Sep. Sci.* 20 (2006) 248-255.
32. Järup, L., Hazards of heavy metal contamination, *Brit. Med. Bull.* 68 (2003) 167-182.
33. Triunfante, P.; Soares, M.E.; Santos, A.; Tavares, S.; Carmo, H.; Bastos, M.L., Mercury fatal intoxication: Two cases reports, *Forensic Sci. Int.* 184 (2009) e1-e6.
34. Bisinoti, M.C.; Jardim, W.F.; O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente, *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.
35. Zahir, F.; Rizwi, S.J.; Haq, S.K.; Khan, R.H., *Environ. Toxicol. Phar.* 20 (2005) 351-360.
36. Stoichev, T.; Amouroux, D.; Martin-Doimeadios, R.C.R.; Monperrus, M.; Donard, O.F.X.; Tsalev, D.L., Speciation Analysis of Mercury in Aquatic Environment, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 591-619.
37. Rivaro, P.; Ianni, C.; Soggia, F.; Frache, R., Mercury speciation in environmental samples by cold vapour atomic absorption spectrometry with in situ preconcentration on a gold trap, *Microchim. Acta* 158 (2007) 345-352.
38. Watanabe, C.; Satoh, H., Evolution of Our Understanding of Methylmercury as a Health Threat, *Environ. Health Persp.* 104 (1996) 367-379.
39. Carro, A.M.; Mejuto, M.C., Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 283-307.
40. Vallant, B.; Kadnar, R.; Goessler, W., Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with

- ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 322-325.
41. Filippelli, M., Determination of trace amounts of organic and mercury in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry and organic mercury speciation by gas chromatography, *Anal. Chem.* 59 (1987) 116-118.
 42. Fischer, R.G.; Rapsomanikis, S.; Andreae, M.O.; Baldi, F., Bioaccumulation of Methylmercury and Transformation of Inorganic Mercury by Macrofungi, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 993-999.
 43. Shi, J.; Liang, L.; Jiang, G.; Jin, X., The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China, *Environ. Int.* 31 (2005) 357-365.
 44. Vetter, J., Arsenic content of some edible mushroom species, *Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 71-74.
 45. Kalac, P., Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review, *Food Chem.* 113 (2009) 9-16.
 46. Kalac, P.; Niznanská, M.; Bevilaqua, D.; Stasková, I., Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and a copper smelter, *Sci. Tot. Environ.* 177 (1996) 251-258.
 47. Lasota, W.; Florczak, J. Effects of growing conditions on accumulation of some toxic substances in mushrooms. II. Absorption and binding of ^{203}Hg by *Agaricus bisporus* Lange and *Pleurotus ostreatus*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 24 (1991) 7-71 (in Polish), em Kalack, P.; Svoboda, L., A review of trace element concentrations in edible mushrooms, *Food Chem.* 69 (2000) 273-281.
 48. Bargagli, R.; Baldi, F., Mercury and methyl mercury in higher fungi and their relation with the substrata in a cinnabar mining area, *Chemosphere* 13 (1984) 1059-1071.
 49. Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives, Sixty-first meeting, Rome, 10-19 June 2003; <http://www.epa.gov/mercury/pdfs/OAR-2002-0056-3460.pdf>, acessado em 27/03/2009.
 50. EEC, Commission Regulation (EC) N° 466/2001, *Official Journal of the European Communities* L77, 1-13.

51. Anvisa, Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965.
52. Anvisa, Procedimentos sobre Cogumelos: 1) dessecados inteiros ou fragmentados e em conserva, 2) em pós, cápsulas, comprimidos e em outras formas de apresentação não convencionais na área de alimentos, Informe Técnico nº 6, de 31 de janeiro de 2003.
53. Anvisa, Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis, Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005.
54. Benbrahim, M.; Denaix, L.; Thomas, A.; Balet, J.; Carnus, J., Metal concentrations in edible mushrooms following municipal sludge application on forest land, *Environ. Pollut.* 144 (2006) 847-854.
55. Falandysz, J.; Bielawski, L., Mercury and its bioconcentration factors in Brown Birch Scaber Stalk (*Leccinum scabrum*) from various sites in Poland, *Food Chem.* 105 (2007) 635-640.
56. Dietz, C.; Sanz, J.; Sanz, E.; Muñoz-Olivas, R.; Câmara, C., Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 114-129.
57. Michalke, B., Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples, *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 56 (2003) 122-139.
58. Tomlinson, M.J.; Lin, L.; Caruso, J.A., Plasma Mass Spectrometry as a Detector for Chemical Speciation Studies, *Analyst* 120 (1995) 583-589.
59. Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.; Muntau, H.; Leeuwen, H.P.V.; Lobinski, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements, Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.
60. Björn, E.; Larsson, T.; Lambertsson, L.; Skyllberg, U.; Frech, W., Recent Advances in Mercury Speciation Analysis with Focus on Spectrometric Methods and Enriched Stable Isotope Applications, *Ambio* 36 (2007) 443-451.
61. Cornelis, R.; Crews, H.; Caruso, J.; Heumann, K., *Handbook of elemental speciation: techniques and methodology*, John Wiley & Sons, England, 2003, 657 p.

62. Hintelmann, H.; Falter, R.; Ilgen, G.; Evans, R.D., Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH_3Hg^+) in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.
63. Ramalhosa, E.; Río-Segade, S.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, A., Microwave treatment of biological samples for methylmercury determination by high performance liquid chromatography–cold vapour atomic fluorescence spectrometry, *Analyst* 126 (2001) 1583-1587.
64. Gao, E.; Jiang, G.; He, B.; Yin, Y.; Shi, J., Speciation of mercury in coal using HPLC-CV-AFS system: Comparison of different extraction methods, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1397-1400.
65. Foy, G.P.; Pacey, G.E., Supercritical fluid extraction of mercury species, *Talanta* 61 (2003) 849-853.
66. Li, Y.; Hu, B., Sequential cloud point extraction for the speciation of mercury in seafood by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 1153-1160.
67. Chen, J.; Chen, H.; Jin, X.; Chen, H., Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration, *Talanta* 77 (2009) 1381-1387.
68. Luque-García, J.L.; Castro, M.D.L., Ultrasound: a powerful tool for Leaching, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41-47.
69. Davis, W.C.; Pol, S.S.V.; Schantz, M.M.; Long, S.E.; Day, R.D.; Christopher, S.J., An accurate and sensitive method for the determination of methylmercury in biological specimens using GC-ICP-MS with solid phase microextraction, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1546-1551.
70. Rahman, G.M.M.; Kingston, H.M., Development of a microwave-assisted extraction method and isotopic validation of mercury species in soils and sediments, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 20 (2005) 183-191.

71. Cattani, I.; Spalla, S.; Beone, G.M.; Del Re, A.A.M.; Boccelli, R.; Trevisan, M., Characterization of mercury species in soils by HPLC-ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films, *Talanta* 74 (2008) 1520-1526.
72. Lagha, A.; Chemat, S.; Bartels, P.V.; Chemat, F., Microwave - ultrasound combined reactor suitable for atmospheric sample preparation procedure of biological and chemical products, *Analisis* 27 (1999) 452-457.
73. Vásquez, M.J.; Abuín, M.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy, *Chemosphere* 39 (1999) 1211-1224.
74. 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, *Spectrochim. Acta B* 64 (2009) 513-519.
75. Liang, L.; Jiang, G.; Liu, J.; Hu, J., Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 131-137.
76. Rai, R.; Maher, W.; Kirkowa, F., Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (2002) 1560-1563.
77. Lemes, M.; Wang, F., Methylmercury speciation in fish muscle by HPLC-ICP-MS following enzymatic hydrolysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.
78. Westöö, G., Determination of methylmercury compounds in foodstuffs I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137.
79. Westöö, G., Determination of methylmercury compounds in foodstuffs II. Determination of Methylmercury in fish, egg, meat, and liver, *Acta Chem. Scand.* 21 (1967) 1790-1800.
80. Westöö, G., Determination of methylmercury salts in various kinds of biological material, *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 2277-2280.
81. Maggi, C.; Berducci, M.T.; Bianchi, J.; Giani, M.; Campanella, L., Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct

- Mercury Analyser, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 32-36.
82. Bramanti, E.; Cavallaro, R.; Onor, M.; Zamboni, R.; D'Ulivo, A., Determination of thiolic compounds as mercury complexes by cold vapor atomic absorption spectrometry and its application to wines, *Talanta* 74 (2008) 936-943.
 83. Morton, J.; Carolan, V.A.; Gardiner, P.H.E., The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 377-381.
 84. Hintelmann, H., Comparison of different extraction techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation, *Chemosphere* 39 (1999) 1093-1105.
 85. Margetínová, J.; Houserová-Pelcová, P.; Kubán, V., Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 115-123.
 86. Ahmed, R.; Stoepler, M., Decomposition and Stability Studies of Methylmercury in Water Using Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry, *Analyst* 111 (1986) 1371-1374.
 87. Gaona, X.; Valiente, M., Stability study on a Westöö-based methodology to determine organomercury compounds in polluted soil samples, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 219-230.
 88. Priego-Capote, F.; Castro, M.D.L., Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 644-653.
 89. Castro M.D.L.; Priego-Capote, F., Ultrasound-assisted preparation of liquids samples, *Talanta* 72 (2007) 321-334.
 90. Río-Segade, S.; Bendicho, C., Slurry sampling combined with ultrasonic pretreatment for total mercury determination in samples containing inorganic and methylmercury by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1907-1912.
 91. Filgueiras, A.V.; Capelo, J.L.; Lavilla, I.; Bendicho, C., Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame

- atomic absorption spectrometry, *Talanta* 53 (2000) 433-441.
92. Yoshinaga, J.; Morita, M.; Okamoto, K., New human hair certified reference material for methylmercury and trace elements, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 279-283.
 93. Collasiol, A.; Pozebon, D.; Maia, S.M., Ultrasound assisted mercury extraction from soil and sediment, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 157-164.
 94. Capelo, J.L.; Lavilla, I; Bendicho, C., Room Temperature Sonolysis-Based Advanced Oxidation Process for Degradation of Organomercurials: Application to Determination of Inorganic and Total Mercury in Waters by Flow Injection-Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984.
 95. Woller, A.; Garraud, H.; Martin, F.; Donard, O.F.X.; Fodor, P., Determination of Total Mercury in Sediments by Microwave-assisted Digestion–Flow Injection–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 53-56.
 96. Tinggi, U.; Craven, G., Determination of Total Mercury in Biological Materials by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry after Microwave Digestion, *Microchem. J.* 54 (1996) 168-173.
 97. Murphy, J.; Jones, P.; Hill, S.J., Determination of total mercury in environmental and biological samples by flow injection cold vapour atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 1867-1873.
 98. Yang, D.; Truong, H.T.; Chen, Y.; Belzile, N., Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 157-164.
 99. Palenzuela, B.; Manganiello, L.; Rios, A.; Valcárcel, M., Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography–piezoelectric detection, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 289-294.
 100. Ramalhosa, E.; Rio-Segade, S.; Pereira, E.; Valed, C.; Duarte, A., Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography–cold vapour atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 135-143.
 101. Qvarnström, J.; Tu, Q.; Frech, W.; Lüdke, C., Flow injection-liquid chromatography-cold vapour atomic absorption spectrometry for rapid

- determination of methyl and inorganic mercury, *Analyst* 125 (2000) 1193-1197.
102. Zoorob, G.K.; McKiernan, J.W.; Caruso, J.A., ICP-MS for Elemental Speciation Studies, *Microchim. Acta* 128 (1998) 145-168.
103. Krata, A.; Jędral, W.; Bulska, E., On the uniforming of the atomization process for inorganic and organic mercury in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 269-272.
104. Marins, R.V.; Paraquetti, H.H.M.; Ayres, G.A., Alternativa analítica para especiação físico-químicas de mercúrio em águas costeiras tropicais, *Quím. Nova* 25 (2002) 372-378.
105. Bisinoti, M.C.; Jardim, W.F.; Júnior, J.L.B.; Malm, O.; Guimarães, J.R., Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica do vapor frio, *Quím. Nova* 29 (2006) 1169-1174.
106. Emteborg, H.; Bjorklund, E.; Odman, F.; Karlsson, L.; Mathiasson, L.; Frech, W.; Baxter, D.C., Determination of Methylmercury in Sediments Using Supercritical Fluid Extraction and Gas Chromatography Coupled With Microwave-induced Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Analyst* 121 (1996) 19-29.
107. Montes-Bayón, M.; DeNicola, K.; Caruso, J.A., Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457-476.
108. Jarvis, K.E.; Gray, A.L.; Houk, R.S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Blackie, New York, USA, 1992, 380 p.
109. Wang, T., Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC–ICP–MS), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 807-831.
110. Michalke, B., The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 142-153.
111. Harrington, C.F., The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167-179.

112. Filippelli, M.; Baldi, F.; Brinckman, F.E.; Olson, G.J., Methylmercury determination as volatile methylmercury hydride by purge and trap gas chromatography in line with Fourier transform infrared spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1457-1460.
113. Diego, A.; Tseng, C.M.; Stoichev, T.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., Interferences during mercury speciation determination by volatilization, cryofocusing, gás chromatography and atomic absorption spectroscopy: comparative study between hydride generation and ethylation techniques, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 623-629
114. Becker, J.S., *Inorganic Mass Spectrometry-Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Jülich, Germany, 2007, 496 p.
115. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part I, *Spectrosc.* 16 (2001) 38-43.
116. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part II: The sample-introduction system, *Spectrosc.* 16 (2001) 56-61.
117. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part III: The plasma source, *Spectrosc.* 16 (2001) 26-31.
118. Thomas, R., A beginner's guide to ICP-MS: Part IV: The interface region, *Spectrosc.* 16 (2001) 26-34.
119. Han, Y.; Kingston, H.M.; Boylan, H.M.; Rahman, G.M.M.; Shah, S.; Richter, R.C.; Link, D.D.; Bhandari, S., Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 428-436.
120. Milestone, *Application notes for digestion*, Milestone, Itália, 2006.
121. Anton Paar GmbH, Multiwave 3000 microwave sample preparation system, Software version v1.27 – Synt, Graz, Áustria (2003).
122. Montuori, P.; Jover, E.; Alzaga, R.; Diez, D.; Bayona, J.M., Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 71-75.
123. Harrington, C.F.; Catterick, T., Problems Encountered During the Development of a Method for the Speciation of Mercury and Methylmercury by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma

- Mass Spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1053-1056.
124. Waters, Spherisorb Columns: Care and use manual, disponível em <http://www.waters.com>, acessado em 15/06/2009.
125. Morel, F.M.M.; Kraepiel, A.M.L.; Amyot, M., The chemical cycle and bioaccumulation of mercury, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29 (1998) 543-566.
126. Aizpurúa, I.C.M.; Tenuta-Filho, A.; Sakuma, A.M.; Zenebon, O., Use of cysteine to remove mercury from shark muscle, *Int. J. Food Sci. Technol.* 32 (1997) 333-337.
127. Falter, R.; Hintelmann, H.; Quevauviller, P., Conclusion of the workshop on "Sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatisation and detection, *Chemosphere* 39 (1999) 1039-1049.