



UFSM

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO ORGÂNICO E
INORGÂNICO POR CVG-GF AAS EM TECIDO MUSCULAR
DE PEIXE APÓS EXTRAÇÃO SELETIVA**

Marcio Pozzobon Pedroso

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO ORGÂNICO E
INORGÂNICO POR CVG-GF AAS EM TECIDO MUSCULAR
DE PEIXE APÓS EXTRAÇÃO SELETIVA**

por

Marcio Pozzobon Pedroso

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

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**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

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO ORGÂNICO E INORGÂNICO POR
CVG-GF AAS EM TECIDO MUSCULAR DE PEIXE APÓS EXTRAÇÃO
SELETIVA**

elaborada por

Marcio Pozzobon Pedroso

como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores



Prof. Dr. Reinaldo Calixto de Campos



Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler

Santa maria, 06 de maio de 2005.

UFSM
Biblioteca Central

UFSM
Biblioteca Central

Dedico o presente trabalho aos meus pais, Odila Maria e Antônio Gilberto, aos meus irmãos, Silvia e André, à minha namorada, Mônica, pelo amor, carinho, incentivo, confiança, caráter e compreensão.

"A virtude de uma pessoa mede-se não por ações excepcionais,
mas pelos hábitos cotidianos."

Blaise Pascal

"A história se repete mas a força deixa a história mal contada."

Humberto Gessinger

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. **Érico M. M. Flores**, pela oportunidade de realização deste trabalho, orientação durante o mestrado e a iniciação científica, pelas inúmeras contribuições feitas para o meu crescimento profissional e pessoal, pela ajuda e companheirismo em todos os momentos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Valderi L. Dressler**, pelo apoio e contribuição durante a execução deste trabalho, pela orientação e companheirismo em laboratório.

Ao Prof. Dr. **Reinaldo Calixto de Campos**, pela participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões feitas para o aprimoramento deste trabalho.

À Prof^a. Dra. **Dirce Pozebon**, por suas sugestões e contribuições como banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. **Adílson José Curtius**, pela doação dos materiais de referência certificados.

Ao Prof. Dr. **Celso Figueiredo Bittencourt**, pelo apoio e contribuição durante a realização deste trabalho.

Aos professores e colegas do Setor de Química Industrial e Ambiental, meu muito obrigado pelo companheirismo, pela contribuição para o meu crescimento científico e pelos bons momentos, em especial aos colegas Adriane, Diego, Diogo, Éder, Édson, Eliane, Fábio, Juliano, Júlio, Luiz, Michele (LARP) e Tibiriçá (LATER). Agradeço ao Fábio por sua colaboração direta no desenvolvimento deste trabalho e, também, a todos que indiretamente contribuíram para o mesmo.

À minha namorada Mônica, pelo incentivo, amor, carinho e, principalmente, compreensão durante o decorrer deste trabalho.

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. MERCÚRIO	7
2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO	8
2.2.1. Análise de especiação de mercúrio	9
2.2.1.1. Análise de especiação de mercúrio mediante uso de técnicas alternativas	13
2.2.1.2. Técnicas de detecção	17
2.3. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	17
2.3.1. Espectrometria de absorção atômica com vapor frio	18
2.3.2. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite	19
2.3.3. Determinação de Hg após aprisionamento das suas espécies voláteis em tubo de grafite	20
2.3.3.1. Avaliação da eficiência do aprisionamento de Hg em tubo de grafite	27
2.3.4. Outras técnicas de aprisionamento.....	29

3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	31
3.2. REAGENTES	33
3.3. MATERIAIS DIVERSOS	33
3.4. SISTEMA CVG-GF-AAS	34
3.4.1. Programas de aquecimento para recobrimento do tubo de grafite com Au e para determinação de Hg.....	34
3.4.2. Avaliação da eficiência total de aprisionamento do Hg	36
3.5. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	36
3.5.1. Determinação da concentração total de Hg	36
3.5.1.1. Decomposição das amostras de tecido muscular de peixe	36
3.5.1.2. Extração total das espécies de Hg	37
3.5.2. Análise de especiação	39
3.5.2.1. Degradação do MeHg	39
3.5.2.2. Extração seletiva para determinação de Hg ²⁺	39
3.5.2.3. Extração seletiva para determinação de MeHg	41
3.5.3. Calibração	41
3.5.4. Avaliação da relação massa de amostra/volume da solução extratora	42
3.5.5. Interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra	42
3.6. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO	43
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	44
4.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CVG-GF AAS	44
4.1.1. Distância entre o capilar e a parede interna do tubo de grafite	45
4.1.2. Concentração do NaBH ₄ e vazão do gás	45

4.1.3. Temperaturas de aprisionamento e atomização do Hg	46
4.1.4. Avaliação da eficiência total de aprisionamento do Hg	49
4.1.5. Limite de detecção e massa característica	50
4.1.6. Faixa linear e precisão	52
4.2. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE PEIXE .	52
4.2.1. Decomposição das amostras de peixe e determinação de Hg total por CVG-GF AAS	52
4.2.2. Extração total de Hg	53
4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO	57
4.3.1. Degradação do MeHg	59
4.3.2. Extração seletiva para determinação de Hg ²⁺	61
4.3.3. Extração seletiva para determinação de MeHg	63
4.3.4. Avaliação da relação massa de amostra/volume da solução extratora	68
4.3.5. Interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra espécie	69
4.4. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO	71
4.5. PARÂMETROS OTIMIZADOS E FIGURAS DE MÉRITO	73
5. CONCLUSÃO	75
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração de Hg total, MeHg e Hg ²⁺ nos materiais de referência utilizados ($\mu\text{g g}^{-1}$)	34
Tabela 2.	Programa de aquecimento do forno de grafite para recobrimento do tubo de grafite com Au (adaptado de Flores <i>et al.</i>)	35
Tabela 3.	Programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de Hg ..	35
Tabela 4.	Concentração total de Hg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” e no material de referência certificado DORM-2, obtidas após decomposição com microondas e determinação por CVG-GF AAS (n = 3)	53
Tabela 5.	Concentração total de Hg na amostra de peixe “anjo” submetida às extrações 1 a 4 e concordância com o valor de referência (n = 3)	53
Tabela 6.	Concentração de Hg ²⁺ encontrado nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando calibração convencional (n = 3).....	61
Tabela 7.	Concentração de Hg ²⁺ nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” mediante calibração por adição de analito e comparação dos resultados com aqueles obtidos por calibração convencional (n = 3)	62
Tabela 8.	Concentração de MeHg obtida mediante a Extração 2 nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando calibração convencional 1 e respectivas porcentagens em relação ao valor de referência para Hg total (n = 3)	63
Tabela 9.	Concentração de MeHg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” mediante calibração convencional 2 e respectivas porcentagens em relação ao valor de referência para Hg total (n = 3)	65
Tabela 10.	Concentração de MeHg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando adição de analito e calibração convencional 2 (n = 3)	65

Tabela 11. Resultados para MeHg, Hg ²⁺ e Hg total para as amostras de peixe “anjo” e “garoupa” (n = 3).....	66
Tabela 12. Concentrações de MeHg, Hg ²⁺ e Hg total obtidos para os materiais de referência certificados “DORM-2” e “DORM-1” (n = 3)	72
Tabela 13. Parâmetros otimizados do procedimento desenvolvido (n = 3).....	73
Tabela 14. Figuras de mérito do procedimento desenvolvido empregando-se os parâmetros otimizados (n = 3).	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema CVG-GF AAS	32
Figura 2.	Procedimentos estudados para a preparação da amostra e extração do Hg (item 3.5.1.2) para a determinação de Hg total (item 3.5.3) por CVG-GF AAS	38
Figura 3.	Procedimentos estudados para as extrações seletivas das espécies de Hg para determinação seletiva de Hg ²⁺ (item 3.5.2.2) e MeHg (item 3.5.2.3) por CVG-GF AAS	40
Figura 4.	Influência da concentração de NaBH ₄ intensidade do sinal analítico para 5 ng de Hg ²⁺	46
Figura 5.	Influência da temperatura do tubo de grafite, nas etapas de aprisionamento e atomização, sobre a intensidade do sinal analítico para 5 ng de Hg ²⁺ (setas indicam as temperaturas escolhidas)	47
Figura 6.	Perfil dos sinais analíticos para 5 ng de Hg em diferentes temperaturas de atomização	48
Figura 7.	Influência do K ₂ Cr ₂ O ₇ e do agente antiespumante no sinal analítico para 5 ng de Hg ²⁺	55
Figura 8.	Concordância entre os valores de Hg total para a amostra de peixe “anjo”, obtidos a partir das extrações 1 a 4, em relação ao valor de referência, mediante o emprego do agente antiespumante, na ausência e na presença de K ₂ Cr ₂ O ₇	57
Figura 9.	Avaliação dos ciclos de extração para L-cisteína e para CHCl ₃ . Em azul está representado o percentual de Hg (Hg ²⁺ e MeHg) restante no frasco após extrações com CHCl ₃ , em relação ao valor de referência para Hg total. Em vermelho, está representado o percentual de MeHg que é extraído com L-cisteína, em relação ao valor de referência para Hg total	58

- Figura 10.** Concordância entre o Hg remanescente na fase aquosa e o valor de referência para a concentração total de Hg, após as extrações 1 a 4. Está representada, em azul, a concordância para o *Hg total* e, em vermelho, a concordância *apenas para o Hg²⁺*, ambos em relação ao valor de referência para Hg total 60
- Figura 11.** Curvas de calibração convencional empregando-se solução de calibração de MeHg e de MeHg, esta após passar pelo mesmo processo de extração que a amostra 64
- Figura 12.** Concordância entre os valores de Hg total na amostra de peixe “anjo” e o valor de referência, em função da massa de amostra utilizada, mediante Extração 2 68
- Figura 13.** Influência da adição de uma das espécies de Hg na determinação da outra espécie. Em vermelho está representada a concordância entre o valor encontrado e o valor esperado para o Hg²⁺ e em azul está representada a concordância entre o valor encontrado e o valor esperado para o MeHg, ambas para a amostra de peixe “anjo”, empregando a Extração 2 e as condições otimizadas. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*
- CE, eletroforese capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*
- CRM, material de referência certificado, do inglês *Certified Reference Material*
- CV AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês *Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*
- CV AFS, espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio, do inglês *Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry*
- CV, vapor frio, do inglês *Cold vapour*
- CVG, geração química de vapor, do inglês *Chemical Vapor Generation*
- d.i., diâmetro interno
- ESI-MS, espectrometria de massa com ionização por electrospray, do inglês *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*
- ETV, vaporização eletrotérmica, do inglês, *Eletrothermal Vaporization*
- FI, injeção em fluxo, do inglês *Flow Injection*
- FI-CV AAS, sistema de injeção em fluxo acoplado à espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês *Flow Injection Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*
- GC, cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
- HG, geração de hidretos, do inglês *Hydride Generation*
- HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*
- HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*
- ICP OES, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
- ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*
- IUPAC, *União Internacional de Química Pura e Aplicada*, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- l, comprimento, do inglês *Length*
- LD, limite de detecção
- LQ, limite de quantificação
- m_0 , massa característica

MeHg, metilmercúrio

MIP OES, espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por microondas, do inglês *Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry*

PTFE, politetrafluoretileno

RSD, desvio padrão relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

SPE, extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

TMAH, hidróxido de tetrametilamônio, do inglês, *tetramethylammonium hydroxide*

UV, ultravioleta

RESUMO

Determinação de Mercúrio Orgânico e Inorgânico por CVG- GF AAS em Tecido Muscular de Peixe Após Extração Seletiva

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento para a análise de especiação de Hg em tecido muscular de peixe, empregando extração seletiva e determinação individual das espécies por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e geração química de vapor (CVG-GF AAS), utilizando um tubo de grafite recoberto com Au e um sistema em batelada. A concentração de cada espécie de Hg, medida em área de pico, foi obtida a partir da determinação individual das mesmas, sendo que as metodologias de calibração empregadas foram a calibração convencional e a adição de analito.

O sistema CVG-GF AAS foi ajustado, onde foram investigados alguns parâmetros do sistema, como as temperaturas de aprisionamento e atomização, a eficiência de aprisionamento das espécies voláteis, a concentração da solução de NaBH_4 , entre outros.

O tecido muscular de peixe foi liofilizado e cominuído à diâmetro de partícula inferior a 75 μm . Foram propostas quatro misturas extratoras para análise de especiação de Hg, as quais foram investigadas as respectivas eficiências e possíveis transformações na distribuição das espécies na amostra original. Além disso, foi avaliada a massa de amostra empregada, bem como a interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra.

A concentração de MeHg, de Hg^{2+} e de Hg total nas amostras de peixe por calibração convencional e adição de analito. Não foi verificada diferença significativa entre os valores obtidos por ambas as calibrações.

O procedimento foi validado através da análise de materiais de referência certificados, sendo que os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados. Quando foi feito um ciclo de aprisionamento, os valores obtidos para os limites de detecção (LD) para Hg na amostra foram de 1,5 ng g^{-1} , como Hg^{2+} , e 3 ng g^{-1} , como MeHg. Entretanto, é possível alcançar LD de 0,75 ng g^{-1} e 1,5 ng g^{-1} , como Hg^{2+} e MeHg, respectivamente, fazendo três ciclos de aprisionamento.

Além disso, pode-se fazer, no mínimo, 250 determinações com o mesmo recobrimento do tubo.

ABSTRACT

Determination of Organic and Inorganic Mercury by CVG-GF AAS in Muscle Fish Tissue After Selective Extraction

In this study a procedure for speciation analysis of Hg in muscle fish tissue was developed with us of selective extraction and determination of each species by chemical vapor generation with graphite furnace atomic absorption spectrometry (CVG-GF AAS), using a gold coated graphite tube and a bath system. The concentration of inorganic and organic species was separately determined by peak area and the calibration was performed by conventional and standard addition methods, recording the signal in area peak.

The system CVG-GF AAS was optimized and some parameters as trapping and atomization temperature, trapping species efficiency, NaBH_4 solution concentration, among others, were investigated.

Samples of muscle fish tissue were lyophilized, ground and passed through a sieve. The sample particle size was less than $75 \mu\text{m}$. It was proposed four kinds of extraction procedures using different solutions. The efficiency of the extraction solutions evaluated and possible changes in the distribution of the species from the original sample were evaluated.

The concentration of MeHg, Hg^{2+} and total Hg were determined in the samples by standard calibration and standard additions techniques. It was not observed significant difference between the values obtained by both calibration techniques.

The accuracy of the procedure was evaluated using two certified reference materials of muscle fish tissue. The detection limits was 1.5 ng g^{-1} for Hg^{2+} and 3 ng g^{-1} for MeHg with only one trapping step. However, it is possible to achieve detection limits of 0.75 ng g^{-1} and 1.5 ng g^{-1} for Hg^{2+} e MeHg, respectively, using three trapping steps. Moreover, it is possible to perform more than 250 determinations with the same gold coating.

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente como resultado de emissões naturais e, também, da ação antropogênica. Pode ser encontrado em águas, solos, ar e organismos vivos, normalmente, em concentrações traço. Entretanto, mesmo em pequenas concentrações, o mercúrio é considerado extremamente tóxico para os mais diversos organismos.¹

A principal fonte de contaminação do homem por mercúrio, quando não exposto diretamente a ambientes propícios à contaminação, é através da alimentação, especialmente nas dietas ricas em peixes. Uma característica do mercúrio é a sua tendência de acumulação através da cadeia alimentar. Sob estes aspectos, alguns peixes, sobretudo os predadores, apresentam elevada concentração de Hg, o que pode constituir um risco a saúde humana quando consumidos em excesso.¹

O Hg é um agente neurotóxico, que pode causar danos neurológicos irreversíveis e, em casos mais extremos, a morte. Além disso, deve ser considerado que diferentes espécies de mercúrio apresentam características distintas, como toxicidade, solubilidade, mobilidade biogeoquímica, tendência de acumulação, entre outras. Das espécies de mercúrio normalmente encontradas, o metilmercúrio (MeHg), considerado mais tóxico que as outras espécies.¹

Devido à elevada toxicidade do MeHg frente às outras formas, o conhecimento da concentração total de mercúrio em uma amostra não fornece uma informação completa para fins de avaliação de risco à população. Com isso, aumenta-se consideravelmente o interesse no desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e confiáveis para a determinação específica de cada uma das

¹ Azevedo, F. A., *Toxicologia do Mercúrio*, RiMa Editora, São Carlos, Brasil, 2003

espécies. Atualmente, diversas técnicas são disponíveis para a determinação de mercúrio, sendo uma das mais utilizadas a espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV AAS).⁶ Outras técnicas de detecção como espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por microondas (MIP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido freqüentemente empregadas para a determinação direta de Hg e suas espécies nos mais diversos tipos de amostras.^{33,57} Contudo, apesar dos avanços instrumentais, as técnicas de determinação disponíveis não são apropriadas para a determinação de Hg em algumas matrizes, principalmente em amostras biológicas. Em vista disto, o tratamento da amostra, uma das etapas analíticas mais propensa a erros, faz-se necessário.³³ Particularmente para amostras sólidas, a etapa de extração e separação das espécies é de grande importância, visto que é necessário evitar a transformação ou degradação das espécies presentes na amostra.⁵⁰ Adicionalmente, tendo em vista o nível de concentração, deve-se prevenir a contaminação por parte dos reagentes ou do ambiente, e eventuais perdas dos analitos.³³

Dentre os procedimentos recomendados para extração das espécies de Hg nas amostras, pode-se citar a extração ácida e a hidrólise alcalina. A primeira é feita com uso de HCl ou H₂SO₄ diluídos, enquanto que a segunda faz a solubilização dos tecidos biológicos com KOH ou TMAH. Estas extrações têm sido amplamente empregadas na análise de especiação de Hg em diversos tipos de amostras.^{13, 17, 50}

Posteriormente à extração, existem várias formas de separar as espécies de mercúrio. Separações empregando técnicas cromatográficas, acopladas a um detector sensível, têm sido amplamente empregadas. Entretanto, em muitos casos, este acoplamento pode ser oneroso, difícil e lento. Técnicas envolvendo troca iônica e extração em fase sólida também têm sido utilizadas, não somente para a separação das espécies, mas, também, para a pré-concentração das mesmas.⁵⁷

⁶ Campos, R. C., Silveira, C. L. P., Lima, R., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 55-59

³³ Leermakers, M. *et al.*, *Trends Anal. Chem.* (2005) IN PRESS

⁵⁷ Sánchez-Uría, J. E., Sanz-Medel, A., *Talanta* 47 (1998) 509-524

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

¹³ Craig, P. J., *Organometallic Compounds In The Environment*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., Guildford, UK, 2003

¹⁷ Cornelis, R. *et al.*, *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2003

No caso do mercúrio presente em amostras biológicas, este apresenta-se quase que exclusivamente, em duas espécies majoritárias, metilmercúrio (MeHg) e íon mercúrico (Hg^{2+}).⁴⁹ Assim, é possível separar estas duas espécies através de procedimentos mais simples, como extrações seletivas de uma das espécies e, desta maneira, não é necessário o uso de técnicas instrumentais de separação. Dentre as extrações, o método de Westö,⁶⁸ baseado em extrações com tolueno e, posteriormente, em água com uso de agentes complexantes, tem sido considerado clássico para a separação das espécies de mercúrio e determinação de MeHg.³³ Ao longo do tempo, este método sofreu diversas modificações e variações para melhorar seu desempenho.⁵⁰

Outra forma de diferenciar as espécies, sem uso de extrações, é através da determinação seletiva de uma das espécies de mercúrio, por meio de redução seletiva. A utilização de SnCl_2 e de NaBH_4 como agentes redutores de Hg tem sido relatada em vários trabalhos, utilizando, principalmente, a detecção por CV AAS, visto que o SnCl_2 reduz apenas o Hg^{2+} , enquanto que o NaBH_4 pode reduzir ambas as espécies de Hg. Contudo, a sensibilidade obtida utilizando ambos os redutores é diferente, o que conduz a duas curvas de calibração. Além disto, quando a redução seletiva é empregada, normalmente uma das espécies é determinada por diferença entre a concentração total e a concentração da outra espécie. Desta maneira, é possível que, em alguns casos, a incerteza associada às determinações seja superior ao valor obtido para a concentração da espécie.

Ainda, quando NaBH_4 é utilizado como redutor, a “nuvem” atômica do analito é diluída devido a grande quantidade de H_2 gerada, provocando diminuição da sensibilidade.⁴¹ Também, quando adições do analito são feitos sobre suspensões e a determinação é feita por CV AAS, picos duplos podem aparecer, devido à diferença cinética de redução entre o analito adicionado e o analito presente nas partículas da suspensão.⁴⁴

Como mencionado, a CV AAS tem sido amplamente empregada para a determinação de Hg em baixas concentrações.²⁸ Assim mesmo, para a determinação deste elemento em concentrações ainda mais baixas, técnicas de

⁴⁹ Quevauviller, P. et al., *Trace Element Speciation – for Environment, Food and Health*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001

⁶⁸ Westö, G., *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137

³³ Leermakers, M. et al., *Trends Anal. Chem.* (2005) In Press

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

⁴¹ Matusiewicz, H., Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 377-397

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

²⁸ Krata, A., Bulska, E., *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 345-350

pré-concentração, como a amalgamação, têm sido utilizadas. Embora permita alcançar LD's baixos, a amalgamação apresenta alguns problemas. A eficiência do aprisionamento do Hg pode ser afetada pela umidade e, também, algumas espécies voláteis formadas no frasco de reação, como hidretos, podem apassivar a superfície aprisionadora. Além disso, qualquer variação durante a etapa de aquecimento, feita para liberar o Hg do aprisionador, ou ainda, na vazão do gás de arraste, afeta consideravelmente a reprodutibilidade das medidas.⁷⁰

Por ser uma técnica bastante sensível, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) pode ser empregada para a determinação de Hg. Porém, esta técnica não é comumente utilizada para a determinação de Hg devido à temperatura da etapa de pirólise. Como, normalmente, utiliza-se a temperaturas próximas a 300 °C, os concomitantes da matriz não são eliminados, podendo ocorrer interferências durante a etapa de atomização. Por isso, ela tem sido empregada apenas para amostras específicas.²⁸

Por outro lado, em muitos trabalhos o mercúrio foi determinado por um acoplamento entre um sistema de vapor frio (CV) ou geração química de vapor (CVG) e GF AAS. Neste acoplamento, as espécies voláteis geradas são aprisionadas dentro de um tubo de grafite recoberto com um metal e, após um certo tempo de aprisionamento, o tubo é aquecido rapidamente, para a detecção mesmo. De um modo geral, interferências cinéticas na geração química de vapor são compensadas pela etapa de aprisionamento⁶⁴ e, ainda, pode ser utilizada como técnica de pré-concentração, o que possibilita a detecção de concentrações baixa, melhorando o limite de detecção (LD). Assim mesmo, foi encontrado apenas um trabalho a respeito da determinação seletiva de espécies de mercúrio utilizando o acoplamento acima descrito, entre CVG e GF AAS.³

Deste modo, neste trabalho foi proposto um procedimento para a determinação de espécies de mercúrio em amostras de peixe, por meio de extração ácida e separação das espécies baseada em extrações líquido-líquido com CHCl_3 e, posteriormente, com L-cisteína. A detecção foi feita por CVG-GF AAS. Foram avaliados diversos parâmetros, como a temperatura de aprisionamento e de atomização do Hg, a concentração dos reagentes utilizados,

⁷⁰ Yan, X. P. E Ni, Z. M., *Anal. Chim. Acta* 291 (1996) 89-105

²⁸ Krata, A., Bulska, E., *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 345-350

⁶⁴ Torres, D. P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

³ Bermejo-Barrera, P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321

a massa de amostra e, principalmente, a forma de calibração. O procedimento foi validado através da análise de Material de Referência Certificado (CRM).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, que se encontra dividido em três partes, estão relacionados os principais trabalhos referentes à determinação de mercúrio. Na primeira parte são descritas algumas características toxicológicas do mercúrio, bem como sua relevância ambiental. A segunda parte trata dos procedimentos propostos para análise de especiação de mercúrio. Já a terceira parte desta revisão aborda procedimentos para a determinação de espécies utilizando a espectrometria atômica.

Maior ênfase foi dada aos trabalhos em que a determinação de mercúrio foi feita por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite empregando aprisionamento “in situ” das espécies voláteis e detecção por GF AAS. Apesar de citados, não foram abordados, de forma mais abrangente, trabalhos em que a separação das espécies de Hg foi feita por técnicas instrumentais ou resinas trocadoras de íons, apesar da importância destes tópicos.

Além disso, quando for feita a abordagem sobre as espécies inorgânicas e orgânicas de mercúrio, estas serão tratadas apenas como MeHg, enquanto que aquelas serão tratadas como Hg^{2+} , mesmo que outras formas encontrem-se presentes nas amostras. A concentração total de Hg será denominada apenas por Hg total. O uso de tal terminologia foi feito apenas para facilitar a leitura, entendendo-se que, apesar de poder existir outras espécies, Hg^{2+} e MeHg são as predominantes. Ainda, quando for feita referência a massa de MeHg, na verdade, entende-se “massa de Hg na forma de MeHg”.

2.1. MERCÚRIO

O mercúrio encontra-se em águas, solos, ar e organismos vivos, porém, normalmente, em concentrações traço. Entretanto, mesmo em baixas concentrações, o mercúrio é tóxico para os mais diversos organismos.¹ A maior aplicabilidade do mercúrio encontra-se na fabricação de termômetros, barômetros, lâmpadas a vapor de mercúrio e também em lâmpadas fluorescentes. Ele é pode ser empregado na forma de amálgama, sendo a amálgama dentária e a mineração de ouro algumas das mais conhecidas aplicações. Algumas espécies de mercúrio estão presentes em fungicidas, anti-sépticos e diuréticos e, também, o mercúrio e suas espécies têm sido utilizados na indústria cloro-álcali e de polpa e papel, como catalisadores, e em pilhas e baterias.^{13, 67}

O mercúrio apresenta-se sob diversas espécies, sendo que estas podem ser classificadas em dois grupos: espécies inorgânicas e espécies orgânicas. Dentre as espécies inorgânicas, a mais encontrada no ambiente é o íon mercúrico, representado por Hg^{2+} , normalmente na forma de sal. Já as espécies orgânicas possuem uma cadeia carbônica ligada ao mercúrio, sendo que a espécie mais encontrada é o MeHg, em que o Hg está ligado a um grupamento metil e um contra-íon. O metal e seus compostos podem se ligar aos grupos sulfidrilas de proteínas e enzimas, pelo fato da elevada afinidade do Hg pelo enxofre, podendo desnaturar proteínas, inativar enzimas ou alterar a atividade celular.¹³

Deve-se salientar que as espécies orgânicas de Hg devem receber maior atenção do ponto de vista toxicológico, em virtude de serem muito mais tóxicas que as inorgânicas. Apesar de todas as formas de Hg poderem se acumular no organismo, as espécies orgânicas se acumulam em extensão muito maior. Isto ocorre porque elas apresentam maior lipossolubilidade e, desta forma, são transportadas mais facilmente através das membranas celulares, podendo, então, se acumular nos tecidos.¹

Embora as espécies inorgânicas sejam menos tóxicas que as orgânicas, as primeiras podem ser metiladas, principalmente, por duas vias: a biológica e a

¹ Azevedo, F. A., *Toxicologia do Mercúrio*, RiMa Editora, São Carlos, Brasil, 2003

¹³ Craig, P. J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., Guildford, UK, 2003

⁶⁷ Sánchez-Uría, J. E., Sanz-Medel, A., *Talanta* 47 (1998) 509-524

química. A taxa de síntese biológica do MeHg, que é a de maior ocorrência, é determinada, principalmente, pela concentração e pela forma química do Hg, assim como pela população e composição das espécies microbianas. Ainda, o Hg pode ser metilado no intestino, no muco e no limo dos peixes, nos lodos e esgotos, e ainda, no intestino de ratos e humanos.¹ O MeHg é facilmente incorporado às cadeias alimentares, sendo magnificado pelas biotas, podendo apresentar concentrações mais elevadas nos tecidos dos peixes do topo da cadeia alimentar. Também, o tamanho e a idade do peixe tem grande influência na concentração de Hg encontrada.

Com a constatação dos danos provocados pelo Hg e, principalmente, pela toxicidade diferenciada das espécies de Hg, sobressai a necessidade de desenvolver procedimentos analíticos cada vez mais sensíveis, confiáveis e, se possível, economicamente viáveis, para sua análise de especiação.

2.2. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

Há alguns anos, a determinação da concentração total de um elemento parecia satisfatória para compreender seus efeitos, tanto para considerações clínicas quanto ambientais. Contudo, hoje é sabido que as propriedades toxicológicas, físicas e químicas de um determinado elemento são consideravelmente dependentes do estado de oxidação ou do grau de alquilação em que esse elemento se encontra.⁴⁹

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*,²⁶ o termo “*especiação*” de um elemento é definido como a distribuição de diferentes espécies químicas de um elemento em uma certa amostra, enquanto que “*análise de especiação*” é definida como o processo analítico de identificação e medida quantitativa de uma ou mais espécies químicas individuais de um certo elemento em uma amostra.⁴⁹

Assim sendo, a importância da análise de especiação surge da necessidade de determinar a concentração das espécies daqueles elementos que

¹ Azevedo, F. A., *Toxicologia do Mercúrio*, RiMa Editora, São Carlos, Brasil, 2003

²⁶ International Union Of Pure And Applied Chemistry, site <http://www.iupac.org/goldbook/ST06848.pdf>, acessado em 10/03/05

⁴⁹ Quevauviller, P. et al., *Trace Element Speciation – for Environment, Food and Health*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001

possuem, relativamente às demais, uma que é mais tóxica, com elevada mobilidade ambiental ou tendência de acumulação em organismos vivos. Conseqüentemente, existem algumas abordagens para análise de especiação. Uma delas envolve elementos cujas espécies orgânicas e inorgânica possuem diferentes toxicidade e mobilidade ou, então, quando os diferentes estados de oxidação ou diferentes complexos de um elemento proporcionam características ambientais e toxicológicas diferenciadas.⁵⁰ Outro tipo de análise de especiação refere-se a elementos que se apresentem sob todas as formas descritas anteriormente.

2.2.1. Análise de especiação de mercúrio

Para a análise de especiação de mercúrio em amostras ambientais, mesmo que todas as espécies de mercúrio sejam tóxicas,¹ o interesse principal consiste em diferenciar as espécies orgânicas, principalmente como MeHg, das espécies inorgânicas, uma vez que estas são significativamente menos tóxicas.⁴⁹

O procedimento ideal para a análise de especiação deve basear-se na manutenção do equilíbrio entre as formas químicas do elemento na amostra, desde a coleta até a determinação do analito.⁴³ Portanto, desde a etapa de amostragem até a etapa de determinação, é fundamental que não ocorra a degradação de nenhuma das espécies de interesse, bem como a transformação ou interconverção das mesmas. Alguns trabalhos abordam, especificamente, as transformações entre espécies de mercúrio durante a análise de especiação, sendo possível verificar que porcentagem de uma espécie de mercúrio é transformada em outra.^{4,19,51}

Quando é necessário fazer a análise de especiação de mercúrio em amostras líquidas, as alternativas comumente utilizadas são a extração em fase sólida (SPE), por processos de adsorção ou de troca-iônica ou, ainda, a extração líquido-líquido. Essas técnicas estão baseadas na retenção ou extração seletiva

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

¹ Azevedo, F. A., *Toxicologia do Mercúrio*, RiMa Editora, São Carlos, Brasil, 2003

⁴⁹ Quevauviller, P. et al., *Trace Element Speciation – for Environment, Food and Health*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001

⁴³ Michalke, B., *Ecotox. Environ. Safe.* 56 (2003) 122-139

⁴ Bloom, N. S., Colman, J. A., Barber, L., *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 371-377

¹⁹ Gaona, X., Valiente, M., *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 219-230

⁵¹ Qvarnström, J., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491

de uma das espécies de mercúrio.³⁰ Já para amostras sólidas, como não existem técnicas para a determinação das espécies de mercúrio diretamente na amostra,⁵⁷ a etapa de pré-tratamento, baseada em extrações, torna-se indispensável.

Os principais problemas que ocorrem na etapa de extração, considerada a etapa crítica na análise de especiação,^{33,57} decorrem do fato de ser necessário desenvolver procedimentos que tenham eficiência adequada para a extração das espécies de interesse e, que concomitantemente, evitem contaminação, perdas ou transformações dessas espécies.⁵⁰ Entre as metodologias empregadas para a extração de espécies de mercúrio em amostras sólidas, o método de Westöö⁶⁸ e suas variantes têm sido os mais utilizados para a extração do MeHg em amostras de sedimentos. Tais métodos baseiam-se, principalmente, na extração das espécies de Hg com um íon haleto em pH próximo a zero, seguida de extração seletiva do MeHg com tolueno e nova extração para o meio aquoso com L-cisteína. Esse método sofreu várias modificações para melhorar a eficiência de extração e, também, para permitir sua aplicação para análise de amostras biológicas.¹⁷

Outras formas de solubilizar as espécies de Hg são a hidrólise alcalina, que utiliza KOH ou TMAH^{51,62,63} e a extração ácida, que utiliza HCl ou H₂SO₄ em meio salino.^{54-56,61} Tais processos podem ser acelerados com o uso de ultra-som^{54,55} ou microondas.⁵⁶

Outra técnica muito empregada para a separação do MeHg é a destilação.²⁴ Este procedimento tem sido aplicado para solos, sedimentos e tecidos biológicos, e consiste em suspender a amostra em ácido e aquecer a mistura a 180 °C em atmosfera de N₂, coletando o destilado em um frasco em banho de gelo.¹¹ Em geral, a eficiência de extração varia de amostra para amostra

³⁰ Lanças, F. M., *Extração em Fase Sólida*, RiMa Editora, 2004, São Carlos, Brasil, 2004

⁵⁷ Sánchez-Uría, J. E., Sanz-Medel, A., *Talanta* 47 (1998) 509-524

³³ Leermakers, M. et al., *Trends Anal. Chem.* (2005) IN PRESS

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

⁶⁸ Westöö, G., *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137

¹⁷ Cornelis, R. et al., *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2003

⁵¹ Qvarnström, J., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491

⁶² Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931

⁶³ Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *Analyst* 123 (1998) 1215-1218

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

⁶¹ Storelli, M. M. et al., *Food Chem.* 89 (2005) 295-300

²⁴ Hintelmann, H., Evans, R. D., *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 378-385

¹¹ Cornelis, R. et al., *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2003

e depende do meio empregado e, portanto, é necessário empregar calibração por adição de analito.⁵⁰

Após a etapa de extração das espécies, na maior parte dos trabalhos são feitas as etapas de separação, derivatização e pré-concentração para que os analitos sejam, finalmente, determinados. Essas etapas, prévias à etapa de determinação, não necessariamente devem fazer parte da análise de especiação e não possuem uma ordem definida para serem executadas.³³ Além disso, em alguns casos, estas etapas podem ocorrer simultaneamente. As técnicas de geração de hidretos (HG), CV, CVG ou etilação são consideradas como técnicas de derivatização mas, muitas vezes, também são empregadas como técnicas de separação. Também sob este aspecto, a técnica de SPE é, simultaneamente, uma técnica de separação e pré-concentração.⁴² Portanto, as etapas que se situam entre a extração e a determinação das espécies não são obrigatórias e, além disso, dependem da natureza da amostra e da técnica de determinação.

A SPE tem sido bastante empregada para separação e pré-concentração de espécies de Hg.⁵⁷ Em muitos casos, a SPE pode atuar apenas como técnica de pré-concentração, sendo necessário, portanto, o emprego de técnicas cromatográficas para separação, enquanto que em outros, a SPE pode ser empregada, também, para separação das espécies. Devido aos diferentes mecanismos de separação, como troca iônica, adsorção ou partição, a SPE pode ser considerada uma técnica versátil para análise de especiação, visto que, também é possível empregar eluição seletiva para separar as espécies a serem determinadas.³⁰

Técnicas cromatográficas possibilitam a análise de especiação para duas ou mais espécies de mercúrio e, por isso, uma das técnicas mais apropriadas para análise de especiação de mercúrio consiste, indubitavelmente, em um acoplamento de um cromatógrafo a gás um detector sensível, como um equipamento para ICP-MS.⁵⁷ Embora a cromatografia gasosa seja a técnica mais popular para a separação para espécies de mercúrio, ela apresenta alguns inconvenientes para certos tipos de amostras e, por isso, alguns pesquisadores têm utilizado separações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).²² A

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

³³ Leermakers, M. et al., *Trends Anal. Chem.* (2005) IN PRESS

⁴² Mester, Z., Sturgeon, R., Pawliszyn, J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 233-260

⁵⁷ Sánchez-Uría, J. E., Sanz-Medel, A., *Talanta* 47 (1998) 509-524

³⁰ Lanças, F. M., *Extração em Fase Sólida*, RiMa Editora, 2004, São Carlos, Brasil, 2004

²² Harrington, C. F., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167-179

grande vantagem da HPLC sobre a cromatografia gasosa (GC) fundamenta-se na flexibilidade dos mecanismos de separação, considerados superiores para a análise de especiação de Hg.^{22,33} Uma revisão sobre o uso de HPLC para análise de especiação de Hg foi publicada por Harrington, onde os métodos estão classificados de acordo com a matriz da amostra e há informações sobre o tipo de coluna, o tipo de fase móvel, o método de detecção e o LD obtido.²²

Outra técnica que possui excelente poder de separação, e que também pode ser utilizada para análise de especiação de mercúrio, é a eletroforese capilar (CE), muito utilizada para espécies iônicas e biomoléculas. Apesar das recentes aplicações desta técnica, seu uso em análise de especiação ainda é escasso, uma vez que o detector mais comumente acoplado à CE é o detector por ultravioleta (UV), que não alcança LD's satisfatórios para análise de especiação de Hg e o volume de amostra é limitado.²¹ Somente em trabalhos em que a determinação é feita por ICP-MS ou espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS), o LD alcançado é satisfatório.¹¹

Embora as técnicas de separação apresentadas tenham seu uso muito difundido e boa aplicabilidade para análise de especiação, estas não serão abordadas de forma mais aprofundada neste trabalho. Será dada ênfase maior a análise de especiação feita sem o uso de técnicas cromatográficas, eletroforéticas ou de SPE.

Como mencionado, durante todas estas etapas, é imprescindível que não ocorram transformações das espécies de Hg. Para compreender melhor tais transformações, muitos autores têm abordado este assunto. Qvarnström e Frech,⁵¹ através do acoplamento entre HPLC-ICP-MS, verificaram que, quando TMAH é utilizado no preparo da amostra, até 11% do Hg²⁺ pode ser transformado em MeHg, enquanto que até 6% do MeHg pode ser transformado em Hg²⁺. Ainda, o TMAH pode causar alguns problemas nas etapas subsequentes devido ao alto teor de matéria orgânica dissolvida.³³ Além de interferir nas etapas de pré-concentração, separação e detecção, Bloom *et al.*⁴ verificaram que o teor de matéria orgânica e a concentração de Hg²⁺ apresentam correlação positiva com a porcentagem de MeHg formado artificialmente. Recentemente, utilizando tetra(n-

²² Harrington, C. F., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167-179

³³ Leermakers, M. *et al.*, *Trends Anal. Chem.* (2005) IN PRESS

²¹ Harrington, C. F., *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 63-74

¹¹ Cornelis, R. *et al.*, *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2003

⁵¹ Qvarnström, J., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491

⁴ Bloom, N. S., Colman, J. A., Barber, L., *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 371-377

propil)borato de sódio como derivatizante, Huang²⁵ observou a formação de MeHg e etilmercúrio, em concentrações de até 3%, em relação à quantidade de Hg²⁺.

2.2.1.1. Análise de especiação de mercúrio mediante uso de técnicas alternativas

Alternativamente ao uso de técnicas cromatográficas ou correlatas, outros procedimentos têm sido citados na literatura para análise de especiação. Contudo, ao contrário das técnicas cromatográficas, tais procedimentos não permitem a separação de várias espécies de Hg. Porém, devido à abundância relativa das espécies de Hg no meio ambiente, a maioria dos pesquisadores determinam apenas o Hg²⁺ e o MeHg, sendo o primeiro denominado como mercúrio inorgânico e o segundo como mercúrio orgânico. Assim sendo, para análise de especiação de mercúrio, tem sido considerada necessária apenas a separação entre as duas espécies majoritárias, MeHg e Hg²⁺, o que justifica a não necessidade de técnicas cromatográficas.¹³

Magos³⁶ desenvolveu um procedimento para a determinação de Hg²⁺ e MeHg, em amostras biológicas, através de redução seletiva com SnCl₂. Após hidrólise alcalina das amostras biológicas com soluções de NaOH, NaCl e cisteína, foi feita a adição de solução de H₂SO₄ 8 mol L⁻¹ e do redutor. Quando foi utilizado SnCl₂ como redutor, devido ao seu baixo poder de redução, apenas o Hg²⁺ foi reduzido. Quando se empregou uma mistura com SnCl₂ e CdCl₂, ambas as espécies de Hg foram reduzidas, sendo possível a determinação da concentração total de Hg. A concentração de MeHg na amostra é determinada por diferença entre a concentração total de Hg e a concentração de Hg²⁺. Todavia, foi necessário empregar a adição de analito para calibração. Limaverde Filho e Campos³⁴ investigaram a influência dos parâmetros envolvidos no procedimento descrito por Magos, para a análise de especiação de Hg em peixes. Os autores observaram que as variações feitas nos parâmetros estudados não tiveram muita influência sobre o sinal analítico. Entretanto, através do uso de um frasco de reação modificado, foi possível evitar a calibração por adição de analito.

²⁵ Huang, J. H., *Anal. Chim. Acta* 532 (2005) 113-120

¹³ Craig, P. J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., Guildford, UK, 2003

³⁶ Magos, L., *Analyst* 96 (1971) 847-853

³⁴ Limaverde Filho, A. M., Campos, R. C., *Quím. Nova* 22 (1999) 477-482

Outro procedimento envolvendo a redução seletiva de Hg^{2+} e MeHg, quando elas já se encontram em solução, foi proposto por Oda e Ingle Jr.⁴⁶ e aplicada por outros autores,^{54,62} o qual está baseado na redução seletiva de Hg^{2+} e MeHg utilizando SnCl_2 e NaBH_4 como redutores. Em uma primeira etapa, foi adicionada uma solução de SnCl_2 à amostra e, devido ao baixo poder de redução do SnCl_2 , apenas o Hg^{2+} foi reduzido e determinado. Em seguida, ao mesmo frasco de reação, foi adicionada uma solução de NaBH_4 , que possibilitou a redução do MeHg a Hg^0 e, com isso, o MeHg foi determinado. A solubilização das espécies foi feita através de hidrólise alcalina, com KOH, e foram analisadas amostras de cabelo, urina e peixe.

Rezende *et al.*⁵² determinaram seletivamente Hg^{2+} e MeHg em peixes por CV AAS. Para tal, foi feito um extrato homogeneizado de peixe, preparado pela adição de água a uma massa conhecida de peixe triturado. A extração completa das espécies de mercúrio foi feita utilizando extrato de peixe, água, H_2SO_4 e KBr. Metilmercúrio foi quantitativamente extraído para a fase de CHCl_3 após quatro extrações consecutivas com 2 mL de CHCl_3 , sendo a determinação feita após redução direta na fase de CHCl_3 . Uma curva de calibração em meio de CHCl_3 foi construída para tal determinação, sendo as soluções de referência submetidas ao mesmo processo de extração que a amostra. Outra curva de calibração, em meio aquoso, foi construída para a determinação do Hg^{2+} contido na fase aquosa residual. Em ambos os casos o redutor utilizado foi NaBH_4 . O limite de detecção para MeHg na amostra foi 25 ng g^{-1} .

Posteriormente, em dois trabalhos semelhantes, feitos por Río-Segade e Bendicho,^{54,55} espécies de Hg foram extraídas de tecido de mexilhão com HCl 6 mol L^{-1} e auxílio de ultra-som e, posteriormente, determinadas por FI-CV AAS. Em um dos trabalhos⁵⁵ a concentração total de mercúrio foi determinada após digestão da amostra, enquanto que a de Hg^{2+} foi determinada após a extração com HCl 6 mol L^{-1} (a determinação foi feita utilizando SnCl_2 como redutor) e o LD obtido para Hg foi de $7,5 \text{ ng g}^{-1}$. No outro trabalho, os mesmos autores⁵⁴ mostraram que modificando apenas a concentração do ácido empregando na extração, no caso HCl , foi possível extrair seletivamente as espécies de Hg.

⁴⁶ Oda, C. E., Ingle Jr, J. D., *Anal. Chem.* 53 (1981) 2305-2309

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁶² Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

Quando foi utilizado HCl 6 mol L⁻¹ todas espécies de Hg foram extraídas. Porém, ao ser usado HCl 2 mol L⁻¹, apenas o MeHg foi extraído, possibilitando assim a determinação seletiva das espécies. Os LDs foram de 11 e 5 ng g⁻¹ para MeHg e Hg²⁺, respectivamente.

Outra forma de determinar seletivamente as espécies de Hg foi desenvolvida por Río-Segade e Tyson,⁵⁶ para amostras biológicas e de sedimento, por espectrometria de absorção atômica com vapor frio acoplado a sistema de injeção em fluxo (FI-CV AAS). Os autores utilizaram como agente redutor apenas NaBH₄. As espécies de mercúrio foram extraídas com auxílio de radiação microondas utilizando HCl 6 mol L⁻¹ ou TMAH e posterior ajuste do pH. A forma encontrada para diferenciar Hg²⁺ e MeHg utilizar concentrações diferentes de NaBH₄. A concentração total de mercúrio foi determinada mediante utilização de NaBH₄ 0,75% (m/v). Já para a determinação do Hg²⁺, foi utilizado NaBH₄ 10⁻⁴% (m/v). Segundo os autores, concentrações muito baixas de NaBH₄ não foram eficientes para reduzir o MeHg à Hg⁰ e, desta forma, apenas o Hg²⁺ foi reduzido. Ainda, foi descrito que TMAH não foi eficiente para a extração de mercúrio em sedimentos e que foi necessária calibração por adição de analito nas determinações em amostras biológicas. Os LDs para Hg²⁺ e MeHg foram de 24 ng g⁻¹ e 4 ng g⁻¹, respectivamente.

Kaercher²⁷ também empregou apenas NaBH₄ como redutor para a determinação seletiva das espécies de Hg em amostras biológicas por FI-CVG AAS. O grande diferencial deste trabalho é que, na concentração de NaBH₄ utilizada, o Hg²⁺ era convertido a Hg⁰ enquanto que o MeHg era convertido a MeHgH. Desta maneira, ambas as espécies alcançavam a cela de medida, mas apenas o Hg⁰, proveniente do Hg²⁺, era determinado. Em uma segunda etapa, a cela de medida era aquecida a 700 °C e, termicamente, o MeHgH também era convertido a Hg⁰. Com a cela de medida aquecida, ambas as espécies foram determinadas e a concentração de MeHg foi calculada por diferença. Este mesmo princípio foi empregado recentemente por Torres *et al.*⁶⁴ para a análise de especiação de Hg em amostras biológicas.

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

²⁷ Kaercher, L. E., "Sistema para a determinação seletiva de espécies de mercúrio em amostras biológicas", Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2003

⁶⁴ Torres, D. P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

Tao *et al.*⁶³ utilizaram TMAH para solubilização de tecidos biológicos e posterior determinação da concentração total de mercúrio por FI-CV AAS, empregando NaBH_4 como agente redutor. Como o MeHg apresentou sensibilidade inferior ao Hg^{2+} , foi utilizada uma solução de HNO_3 15% (v/v) em KMnO_4 0,2% (m/v) como meio carreador no sistema de injeção em fluxo (FI), para auxiliar na oxidação do MeHg e, com isso, ambas as espécies de Hg apresentaram a mesma sensibilidade. Em outro trabalho,⁶² os mesmos autores utilizaram TMAH para a solubilização de tecidos biológicos e posterior determinação seletiva de Hg^{2+} , através da utilização de SnCl_2 como agente redutor.

Analisando os trabalhos de Tao *et al.*^{62,63} pode-se concluir que, empregando SnCl_2 , apenas o Hg^{2+} é determinado, enquanto que, quando o MeHg é oxidado à Hg^{2+} , é determinada a concentração total de Hg e, por diferença, é possível obter a concentração de MeHg. Esta forma de diferenciar as espécies de Hg, que envolve a oxidação do MeHg, normalmente em linha, através de agentes oxidantes ou radiação UV, tem sido bastante utilizada.

A oxidação em linha tem sido empregada, muitas vezes, para degradar compostos orgânicos de arsênio, selênio e mercúrio. Wurl *et al.*⁶⁹ determinaram Hg total em águas superficiais por FI-CV AAS. Foram comparados três tipos de oxidação: com radiação UV, radiação microondas e com oxidantes químicos ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e KBr/KBrO_3), sendo que os melhores resultados foram obtidos quando radiação UV foi empregada. Também, Cava-Montesinos *et al.*⁸ determinaram Hg por FI-CV AFS em tecido de peixe, empregando a oxidação química. Utilizando SnCl_2 , primeiramente, apenas o Hg^{2+} foi determinado. Em seguida, pela adição em linha de uma mistura oxidante de KBr/KBrO_3 , o MeHg foi transformado em Hg^{2+} e, desta maneira, a concentração total de Hg foi determinada, sendo a concentração de MeHg determinada por diferença.

⁶³ Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *Analyst* 123 (1998) 1215-1218

⁶² Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931

⁶⁹ Wurl, O., Elsholz, O., Baasner, J., *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 191-195

⁸ Cava-Montesinos, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

2.2.1.2. Técnicas de detecção

Diversas técnicas de detecção têm sido empregadas para Hg,¹⁰ acopladas ou não com as já citadas técnicas de separação. Já é sabido que as técnicas de detecção utilizadas devem ter, entre outras características, excelente sensibilidade e seletividade. Assim sendo, técnicas como ICP-MS, ICP OES, MIP OES, AAS e AFS têm sido as mais utilizadas para a determinação de Hg, visto que, preenchem os principais requisitos.³³ Dentre essas técnicas, a ICP-MS, em vista dos limites de detecção atingidos seja, talvez, o detector ideal para análise de especiação em amostras com baixas concentrações de Hg. Outra técnica de detecção que está se tornando cada vez mais popular é a CV AFS, por ser uma técnica relativamente barata e apresentar limites de detecção baixos.³³ Mesmo assim, para a determinação de Hg, a CV AAS tem sido a técnica mais utilizada, devido, provavelmente, à maior disponibilidade da técnica em muitos laboratórios e boa sensibilidade para a maior parte das aplicações.⁶

2.3. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica consolidada para a determinação de cerca de 70 elementos nos mais diversos tipos de amostras. Quando se faz necessária a determinação em baixas concentrações, as técnicas de GF AAS, CV AAS e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) têm sido as mais aplicadas.⁶⁶

A técnica de GF AAS pode ser utilizada para amostras sólidas, líquidas e, em alguns casos, gasosas. As técnicas de HG AAS e CV AAS são muito semelhantes entre si, nas quais, o elemento em solução é convertido em uma espécie volátil e arrastado por um gás inerte até uma cela de detecção. A principal diferença é que a HG AAS é aplicada para elementos que formam hidretos voláteis, como As, Se, Sb, etc, que são atomizados em uma cela de quartzo aquecida. Já a CV AAS tem sido aplicada para a determinação de Hg e

¹⁰ Clevenger, W. L., Smith, B. W., Winefordner, J. D., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 1-26

³³ Leermakers, M. *et al.*, *Trends Anal. Chem.* (2005) IN PRESS

⁶ Campos, R. C., Silveira, C. L. P., Lima, R., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 55-59

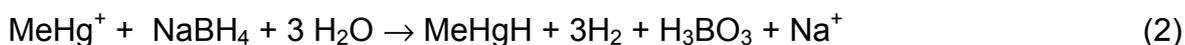
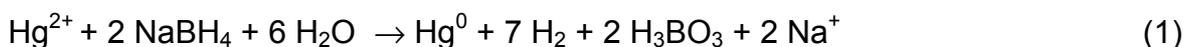
⁶⁶ Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Alemanha, 1999

Cd,⁴⁷ pelo fato de que esses elementos podem ser reduzidos à forma elementar e gasosa, transportados até a cela de medida, a qual não necessita ser aquecida, pois os elementos já estariam na forma de átomos livres.⁶⁶

2.3.1. Espectrometria de absorção atômica com vapor frio

A CV AAS consiste na redução do mercúrio à forma elementar, através do contato da solução ácida contendo o elemento com um redutor (SnCl_2 ou NaBH_4), seguido de sua separação para a fase gasosa e subsequente determinação em uma cela. Os primeiros trabalhos desenvolvidos utilizavam o SnCl_2 como redutor, que embora possua uma cinética de redução rápida, implicava no uso de um gás para borbular a amostra, de modo a auxiliar na remoção do mercúrio para a fase gasosa e, por conseqüência, no seu transporte até a cela de medição. Quando NaBH_4 passou a ser utilizado como redutor, o processo de expulsão do Hg^0 formado, da solução para a fase gasosa tornou-se automático, pela liberação de grandes quantidades de H_2 no seio da solução, pelo redutor. Ao mesmo tempo, tornou-se possível reduzir até o MeHg , o que não pode ser feito com SnCl_2 .⁶⁶

Segundo Capelo *et al.*,⁷ quando NaBH_4 é usado como redutor, a sensibilidade para MeHg é cerca de 20% menor em comparação com aquela alcançada para Hg^{2+} . As reações 1 e 2 representam o processo de redução, em meio ácido, do Hg^{2+} e de MeHg .



Com base nas reações de redução descritas em (1) e (2), MeHg não é convertido a Hg^0 , mas, sim, a hidreto de MeHg , que não é determinado por CV AAS. Tal afirmação já havia sido feita por Puk e Weber.⁴⁸ Contrariando a afirmação anteriormente feita, outros autores verificaram a redução direta de MeHg a Hg^0 .^{52,54,55,66} Entretanto, nos trabalhos em que foi feita redução direta do

⁴⁷ Pohl, P., *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 21-27

⁶⁶ Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Alemanha, 1999

⁷ Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984

⁴⁸ Puk, R., Weber, J. H., *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 175-183

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

MeHg à Hg^0 , foi utilizado HNO_3 ^{52,54} ou ultra-som durante a extração.⁵⁵ Devido ao poder de oxidação do HNO_3 ou da espécie radicalar OH, esta formada com o uso de ultra-som,⁷ muito possivelmente estes oxidantes tenham degradado o MeHg a Hg^{2+} durante a extração ou no próprio frasco de geração das espécies voláteis, proporcionando o mesmo sinal tanto para MeHg quanto para Hg^{2+} .

Todavia, Río-Segade e Tyson⁵⁶ demonstraram que é possível determinar MeHg sem prévia degradação a Hg^{2+} , apenas pelo uso de NaBH_4 em concentrações elevadas, sem utilização de qualquer oxidante. Recentemente, Torres *et al.*⁶⁴ determinaram apenas Hg^{2+} , na presença de MeHg, por CV AAS, empregando solução redutora de NaBH_4 3% (m/v). Este resultado contraria o que foi relatado por Río-Segade e Tyson, que demonstraram que nesta concentração de NaBH_4 , ocorreria a redução do MeHg à Hg^0 . De qualquer modo, como afirmado por Puk e Weber,⁴⁸ as condições em que redução ocorre e a concentração do redutor devem ser controladas. Com base no que foi descrito, afirmar se o NaBH_4 pode ou não reduzir MeHg até Hg^0 depende da condição experimental empregada em cada trabalho.

2.3.2. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

O mercúrio não tem sido comumente determinado por GF AAS, pois a temperatura máxima de pirólise recomendada, é de apenas cerca de 300 °C, para evitar perdas do elemento antes da etapa de atomização.²⁸ Nesta temperatura, praticamente não há eliminação dos concomitantes da amostra, o que pode levar a diversas interferências na determinação do Hg. Mesmo assim, a razão principal é que a técnica de CV AAS permite trabalhar com maior volume de amostra e, por isso, possibilita alcançar LD's mais baixos. , além de ser mais rápida e mais fácil de utilizar. Ainda, o comprimento de onda correspondente à linha de ressonância entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado, que é 189,4 nm, situa-se em uma faixa de comprimentos de onda inadequada para a maioria dos

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁷ Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

⁶⁴ Torres, D. P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

⁴⁸ Puk, R., Weber, J. H., *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 175-183

²⁸ Krata, A., Bulska, E., *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 345-350

equipamentos de AAS.⁶⁶ Mesmo com tais limitações, em alguns casos específicos a GF AAS foi utilizada para a determinação de Hg com êxito.^{14,23,58} Todavia, em muitos trabalhos em que a determinação de Hg foi feita por GF AAS, foi utilizado um acoplamento entre GF AAS e CVG.^{3,18,29,32,40,44} Neste tipo de acoplamento, o Hg gerado por CVG, em batelada ou por FI, foi arrastado até a superfície interna do tubo de grafite por um gás, onde a superfície do tubo encontra-se recoberta com um metal nobre. Assim, o mercúrio foi aprisionado na forma de amálgama com o metal, sendo, posteriormente, atomizado e detectado.

2.3.3. Determinação de Hg com aprisionamento das suas espécies voláteis em tubo de grafite

No decorrer deste trabalho, o termo *aprisionamento* será aplicado a sistemas em que um tubo de grafite, modificado ou não, é utilizado para coletar o analito volátil gerado por CVG ou CV e, logo após, volatilizado para subsequente determinação. Portanto, termos provenientes do inglês como *collection*, *accumulation*, *concentration*, *enrichment*, *sequestration* e *preconcentration*, todos semelhantes, serão abordados como aprisionamento.⁴¹ Ainda, o aprisionamento *in situ* das espécies voláteis aplica-se, especificamente, aos casos em que o aprisionamento das espécies e a determinação das mesmas ocorrem em um mesmo local. De acordo com esta definição, neste trabalho será empregado o termo “aprisionamento *in situ*”, quando se faz a detecção por GF AAS e, apenas, “aprisionamento” quando se tratar da retenção dos analitos em um local diferente do detector (p.ex., CVG-ETV-ICP OES, CVG-ETV-MIP OES ou CVG-ETV-ICP-MS).

O aprisionamento das espécies voláteis, provenientes de CVG e subsequente detecção por GF AAS, possui diversas vantagens quando comparado à determinação direta das espécies voláteis por estas mesmas

⁶⁶ Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Alemanha, 1999

¹⁴ De-Qiang, Z., Zhe-Ming, N., Han-Wen, S., *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1049-1055

²³ Hinds, M. W., *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1063-1068

⁵⁸ Silva, A. F., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2031-2045

³ Bermejo-Barrera, P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

²⁹ Kumar, S. J., Meeravali, N. N., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 166-168

³² Lee, S. H., Jung, K. H., Lee, D. S., *Talanta* 36 (1989) 999-1003

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

⁴¹ Matusiewicz, H., Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 377-397

técnicas. Uma das vantagens do aprisionamento é o aumento de sensibilidade quando comparado diretamente com sistemas em batelada, permitindo alcançar melhores limites de detecção. Também, pode-se remover alguns interferentes previamente à determinação do analito, tanto nos casos em que o tubo de grafite é utilizado como atomizador quanto nos casos que ele atua apenas como vaporizador.^{39,41} Adicionalmente, interferências devido à cinética de geração do vapor são eliminadas, bem como os picos duplos que surgem quando se utiliza amostra de suspensão enriquecida com o analito, ou em casos em que a oscilação do gás de arraste modifica o perfil do sinal analítico.⁴⁴

Para o aprisionamento *in situ* de espécies voláteis de Hg, diferentes metais têm sido utilizados, como Au, Pt, Pd, Rh e Ir, sendo que cada metal proporciona diferentes temperaturas de aprisionamento e de atomização, devido às diferentes interações com o Hg. Tais metais podem ser introduzidos sobre a superfície interna do tubo de grafite, puros ou como uma liga com outros metais, na forma de uma gaze, um fio ou uma lâmina do metal. Outra possibilidade, bastante empregada em trabalhos mais recentes, consiste na adição de uma solução do metal sobre a superfície do tubo de grafite. Após a adição da solução, é feito o aquecimento do tubo de grafite para secagem do solvente e obtenção de uma fina camada do metal sobre a superfície interna do tubo.

O conceito de aprisionamento *in situ* de espécies voláteis em um tubo de grafite pré-aquecido foi introduzido por Drasch e colaboradores.¹⁶ Neste trabalho, um capilar de quartzo, posicionado perpendicularmente à superfície interna de um tubo de grafite, foi usado para introduzir arsina no tubo aquecido a 370 °C, com posterior atomização a 2700 °C. Contudo, foi feito apenas um estudo da possibilidade do aprisionamento. Lee³¹ foi o primeiro a utilizar a técnica de maneira quantitativa, na determinação de bismuto. Bismutina foi gerada em um frasco de reação, carregada por um fluxo de He, coletada dentro do tubo a 350 °C e, posteriormente, atomizada a 1850 °C. Contudo, a eficiência de aprisionamento, investigada com uso de ²⁰⁷Bi como traçador, foi de apenas 11%.

Inicialmente, o aprisionamento *in situ* foi aplicado para hidretos voláteis e, posteriormente, para espécies voláteis de Hg. O primeiro trabalho sobre a

³⁹ Matusiewicz, H., *Appl. Spectrosc. Rev.* 38 (2003) 263-294

⁴¹ Matusiewicz, H., Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 377-397

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

¹⁶ Drasch, G., Vonmeyer, L., Kauert, G., *Fresenius Z. Anal. Chem.* 304 (1980) 141-142

³¹ Lee, D. S., *Anal. Chem.* 54 (1982) 1682-1686

determinação de mercúrio por GF AAS com aprisionamento *in situ* das espécies voláteis de Hg foi publicado em 1989 por Baxter e Frech.² Após a redução do Hg com cloreto estanoso, em sistema em batelada, o Hg⁰ foi transportado por um gás até um tubo de grafite recoberto com uma lâmina ou uma gaze de platina, onde foi amalgamado. Após a etapa de coleta do Hg⁰ (até 9 minutos), o tubo foi aquecido a 750 °C e o Hg foi medido. Tanto o sistema em batelada quanto o tubo de grafite foram construídos em laboratório. O sistema foi aplicado para amostras sintéticas de água do mar e a massa característica (m_0) obtida foi 49 pg, quando foi utilizado o tubo de grafite produzido em laboratório. Já a m_0 obtida mediante o uso de tubos disponíveis comercialmente, foi cerca de duas vezes pior.

No mesmo ano, Lee *et al.*³² determinaram Hg em águas naturais, *biota* e sedimento marinho por GF AAS com aprisionamento *in situ* do Hg⁰ após redução com SnCl₂. O Hg foi aprisionado durante 2 minutos em um disco poroso de grafite recoberto com ouro, posicionado dentro do forno de grafite. Foi encontrado um valor de 20 pg para a m_0 (um dos melhores valores reportados na literatura), faixa linear de 0,01 ng a 10 ng, e LD 5 pg. Entretanto, apesar dos bons resultados obtidos com este procedimento, não foram encontrados outros trabalhos empregando este mesmo sistema.

Yan *et al.*⁷¹ também determinaram Hg de forma muito semelhante à de Baxter e Frech. Contudo, as espécies voláteis geradas pela reação com NaBH₄ foram conduzidas até um tubo de grafite recoberto termicamente com PdCl₂. A temperatura para o aprisionamento das espécies voláteis foi 250 °C enquanto que a temperatura de atomização foi 2200 °C. Empregando este procedimento, mercúrio foi determinado em amostras de água tratada, água do mar e de efluente líquido. A calibração foi feita empregando-se uma curva de calibração convencional, a m_0 foi 114 pg e o LD foi de 0,6 ng L⁻¹ para 50 mL de amostra.

Sinemus *et al.*⁵⁹ determinaram Hg por GF AAS em soluções de referência através do aprisionamento *in situ* de suas espécies voláteis, geradas por reação com NaBH₄ em um sistema em fluxo. O aprisionamento foi feito em uma gaze de Au-Pt situada sobre a superfície interna do tubo de grafite, abaixo do feixe óptico. O aprisionamento foi feito a 160 °C, sendo a atomização realizada a 750 °C. A m_0 foi 75 pg e o LD 3,5 ng L⁻¹ para 10 mL de amostra. As medidas foram feitas em

² Baxter, D. C., Frech, W., *Anal. Chim. Acta* 225 (1989) 175-183

³² Lee, S. H., Jung, K. H., Lee, D. S., *Talanta* 36 (1989) 999-1003

⁷¹ Yan, X. P., Ni, Z. M., Guo, Q. L., *Anal. Chim. Acta* 272 (1993) 105-114

⁵⁹ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 643-648

altura de pico e os autores relataram que o aprisionamento *in situ* diminui o alargamento do sinal devido ao transporte, como ocorria com outras técnicas de amalgamação fora do tubo de grafite. Em outro trabalho, os mesmos autores⁶⁰ utilizaram o sistema descrito anteriormente, porém sem a gaze de Au-Pt no interior do tubo de grafite, que foi substituída pelo recobrimento com Ir. Este tipo de aprisionamento mostrou ser um pouco mais eficiente que aquele descrito anteriormente. A temperatura de atomização foi 950 °C, enquanto que a limpeza do tubo foi feita a 2000 °C para liberação dos elementos formadores de hidretos voláteis que poderiam apassivar a superfície de Ir. A m_0 foi 180 pg e o LD 70 pg (para 5 mL da amostra). Nesse mesmo trabalho, foram comparados os sinais analíticos obtidos para atomização do Hg mediante o uso da gaze de Au-Pt inserida dentro do tubo com aqueles obtidos para a atomização diretamente na plataforma do tubo de grafite recoberta com Ir. O sinal analítico, referente à atomização diretamente da plataforma do tubo de grafite, é mais estreito e, além disso, o valor para altura de pico é maior, devido ao aquecimento mais rápido da plataforma do forno de grafite. Contudo, o valor para área de pico é semelhante em ambos os aprisionamentos, demonstrando que a eficiência de aprisionamento e liberação das espécies voláteis é, no mínimo, tão alta quanto com a gaze metálica.

O primeiro trabalho que empregou o aprisionamento *in situ* para a determinação seletiva de espécies de Hg foi feito, em 1997, por Bermejo-Barrera *et al.*,³ em amostras de água do mar, utilizando acoplamento do tipo FI-CV-GF AAS. Para tal, foi feita a redução seletiva do Hg utilizando NaBH_4 e SnCl_2 como redutores. Foram necessários 60 s para o aprisionamento das espécies voláteis contidas originalmente em 1,5 mL de amostra. Para recobrimento do tubo de grafite foram testados Ir, W e Zr, e, após o recobrimento do tubo, cerca de 500 ciclos de atomização puderam ser feitos. Além disso, para cada um dos três metais, a m_0 do Hg^{2+} (reduzido com SnCl_2) foi menor que a do MeHg (reduzido com NaBH_4). As massas características obtidas na presença de Ir, W e Zr foram, respectivamente, de 240, 450 e 700 pg para Hg^{2+} e de 300, 600 e 900 pg para MeHg. Não foi comentado pelos autores se essa diferença de sensibilidade entre as espécies de Hg era devido à etapa de geração do vapor ou aprisionamento do

⁶⁰ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1719-1722

³ Bermejo-Barrera, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321

mesmo. O procedimento foi validado apenas para Hg^{2+} com calibração convencional.

Kumar e Meeravali²⁹ avaliaram diferentes materiais para aprisionamento do Hg^0 , obtido após a reação com SnCl_2 . Foram estudados Au, na forma de um fio enrolado à plataforma de L'vov e ligas de Pd-Au e Pt-Rh inseridas na forma de gaze. O fio de Au demonstrou ser mais eficiente que as ligas para aprisionamento do Hg ($m_0 = 76, 112$ e 136 pg, para Au, Pd-Au e Pt-Rh, respectivamente). O sistema foi empregado para a determinação da concentração total de Hg em CRM's de origem ambiental, após a digestão dos mesmos em forno de microondas. Uma das vantagens do sistema, citada pelos autores, além de uma boa m_0 , foi que esse sistema, frente àqueles que utilizam um tubo de grafite recoberto com algum metal, permitiu fazer até 500 ciclos de aquecimento sem perda da sensibilidade. Quando foi necessária a troca do tubo de grafite, isto ocorreu devido ao desgaste do mesmo.

Flores *et al.*¹⁸ determinaram a concentração total de Hg em amostras de carvão, diretamente de uma suspensão da amostra, por CV-GF AAS. Ouro, Ir e Rh foram testados como recobrimento, sendo que melhores resultados foram encontrados quando Au foi utilizado. As amostras foram cominuídas a um tamanho de partícula inferior a $50 \mu\text{m}$, e uma suspensão cerca de 0,5% (m/v) foi preparada em HNO_3 1 mol L^{-1} , a qual foi deixada em repouso por até 72 horas para total extração do Hg. O procedimento foi validado com CRM de carvão e de cinza volante. Para algumas amostras, 48 horas de extração foram suficientes para extração total do Hg. A m_0 encontrada foi de 110 pg e o LD na amostra foi 9 ng g^{-1} .

Matusiewicz e Mikolajczak⁴⁰ determinaram Hg e elementos formadores de hidretos por CVG-GF AAS em amostras de cerveja e mosto, sem decomposição prévia das amostras. Para as determinações de Hg, foi injetado $1 \mu\text{g}$ de Au na plataforma do tubo de grafite previamente a cada medida, e as temperaturas de aprisionamento e atomização foram $110 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1300 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Os autores relataram que este tipo de acoplamento melhora o LD e, com isso, os brancos são a maior limitação, devido a impurezas dos reagentes, principalmente do redutor. A eficiência de aprisionamento foi 66%, medida através da

²⁹ Kumar, S. J., Meeravali, N. N., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 166-168

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

comparação dos sinais de Hg por CVG-GF AAS e, diretamente, por GF AAS, utilizando o mesmo programa de aquecimento. A m_0 foi de 92 pg para Hg e a calibração foi feita através da técnica de adição de analito porque muita espuma era formada. O procedimento foi validado com o uso de CRM's.

Moreda-Piñeiro *et al.*⁴⁵ determinaram a concentração total de As, Bi, Ge, Hg e Se por CVG-GF AAS em amostras de cinza volante diretamente de uma suspensão a 1% (m/v) da amostra em solução de glicerol 0,02% (v/v). Para a determinação de mercúrio, 1 mL da amostra foi transferido para o frasco de reação juntamente com 0,4 mL de solução de HCl 6 mol L⁻¹, onde o Hg foi reduzido com NaBH₄ 2% (m/v). O tubo de grafite foi recoberto com Ir, sendo que, para Hg, as temperaturas de coleta e de atomização foram 400 °C e 2500 °C, respectivamente. A m_0 foi 370 pg e o LD na amostra 0,055 µg g⁻¹ para Hg. As inclinações das curvas de calibração convencional e de adição de analito foram significativamente diferentes, demonstrando que, possivelmente, há interferência de matriz. O procedimento foi validado utilizando-se CRM de cinza volante. Os autores não comentaram sobre a possível passivação do recobrimento do tubo de grafite, ocasionada pelo aprisionamento dos demais elementos.

Em trabalho semelhante, Moreda-Piñeiro *et al.*⁴⁴ determinaram Hg em suspensões de amostras biológicas (cabelo humano e frutos do mar), e de amostras ambientais (sedimento marinho, cinzas volante e solos), por CVG-GF AAS. Volumes variáveis das suspensões foram transferidos para um frasco contendo 1 mL de HCl 6 mol L⁻¹, onde o NaBH₄ 1% (m/v) foi utilizado como agente redutor para Hg. Algumas variáveis foram ajustadas empregando-se planejamento fatorial, sendo que a temperatura e o tempo de coleta foram as mais importantes, porém, a massa de Ir para o recobrimento não foi ajustada. A temperatura e o tempo de coleta das espécies voláteis foram, respectivamente, 75 °C e 40 s, e a temperatura de atomização foi 2600 °C. O procedimento foi validado com CRM's de origem biológica e ambiental; porém, foi aplicado apenas para análise de amostras de sedimento e de carvão. Os limites de detecção variaram, de acordo com a matriz, entre 21 e 170 ng g⁻¹, e a m_0 foi 390 pg.

Matusiewicz e Kopras³⁸ determinaram a concentração total de As, Bi, Ge, Sb, Se e Hg em CRM's de origem biológica e ambiental, após digestão ácida dos

⁴⁵ Moreda-Piñeiro, J. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

³⁸ Matusiewicz, H., Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

mesmos, através do acoplamento CVG-ETV-MIP OES, utilizado NaBH_4 como redutor em sistema em batelada e em fluxo. O recobrimento do forno de grafite foi feito com Au-Pd antes de cada ciclo de aquecimento. Pelo fato da técnica de determinação ser multielementar, foi adotada uma temperatura de compromisso, tanto para o aprisionamento ($300\text{ }^\circ\text{C}$) quanto para a vaporização ($2100\text{ }^\circ\text{C}$). Por isso, a sensibilidade do Hg ficou comprometida, sendo que a eficiência global de aprisionamento do Hg foi diminuída em 40% em relação ao aprisionamento a $100\text{ }^\circ\text{C}$. Os analitos foram determinados em seis CRM's (sedimento marinho, tecido de ostra, solo, cinza volante, cabelo e folhas de tabaco). Para Hg, os resultados não concordaram com os valores certificados. Os autores ainda citaram que, a $300\text{ }^\circ\text{C}$, o recobrimento com uma mistura Au-Pd aumenta a eficiência de aprisionamento do Hg quando comparado com recobrimento apenas com Au.

Vieira *et al.*⁶⁵ determinaram Hg e outros elementos formadores de hidretos por CVG-ETV-ICP-MS em amostras de sedimentos, diretamente de suspensões ácidas. A concentração de sólidos na suspensão era 0,3% (m/v). A suspensão foi preparada em HF e água régia, sonicada por 30 minutos e ocasionalmente agitada por 24 horas. Como redutor foi utilizado NaBH_4 , sendo que foram necessários 40 segundos para o aprisionamento das espécies voláteis em um tubo de grafite recoberto com Ir. Posteriormente, o tubo foi aquecido a $2000\text{ }^\circ\text{C}$ para volatilização dos elementos. O LD para Hg na amostra foi $0,8\text{ ng g}^{-1}$ e o procedimento foi validado pela análise de CRM's.

Recentemente, Torres *et al.*⁶⁴, empregando um sistema semelhante aquele descrito por Flores *et al.*,¹⁸ determinaram Hg total em amostras biológicas por CVG-GF AAS. Para a solubilização dos tecidos biológicos foi utilizado TMAH e, posteriormente, a concentração de Hg total foi determinada por CVG-GF AAS e, também, por CVG AAS com aquecimento da cela de medida. A determinação do Hg^{2+} foi feita por CV AAS, porém, com a cela de medida à temperatura ambiente. Os autores destacam que, em batelada, o LD obtido por CVG-GF AAS foi $0,001\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que empregando CVG AAS sem aprisionamento, os LD's foram $0,025\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ para a cela a temperatura ambiente e $0,13\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ para a cela aquecida.

⁶⁵ Vieira, M. A., *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 297-300

⁶⁴ Torres, D. P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

2.3.3.1. Avaliação da eficiência do aprisionamento de Hg em tubo de grafite

Muitos trabalhos têm descrito a eficiência de aprisionamento das espécies voláteis de Hg no tubo de grafite.^{2,15,37,38} Varias formas de avaliar esta eficiência são relatadas, sendo que em alguns artigos os autores avaliam a eficiência de aprisionamento, enquanto que em outros, é investigada apenas a eficiência total de aprisionamento. A eficiência total de aprisionamento é o produto da eficiência de geração pela eficiência de aprisionamento ($E_0 = E_1 \cdot E_2$). A primeira delas (E_1) refere-se à fração de analito que foi removido do frasco de reação em relação à massa que foi adicionada, enquanto que a segunda (E_2) é a fração entre a quantidade de Hg que foi aprisionada em relação à quantidade de analito que foi removida do frasco de reação e transportada até o tubo. Como, em alguns casos, os valores de E_0 e E_1 podem ser determinados experimentalmente, o valor de E_2 pode ser calculado.

No trabalho pioneiro de Baxter e Frech², a eficiência total de aprisionamento foi avaliada através de cálculos descritos por L'vov, que correlacionam a área do pico analítico com a massa de analito. Boa concordância entre os valores de m_0 obtidos experimentalmente com aqueles preditos pelos cálculos indicou que a eficiência total de aprisionamento (geração e aprisionamento) se aproximou de 100%.

Matusiewicz e Kopras³⁸ avaliaram a eficiência total de aprisionamento para Hg e elementos formadores de hidretos por CVG-ETV-MIP OES. Para Hg, foram comparados os sinais analíticos obtidos de duas maneiras: 1) quando certa massa de Hg era adicionada ao frasco de reação e volatilizada e 2) quando a mesma massa do analito foi injetada, na forma de solução, diretamente no tubo de grafite. O programa de temperatura para o aprisionamento e volatilização dos analitos foi praticamente o mesmo para ambos os casos. Quando a solução era injetada diretamente no tubo de grafite, foi necessária uma etapa de secagem do solvente, por 55 segundos a 105 °C. Com base nos valores obtidos, foi alcançada eficiência de aprisionamento total de aprisionamento de 60%. Os autores sugeriram recobrir o tubo de grafite com uma mistura contendo 1 µg de Au e 1 µg

² Baxter, D. C., Frech, W., *Anal. Chim. Acta* 225 (1989) 175-183

¹⁵ Docekal, B., Dedina, J., Krivan, V., *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 787-794

³⁷ Matousek, J. P. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155

³⁸ Matusiewicz, H., Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

² Baxter, D. C., Frech, W., *Anal. Chim. Acta* 225 (1989) 175-183

³⁸ Matusiewicz, H., Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

de Pd, para aumentar a eficiência de aprisionamento do Hg em relação ao recobrimento apenas com Au.

Matousek e colaboradores³⁷ avaliaram a eficiência apenas referente ao aprisionamento do Hg em um tubo recoberto com Au, utilizando ETV-ICP-MS. Foi obtida, tanto para deposição térmica quanto eletrolítica do Au, eficiência próxima a 63%, valor semelhante ao obtido anteriormente.⁴⁰ Além disso, quando o recobrimento do tubo de grafite foi feito com Ir-Pd a eficiência de aprisionamento de 74% foi obtida. Foi observada que a eficiência de aprisionamento do Hg em Au diminui com o aumento da temperatura, sendo que a eficiência é máxima a 40 °C e ausente a 400 °C. Sabendo-se que a 400 °C o Hg não é aprisionado pelo Au, o sinal medido naquela temperatura corresponde a todo o mercúrio colocado no frasco de reação. Qualquer diminuição do sinal em temperaturas menores significava que alguma quantia de Hg havia sido aprisionada. Pela diferença entre os sinais medidos a 400 °C e a 40 °C foi possível calcular a parcela de Hg que foi coletada no tubo de grafite.

Outra forma de avaliar a eficiência de aprisionamento de espécies voláteis é através do uso de radiotraçadores. Docekal *et al.* avaliaram a eficiência de geração e de aprisionamento para Se em um tubo recoberto com Pd. Empregando radioisótopos de Se, foi feita a medição da radioatividade do frasco de reação antes e depois da adição da solução de NaBH₄, sendo que a diferença entre os valores corresponde ao Se removido do frasco e enviado para o tubo de grafite. Com isto, foi possível determinar a eficiência de geração, através da razão entre o Se removido do o Se contido originalmente no frasco. Posteriormente, foi feita a medição da radioatividade do tubo de grafite no qual foi aprisionado o Se. A razão entre o Se aprisionado e o Se removido do frasco, calculado anteriormente, corresponde à eficiência de aprisionamento do Se. Este método, considerado pelos próprios autores como o mais seguro para avaliar a eficiência de aprisionamento, foi empregado apenas para Se, Sb e As, e não foram encontrados trabalhos reportando a utilização do mesmo para avaliar a eficiência de aprisionamento do Hg.

³⁷ Matousek, J. P. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

2.3.4. Outras técnicas de amalgamação

A técnica de amalgamação desenvolvida para a determinação de Hg por CV AAS foi considerada como um dos principais avanços para a determinação deste elemento, principalmente durante a década de 70, quando vários trabalhos a respeito desse assunto foram desenvolvidos. A amalgamação é, normalmente, feita pela passagem das espécies voláteis de Hg, geradas no frasco de reação, através de um aprisionador, normalmente uma superfície de Au, para formação de um amálgama. Um subsequente aquecimento, entre 500 °C e 700 °C, libera o Hg na forma de átomos livres, e um gás conduz o Hg até a cela de detecção, normalmente uma cela de vidro ou quartzo.^{2,66} Esta técnica, bem como as técnicas de aprisionamento *in situ*, minimiza interferências cinéticas devido à diferenças na taxa de geração das espécies. Ademais, quando é feita a medida do sinal em altura de pico, a sensibilidade pode ser aumentada em uma ou mais ordens de magnitude, pois todo mercúrio aprisionado é liberado rapidamente para a cela de detecção, conduzindo a LDs na faixa de 0,1 ng de Hg.^{66,67}

Entretanto, alguns hidretos podem envenenar e passivar a superfície do aprisionador, levando a uma diminuição da sensibilidade,⁶⁷ por diminuir a eficiência de aprisionamento, ou de volatilização, ou por ambos os fatores combinados. A presença de umidade na superfície do aprisionador pode causar os mesmos problemas já citados.⁵⁹ Outro problema normalmente relatado quando a determinação é feita por CV AAS é que qualquer variação na vazão do gás de arraste altera o perfil do sinal analítico e, também, a sensibilidade, o que afeta a precisão do procedimento.^{2,59,66}

Bruhn *et al.*⁵ utilizaram um sistema muito parecido com o desenvolvido por Welz *et al.*⁶⁷ para determinar a concentração total de mercúrio em amostras de cabelo após digestão das amostras. O LD absoluto foi 0,13 ng, a m_0 290 pg e a faixa linear entre 0,5 e 12,5 ng de Hg. O procedimento foi validado com CRM's (cabelo, tecido de ostra, peixes e sedimentos).

² Baxter, D. C., Frech, W., *Anal. Chim. Acta* 225 (1989) 175-183

⁶⁶ Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Alemanha, 1999

⁶⁷ Welz, B., *et al.*, *At. Spectrosc.* 5 (1984) 37-42

⁵⁹ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 643-648

⁵ Bruhn, C. G. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 535-541

Magalhães *et al.*³⁵ determinaram Hg em amostras de sedimento por AAS. Massas de amostra entre 2 mg e 60 mg foram pesadas em um copo de quartzo, que era inserido dentro de uma câmara de pirólise. A amostra era aquecida a 1100 °C por três lâmpadas com radiação infravermelha. Um gás carrega o Hg e outras espécies voláteis por uma coluna de alumina-silica-CuO, onde as demais espécies eram retidas, e o Hg ficava retido em um coletor de Au, situado após a coluna. Em seguida, o coletor era aquecido, liberando o Hg, que era medido por AAS. Os autores obtiveram LD de 0,26 ng.

Hall e Pelchat²⁰ desenvolveram um sistema em que a determinação de Hg é feita mediante pirólise da amostra sólida. Primeiramente, uma barqueta contendo uma certa massa da amostra é introduzida em um compartimento do equipamento, o qual é aquecido, e os gases liberados são conduzidos para uma superfície de Au. Desta forma, o Hg fica aprisionado no Au, para subsequente liberação térmica e determinação por AAS. Essa técnica, exclusiva para a determinação de Hg, proporciona ciclos de medida duram cerca de cinco minutos, não necessita de decomposição da amostra e, portanto, minimiza o tempo de análise e possíveis perdas ou contaminações. Ainda, é possível determinar até 0,05 ng de mercúrio em cerca de 300 a 500 mg da amostra, alcançando LDs de aproximadamente 0,1 ng g⁻¹. Tal técnica também foi utilizada, por Costley *et al.*,¹² para a determinação de Hg em solo, sedimento e tecidos biológicos, obtendo LD na ordem de 0,1 ng g⁻¹. Cizdziel e Gerstenberger⁹ determinaram Hg em cabelo humano e pêlos de animal, utilizando um equipamento semelhante ao anterior,²⁰ onde é feita a combustão das amostras. Apesar do LD absoluto ser 0,02 ng de Hg, o LD na amostras foi 0,5 µg g⁻¹, devido a pequena massa de amostra empregada.

³⁵ Magalhães, C. E. C. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1231-1234

²⁰ Hall, G. E. M., Pelchat, P., *Analyst* 122 (1997) 921-924

¹² Costley, C. T. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 179-183

⁹ Cizdziel, J. V., Gerstenberger, S., *Talanta* 64 (2004) 918-921

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

As determinações de mercúrio foram feitas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Analytik Jena (mod. AAS 5 EA, Alemanha) com aquecimento transversal e tubos de grafite sem plataforma. Como fonte de radiação específica para mercúrio foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco (comprimento de onda: 253,7 nm; corrente da lâmpada: 4 mA), fenda espectral de 0,8 nm e como sistema de correção de fundo foi utilizada uma lâmpada de deutério. O gás carregador utilizado foi argônio (99,996%, White Martins, Brasil). Um sistema de geração de hidretos/vapor frio Analytik Jena (HS 5 mercury/hydride system, Alemanha), operando no modo batelada, foi acoplado ao atomizador eletrotérmico, através do amostrador automático Analytik Jena (MPE 5), para a introdução das espécies voláteis de Hg no tubo de grafite.

O capilar de politetrafluoretileno (PTFE) que está normalmente conectado ao braço do amostrador automático foi substituído por outro capilar de PTFE, porém mais longo ($l = 1$ m; d.i. = 1 mm). Este capilar foi conectado ao orifício de saída do frasco de reação, para fazer a transferência das espécies voláteis desde o frasco de reação até o tubo de grafite. Um aprisionador de gotículas, construído no próprio laboratório, foi conectado ao capilar de transferência a cerca de 10 cm após o frasco de reação. Tal aprisionador consiste de um frasco com capacidade para 2 mL, com dois orifícios na extremidade superior, um deles para a entrada e outro para a saída dos gases. Na Figura 1 está representado um desenho do sistema CVG-GF AAS.

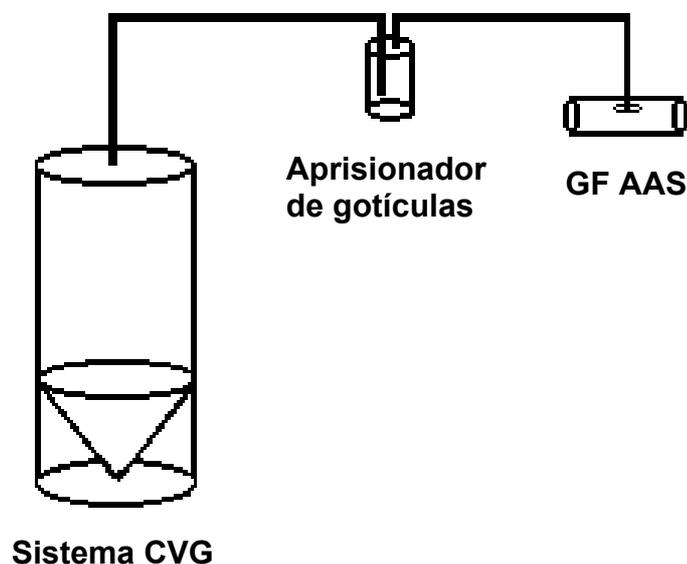


Figura 1. Sistema CVG-GF AAS.

Para fins de comparação, foram feitas determinações de Hg por CV AAS utilizando um espectrômetro de absorção atômica Analytik Jena (mod. Vario 6, Alemanha) equipado com o mesmo sistema de geração de hidretos/vapor frio.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança eletro mecânica Metler Toledo (mod. AG245, Alemanha) com resolução de 0,0001 g e tara máxima de 245 g. Uma centrífuga *Sigma* (mod. 3k30, Alemanha) com capacidade para 8 frascos de 15 mL ou 4 frascos de 50 mL foi utilizada para o processo de extração. Para o preparo das amostras foram utilizados um sistema de liofilização Terroni (mod. LH2000/3, Brasil), um liquidificador doméstico Walita (mod. LIQFAZ, Brasil) um moinho criogênico Spex Certiprep[®] (mod. 6750 Freezer Mill, EUA), um sistema de tamisação Bertel (mod. Bertel, Brasil). Para a decomposição das amostras foi utilizado um forno de microondas Anton Paar (mod. Multiwave 3000[®], Áustria).

3.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada e deionizada em uma coluna trocadora de íons e purificada em um sistema Milli Q (Millipore, USA). Os ácidos nítrico (65%, 1,4 kg L⁻¹, Merck, Alemanha) e clorídrico (37%, 1,19 kg L⁻¹, Merck, Alemanha) foram bidestilados em sistema de sub-ebulição Milestone (mod. duoPUR 2.01E, Itália).

A solução estoque de Hg²⁺ (1000 mg L⁻¹) foi preparada a partir de solução Titrisol[®] (Merck, Alemanha, 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 MeHg foi preparada a partir da dissolução de CH₃HgCl (98%, m/m, Fluka, EUA) em metanol e armazenada (por no máximo dois meses) sob refrigeração e protegida da luz. Para preparar soluções de calibração, foram feitas diluições da solução estoque em HNO₃ 0,2% (m/v) ou em HCl 0,5 mol L⁻¹.

As soluções do redutor NaBH₄ (Merck, Alemanha) foram preparadas diariamente, em solução de NaOH 0,5% (m/v). As soluções dos ácidos nítrico e clorídrico foram preparadas a partir de diluição dos respectivos ácidos concentrados. A solução de Au (1000 mg L⁻¹) foi preparada a partir de solução Titrisol[®] (Merck, Alemanha, [H(AuCl₄)] Cat. n°1.09868, com 1000 ± 0,002 mg L⁻¹ de Au em HCl 5% (m/v)). Como agente antiespumante foi utilizado o Antifoam A Emulsion (emulsão aquosa a 30%, Sigma, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e marca Merck.

3.3. MATERIAIS DIVERSOS

Toda vidraria utilizada neste trabalho foi lavada por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por um período de 24 horas e, posteriormente, enxaguada com água. Para os processos de extração foram empregados frascos de polipropileno (Sarstedt, Alemanha) com fundo cônico, graduados, com capacidade máxima de 15 mL e de 50 mL, que não foram descontaminados previamente ao uso.

Os CRM's (NRCC, Canadá) utilizados estão listados na Tabela 1, com as respectivas concentrações de MeHg e Hg total.

Tabela 1. Concentração de Hg total, MeHg e Hg²⁺ nos materiais de referência utilizados ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Material	Hg Total	MeHg	Hg ²⁺ ^a
DORM-1 (Dogfish Liver)	0,80 \pm 0,07	0,73 \pm 0,06	0,07 \pm 0,09
DORM-2 (Dogfish Liver)	4,64 \pm 0,32	4,47 \pm 0,26	0,17 \pm 0,40

* Não certificado. Valor calculado, neste trabalho, pela diferença entre a concentração de Hg total e de MeHg

3.4. SISTEMA CVG-GF-AAS

Algumas variáveis do sistema CVG-GF-AAS foram ajustadas tendo-se em vista a obtenção do melhor sinal analítico do Hg²⁺. A vazão do gás de arraste foi variada entre 6 e 36 L h⁻¹. A distância entre o capilar do amostrador automático e a superfície do tubo de grafite foi variada entre 0,1 mm e 5 mm. Foi avaliada a influência da concentração da solução de NaBH₄ no sinal analítico para Hg²⁺.

3.4.1. Programas de aquecimento para recobrimento do tubo de grafite com Au e para determinação de Hg

A superfície do tubo de grafite foi recoberta com ouro através da injeção de 50 μL de uma solução de Au 1000 mg L⁻¹. Em seguida, o tubo foi aquecido conforme o programa de recobrimento,¹⁸ descrito na Tabela 2, para produzir uma camada de Au sobre a superfície interna do tubo. O procedimento foi repetido por 5 vezes, totalizando 250 μg de Au sobre a superfície do tubo.

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno de grafite para recobrimento do tubo de grafite com Au (adaptado de Flores *et al.*¹⁸).

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	Vazão de Gás*
1	110	10	50	Max
2	160	30	50	Max
3	875	50	10	Min
4	1100	1	5	Max

* Vazão do gás inerte: Max = 2 L min⁻¹ ; Min = 0,1 L min⁻¹

Para a determinação de mercúrio por CVG-GF AAS foi utilizado o tubo de grafite recoberto com Au e o programa de aquecimento mostrado na Tabela 3.¹⁸ Neste programa, semelhante aquele empregado por Flores *et al.*,¹⁸ foram otimizadas apenas as temperaturas das etapas de aprisionamento e de atomização, enquanto que os demais parâmetros não foram alterados.

Tabela 3. Programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de Hg.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tempo (s)	Vazão de Gás*
Pré-aquecimento	60	30	5	Min
Aprisionamento**	60	0	50	Interrompido
Auto Zero	60	0	5	Min
Atomização***	700	1000	8	Interrompido
Limpeza	1050	200	2	Max

* Vazão do gás inerte: Max = 2 L⁻¹; Min = 0,1 L min⁻¹

** CVG: Injeção de NaBH₄ = 20 s; Aprisionamento = 30 s

*** Etapa de leitura

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

3.4.2. Avaliação da eficiência total de aprisionamento do Hg

Após a otimização das temperaturas de aprisionamento e de atomização, foi avaliada a eficiência total de aprisionamento (geração + aprisionamento) do Hg no tubo de grafite recoberto com Au. Como descrito por Matusiewicz e Kopras³⁸ foram obtidos os sinais analíticos para 5 ng de Hg²⁺ de duas formas: *i*) quando 5 ng de Hg foram adicionados ao frasco de reação, para posterior redução e aprisionamento do Hg, e *ii*) quando 5 ng de Hg²⁺ são adicionados diretamente à superfície do tubo de grafite, na forma de solução. Para ambos os casos foi empregado o mesmo programa de aquecimento do tubo. Para o caso *ii*), foram introduzidos 10 µL de uma solução de Hg 0,5 mg L⁻¹, em KMnO₄ 0,3% (m/v).⁵⁸

3.5. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o desenvolvimento dos procedimentos de extração e separação das espécies de Hg, foram utilizadas amostras de tecido muscular de peixe, comercialmente disponíveis: amostras de peixe “anjo” (*Squatina squatina*) e “garoupa” (*Epinephelus ssp*). Para cada amostra, cerca de 1 kg do tecido muscular foi triturado em liquidificador e, posteriormente, liofilizado por 24 horas para, então, ser moído em moinho criogênico até granulometria inferior a 75 µm. Esta granulometria foi escolhida em função das peneiras disponíveis no laboratório.

3.5.1. Determinação da concentração total de Hg

3.5.1.1. Decomposição das amostras de tecido muscular de peixe

As amostras de tecido muscular de peixe utilizadas foram decompostas em forno de microondas, para posterior determinação da concentração total de Hg por CV AAS. Cerca de 0,8 g de amostra foram transferidos para um frasco do

³⁸ Matusiewicz, H., Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

⁵⁸ Silva, A. F., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2031-2045

sistema do forno de microondas Multiwave 3000 e foram adicionados 4 mL de HNO₃, 2 mL de H₂O₂ e 0,5 mL de HCl. Em seguida, foi executado o seguinte programa de decomposição: 10 minutos/600 W + 15 minutos/1600 W. Após arrefecimento, a solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e foi feita a aferição com água. Para validação deste procedimento, foi feita a decomposição do CRM DORM-2.

3.5.1.2. Extração total das espécies de Hg

Para a determinação da *concentração total de Hg*, as amostras passaram por diferentes extrações e, em seguida, foi feita a determinação de Hg total por CVG-GF AAS (item 3.5.3). Foram estudadas algumas extrações descritas na literatura para análise de especificação de Hg. As extrações foram feitas sob proteção da luz, e os brancos de cada extração foram feitos de forma idêntica.

Extração 1: (adaptado de Rio-Segade *et al.*⁵⁶) 50 mg da amostra foram pesados e transferidos para um frasco de polipropileno de 15 mL, e foram adicionados 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹. O frasco foi levado a um forno de microondas doméstico e aquecido por 3 minutos a 80 W.

Extração 2: (adaptado de Rezende *et al.*⁵²): 50 mg de amostra foram transferidos para um frasco de polipropileno de 15 mL, adicionados 5 mL de uma solução de NaCl 1 mol L⁻¹ em H₂SO₄ 25% (v/v) e a mistura foi agitada manualmente por dois minutos.

Extração 3 (adaptado de Cava-Montesinos *et al.*⁸): 50 mg de amostra foram transferidos para um frasco de polipropileno de 15 mL, contendo 1 mL de H₂O. Foram adicionados 3,5 mL de uma solução mista (0,75 mL de H₂SO₄, 0,14 mL de HNO₃, 2,6 mL de HCl e 0,1 mL de solução de K₂Cr₂O₇ 100 mg L⁻¹). A solução foi deixada em repouso por 15 minutos e, posteriormente, foi feita a aferição a 5 mL com água.

Extração 4 (adaptado de Ribeiro *et al.*⁵³): 50 mg de amostra foram transferidos para um frasco de polipropileno de 15 mL, contendo 1 mL de H₂O, ao qual foram

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁸ Cava-Montesinos, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵³ Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253

adicionados 2,5 mL HCl e 0,25 mL de HNO₃. A mistura foi deixada em repouso por 15 minutos e, posteriormente, foi feita a aferição a 5 mL com água.

Na Figura 2 é mostrado um fluxograma que resume todas as extrações feitas.

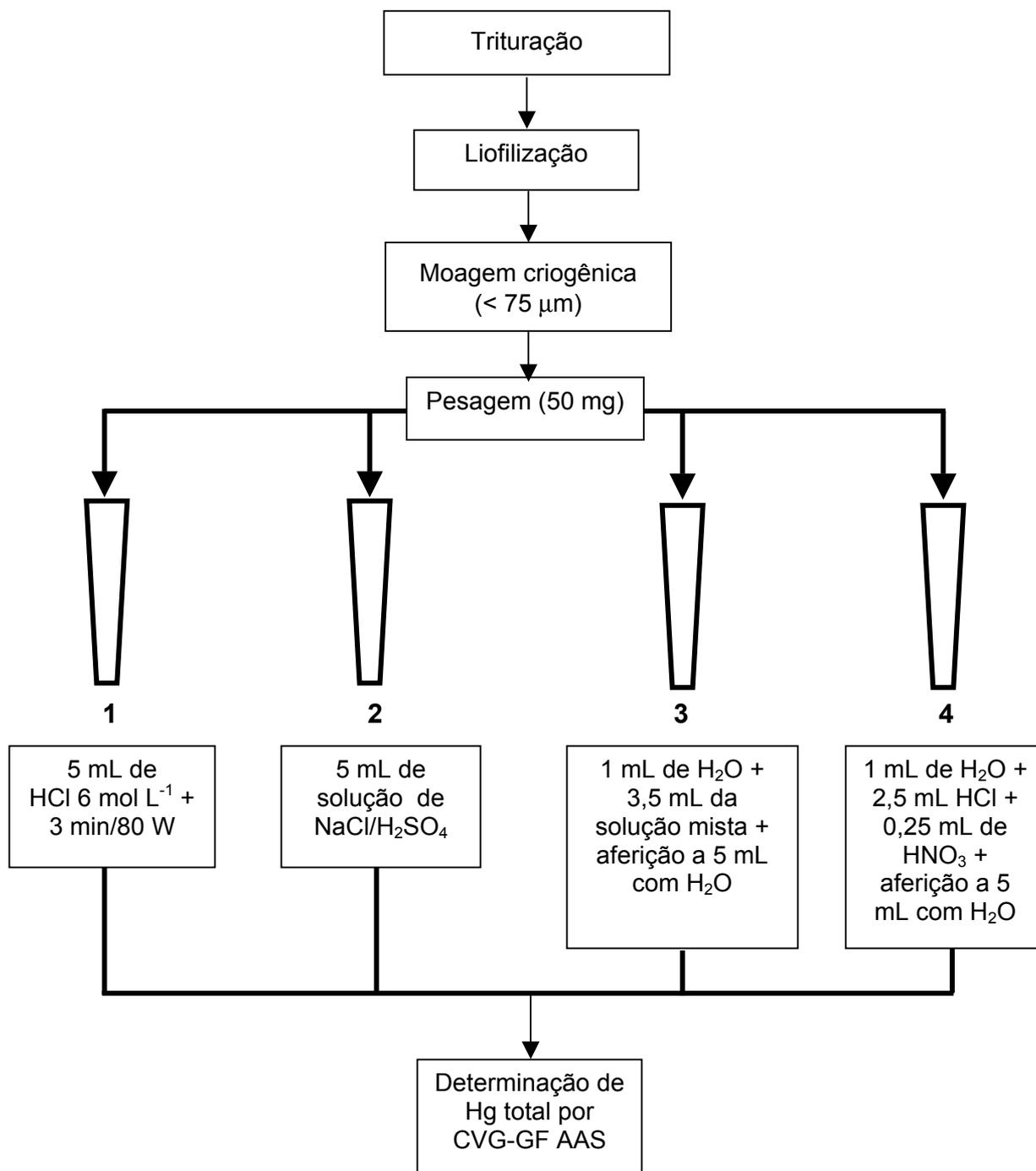


Figura 2. Procedimentos estudados para a preparação da amostra e extração do Hg (item 3.5.1.2) para a determinação de Hg total (item 3.5.3) por CVG-GF AAS.

3.5.2. Análise de especiação

As extrações descritas a seguir, para análise de especiação de Hg, baseiam-se no método de Westöö.⁶⁸ Este método fundamenta-se no fato de que o MeHg, quando em solução polar, é extraído para uma fase mais apolar e, em seguida, extraído novamente para fase mais polar com auxílio de um agente complexante. Neste trabalho foi utilizado CHCl_3 , como fase mais apolar, e uma solução aquosa de L-Cisteína 1% (m/v), como fase polar. Antes de aplicar tais extrações às amostras, foi feita uma avaliação dos ciclos necessários para extração completa das espécies de Hg. Para melhor separação entre as fases, a mistura obtida foi centrifugada a 6000 rpm por 2 minutos.

Os testes para a determinação dos ciclos de extração com CHCl_3 foram feitos conforme descrição no item 3.5.2.2. Foram feitos entre 1 e 8 ciclos de extração com CHCl_3 . Já para verificar o número de ciclos com L-cisteína, procedeu-se de maneira similar àquela descrita no item 3.5.2.3, variando os ciclos de extração de 1 a 6.

3.5.2.1. Degradação do MeHg

A avaliação da degradação do MeHg foi feita de acordo com o item *Extração seletiva para a determinação de Hg^{2+}* (3.5.2.2).

3.5.2.2. Extração seletiva para a determinação de Hg^{2+}

A extração seletiva das espécies de Hg para a determinação de Hg^{2+} , esquematizada na Figura 3, foi feita do seguinte modo: foram pesados, exatamente, cerca de 50 mg da amostra de peixe “anjo” e transferidos para um frasco de polipropileno de 15 mL. A este frasco foram adicionados os respectivos ácidos, referentes às extrações descritas no item 3.5.1.2. Após agitação da solução por, aproximadamente, um minuto, foram feitas sucessivas extrações com CHCl_3 . Posteriormente, até 3 mL da fração polar foram transferidos para o

⁶⁸ Westöö, G., *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137

frasco de reação, juntamente com uma gota de agente antiespumante. A determinação de Hg^{2+} foi feita por CVG-GF AAS, conforme será descrito no item *Calibração* (3.5.3).

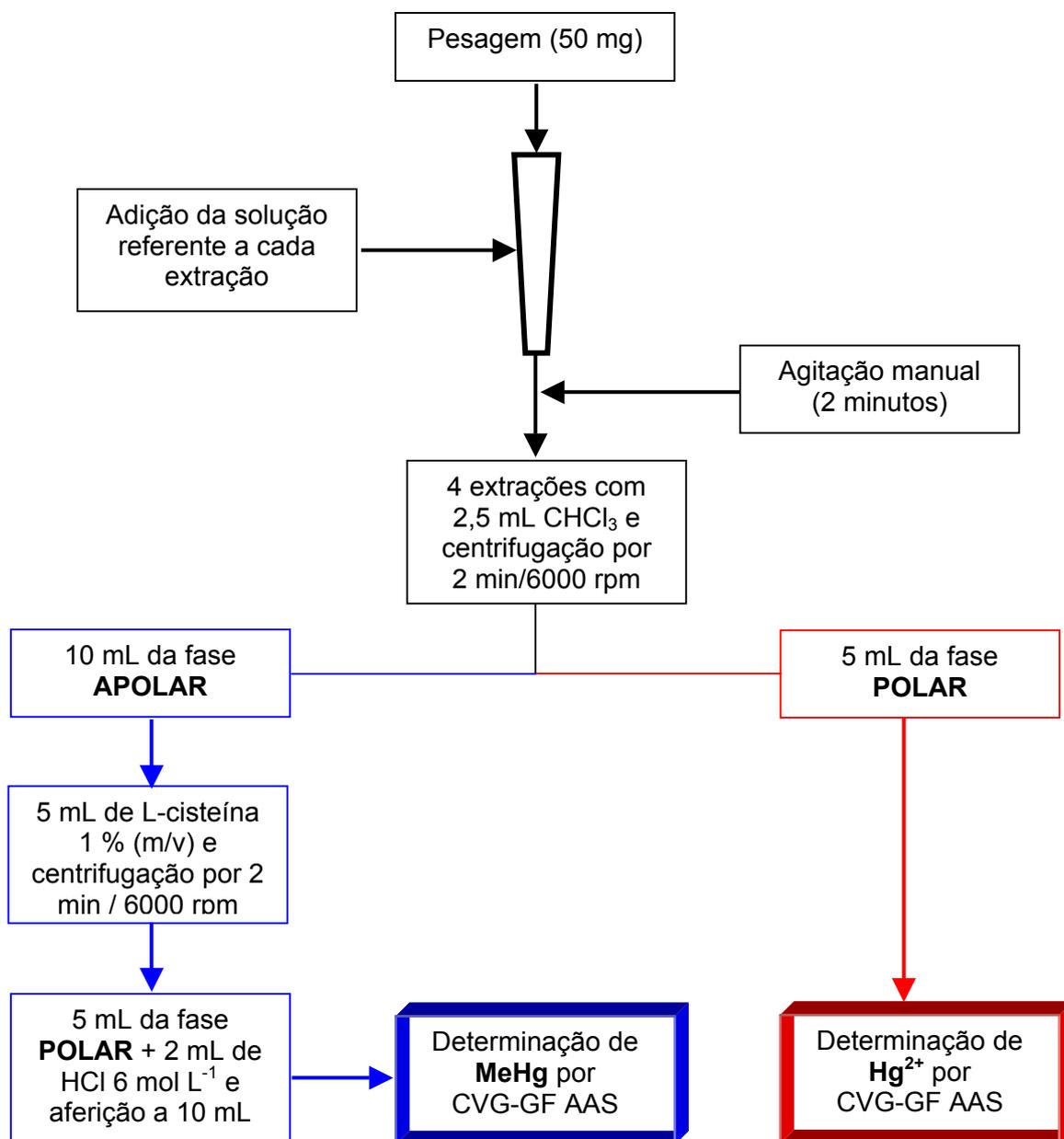


Figura 3. Procedimentos estudados para as extrações seletivas das espécies de Hg para determinação seletiva de Hg^{2+} (item 3.5.2.2) e MeHg (item 3.5.2.3) por CVG-GF AAS.

3.5.2.3. Extração seletiva para a determinação de MeHg

A extração seletiva das espécies de Hg para determinação de MeHg foi feita de forma semelhante àquela descrita no item 3.5.2.2 e, também, está descrita na Figura 3. Entretanto, após a extração com CHCl_3 , a fração apolar, obtida após cada extração, foi transferida para outro frasco, com capacidade para 15 mL e, então, foram feitas extrações com frações de 5 mL de L-Cisteína 1% (m/v). A fase polar foi transferida para outro frasco de polipropileno, graduado e com capacidade para 50 mL, onde foram adicionados 8 mL de HCl 6 mol L^{-1} e feita a aferição para 25 mL com água. Para a determinação do MeHg, 1 mL da amostra foi transferido para o frasco de reação. A determinação de MeHg foi feita por CVG-GF AAS, conforme será descrito no item *Calibração* (3.5.3).

3.5.3. Calibração

Em todas as determinações feitas neste trabalho, foi utilizada uma solução de NaBH_4 1% (m/v), estabilizada em NaOH 0,5% (m/v), sendo injetados cerca de 4 mL desta solução no frasco de reação. Além disso, foram adicionados 100 μL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1% (m/v), diretamente no frasco de reação. Para a *determinação de Hg total*, foi empregada a calibração convencional. Até 3 mL das soluções de referência de Hg^{2+} em meio de H_2SO_4 e NaCl , correspondente a massa de Hg entre 0,5 ng e 10 ng, foram transferidos para o frasco de reação.

Para a *determinação seletiva de Hg^{2+}* , foram empregadas tanto a calibração convencional como a adição de analito. Para a calibração convencional, foram transferidos até 3 mL da solução de calibração para o frasco de reação, correspondendo a massas entre 0,5 ng e 10 ng de Hg^{2+} , em meio idêntico ao utilizado na etapa de extração. Quando foi empregada a adição de analito, a todos os frascos foram transferidas massas iguais de amostra e adicionados 2,5 ng, 5 ng, 7,5 ng e 10 ng de Hg^{2+} a cada um dos frascos. Este procedimento foi repetido para massas de amostra compreendidas entre 20 mg e 150 mg. Após a aferição do volume a 5 mL com solução ácida utilizada na extração, todos os frascos foram manualmente agitados por 1 minuto e,

posteriormente, as suspensões foram deixadas em repouso por cerca de 15 horas antes da extração com CHCl_3 .

Para a *determinação seletiva de MeHg* também foram empregadas a calibração convencional e adição de analito. Entretanto, a calibração convencional foi feita de 2 maneiras (denominadas de calibração convencional 1 e calibração convencional 2), sendo modificada apenas a solução de calibração empregada. Na *calibração convencional 1*, foram utilizadas soluções de calibração de MeHg. Já para a *calibração convencional 2*, foram utilizadas soluções de MeHg que passaram pelo mesmo processo de extração que a amostra. Em ambos os casos, foram transferidos até 3 mL da solução de calibração, em meio de H_2SO_4 , para dentro do frasco de reação, correspondendo a massas entre 0,7 e 10 ng de Hg^{2+} .

Quando foi empregada a adição de analito para a determinação de MeHg, a todos os frascos foram pesadas massas iguais de amostra (entre 20 mg e 150 mg), e adicionados 25 ng, 50 ng, 75 ng e 100 ng de MeHg a cada um deles. Após a aferição a 5 mL com a solução respectiva a cada uma das extrações, todos os frascos foram manualmente agitados por 1 minuto e, posteriormente, os mesmos permaneceram em repouso por cerca de 15 horas antes da extração com CHCl_3 . Em seguida, foi feita a extração com L-Cisteína e foi feita a aferição a 25 mL com HCl 6 mol L^{-1} .

3.5.4. Avaliação da relação massa de amostra/volume da solução extratora

A razão massa de amostra/volume da solução extratora foi avaliada mantendo-se fixo o volume da solução extratora e fazendo-se variar a massa de amostra entre 20 mg a 400 mg.

3.5.5 Interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra

Foram feitos ensaios para verificar a interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra. Foram adicionadas massas crescentes de Hg^{2+} diretamente ao frasco de polipropileno, para posterior determinação de MeHg. Portanto, foram adicionados massas de 0,1 μg , 1 μg e 10 μg de Hg^{2+} diretamente

no frasco de reação, onde havia cerca de 50 mg da amostra, e procedeu-se conforme descrito no item *Extração seletiva para a determinação de MeHg* (3.5.2.3). O mesmo foi feito para a determinação de Hg^{2+} , porém foram adicionados 0,1 μg , 1 μg e 10 μg de MeHg, e procedeu-se conforme descrito no item *Extração seletiva para a determinação de Hg^{2+}* (3.5.2.2).

3.6. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO

O procedimento descrito para a *Extração total de Hg* (3.5.1.2) e para a *Extração seletiva para a determinação de Hg^{2+}* (3.5.2.2) e *Extração seletiva para a determinação de MeHg* (3.5.2.3) foi validado pela análise de CRM's, descritos no item *Materiais diversos* (3.3).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CVG-GF AAS

Inicialmente foi feito o acoplamento entre o sistema de geração de vapor frio e o espectrômetro de absorção atômica. Contudo, durante os primeiros testes para o acoplamento, foi observada uma baixa reprodutibilidade entre as medidas, com desvio padrão relativo (RSD) de cerca de 15%. Pôde ser notado que pequenas gotas, provenientes do frasco de reação, eram transportadas pelo capilar de PTFE até o tubo de grafite. Provavelmente, as gotículas carregavam, também, uma pequena parcela da solução, que poderia conter HCl, H₂SO₄, NaCl ou NaBH₄. Desta maneira, a temperatura da etapa de coleta, que havia sido fixada em 60 °C, não era suficiente para remover do tubo estes interferentes, previamente a atomização do Hg. Assim, durante a etapa de atomização, vapor d'água e outras espécies eram volatilizadas juntamente com o Hg, ocasionando grande variação entre medidas. Além disso, possivelmente, a umidade existente sobre a superfície de Au também poderia interferir no processo de amalgamação.⁵⁹

Além de observar a flutuação do sinal analítico, foi possível, também, visualizar que a camada de Au que recobria a superfície interna do tubo de grafite era danificada. Verificou-se um desgaste, em formato circular, situada exatamente na saída do capilar do braço do amostrador automático, provavelmente onde as gotículas eram depositadas. Esse problema foi contornado utilizando-se um aprisionador de gotículas feito no próprio laboratório (item 3.1, Figura 1). Com este aprisionador de gotículas, o capilar que conduzia os gases provenientes do copo de reação era posicionado próximo ao fundo do microfrasco, forçando as

⁵⁹ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 643-648

gotículas da solução a colidirem com a parede do frasco e, assim, minimizando o transporte das gotículas da solução até o tubo de grafite. Assim sendo, a flutuação do sinal analítico para sucessivas medidas, observada anteriormente, amostra foi significativamente reduzida e o RSD foi diminuído de 15% para 4%.

4.1.1. Distância entre o capilar e a parede interna do tubo de grafite

Como descrito no item 3.4, a distancia entre o capilar e a parede interna do tubo de grafite foi variada entre 0,1 e 5 mm, na tentativa de verificar se a eficiência de aprisionamento era modificada. Contudo, para as diferentes distâncias entre o capilar e o tubo, a absorbância variou cerca de 5%, quando foi avaliada uma massa de 5 ng de Hg^{2+} . Matusiewicz e Kropas³⁸ também verificaram que a distância entre o capilar e o tubo de grafite não apresenta influência sobre a intensidade do sinal. Sendo assim, a distância entre o capilar e a superfície do tubo foi fixada em 0,4 mm, valor semelhante ao utilizado em outros trabalhos.^{18,38}

4.1.2. Concentração do NaBH_4 e vazão do gás

A concentração de NaBH_4 foi variada de 0,25% (m/v) a 3% (m/v), cujos resultados estão mostrados na Figura 4. Como pode ser observado, para 5 ng de Hg^{2+} , praticamente não há variação do sinal analítico para as concentrações do redutor entre 1% (m/v) e 3% (m/v). Para concentrações menores que 1%, verifica-se uma diminuição na intensidade do sinal analítico. Com isso, foi adotada a concentração de 1% (m/v) para a redução de Hg. Também foi variada a vazão do gás de arraste, entre 6 e 36 L h^{-1} , porém, não foi observada variação significativa entre os sinais analíticos, sendo adotada a vazão de 12 L h^{-1} .

³⁸ Matusiewicz, H., Kropas, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

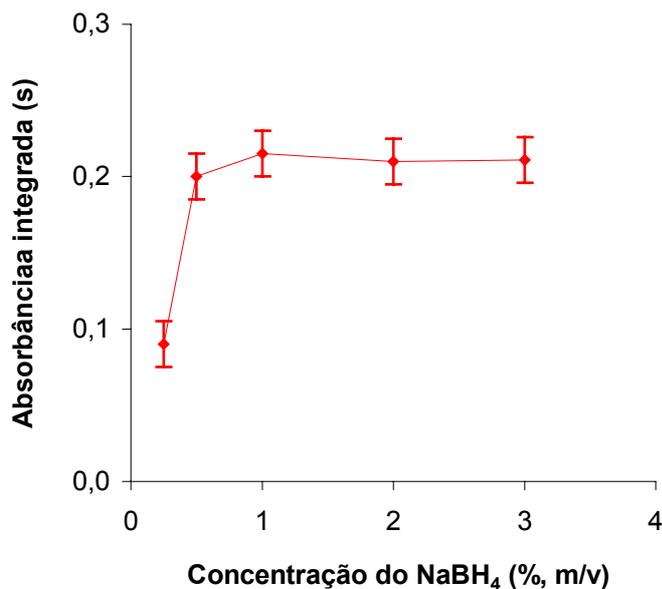


Figura 4. Influência da concentração de NaBH₄ intensidade do sinal analítico para 5 ng de Hg²⁺.

4.1.3. Temperaturas de aprisionamento e atomização do Hg

Para verificar qual a melhor temperatura para coleta do Hg, a temperatura do tubo de grafite foi variada entre 60 °C e 400 °C, conforme descrito no item 3.4.1. e a absorbância foi registrada. Para a avaliação da temperatura de atomização, a mesma foi variada entre 550 °C e 950 °C. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

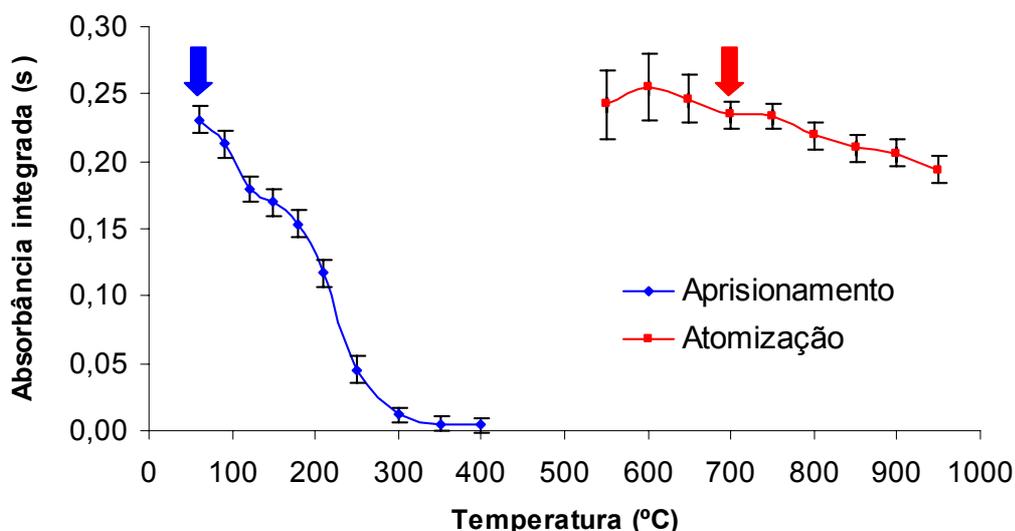


Figura 5. Influência da temperatura do tubo de grafite, nas etapas de aprisionamento e atomização, sobre a intensidade do sinal analítico para 5 ng de Hg^{2+} (setas indicam as temperaturas escolhidas).

Ao observar a Figura 5 nota-se que, aumentando a temperatura, diminui a eficiência de aprisionamento do Hg. A melhor temperatura para o aprisionamento foi de 60 °C. Já com temperatura de coleta de 350 °C, não foi possível a determinação de Hg, pois nesta temperatura a eficiência de aprisionamento foi praticamente nula. Resultados semelhantes foram obtidos por Matousek *et al.*³⁷ que, utilizando também um tubo de grafite recoberto com Au, observaram que a 40 °C ocorreu eficiência máxima de aprisionamento e, a 400 °C, o Hg não era mais aprisionado. Não foi possível trabalhar com temperaturas inferiores a 60 °C em vista da limitação do *software* do equipamento.

Em relação a temperatura de atomização (Figura 5), observou-se que na temperatura de 550 °C a absorbância foi cerca de 0,24 s. Contudo, notou-se que este não foi totalmente integrado, em função desta temperatura ser insuficiente para a volatilização de todo o Hg contido no tubo de grafite no intervalo de 15 segundos. Quando a temperatura de atomização foi de 600 °C, obteve-se melhores valores para absorbância, porém, mesmo que seja possível integrar completamente o sinal analítico, os resultados apresentaram grande variação. A partir de 600 °C, a absorbância apresenta um pequeno decréscimo e, também, o

³⁷ Matousek, J. P. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155

tempo de integração torna-se menor. A 700 °C, a integração do sinal analítico foi feita em cerca de 8 segundos, e o RSD tornou-se menor. Em decorrência destes resultados, adotou-se 700 °C como a temperatura ótima de atomização visto que, acima deste valor, não há um aumento significativo na precisão e, por outro lado, existe uma progressiva diminuição do sinal analítico. Ainda, próximo a 900 °C uma parcela do Au é vaporizada,³⁷ desgastando o recobrimento de Au do tubo e, por conseqüência, diminuindo o número de ciclos de atomização possíveis com o mesmo recobrimento.

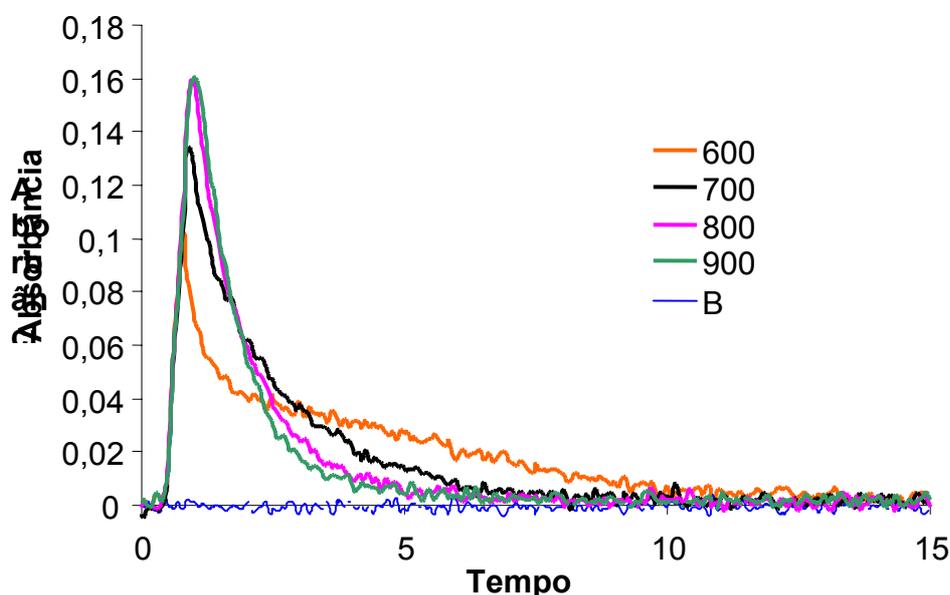


Figura 6. Perfil dos sinais analíticos para 5 ng de Hg em diferentes temperaturas de atomização.

Observando-se os sinais analíticos, apresentados na Figura 6, é importante salientar que o sinal de fundo sempre foi baixo, praticamente desprezível, mesmo quando foi feita a geração das espécies de Hg empregando-se os extratos das amostras. Estes resultados eram esperados, levando em consideração a virtual ausência da matriz no momento da atomização.

³⁷ Matousek, J. P. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155

4.1.4. Avaliação da eficiência total de aprisionamento do Hg

A eficiência de aprisionamento do Hg tem sido avaliada por alguns autores. Porém, normalmente, é possível avaliar apenas a eficiência total de aprisionamento, que corresponde à eficiência das etapas de geração e de aprisionamento, e não apenas a eficiência da etapa de aprisionamento. Neste trabalho, seguindo procedimento semelhante ao de Matusiewicz e Kopras,³⁸ foi avaliada a eficiência total (geração e aprisionamento). Desta maneira, foram comparados os sinais analíticos para 5 ng de Hg²⁺ quando: *i*) esta massa de analito era adicionada ao frasco de reação e as espécies voláteis geradas eram aprisionadas na superfície do tubo de grafite a 60 °C e, *ii*) a mesma massa de analito era introduzida, na forma de solução, diretamente sobre a superfície do tubo de grafite (vide item 3.4.2). Por meio deste procedimento, é possível obter apenas a eficiência total, visto que, não é possível determinar a eficiência das etapas de geração e de aprisionamento separadamente. Entretanto, a informação obtida é suficiente para estimar eventuais ganhos de sensibilidade com o sistema empregado.

Para este teste, quando a solução do analito foi introduzida diretamente no tubo de grafite, a absorvância integrada obtida foi cerca de 0,35 s, enquanto que, quando foi feito o aprisionamento das espécies voláteis, a absorvância foi cerca de 0,23 s. Assim, a eficiência de aprisionamento para Hg, a 60 °C, foi cerca de 65%. Este valor está de acordo com aqueles descritos na literatura para a eficiência total de aprisionamento, tratando-se de tubos recobertos com Au (também cerca de 65%).^{37,38}

Outro parâmetro investigado foi o número de ciclos de aprisionamento e atomização que podem ser feitos sem que ocorra diminuição da intensidade do sinal. No decorrer dos experimentos, foi possível fazer, pelo menos, 250 ciclos de aprisionamento e atomização antes que o sinal analítico diminua mais que 10% em relação ao sinal original. É importante salientar que o número de ciclos de aprisionamento depende, principalmente, da temperatura de atomização e limpeza do tubo de grafite e, também, do bom funcionamento do aprisionador de gotículas, uma vez que, se forem transportadas gotículas da solução até a

³⁸ Matusiewicz, H., Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

³⁷ Matousek, J. P. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155

superfície do tubo de grafite, haverá um desgaste da camada de Au que recobre o tubo.

4.1.5. Limite de detecção e massa característica

Em relação ao sinal do analito na solução do branco, nas condições anteriormente mencionadas, a absorbância foi cerca de 0,02 s, o qual, possivelmente, decorre de contaminações das soluções utilizadas, tanto dos ácidos quanto da solução redutora. Outros autores também verificaram este tipo de contaminação,^{40,67} salientando que a contaminação é originada, principalmente, da solução redutora. Para minimizar a influência causada pela contaminação dos reagentes, Welz *et al.*⁶⁷ borbulharam He por 30 minutos na solução de SnCl₂ e nas demais soluções utilizadas e, desta forma, foi reduzido o valor do branco.

Neste trabalho, Ar foi borbulhado por 30 minutos nas soluções utilizadas e, no entanto, não foi verificada uma diminuição para o sinal do branco. Uma outra tentativa de diminuir o sinal do analito no branco foi descontaminar a solução de NaBH₄, gotejando-se nela HCl 6 mol L⁻¹. Com isso, o sinal do Hg no branco diminuiu, de cerca de 0,020 ± 0,003 s, para cerca de 0,008 ± 0,003 s. Possivelmente, a concentração da solução de NaBH₄ tenha diminuído cerca de 5%, contudo, não foi verificada variação da massa característica do Hg, demonstrando que a diminuição da concentração do redutor não teve influência na redução do analito.

O LD obtido desta maneira, calculado como três vezes o desvio de 10 medidas do branco, foi de 0,08 µg L⁻¹. Assim sendo, utilizando-se 3 mL da solução, o LD absoluto foi 0,23 ng de Hg. Porém, como a técnica de aprisionamento "*in situ*" pode ser utilizada como técnica de pré-concentração, foram feitos 3 ciclos de aprisionamento, previamente à detecção. O emprego de 3 ciclos de aprisionamento implica em três vezes maior volume das soluções de NaBH₄ e de ácido, com conseqüente aumento da massa de Hg aprisionado no tubo de grafite. Como o processo de aprisionamento, neste caso, é repetido três vezes, poder-se-ia esperar maior variação das medidas de absorbância.

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

⁶⁷ Welz, B. *et al.*, *At. Spectrosc.* 5 (1984) 37-42

Entretanto, foi verificada menor variação entre as medidas e o LD na solução diminuiu para $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$. Cabe ressaltar que este procedimento, empregando três ciclos de aprisionamento no tubo de grafite, foi repetido diversas vezes e obteve-se, sempre, valores praticamente iguais para o LD e para a variação entre as medidas de absorvância do branco. Estes resultados pode ser explicados com base na intensidade do sinal de absorvância, quando foram empregados três ciclos de aprisionamento o qual, sendo mais elevado, acarretou em menor variação dos sinais referentes às dez replicatas. Com isso, o LD absoluto melhorou para $0,11 \text{ ng}$, ou seja, metade do valor obtido com apenas um ciclo de aprisionamento.

A massa característica foi 100 pg de Hg. Comparando-se este valor de massa característica com aqueles citados na literatura, eles são semelhantes, considerando trabalhos em que foi feito o recobrimento do tubo de grafite com Au (110 pg ,¹⁸ 92 pg ⁴⁰ e 130 pg ⁶⁴). Não foram feitos testes para recobrimento do tubo de grafite com outros metais, uma vez que, segundo a literatura, eles proporcionam massas características maiores que aquelas obtidas com Au (Pd 114 pg ;⁷¹ Ir 180 pg ⁶⁰, 240 pg ,³ 370 pg ⁴⁵ e 390 pg ⁴⁴ e; W 450 pg ;³ Zr 700 pg ³). Possivelmente, o valor para a massa característica é maior, devido a necessidade de aquecer o tubo de grafite, durante a etapa de atomização, à temperaturas maiores que aquelas utilizadas para o Au, entre $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ e $2600 \text{ }^\circ\text{C}$.

Segundo a literatura, as melhores massas características foram obtidas quando, dentro do tubo de grafite, foi inserido uma gaze, um disco poroso ou um fio de um metal nobre (disco poroso de Au 20 pg ;³² gaze de Au-Pt 75 pg ;⁵⁹ fio de Au 76 pg ²⁹). No entanto, estes trabalhos necessitam da introdução de um fio ou uma gaze dentro do tubo de grafite, que não deve obstruir o feixe ótico. Assim, os sistemas comerciais são modificados, o que dificulta a utilização em laboratório e, por isso, nos trabalhos mais atuais o aprisionamento do Hg não tem sido feito desta maneira. Ainda, Bermejo-Barrera *et al.*³ encontraram, para o mesmo recobrimento, diferentes massas características para Hg^{2+} e para MeHg (240 e

¹⁸ Flores, E. M. M., Welz, B., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1605-1614

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

⁶⁴ Torres, D. P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

⁷¹ Yan, X. P., Ni, Z. M., Guo, Q. L., *Anal. Chim. Acta* 272 (1993) 105-114

⁶⁰ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1719-1722

³ Bermejo-Barrera, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321

⁴⁵ Moreda-Piñeiro, J. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

³² Lee, S. H., Jung, K. H., Lee, D. S., *Talanta* 36 (1989) 999-1003

⁵⁹ Sinemus, H. W. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 643-648

²⁹ Kumar, S. J., Meeravali, N. N., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 166-168

300 pg, respectivamente) que, segundo os próprios autores, decorre dos diferentes mecanismos de redução entre o SnCl_2 e o NaBH_4 .

4.1.6. Faixa linear e precisão

As curvas de calibração feitas com Hg^{2+} em HCl 1 mol L^{-1} e NaBH_4 1% (m/v) em NaOH 0,5% (m/v), foram lineares desde 0,7 ng até 10 ng de Hg^{2+} (0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ até 3,30 $\mu\text{g L}^{-1}$, para 3 mL de solução), com coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99. Quando foram empregadas massas de Hg^{2+} superiores a 10 ng, a correlação diminuiu, obtendo-se R^2 inferior a 0,99 nestes casos. Outra característica importante é o RSD entre 10 medições de uma mesma massa de Hg. Para o branco, o RSD foi de 30%, enquanto que para 0,75 ng de Hg o RSD diminuiu para 4% e para 4 ng de Hg o RSD foi inferior a 2%.

4.2. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE PEIXE

4.2.1. Decomposição das amostras de peixe e determinação de Hg total por CVG-GF AAS

As amostras dos peixes “garoupa” e “anjo”, utilizadas para as otimizações experimentais, foram decompostas em forno de microondas (item 3.5.1.1), juntamente com o CRM DORM-2. Após a validação do procedimento de decomposição, os valores obtidos para as amostras foram adotados como referência para Hg total nas amostras. As concentrações de Hg medidas nas amostras decompostas estão apresentadas na Tabela 4, juntamente com o valor para a decomposição do CRM DORM-2.

Tabela 4. Concentração total de Hg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” e no material de referência certificado DORM-2, obtidas após decomposição com microondas e determinação por CVG-GF AAS (n = 3).

Amostra	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Anjo	$1,78 \pm 0,10$
Garoupa	$0,277 \pm 0,020$
DORM-2 *	$4,58 \pm 0,22$

* DORM-2: $4,64 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$

4.2.2. Extração total de Hg

Inicialmente, foram feitas as extrações conforme descrito no item 3.5.1.2 para a amostra de peixe “anjo”, com posterior determinação de Hg total por CVG-GF AAS. Para a quantificação foi empregada a calibração convencional, utilizando-se solução de calibração de Hg^{2+} . Os resultados obtidos, para cada extração, estão apresentados na Tabela 5, bem como a concordância entre valor obtido para cada extração e o valor de referência para a amostra de peixe “anjo” (Tabela 4).

Tabela 5. Concentração total de Hg na amostra de peixe “anjo” submetida às Extrações 1 a 4 e concordância com o valor de referência (n = 3).

Extração	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concordância (%)*
1 ($\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$) ⁵²	$1,42 \pm 0,08$	80 ± 6
2 ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$) ⁵⁴	$1,48 \pm 0,12$	83 ± 8
3 (mistura ácida) ⁸	$1,71 \pm 0,08$	96 ± 5
4 ($\text{HNO}_3 + \text{HCl}$) ⁵³	$1,74 \pm 0,14$	98 ± 5

* Valor de referência: $1,78 \pm 0,10 \mu\text{g g}^{-1}$

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁸ Cava-Montesinos, P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵³ Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253

Como pode ser observado na Tabela 5, apenas mediante as Extrações 3 e 4 a concordância com o valor de referência foi próxima a 100%. Para as demais extrações a concordância foi entre 80% e 85%. Para a Extração 1, os resultados encontrados são contraditórios em relação aos apresentados por Rio-Segade e Bendicho,^{54,55} uma vez que eles observaram concordância de cerca de 100%, para Hg total em amostras de mexilhão.

Conforme relatado por Ribeiro *et al.*,⁵³ a Extração 4 promove a quebra da ligação entre C e Hg, convertendo MeHg a Hg^{2+} . Ainda, segundo Cava-Montesinos *et al.*,⁸ o $K_2Cr_2O_7$, que é utilizado na Extração 3, atua como catalisador na oxidação do MeHg. Além disso, segundo a literatura, as Extrações 1⁵⁴ e 2⁵² não promovem a quebra da ligação entre C e Hg e, tampouco, utilizam algum catalisador para auxiliar a redução. Assim sendo, se apenas as extrações que, possivelmente, promoveram a quebra da ligação entre C e Hg (Extrações 3 e 4) obtiveram concordância próxima a 100% pode-se, então, inferir que a baixa concordância mediante as outras extrações (Extrações 1 e 2) não seja devida à extração incompleta das espécies de Hg, mas, sim, a diferença de sensibilidade entre o MeHg e o Hg^{2+} , devido à falta de eficiência nas etapas de geração ou de aprisionamento das espécies.

A diferença de sensibilidade entre as espécies de Hg foi relatada, também, por Capelo *et al.*,⁷ que verificou que o sinal do MeHg foi 20% inferior ao sinal para o Hg^{2+} ,^{55,62} enquanto que outros autores^{64,66} não observaram diferença de sensibilidade. Esta divergência entre os autores pode ser atribuída a fatores como diferenças na concentração do redutor⁵⁶ ou no pH do meio de geração,⁵⁵ visto que as condições de redução das espécies de Hg são diferentes em cada um dos trabalhos. Ou seja, pode-se afirmar que durante a etapa de medição do sinal, as espécies de Hg podem apresentar sensibilidade diferente.

Deste modo, segundo as evidências anteriores, pode-se supor que a baixa concordância, para Hg total, entre o valor de referência e os valores obtidos após as extrações, seja somente devida a etapa de medição do sinal, e não, à baixa

⁵⁴ Rio-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁵⁵ Rio-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵³ Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253

⁸ Cava-Montesinos, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁷ Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984

⁶² Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931

⁶⁴ Torres, D. P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

⁶⁶ Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Alemanha, 1999

⁵⁶ Rio-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

eficiência de extração. Foi, então, avaliada a influência da adição de $K_2Cr_2O_7$ sobre os sinais analíticos para soluções de calibração de Hg^{2+} e MeHg. Para isso foram adicionados 100 μ L de $K_2Cr_2O_7$ 0,1% (m/v), diretamente ao frasco de reação, previamente a determinação. Ainda, nos casos em que ocorreu a formação de grande quantidade de espuma no frasco de reação, após a adição da solução de $NaBH_4$, foi necessário adicionar algumas gotas do agente antiespumante, e sua influência sobre a intensidade do sinal também foi avaliada. Os resultados estão mostrados na Figura 7.

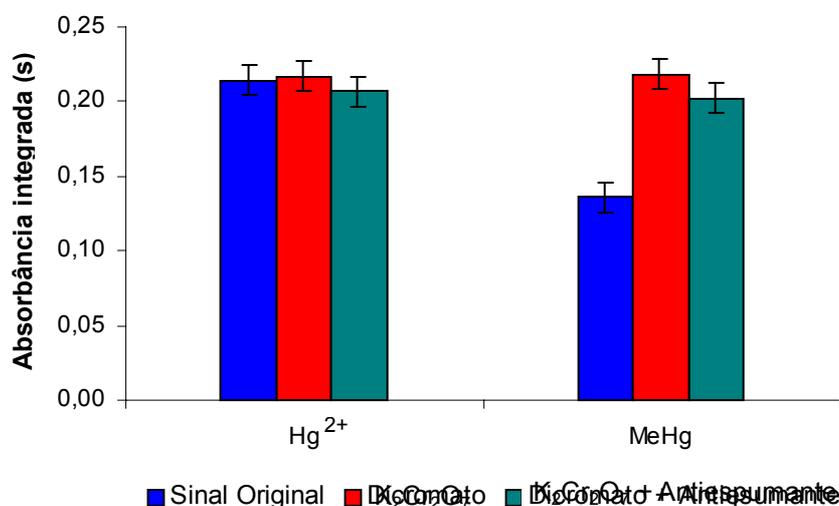


Figura 7. Influência do $K_2Cr_2O_7$ e do agente antiespumante no sinal analítico para 5 ng de Hg^{2+} .

Observando-se a Figura 7, pode-se afirmar que:

- o sinal analítico do MeHg na ausência de $K_2Cr_2O_7$ é inferior ao sinal do Hg^{2+} , como Capelo *et al.*⁷ haviam descrito. Desta forma, quando ambas as espécies estiverem em solução, a absorbância será diferente daquela obtida para as espécies em soluções individuais. Possivelmente, este tenha sido o motivo da baixa concordância com o valor de referência para as Extrações 1 e 2, visto que, a calibração foi feita com solução de calibração de Hg^{2+} e os extratos apresentavam ambas espécies em solução, devendo estar a maior parte do Hg na forma de MeHg.
- quando é feita a adição de $K_2Cr_2O_7$, o sinal analítico do Hg^{2+} não é alterado, enquanto que, para o MeHg, o sinal aumentou, apresentando o mesmo valor

⁷ Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C., *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984

que o do Hg^{2+} . Provavelmente esta seja a explicação para a Extração 3 proporcionar concordância de 100%, uma vez que o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ foi adicionado durante a extração.

- iii) a adição do agente antiespumante diminui, em cerca de 7%, os sinais analíticos de ambas as espécies de Hg. Contudo, como a diminuição do sinal é idêntica para as duas espécies, não há problema em utilizar o agente antiespumante, desde que ele também seja utilizado para a calibração. Assim, haverá a diminuição tanto no sinal das amostras quanto no sinal das soluções de calibração.

Com base nestes resultados, pode-se inferir que a concordância entre as Extrações 1 e 2 pode estar errada e que este erro possa ter ocorrido durante a etapa de determinação. Para evitar tal erro, tanto às soluções de calibração, como aos extratos das amostras, deve-se adicionar $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e antiespumante diretamente no copo de reação antes de cada medição, igualando, desta maneira, o sinal analítico do MeHg e do Hg^{2+} .

No item 4.1.5 foi relatado que os autores Bermejo-Barrera *et al.*³ obtiveram a massa característica para Hg^{2+} cerca de 20% inferior à obtida para MeHg, sendo que, naquele trabalho, foi utilizado NaBH_4 para redução do MeHg e SnCl_2 para Hg^{2+} . Além disso, esta diferença foi atribuída ao diferente mecanismo de redução dos redutores utilizados. Observando-se a Figura 7, é possível inferir que os autores tenham encontrado algum problema na geração do Hg^0 a partir do MeHg, visto que o sinal analítico para o MeHg é inferior ao do Hg^{2+} . Assim, poderia ser indicado o emprego de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, tornando o sinal analítico para ambas as espécies semelhante, passando-se a empregar apenas uma curva de calibração para as determinações.

Deste modo, foram feitas novas medições para todas as Extrações, porém, com adição de solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e de antiespumante diretamente no frasco de reação. Os novos resultados estão apresentados na Figura 8, comparados com os valores anteriores, obtidos sem a adição da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

³ Bermejo-Barrera, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321

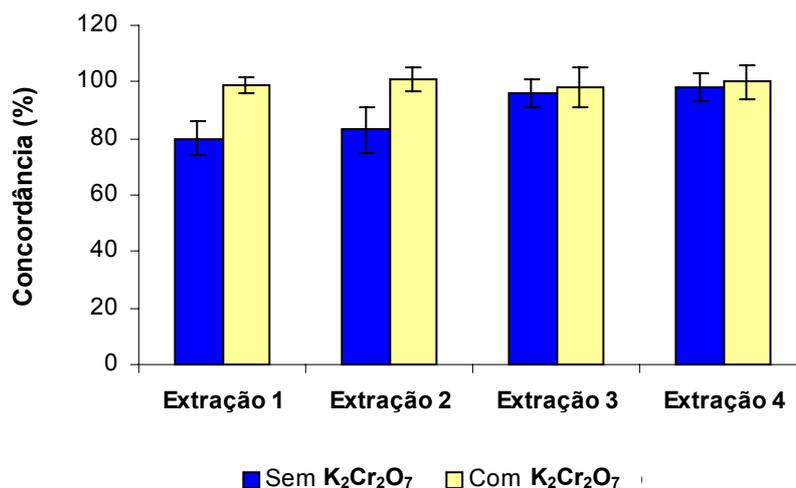


Figura 8. Concordância entre os valores de Hg total para a amostra de peixe “anjo”, obtidos a partir das Extrações 1 a 4, em relação ao valor de referência, mediante o emprego do agente antiespumante, na ausência e na presença de $K_2Cr_2O_7$.

Como pode ser verificado na Figura 8, os novos valores de concordância para as quatro extrações foram próximas a 100%. Estes resultados demonstram que é necessária a adição de $K_2Cr_2O_7$ na determinação de Hg total nas amostras. Pode-se ainda afirmar que o Hg é totalmente extraído da amostra, independentemente da solução extratora utilizada neste trabalho. Embora qualquer uma das extrações seja apropriada para a extração total das espécies de Hg, é necessário avaliar em qual delas não ocorre degradação ou transformação das espécies de Hg, já que esta extração será utilizada para análise de especiação e, portanto, não podem ocorrer transformações das espécies.

4.3. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO

No presente trabalho, para a análise de especiação de Hg, a separação entre MeHg e Hg^{2+} foi feita através de uma extração seletiva (item 3.5.2), baseada no método de Westöö.⁶⁸ Nesse método, quando as espécies encontram-se em solução polar, o MeHg é extraído para a fase mais apolar com um solvente

⁶⁸ Westöö, G., *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137

orgânico apropriado, enquanto que o Hg^{2+} permanece na fase polar. Posteriormente, o MeHg é extraído para nova fase polar com o uso de um agente complexante. Inicialmente (item 3.5.2), foi feita a avaliação do número de extrações necessárias para extração completa das espécies. O volume de CHCl_3 usado em cada extração foi fixado em 2,5 mL e o volume de solução de L-cisteína foi fixado em 5 mL. A escolha destes volumes foi devida ao fato de que volumes menores dificultavam a posterior remoção de uma das fases.

Conforme descrito no item *Análise de especificação* (3.5.2), foram avaliados quantos ciclos de extração com CHCl_3 são necessários para remover o MeHg, proveniente da amostra de peixe “anjo”, da solução ácida. Após, foram otimizados os ciclos de extração necessários para extrair novamente o MeHg, que estava na fase apolar, para a fase polar. Os resultados assim obtidos para a amostra de peixe “anjo” estão apresentados na Figura 9. Nos testes, foi utilizada a Extração 2, que emprega solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$.

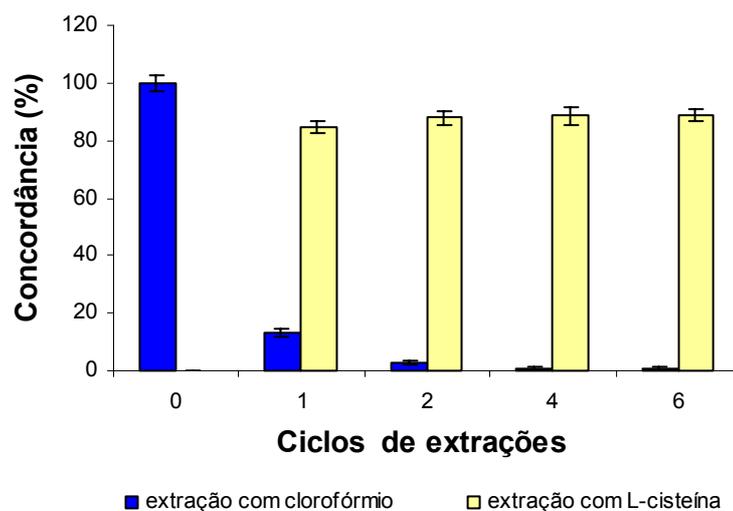


Figura 9. Avaliação dos ciclos de extração para L-cisteína e para CHCl_3 . Em azul está representado o percentual de Hg (Hg^{2+} e MeHg) restante no frasco após extrações com CHCl_3 , em relação ao valor de referência para Hg total. Em vermelho, está representado o percentual de MeHg que é extraído com L-cisteína, em relação ao valor de referência para Hg total.

É possível verificar, na Figura 9, que quatro ciclos de extração com 2,5 mL de CHCl_3 são necessários para extrair todo MeHg para a fase apolar. Pode-se observar que com menos de quatro ciclos de extração uma certa quantidade de MeHg ainda permanece na fase polar e, com mais que quatro ciclos, a

concentração para Hg^{2+} não diminui, demonstrando que, provavelmente, nenhuma parcela do Hg^{2+} é extraída para a fase apolar. Conseqüentemente, o número de ciclos de extração com CHCl_3 foi fixado em 4 e avaliado o número de extrações solução de L-cisteína 1% (m/v). Foi observado que, com apenas duas extração com L-cisteína, a concentração de MeHg atinge o valor máximo e, aumentando-se o número de extrações, o incremento é desprezível. Portanto, para a extração seletiva das espécies de Hg em peixes, são necessários quatro ciclos de extração com 2,5 mL de CHCl_3 e dois com 5 mL L-cisteína 1% (m/v).

4.3.1. Degradação do MeHg

Para que as extrações anteriormente descritas (item 3.5.1.2) possam ser empregadas para análise de especiação de Hg, é necessário que não ocorra degradação ou transformação das espécies durante a extração. Segundo Cava-Montesinos *et al.*,⁸ que utilizaram a o mesmo meio extrator empregado na Extração 3, em sistema em fluxo, não ocorre degradação do MeHg. Já na Extração 4, empregada por Ribeiro *et al.*,⁵³ que utiliza HCl e HNO_3 concentrados, há a quebra da ligação entre C e Hg. Para as demais extrações,^{52,54-56} não há degradação das espécies.

Portanto, as quatro extrações foram novamente avaliadas, com intuito de verificar se ocorria degradação do MeHg. Foram feitos, conforme estabelecido anteriormente, quatro ciclos de extração com CHCl_3 e dois ciclo de extração com L-cisteína para separar quantitativamente as espécies de Hg. Desta maneira, a possível degradação do MeHg durante a extração foi investigada, conforme descrito no item *Degradação do MeHg* (3.5.2.1), cujos resultados estão mostrados na Figura 10.

⁸ Cava-Montesinos, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵³ Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

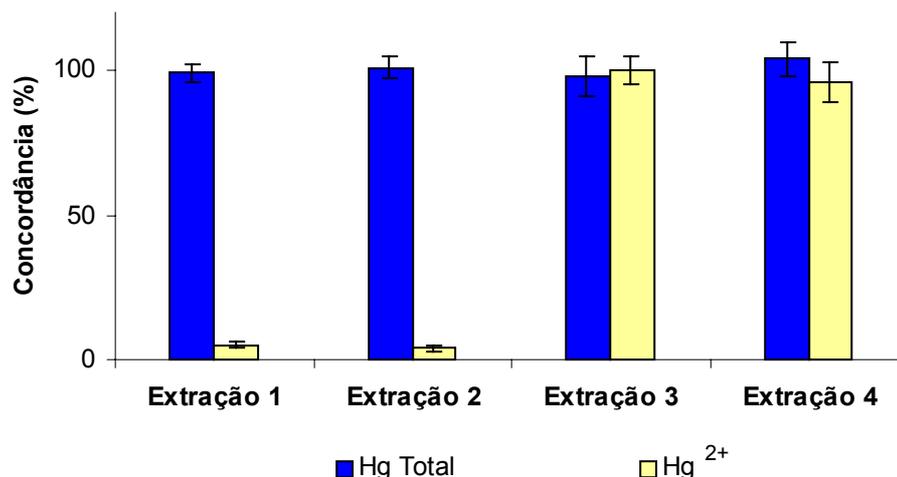


Figura 10. Concordância entre o Hg remanescente na fase polar e o valor de referência para a concentração total de Hg, após as Extrações 1 a 4, para a amostra de peixe “anjo”. Está representada, em azul, a concordância para o *Hg total* e, em vermelho, a concordância *apenas para o Hg²⁺*, ambos em relação ao valor de referência para Hg total.

Foi observado, na Figura 10, que a concentração para o Hg²⁺, mediante as Extrações 3 e 4, foram muito próximas à concentração de Hg total. Provavelmente, isto seja devido à degradação do MeHg. Contudo, o resultado para a Extração 4 é contraditório com aquele obtido por Cava-Montesinos *et al.*,⁸ que não observou degradação do MeHg quando a mesma solução para extração foi utilizada, porém, em sistema em fluxo.

Para as Extrações 1 e 2, a concordância para o Hg²⁺ foi de cerca de 4% em relação ao valor total. Estes valores estão de acordo com os valores normalmente citados em outros trabalhos para a concentração de Hg²⁺ em peixes, que pode chegar até a 15%.⁶¹ Analisando-se estes resultados, não se pode afirmar, com segurança, que o MeHg não foi degradado utilizando-se as Extrações 1 e 2. Entretanto, pode-se afirmar que o MeHg não foi totalmente degradado, como nas outras extrações, e, se ele foi, provavelmente seja uma parcela muito pequena. Deste modo, no presente trabalho, só será possível afirmar que não ocorreu a degradação do MeHg a Hg²⁺ ou a formação de MeHg, através do emprego de CRM's, ou então, por testes de recuperação.

⁸ Cava-Montesinos, P. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁶¹ Storelli, M. M. *et al.*, *Food Chem.* 89 (2005) 295-300

A partir dos resultados anteriormente apresentados, fica evidente que, dos procedimentos investigados, apenas as Extrações 1 e 2 são apropriadas para análise de especiação de Hg em peixes pois, quando estas extrações foram empregadas, não foi perceptível a degradação do MeHg e, por outro lado, sempre uma determinada quantidade de Hg^{2+} permaneceu na fase polar. Embora seja possível utilizar ambas as extrações para análise de especiação de Hg, foi observado por Hintelmann e Evans²⁴ que quando é usado HCl 6 mol L^{-1} (Extração 1), uma pequena quantidade do Hg^{2+} pode ser convertido à MeHg. Portanto, a Extração 2, que o meio extrator é a solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$, foi adotada para Hg total e, também, para os subseqüentes testes feitos neste trabalho, para a análise de especiação.

4.3.2. Extração seletiva para a determinação de Hg^{2+}

A extração seletiva para a posterior determinação de Hg^{2+} foi feita conforme descrita no item 3.5.2.2, sendo utilizados 3 mL da fração polar remanescente após a extração com CHCl_3 . Os resultados obtidos empregando calibração convencional, bem como a concordância entre a concentração de Hg^{2+} e o valor de referência, estão demonstrados na Tabela 6, para as duas amostras estudadas.

Tabela 6. Concentração de Hg^{2+} encontrado nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando calibração convencional (n = 3).

Amostra	Concentração de Hg^{2+} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% de Hg^{2+}
Anjo	$0,07 \pm 0,01$	$1,78 \pm 0,10$	$4 \pm 0,5$
Garoupa	$0,007 \pm 0,002$	$0,277 \pm 0,020$	$2 \pm 0,7$

²⁴ Hintelmann, H., Evans, R. D., *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 378-385

Contudo, embora seja demonstrado na Figura 8 que todo o Hg é extraído, segundo Río-Segade e Bendicho⁵⁵, o Hg²⁺ é mais dificilmente extraído que o MeHg. A partir desta informação, pode-se inferir que, se uma pequena parte do Hg²⁺ não for extraída, esta não terá muita influência na determinação do Hg total, visto que a concentração de Hg²⁺ frente à concentração total de Hg em peixes é baixa. Provavelmente, isto altere bastante o resultado para Hg²⁺ e, este resultado, seja inferior ao valor verdadeiro. Portanto, apenas para fim de comparação, foi feita a calibração por adição de analito (item 3.5.3) para a determinação de Hg²⁺. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração de Hg²⁺ nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” mediante calibração por adição de analito e comparação dos resultados com aqueles obtidos por calibração convencional (n = 3).

Amostra	Hg ²⁺ adição de analito (µg g ⁻¹)	Hg ²⁺ calibração convencional (µg g ⁻¹)
Anjo	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Garoupa	0,009 ± 0,002	0,007 ± 0,002

Aplicando o teste “t”, verificou-se que não há diferença significativa (P = 0,05) entre resultados obtidos com as duas formas de calibração para a determinação de Hg²⁺. Também, pode ser observada uma variação elevada para cada uma das formas de calibração, para a amostra de peixe “garoupa”. Isto pode ser justificado por uma grande variação nas extrações, e não nas determinações de Hg²⁺. Com base nos resultados apresentados na Tabela 7, não foi verificada diferença significativa entre a concentração de Hg²⁺ obtida por calibração convencional e por adição de analito. Assim, pode ser afirmado que todo Hg²⁺ é extraído da amostra e, também, que se pode empregar a calibração convencional para determinar Hg²⁺ em vez da adição de analito, uma vez que esta última forma de calibração é mais lenta e trabalhosa que aquela proposta.⁵⁰

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

4.3.3. Extração seletiva para a determinação de MeHg

A extração do MeHg foi feita conforme descrito no item 3.5.2.3, mediante a Extração 2. Além disso, conforme discutido no item *Análise de Especificação* (4.3), foram utilizadas quatro extrações com CHCl_3 e uma com L-cisteína 1% (m/v). Ao final destas extrações, foram adicionados 2 mL de HCl 6 mol L^{-1} aos 5 mL da solução de L-Cisteína, e foi feita a aferição a 10 mL com água.

A primeira determinação de MeHg foi feita através de calibração convencional 1 (3.5.3), utilizando-se solução de calibração de Hg^{2+} , visto que, conforme a Figura 7, quando o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ é empregado, o Hg^{2+} e o MeHg apresentam a mesma sensibilidade. As concentrações de MeHg nas amostras empregando a calibração convencional 1 estão demonstradas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de MeHg obtida mediante a Extração 2 nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando calibração convencional 1 e respectivas porcentagens em relação ao valor de referência para Hg total (n = 3).

Amostra	Concentração de MeHg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração total de Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	% de MeHg
Anjo	$1,58 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,10$	88 ± 7
Garoupa	$0,251 \pm 0,020$	$0,277 \pm 0,020$	91 ± 7

Analisando-se a Tabela 8, verifica-se que cerca de 90% do Hg contido na amostra encontra-se na forma de MeHg, valores que estão dentro da faixa de concentração esperada para MeHg.⁶¹ Todavia, pode-se verificar que, se forem adicionados o valor para a concentração de MeHg ao valor para a concentração de Hg^{2+} , tem-se, para ambas as amostras, cerca de 92% de concordância em relação ao valor de referência. É possível verificar, na Figura 9, que a eficiência das extrações com L-Cisteína não foi 100% mas, cerca de 90%. Também, ao contrário do esperado, mesmo aumentando o número de extrações sucessivas não foi possível atingir o valor de 100%. Desta maneira, possivelmente, uma parcela do MeHg não estaria sendo transferida para a fase polar.

⁶¹ Storelli, M. M. et al., *Food Chem.* 89 (2005) 295-300

Com isto, pode-se inferir que, se a solução de calibração de MeHg fosse submetida ao mesmo processo de extração que a amostra, seria possível a determinação por calibração convencional. Portanto, foram comparadas as sensibilidades entre curvas de calibração convencional 1 e 2, uma delas usando solução de MeHg e a outra, com solução de MeHg submetida ao mesmo processo de extração que a amostra. Baseando-se neste teste, foi possível verificar que, realmente, a eficiência de extração com L-cisteína é de 90%. As curvas de calibração estão mostradas na Figura 11.

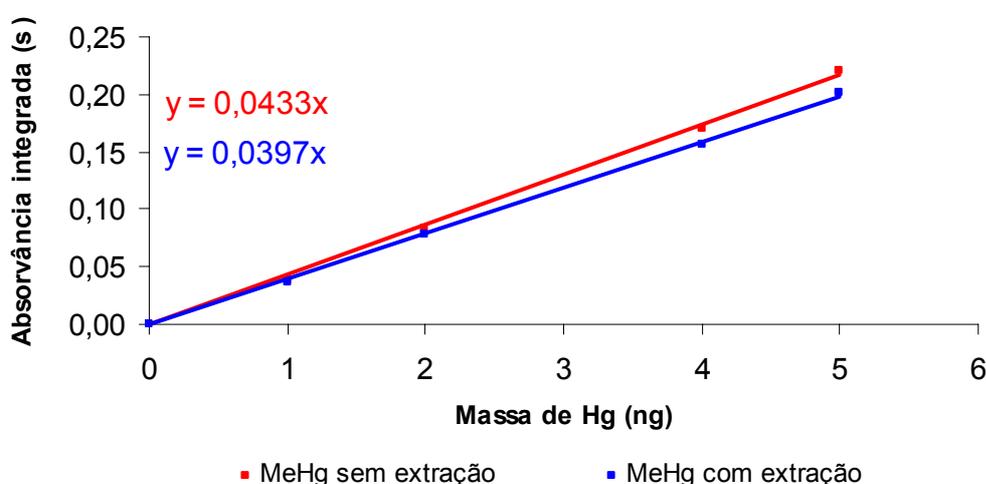


Figura 11. Curvas de calibração convencional empregando-se solução de calibração de MeHg e de MeHg, esta após passar pelo mesmo processo de extração que a amostra.

Como pode ser visto na Figura 11, a inclinação da curva de calibração com solução de MeHg, após extração com CHCl_3 e L-cisteína, é cerca de 10% inferior àquela obtida sem a extração. Deste modo, confirma-se que, nas condições em que as extrações foram feitas, cerca de 10% do MeHg não foi extraído para a fase polar. Provavelmente, nas determinações em que foi empregada a calibração convencional 1, isto também tenha ocorrido, proporcionando resultados inferiores aos esperados.

Foi feita, então, a determinação de MeHg empregando-se a calibração convencional 2, que utiliza uma solução de calibração de MeHg que passou pelo mesmo processo de extração que a amostra. Os resultados estão apresentados na Tabela 9, bem como o valor de referência para Hg total e a concordância entre eles.

Tabela 9. Concentração de MeHg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” mediante calibração convencional 2 e respectivas porcentagens em relação ao valor de referência para Hg total (n = 3).

Amostra	MeHg - calibração convencional 2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentração total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concordância (%)
Anjo	1,66 \pm 0,13	1,78 \pm 0,10	94 \pm 6
Garoupa	0,279 \pm 0,017	0,277 \pm 0,020	100 \pm 4

Pode-se verificar na Tabela 9 que, empregando-se a calibração convencional 2 para a determinação de MeHg, os valores encontrados foram superiores aos encontrados quando a calibração convencional 1 foi empregada. Adicionando-se os valores de concentração para MeHg obtidos com a calibração convencional 2, aos valores obtidos com calibração convencional para Hg^{2+} , tem-se concordância muito próxima a 100% em relação ao valor de referência para Hg total. Contudo, para se obter um resultado mais confiável, para a concentração de MeHg, foi feita a determinação de MeHg empregando-se a adição de analito, conforme descrito no item *Calibração* (3.5.3). É importante salientar que, após a adição do MeHg diretamente ao frasco, a mistura foi agitada e, então, foi deixada em repouso por 15 horas para permitir o equilíbrio entre as espécies.⁵⁰ Os resultados, empregando-se a calibração por adição de analito para determinação de MeHg, nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa”, estão mostrados na Tabela 10, juntamente com os valores obtidos através da calibração convencional 2.

Tabela 10. Concentração de MeHg nas amostras de peixe “anjo” e “garoupa” empregando adição de analito e calibração convencional 2 (n = 3).

Amostra	MeHg - adição de analito ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MeHg – calibração convencional 2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Anjo	1,68 \pm 0,12	1,66 \pm 0,13
Garoupa	0,266 \pm 0,015	0,279 \pm 0,017

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

Através do teste “t” ($P = 0,05$), é possível afirmar que não existe diferença significativa entre os valores encontrados através da adição de analito e aqueles encontrados através da calibração convencional 2 (Tabela 10). Desta forma, é possível determinar a concentração de MeHg nas amostras de peixe sem a necessidade da calibração por adição de analito, como tem sido feito por alguns autores.^{40,44,45} É importante ressaltar que, ao empregar a calibração convencional e evitar a adição de analito, há uma diminuição do tempo de análise.⁵⁰

Para efeito de comparação, os valores da concentração total de Hg e das suas espécies, para as amostras de peixe “anjo” e “garoupa”, estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados para MeHg, Hg²⁺ e Hg total para as amostras de peixe “anjo” e “garoupa” (n = 3).

	MeHg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Hg ²⁺ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Anjo			
Decomposição (3.5.1.1)	---	---	1,78 \pm 0,10
Extração total 2 (3.5.1.2)	---	---	1,76 \pm 0,12
Adição de analito (3.5.3)	1,68 \pm 0,12	0,07 \pm 0,02	1,75 \pm 0,12
Calibração convencional 2 (3.5.3)	1,66 \pm 0,13	0,07 \pm 0,01	1,73 \pm 0,13
Garoupa			
Decomposição (3.5.1.1)	---	---	0,277 \pm 0,020
Extração total 2 (3.5.1.2)	---	---	0,280 \pm 0,031
Adição de analito (3.5.3)	0,266 \pm 0,015	0,009 \pm 0,002	0,275 \pm 0,015
Calibração convencional 2 (3.5.3)	0,279 \pm 0,017	0,007 \pm 0,002	0,286 \pm 0,017

Com base nos valores obtidos, demonstrados na Tabela 11, pode-se verificar que é possível determinar a concentração das espécies de Hg, mediante calibração convencional, por mais de uma maneira, sem que exista diferença significativa entre cada uma delas e o valor certificado. As concentrações podem ser obtidas de três maneiras, como descrito a seguir:

⁴⁰ Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

⁴⁵ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895

⁵⁰ Quevauviller, P., Morabito, R., *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96

- i) Hg total e MeHg: neste caso, é feita a determinação do Hg total e do MeHg, sendo o Hg^{2+} determinado por diferença. Uma das desvantagens desta forma de determinação é que, por apresentarem-se normalmente em concentrações muito próximas, o valor da concentração de Hg^{2+} poderá estar contida no desvio das medidas do Hg total e MeHg e, portanto, o resultado para Hg^{2+} apresentará uma incerteza elevada, o que torna o valor para Hg^{2+} sem significado prático.
- ii) Hg total e Hg^{2+} : é feita a determinação de Hg total e de Hg^{2+} , sendo a concentração de MeHg determinada por diferença. Dentre as vantagens de se fazer este tipo de determinação, pode-se citar que não é necessário trabalhar com soluções de MeHg, uma vez que esta espécie é determinada por diferença. Outra vantagem diz respeito à concentração de Hg^{2+} , que no caso i) terá uma incerteza muito elevada, sendo em alguns casos, maior que o próprio valor da concentração da espécie. Aqui, determinando diretamente o Hg^{2+} , a variação associada a esta espécie é diminuída em relação ao primeiro caso, mesmo em amostras onde a concentração de Hg^{2+} esteja próxima ao limite de quantificação (LQ). Além disso, pode-se empregar apenas uma curva de calibração para estas duas espécies. Todavia, para amostras que apresentam uma concentração muito pequena de Hg ($< 0,005 \mu\text{g g}^{-1}$), provavelmente a concentração de Hg^{2+} será próxima ao LQ do procedimento. Este caso pode-se fazer mais de um ciclo de aprisionamento, melhorando o LQ na amostra.
- iii) MeHg e Hg^{2+} : frente às duas maneiras expostas anteriormente, esta pode ser considerada a ideal para determinar a concentração individual de cada espécie, visto que cada uma delas é realmente determinada, e não calculada por diferença. Mesmo sendo necessário fazer a calibração para cada espécie e, também, manipular soluções de MeHg, ambas as espécies podem ser determinadas a partir de um único frasco para extração ácida. Isto porque, após a extração inicial com H_2SO_4 , ao se fazer a extração com CHCl_3 , o Hg^{2+} permanece na solução polar, enquanto que o MeHg é transferido para fase apolar. Esta é a melhor forma de se verificar se houve transformação entre as espécies visto que, se diminuir a concentração de uma das espécies,

provavelmente, irá aumentar a outra espécie na exata proporção e, certamente, a soma da concentração das espécies deverá ser igual ao valor encontrado quando não houver degradação durante a extração.

4.3.4. Avaliação da relação massa de amostra/volume da solução extratora

Inicialmente, foi avaliado até que massa de amostra pode ser utilizada na extração total do Hg, mantendo-se fixo o volume dos reagentes, sem que a eficiência de extração diminua, o que poderia comprometer o resultado final. Os testes foram feitos conforme descrito no item *Avaliação da relação massa de amostra/volume da solução extratora* (3.5.4), cujos resultados encontrados estão mostrados na Figura 12.

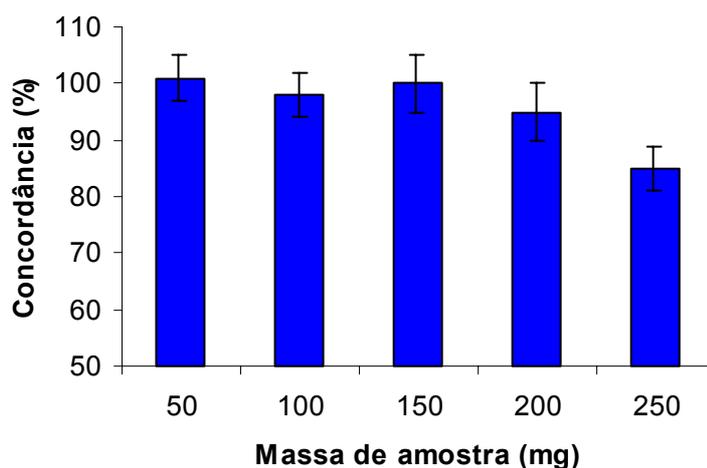


Figura 12. Concordância entre os valores de Hg total na amostra de peixe “anjo” e o valor de referência, em função da massa de amostra utilizada, mediante Extração 2.

Conforme observado na Figura 12, é possível utilizar até 150 mg de amostra, para extração com 5 mL de H_2SO_4 , sem diminuição da eficiência. Para massas maiores que 150 mg, a eficiência da extração fica comprometida, obtendo-se concordância com o valor de referência inferior a 95%. Embora 150 mg de amostra possam ser considerados como sendo uma massa pequena, é importante ressaltar que se trata da amostra liofilizada, enquanto que, na maioria dos trabalhos, onde são empregados entre 0,5 e 1 g de amostra, tais massas

referem-se à amostra úmida. Para fins de comparação, foi avaliado o teor de água nas amostras de peixe estudadas, verificando-se que cerca de 70% (m/m) do tecido muscular de peixe é constituído de água. Com isso, a massa de amostra liofilizada de 150 mg corresponde, aproximadamente, a 500 mg de amostra úmida, que é a massa normalmente utilizada por diversos autores^{55,56,61} para a extração de espécies de Hg em peixe.

4.3.5. Interferência de uma espécie de Hg na determinação da outra espécie

Conforme descrito no item *Interferência de uma das espécies de Hg na determinação da outra* (3.5.5), foram feitas adições de massas crescentes de uma das espécies de Hg, a cerca de 50 mg da amostra de peixe “anjo”, para determinação da outra espécie. Desta forma, pôde-se verificar até que concentração uma das espécies pode estar presente sem que ocorram erros na determinação da outra espécie, nas condições otimizadas anteriormente. Os resultados estão demonstrados na Figura 13.

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

⁶¹ Storelli, M. M. *et al.*, *Food Chem.* 89 (2005) 295-300

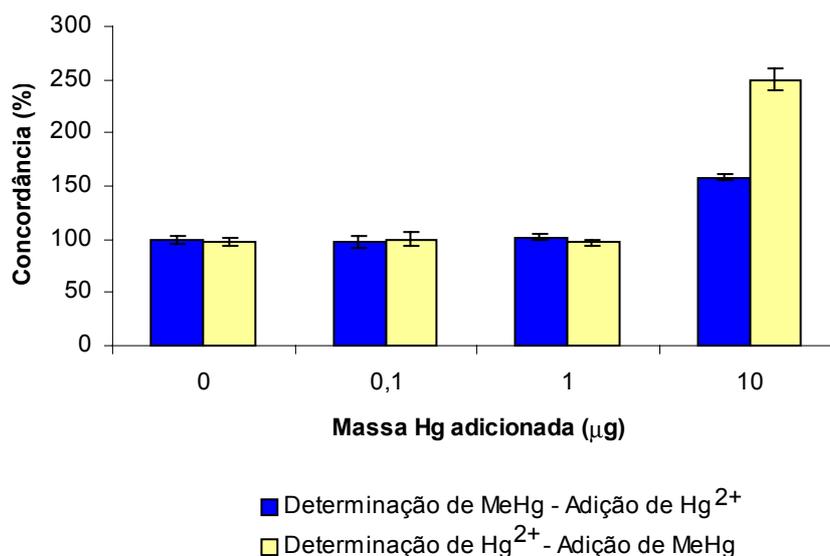


Figura 13. Influência da adição de uma das espécies de Hg na determinação da outra espécie. Em vermelho está representada a concordância entre o valor encontrado e o valor esperado para o Hg^{2+} e em azul está representada a concordância entre o valor encontrado e o valor esperado para o MeHg, ambas para a amostra de peixe “anjo”, empregando a Extração 2 e as condições otimizadas.

Como a concentração de MeHg na amostra de peixe “anjo” é de $1,66 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$, para uma massa de 50 mg tem-se, aproximadamente, 83 ng de MeHg no frasco. Portanto, a concordância apresentada para a determinação de MeHg, representada em azul na Figura 13, é referente à massa esperada, de 83 ng de MeHg. Pode-se afirmar que é possível a presença de até $1 \mu\text{g}$ de Hg^{2+} no frasco de extração sem que ocorram erros na determinação do MeHg. Com isso, é possível determinar corretamente MeHg em amostras onde a concentração de Hg^{2+} seja até 12 vezes maior sem que ocorram erros perceptíveis. Dentre as prováveis razões para obter um valor superior a 100% para a recuperação do MeHg, pode-se ser a separação das fases durante a etapa de centrifugação. Se esta não for bem feita, qualquer gotícula ou bolha da fase ácida, presente na interface, pode ter causado tais erros. Ainda, o CHCl_3 pode conter até 0,5% de água. Tal percentual, relativo a massa de $10 \mu\text{g}$ de Hg^{2+} contido na fase aquosa, representa 50 ng, que por sua vez corresponde a 60% em relação aos 83 ng esperados. Como se obteve cerca de 160% de concordância, os 60% a mais em relação ao valor esperado podem ser explicados desta forma.

Já para o Hg^{2+} , como a concentração dele na amostra de peixe “anjo” é de $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ tem-se, para 50 mg de amostra, 3,5 ng de Hg^{2+} no frasco de extração. Desta forma, a concordância para determinação de Hg^{2+} é referente à massa de 3,5 ng de Hg^{2+} . Foi verificado que pode-se determinar Hg^{2+} na presença de até 1 μg de MeHg no frasco de extração, ou seja, em amostras onde a concentração de MeHg é cerca de 300 vezes maior que a concentração de Hg^{2+} , com boa concordância com o valor esperado. As razões para as interferências observadas para massa de MeHg maiores que 10 μg podem ser atribuídas às interconversões entre as espécies. Contudo, é mais provável que tenha ocorrido uma diminuição na eficiência de extração com CHCl_3 , visto que os quatro ciclos de extração com 2,5 mL de CHCl_3 foram otimizados para uma massa de 3,5 ng de Hg^{2+} e, nos testes, foram utilizadas massas 3000 vezes maiores. Outra explicação pode ser devido a contaminação do sal empregado para preparar a solução de MeHg. Se o sal apresentar Hg^{2+} como impureza, o que é bastante provável já que o Hg^{2+} é um dos produtos da degradação do MeHg, o problema encontrado não seria por causa da ineficiência da extração com CHCl_3 , mas sim, devido à adição direta de Hg^{2+} proveniente da solução de MeHg. Esta dúvida pode ser solucionada empregando a determinação por ICP-MS e diluição isotópica, como feito por Qvarnström e Frech.⁵¹

4.4. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Após todas otimizações feitas, o procedimento foi validado através da análise dos CRM's descritos no item *Materiais diversos* (3.3). Foi feita a determinação da concentração total de Hg, empregando a Extração 2, bem como a determinação individual de cada espécie, empregando tanto a calibração convencional quanto a adição de analito. Nos casos em que cada espécie foi determinada individualmente, a concentração total de Hg foi calculada a partir da soma das concentrações de cada uma das espécies. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

⁵¹ Qvarnström, J., Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491

Tabela 12. Concentrações de MeHg, Hg²⁺ e Hg total obtidos para os materiais de referência certificados “DORM-2” e “DORM-1” (n = 3).

	MeHg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Hg ²⁺ ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)
DORM-2			
Valor certificado	4,47 ± 0,26	0,17 ± 0,40 *	4,64 ± 0,32
Extração total 2 (3.5.1.2)	---	---	4,55 ± 0,20
Adição de analito (3.5.3)	4,21 ± 0,10	0,32 ± 0,03	4,53 ± 0,10
Calibração convencional 2 (3.5.3)	4,17 ± 0,11	0,31 ± 0,03	4,48 ± 0,11
DORM-1			
Valor certificado	0,73 ± 0,06	0,07 ± 0,09 *	0,80 ± 0,07
Extração total 2 (3.5.1.2)	---	---	0,78 ± 0,04
Adição de analito (3.5.3)	0,71 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,81 ± 0,05
Calibração convencional 2 (3.5.3)	0,73 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,83 ± 0,05

* Não certificado. Valor calculado, neste trabalho, pela diferença entre a concentração de Hg total e de MeHg

Observando a Tabela 12 é possível verificar que os valores obtidos para a concentração total de Hg, pelas diferentes formas de calibração, não apresentaram diferença significativa (teste “t”, P = 0,05) dos valores certificados para Hg total. O mesmo foi feito para a concentração de MeHg, sendo que também não foi verificada diferença significativa entre os valores certificados e os obtidos experimentalmente, tanto por calibração convencional quanto por adição de analito.

Não foi possível validar a metodologia para concentração de Hg²⁺ porque estes CRM’s não são certificados para Hg²⁺. Mesmo assim, apenas para efeito de comparação, os valores para concentração de Hg²⁺ apresentados na Tabela 12 foram calculados como sendo a diferença entre os valores de concentração de Hg total e de MeHg, o que tem sido feito por alguns autores^{8,55,56} Como relatado, toda vez que a concentração de Hg²⁺ é calculada por diferença entre a concentração total de Hg e a concentração de MeHg, para amostras onde o MeHg é o constituinte majoritário, obtém-se uma incerteza elevada para Hg²⁺ (vide Tabela 12). Tomando-se estes valores para análise estatística (teste “t”, P = 0,05), para o CRM DORM-1 não foi verificada diferença significativa entre os valores, tanto para calibração convencional quanto para adição de analito. Já para

⁸ Cava-Montesinos, P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

o CRM DORM-2, observou-se diferença significativa entre os valores calculados e aqueles obtidos experimentalmente. No entanto, como estes valores não são certificados, não é possível chegar a uma conclusão segura.

Com base nas análises estatísticas feitas, o procedimento para análise de especiação de Hg em amostras de tecido muscular de peixe com determinação por CVG-GF AAS foi validado, com calibração convencional ou adição de analito.

4.5. PARÂMETROS OTIMIZADOS E FIGURAS DE MÉRITO

Os principais parâmetros estão apresentados na Tabela 13 e as figuras de mérito do procedimento estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 13. Parâmetros otimizados do procedimento desenvolvido (n = 3).

Parâmetro	Valor
Ciclos de extração (volume de CHCl_3 = 2,5 mL)	4
Ciclos de extração (volume de L-cisteína 1%, m/v = 5 mL)	2
Massa de amostra (liofilizada)	< 150 mg
Concentração de NaBH_4	1% (m/v)
Volume do extrato da amostra	3 mL
Temperatura de aprisionamento	60 °C
Temperatura de atomização	700 °C
Tempo de integração	8 s

Tabela 14. Figuras de mérito do procedimento desenvolvido empregando-se os parâmetros otimizados (n = 3).

Parâmetro	Valor
Faixa linear para calibração convencional	0,7 a 10 ng
RSD	< 4%
Massa característica	100 pg
LD absoluto	0,23 ng
LD amostra (total = Hg^{2+} ; MeHg)	1,5 ng g^{-1} ; 3,0 ng g^{-1}
Tempo total de aquecimento (GF AAS)	77 s

Os parâmetros apresentados na Tabela 14 foram obtidos empregando-se apenas 1 ciclo de aprisionamento. O valor obtido para o LD na amostra é semelhante ou melhor, na maioria dos casos, aos valores encontrados para Hg total quando foram empregados sistemas com aprisionamento: 1 ng g⁻¹ (CVG-GF AAS),⁶⁴ 0,8 ng g⁻¹ (CVG-ETV-ICP-MS),⁵³ 55 ng g⁻¹ (CVG-GF AAS),⁴⁵ 70 ng g⁻¹ (CVG-GF AAS),⁴⁴ 3 ng g⁻¹ (CV-GF AAS),²⁹ 10 ng g⁻¹ (CVG-ETV-MIP OES).³⁸ Quando é feita a comparação com os valores para o LD obtidos por FI-CV AAS, pode-se verificar que os valores obtidos por CVG-GF AAS são melhores: 3 ng g⁻¹,⁵⁵ 7 ng g⁻¹,⁸ 7,5 ng g⁻¹,⁵⁴ 30 ng g⁻¹,⁶³ 1,2 ng g⁻¹ (Hg²⁺) e 6,6 ng g⁻¹ (MeHg)⁵⁶. Já o LD obtido por CV AAS em batelada é cerca de 10 vezes pior quando comparados aos obtidos por CVG-GF AAS: 25 ng g⁻¹,⁶⁴ 30 ng g⁻¹,³⁴ 20 ng g⁻¹⁶² e 25 ng g⁻¹.⁵² Cabe ressaltar que o LD na amostra diminui com número de ciclos de aprisionamento, sendo que com 3 ciclos de aprisionamento o LD pode ser reduzido para cerca de 0,7 ng g⁻¹.

⁶⁴ Torres, D. P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

⁵³ Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253

⁴⁵ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895

⁴⁴ Moreda-Piñeiro, J. et al., *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122

²⁹ Kumar, S. J., Meeravali, N. N., *At. Spectrosc.* 18 (1997) 166-168

³⁸ Matusiewicz, H., Koprass, M., *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425

⁵⁵ Río-Segade, S., Bendicho, C., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268

⁸ Cava-Montesinos, P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390

⁵⁴ Río-Segade, S., Bendicho, C., *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252

⁶³ Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *Analyst* 123 (1998) 1215-1218

⁵⁶ Río-Segade, S., Tyson, J. F., *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807

⁶⁴ Torres, D. P. et al., *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294

³⁴ Limaverde Filho, A. M., Campos, R. C., *Quím. Nova* 22 (1999) 477-482

⁶² Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931

⁵² Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251

5. CONCLUSÃO

O procedimento desenvolvido neste trabalho para a extração seletiva de espécies de Hg em tecido de peixe, empregando extração com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NaCl}$, seguido de extração com CHCl_3 e com L-cisteína, para posterior determinação de Hg por CVG-GF AAS, demonstrou-se eficiente, atingindo-se o objetivo proposto. De modo geral, o procedimento é simples, em relação aos métodos de separação normalmente empregados. Outra característica importante é que a extração ácida utilizada é a mesma tanto para Hg total como para as espécies de Hg, a qual não proporciona a transformação das espécies de mercúrio durante o procedimento.

Como foi demonstrado ao longo do trabalho, é possível empregar uma curva de calibração convencional para determinar Hg total, MeHg e Hg^{2+} . Para MeHg, é necessário que a solução de calibração de MeHg passe pelo mesmo processo de extração que a amostra. Os valores encontrados através de calibração convencional foram comparados com aqueles obtidos por adição de analito, não sendo verificada diferença significativa entre ambas calibrações. Além disso, os resultados obtidos na análise de CRM's reforçam a afirmação anterior. Contudo, não foi possível validar o procedimento para o Hg^{2+} , por falta de um CRM com a concentração do mesmo certificada.

Fez-se a determinação individual das espécies, bem como a determinação de Hg total. Portanto, dependendo do objetivo da análise, pode-se determinar a espécie de interesse diretamente, e não por meio de cálculo por diferença entre o valor da concentração total e o valor da concentração de uma das espécies, o que geralmente implica em uma precisão pior. De outro modo, é possível fazer apenas uma curva de calibração e determinar Hg total e Hg^{2+} , ou ainda, quando a massa

de amostra disponível é pouca, empregar a mesma replicata da amostra para se fazer a análise de especiação. Portanto, cada tipo de calibração apresenta uma certa vantagem e, por isso, pode ser empregada de acordo com o objetivo do trabalho.

O LD obtido para Hg total em peixes é satisfatório para a faixa de concentração normalmente encontrada. Além disso, o LD para Hg^{2+} , que é encontrado em menor quantidade nos peixes, é baixo, conforme mostram os parâmetros de mérito. Os LDs obtidos para Hg^{2+} e MeHg são semelhantes ou melhor que aqueles obtidos através de técnicas de aprisionamento em tubo de grafite, e muito melhores que aqueles obtidos por CV AAS em batelada. Pode-se melhorar ainda mais o LD na amostra fazendo mais de um ciclo de aprisionamento, onde LDs na ordem de sub-ng g^{-1} podem ser alcançados.

Através dos testes de interferência de uma das espécies na determinação da outra, não foi verificada interferência para massas de Hg, no frasco de extração, de até 1 μg . Isto possibilita a determinação seletiva das espécies de Hg em amostras onde a proporção entre MeHg e Hg^{2+} esteja entre 300:1 ou 1:12.

6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Em vista da relativa abrangência dos assuntos abordados neste trabalho e, também, por sugestões da banca de avaliação, serão apresentadas algumas sugestões para continuidade e complementação deste trabalho. Algumas das sugestões recebidas foram feitas para finalização do trabalho porém, outras, devido a complexidade ou tempo elevado para realização das mesmas, não foram feitas e estão descritas abaixo como proposta para outros trabalhos.

- Avaliação da eficiência de geração, através da determinação do Hg contido no resíduo do frasco de geração após a adição do redutor;
- Utilizar o tecido de peixe na forma de homogenato, o que evita as etapas de liofilização e cominuição e, com isso, torna o procedimento mais rápido e acessível;
- Fazer a determinação do MeHg diretamente em meio apolar, para evitar a etapa de extração com L-cisteína;
- Verificar a aplicabilidade do procedimento desenvolvido para outras amostras, como sedimentos, onde a relação entre Hg^{2+} que MeHg é mais elevada;
- Verificar se o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ atua como catalisador na redução do MeHg ou se ele oxida o MeHg à Hg^{2+} que, por sua vez, é reduzido à Hg^0 ;
- Avaliar a eficiência de aprisionamento para o MeHg, empregando uma concentração do redutor na qual o MeHg seja reduzido ao seu respectivo hidreto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azevedo, F. A., *Toxicologia do mercúrio*, RiMa Editora, São Carlos, Brasil, 2003.
2. Baxter, D. C., Frech, W., "Determination of mercury by atomic absorption spectrometry using a platinum-lined graphite furnace for in situ preconcentration", *Anal. Chim. Acta* 225 (1989) 175-183.
3. Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., "Use of flow injection cold vapour and preconcentration on coated graphite tube for the determination of mercury in polluted seawaters by electrothermal atomic absorption spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 317-321.
4. Bloom, N. S., Colman, J. A., Barber, L., "Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples", *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 371-377.
5. Bruhn, C. G., Rodríguez, A. A., Barrios, C., Jaramillo, V. H., "Determination of total mercury in scalp hair of humans by gold amalgamation cold vapour atomic absorption spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 535-541.
6. Campos, R. C., Silveira, C. L. P., Lima, R., "Detection limits for mercury determination by CV AAS and CV-ICP AES using gold trap preconcentration", *At. Spectrosc.* 18 (1997) 55-59.

7. 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.
8. Cava-Montesinos, P., Domínguez-Vidal, A., Cervera, M. L., Pastor, A., De La Guardia, M., "On-line speciation of mercury in fish by cold vapour atomic fluorescence through ultrasound-assisted extraction", *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1386-1390.
9. Cizdziel, J. V., Gerstenberger, S., "Determination of total mercury in human hair and animal fur by combustion atomic absorption spectrometry", *Talanta* 64 (2004) 918-921.
10. Clevenger, W. L., Smith, B. W., Winefordner, J. D., "Trace determination of mercury: a review", *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 1-26.
11. Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K., *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2003.
12. Costley, C. T., Mosop, K. F., Dean, J. D., Garden, L. M., Marshall, J., Carroll, J., "Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold preconcentration", *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 179-183.
13. Craig, P. J., *Organometallic Compounds in the Environment*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., Guildford, UK, 2003.
14. De-Qiang, Z., Zhe-Ming, N., Han-Wen, S., "Stabilization of organic and inorganic mercury in the graphite furnace with $(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_6$ - $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}_6$ as a mixed chemical modifier", *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1049-1055.
15. Docekal, B., Dedina, J., Krivan, V., "Radiotracer investigation of hydride trapping efficiency within a graphite furnace", *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 787-794.

16. Drasch, G., Vonmeyer, L., Kauert, G., "Application of the furnace atomic-absorption method for the detection of arsenic in biological samples by means of the hydride technique", *Fresenius Z. Anal. Chem.* 304 (1980) 141-142.
17. Ebdon, L., Pitts, L., Cornelis, R., Crews, H., Quevauviller, P., *Trace element speciation – for environment, food and health*, John Willey & Sons, England, 2003.
18. 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.
19. 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.
20. Hall, G. E. M., Pelchat, P., "Evaluation of a direct solid sampling atomic absorption spectrometer for the trace determination of mercury in geological samples", *Analyst* 122 (1997) 921-924.
21. Harrington, C. F., "Speciation of mercury at ng/mL concentration levels by capillary electrophoresis with amperometric detection", *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 63-74.
22. Harrington, C. F., "The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography", *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167-179.
23. Hinds, M. W., "Determination of mercury in gold bullion by flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 1063-1068.
24. Hintelmann, H., Evans, R. D., "Applications of stable isotopes in environmental tracer studies – Measurement of monomethylmercury by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation", *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 378-385.

25. Huang, J. H., "Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate", *Anal. Chim. Acta* 532 (2005) 113-120.
26. International Union Of Pure And Applied Chemistry, site <http://www.iupac.org/goldbook/ST06848.pdf>, acessado em 10/03/05.
27. Kaercher, L. E., "Sistema para a determinação seletiva de espécies de mercúrio em amostras biológicas", Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2003.
28. Krata, A., Bulska, E., "Critical evaluation of analytical performance of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury determination", *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 345-350.
29. Kumar, S. J., Meeravali, N. N., "In situ trapping of mercury vapors on Au, Pd-Au alloy or Pt-Rh alloy in the graphite furnace for the determination of Hg in environmental samples after microwave digestion", *At. Spectrosc.* 18 (1997) 166-168.
30. Lanças, F. M., *Extração em Fase Sólida*, RiMa Editora, 2004, São Carlos, Brasil, 2004.
31. Lee, D. S., "Determination of bismuth in environmental samples by flameless atomic absorption spectrometry with hydride generation", *Anal. Chem.* 54 (1982) 1682-1686.
32. Lee, S. H., Jung, K. H., Lee, D. S., "Determination of mercury in environmental samples by cold vapour generation and atomic-absorption spectrometry with a gold-coated graphite furnace", *Talanta* 36 (1989) 999-1003.
33. Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., Horvat, M., "Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation", *Trends Anal. Chem.* (2005) In Press.
34. Limaverde Filho, A. M., Campos, R. C., "Redução seletiva aplicada à especiação de mercúrio em peixes: uma adaptação do método de Magos", *Quím. Nova* 22 (1999) 477-482.

35. Magalhães, C. E. C., Krug, F. J., Fostier, A. H., Berndt, H., "Direct determination of mercury in sediments by atomic absorption spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1231-1234.
36. Magos, L., "Selective atomic-absorption determination of inorganic mercury and methylmercury in undigested biological samples", *Analyst* 96 (1971) 847-853.
37. Matousek, J. P., Javetz, R., Powell, K. P., Louie, H., "Mechanistic studies on the trapping and desorption of volatile hydrides and mercury for their determination by electrothermal vaporization-inductively-coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 147-155.
38. Matusiewicz, H., Koprás, M., "Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se) and Hg in biological and environmental reference materials by electrothermal vaporization-microwave induced plasma-optical emission spectrometry with their *in situ* trapping in a graphite furnace", *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1415-1425.
39. Matusiewicz, H., "Chemical vapor generation with slurry sampling: a review of atomic absorption applications", *Appl. Spectrosc. Rev.* 38 (2003) 263-294.
40. Matusiewicz, H., Mikolajczak, M., "Determination of As, Sb, Se and Hg in beer and wort by direct hydride generation sample introduction-electrothermal AAS", *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 652-657.
41. Matusiewicz, H., Sturgeon, R. E., "Atomic spectrometric detection of hydride forming elements following *in situ* trapping within a graphite furnace", *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 377-397.
42. Mester, Z., Sturgeon, R., Pawliszyn, J., "Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation", *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 233-260.
43. Michalke, B., "Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples", *Ecotox. Environ. Safe.* 56 (2003) 122-139.
44. Moreda-Piñeiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D., "Direct mercury determination in

- aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation-electrothermal atomic absorption spectrometry”, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 111-122.
45. Moreda-Piñeiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D., “Direct As, Bi, Hg and Se(IV) cold vapor/hydride generation from coal fly ash slurry samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry”, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 883-895.
 46. Oda, C. E., Ingle Jr, J. D., “Speciation of mercury by cold vapor atomic absorption spectrometry with selective reduction”, *Anal. Chem.* 53 (1981) 2305-2309.
 47. Pohl, P., “Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate”, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 21-27).
 48. Puk, R., Weber, J. H., “Determination of mercury (II), monomethylmercury cation, dimethylmercury and diethylmercury by hydride generation, cryogenic trapping and atomic absorption spectrometric detection”, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 175-183.
 49. Quevauviller, P. *et al.*, *Trace Element Speciation – for Environment, Food and Health*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001.
 50. Quevauviller, P., Morabito, R., “Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices”, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 86-96.
 51. Qvarnström, J., Frech, W., “Mercury species transformation during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS”, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491.
 52. Rezende, M. C. R., Campos, R. C., Curtius, A. J., “Speciation of mercury in fish samples by solvent extraction, methyl-mercury reduction directly in the organic medium and cold vapour atomic absorption spectrometry”, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 247-251.

53. Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Curtius, A. J., "Determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in environmental reference materials as acid slurries by on-line hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 243-253.
54. Río-Segade, S., Bendicho, C., "Selective reduction method for separated determination of inorganic and total mercury in mussel by flow-injection cold vapour technique", *Ecotox. Environ. Safe.* 42 (1999) 245-252.
55. Río-Segade, S., Bendicho, C., "Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapour technique", *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268.
56. Río-Segade, S., Tyson, J. F., "Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent", *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 797-807.
57. Sánchez-Uría, J. E., Sanz-Medel, A., "Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples", *Talanta* 47 (1998) 509-524.
58. Silva, A. F., Welz, B., Curtius, A. J., "Noble metals as permanent chemical modifiers for the determination of mercury in environmental reference materials using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry and calibration against aqueous standards", *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2031-2045.
59. Sinemus, H. W., Stabel, H. H., Radziuk, B., Kleiner, J., "Automated determination of mercury by continuous flow vapour generation and collection in a graphite tube", *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 643-648.
60. Sinemus, H. W., Stabel, H. H., Radziuk, B., Kleiner, J., "Determination of mercury following sequestration on an iridium coated graphite surface", *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1719-1722.
61. Storelli, M. M., Storelli, A., Giacomini-Stuffler, R., Marcotrigiano, G. O., "Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake

- and striped mullet from the Mediterranean sea: estimated weekly intake”, *Food Chem.* 89 (2005) 295-300.
62. Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., “Determination of inorganic mercury in biological tissue by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization”, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1929-1931.
63. Tao, G., Willie, S. N., Sturgeon, R. E., “Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapor generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion”, *Analyst* 123 (1998) 1215-1218.
64. Torres, D. P., Vieira, M. A., Ribeiro, A. S., Curtius, A. J., “Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell”, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 289-294.
65. Vieira, M. A., Saint'pierre, T. D., Welz, B., Curtius, A. J., “Determination of As, Hg, Se e Sn in sediments slurries by CVG-ETV-ICP-MS with trapping in Ir treated graphite furnace and calibration against aqueous standards”, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 297-300.
66. Welz, B., Sperling, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, Ed. VCH, 3th ed., Weinheim, Germany, 1999.
67. Welz, B., Melcher, M., Sinemus, H. W., Maier, D., “Picotrace determination of mercury using the amalgamation technique”, *At. Spectrosc.* 5 (1984) 37-42.
68. Westöö, G., “Determination of methylmercury compounds in foodstuffs .I. Methylmercury compounds in fish identification and determination”, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137.
69. Wurl, O., Elsholz, O., Baasner, J., “Monitoring of total Hg in the river Elbe: FIA-device for on-line digestion”, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 191-195.

-
70. Yan, X. P. E Ni, Z. M., "Vapour generation atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta* 291 (1996) 89-105.
71. Yan, X. P., Ni, Z. M., Guo, Q. L., "In situ concentration of mercury vapour in a palladium-coated graphite tube: determination of mercury by atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta* 272 (1993) 105-114.