

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química**

Relatório de Estágio

Determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas tratadas com hidróxido de tetrametilamônio por espectrometria de absorção atômica com vapor frio usando diferentes temperaturas no tubo de quartzo

Daiane Placido Torres

Florianópolis, Agosto de 2006.

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Laboratório de Espectrometria Atômica**

Determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas tratadas com hidróxido de tetrametilamônio por espectrometria de absorção atômica com vapor frio usando diferentes temperaturas no tubo de quartzo

Daiane Placido Torres

Orientador: Prof. Dr. Adilson José Curtius

Florianópolis, Agosto de 2006.

Dedicatória:

Dedico este trabalho à minha mãe Jucélia e ao meu pai Atair que sempre acreditaram na minha capacidade como estudante e também como profissional na área de Química.

Agradecimentos

Ao Professor Adilson, meu orientador, e a Professora Vera por acreditarem em meu potencial e pela confiança em mim depositada.

Ao casal Mariana e Anderson pelos valiosos ensinamentos sobre absorção atômica e geração química de vapor, amizade e suporte nos momentos de maior dificuldade.

Ao meu pai Atair, minha mãe Jucélia e aos meus irmãos Luciano e Juliana pelo apoio constante nas horas difíceis do caminho que escolhi percorrer.

Aos meus colegas de laboratório Alessandra, Anderson, Charles, Daniel, Eduardo, Fábio, Jairo, Jesse, Luciano, Mariana, Mirela e Tatiana pelos momentos de ensinamento e também de descontração, e em especial à Ingrid e Tatiane pela amizade sincera.

Ao meu namorado, Reginaldo, por me dar força e incentivo, e também por acreditar muito em minha capacidade.

Aos meus colegas de curso e a todos que de alguma maneira contribuíram com meus trabalhos de iniciação científica.

E a Deus, por me dar força para enfrentar e tirar boas lições de cada dia da minha vida.

Sumário

Lista de Tabelas.....	II
Lista de Figuras.....	III
Lista de Abreviações.....	IV
Resumo.....	V
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	4
3. Materiais e Métodos.....	5
3.1 Instrumentação.....	5
3.2 Tratamento do tubo de grafite com modificador permanente.....	8
3.3 Reagentes e Materiais de Referência.....	8
3.4 Preparo de amostra.....	9
3.5 Procedimento Analítico.....	10
4. Resultados e Discussão.....	11
4.1 Otimização do sistema de geração de vapor.....	11
4.2 Efeito do Volume de TMAH.....	13
4.3 Especificação.....	14
4.4 Temperatura de Retenção.....	16
4.5 Condições de Chama.....	17
4.6 Figuras de Mérito.....	17
5. Resultados Analíticos.....	18
6. Conclusão.....	20
7. Referências.....	21

Lista de Tabelas

Tabela 1. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de mercúrio total por CV-GF AAS.....	8
Tabela 2. Figuras de mérito para determinação de Hg total, Hg ²⁺ em solução aquosa de CH ₃ Hg ⁺ e de Hg ²⁺ em TMAH 1% m/v por CV-GF AAS e por CV AAS, com ou sem o aquecimento do tubo de quartzo.....	15
Tabela 3. Resultados para a determinação de mercúrio total, inorgânico e metilmercúrio em materiais biológicos de referência certificada por CV AAS e CV-GF AAS. Valores obtidos (média ± desvio padrão) em µg g ⁻¹ e n = 3.....	19

Lista de Figuras

Figura 1. Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo.....	5
Figura 2. Representação esquemática do sistema CV AAS utilizado para determinação das espécies de Hg.....	6
Figura 3. Sistema CV-GF AAS utilizado para determinação de Hg total.....	7
Figura 4. Efeito da concentração de NaBH ₄ no sinal de absorvância para a suspensão de algumas amostras e em uma solução aquosa obtida por CV-GF AAS.....	11
Figura 5. Efeito da concentração de HCl no sinal de absorvância para algumas amostras e em uma solução aquosa obtida por CV-GF AAS.....	12
Figura 6. Efeito do volume de TMAH no sinal de absorvância para a suspensão de algumas amostras obtidas por CV-GF AAS.....	13
Figura 7. Curvas de calibração obtidas para Hg ²⁺ e metilmercúrio por CV AAS, sem e com o aquecimento do tubo de quartzo.....	16
Figura 8. Efeito da temperatura do tubo de grafite para retenção do vapor no sinal de absorvância para solução aquosa e padrões de Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺	16

Lista de Abreviações

ET AAS = Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)

CV AAS = Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry)

CV-GF AAS = Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio no Forno de Grafite (Cold Vapor Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

CVG-ICP-MS = Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado e Geração Química de Vapor

FI-CV AAS = Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio em Sistema em Fluxo (Flow Injection Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry)

GF AAS = Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

LOD = Limite de Detecção (Limit of Detection)

MetilHg = Metilmercúrio

TMAH = Hidróxido de tetrametilamônio (tetramethylammonium hydroxide)

Resumo

Neste trabalho se propõe um método simples, rápido e de baixo custo para determinação de mercúrio total e inorgânico em suspensão de amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio. Mercúrio orgânico (metilmercúrio) é obtido pela diferença entre a concentração de mercúrio total e inorgânico. Depois do tratamento da amostra à temperatura ambiente com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), mercúrio inorgânico é medido por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS), mantendo o tubo de quartzo à temperatura ambiente, enquanto mercúrio total é medido pela mesma técnica, aquecendo o tubo de quartzo em uma chama de acetileno. Pela análise de alguns materiais biológicos de referência certificados, ficou evidente que a diferença entre as concentrações mencionadas corresponde ao metilmercúrio. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com vapor frio (CV-GF AAS) com retenção do vapor em um tubo de grafite tratado com Au aquecido foi usada para otimizar as condições de geração de vapor e também para determinar mercúrio total. De modo geral, as concentrações obtidas por ambas as técnicas estão de acordo com os valores certificados ou com as diferenças dos valores certificados para mercúrio total, inorgânico e metilmercúrio conforme o teste-*t* para um limite de confiança de 95%. Os resultados para Hg total obtidos pelas duas técnicas também estão em concordância. Os desvios padrão relativos foram menores que 10% para a maioria dos resultados. Os limites de detecção para as amostras foram: 0,13 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Hg total e 0,025 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Hg inorgânico por CV AAS. O limite de detecção para Hg total por CV-GF AAS foi 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$. Simplicidade, baixo custo e alta eficiência sem o uso de técnicas cromatográficas são algumas das qualidades do método proposto, tornando-o adequado para a especificação de mercúrio em amostras biológicas.

1. Introdução

O mercúrio é um elemento extremamente tóxico responsável por causar danos aos seres humanos e comprometimento do ecossistema, sendo que sua toxicidade está diretamente relacionada à sua forma química. O metilmercúrio (metilHg) é a espécie mais tóxica e o interesse em seu estudo deve-se, principalmente, à capacidade de ser bioacumulado mediante a adsorção em corpos superficiais, bem como a ingestão de alimentos, principalmente peixes, frutos do mar e derivados. Segundo a literatura, os organismos aquáticos possuem elevada capacidade de absorver os compostos de mercúrio, quer sejam de origem orgânica ou inorgânica. Os peixes absorvem o mercúrio com facilidade e o acumulam em seus tecidos, principalmente na forma de metilHg, mesmo quando expostos à espécie Hg^{2+} , indicando a ocorrência de metilação destes. O metilHg afeta primeiramente o sistema nervoso central e em alguns casos, áreas específicas do cérebro são afetadas causando danos irreversíveis [1 – 4].

O interesse em se determinar mercúrio para estimar o seu real impacto no meio ambiente, principalmente, no sistema aquático, na vegetação e nos seres humanos, levou a um grande progresso no desenvolvimento de técnicas de análise para este elemento. A sua alta toxicidade, o seu baixo nível de concentração em algumas amostras e a sua natureza volátil e associação com outros compostos, fazem com que sejam necessárias técnicas bastante sensíveis e precisas para a determinação de suas espécies em diferentes matrizes. A geração química de vapor (CVG) é uma técnica analítica bastante sensível na qual os analitos são vaporizados na forma de átomos ou moléculas gasosos através de uma reação química à temperatura ambiente e posteriormente transportados para um atomizador ou cela de absorção aquecida ou não. A geração química de vapor pode ocorrer através da técnica de geração de hidreto (HG) para determinação de elementos como As, Bi, Sb, Se, e Te, técnica de vapor frio (CV), para determinação de Hg, etilação, para Pb e Hg, e geração de carbonil, para determinação de Ni. O método utilizado neste trabalho foi a técnica de vapor frio, na qual o mercúrio forma mercúrio metálico, uma espécie bastante volátil, ao reagir em meio ácido com o agente redutor tetrahidroborato de sódio, $NaBH_4$. A espectrometria

de absorção atômica com vapor frio (CV AAS) é um método analítico instrumental sensível e convencional, amplamente usado, pois:

- Garante uma eficiência de transporte de até 100% do frasco reacional ao atomizador
- O vapor formado é homogêneo, o que implica em:
 - Melhor precisão
 - Melhor seletividade
 - Melhores LDOs, também devido à pré-concentração *in situ* do analito
 - Permite estudos de especiação
 - Pode ser acoplada a diferentes técnicas

No entanto, apesar de melhoras significativas na instrumentação, a determinação de metilHg é muitas vezes prejudicada por problemas relativos a recuperações não-quantitativas e questões sobre a possibilidade de formação e transformações de metilHg durante as etapas de preparação da amostra e separação. A geração de vapor frio (CV) diretamente de alíquotas de amostras preparadas na forma de suspensão tem se apresentado como uma alternativa simples e eficaz, pois evita que se utilizem os tratamentos intensivos e tediosos para o preparo das amostras, sujeitos à perda do analito ou contaminação das mesmas. Especiação de compostos de mercúrio em amostras biológicas e ambientais requer procedimentos analíticos rigorosos em cada estágio de coleta, tratamento e medida. Em geral a especiação de Hg envolve as seguintes etapas: (a) coleta da amostra, pré-tratamento, preservação e estocagem; (b) extração do Hg da matriz, purificação e pré-concentração; (c) separação das espécies de Hg de interesse; e (d) detecção [2 - 6].

Assim, as técnicas de especiação, em muitos trabalhos, estão baseadas principalmente na cromatografia líquida ou gasosa para a separação do analito acoplada a diferentes técnicas para a sua detecção [7, 8]. Mas, em um trabalho muito inovador de Kaercher *et al.* [9], foi demonstrada a possibilidade de se determinar espécies de Hg em amostras de peixe, pelo uso de um sistema construído em seu laboratório usando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor e injeção em fluxo (FI-VG AAS). Esse método é baseado na geração do vapor das espécies de mercúrio e uma detecção seletiva do Hg^{2+} ou Hg total pela variação da temperatura da cela de quartzo, porque somente o Hg^{2+} é medido quando a cela de quartzo está à temperatura ambiente, e quando a cela de quartzo é aquecida pela chama a concentração de Hg total é medida. A concentração de Hg orgânico na amostra é

calculada da diferença entre as concentrações de Hg total e Hg^{2+} . Sabendo que a quantidade de metilHg nas amostras biológicas marinhas é muito superior a de qualquer outra espécie organomercurial, pode-se considerar a concentração de Hg orgânico igual à concentração de metilHg para essas amostras. Isso ocorre principalmente devido à alta solubilidade das espécies de Hg orgânico em lipídeos (lipossolubilidade) e a alta capacidade de metilação desses organismos.

Vários trabalhos têm sido realizados nos últimos anos [8, 10-17] com a proposta de unir os benefícios das técnicas CV AAS e/ou CVG-ICP-MS e a facilidade do preparo de amostras biológicas e ambientais na forma de suspensão, para a determinação de mercúrio. A amostragem em suspensão é um método particularmente atrativo, pois combina as vantagens da amostragem líquida e sólida. Desta forma, as amostras são facilmente preparadas, não requerendo um pré-tratamento químico agressivo, são menos susceptíveis a contaminação e perda do analito antes da análise, e geralmente padrões aquosos simples podem ser usados para a calibração. Ribeiro *et al.* [13] propôs um método para determinação de Hg em amostras de sedimentos, lodo de esgoto e carvão por CV AAS em linha usando amostragem em suspensão. Dos Santos *et al.*[18] avaliou cinco diferentes procedimentos de preparação de suspensão usando água régia, ácido nítrico e hidróxido de tetrametilamônio para determinação de Hg em amostras sólidas usando ICP OES com visão axial e geração de vapor frio, sendo a otimização dos parâmetros obtida por análise fatorial. Um especial interesse pode ser observado na utilização do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para a solubilização de diversos materiais biológicos, resultando na obtenção de procedimentos de preparo de amostra extremamente simples. O TMAH é fortemente alcalino, solúvel em meio aquoso e, por proporcionar um tratamento suave, é ideal para estudos de especiação, uma vez que as espécies de interesse são extraídas para a fase aquosa, sem a possibilidade de ocorrer a interconversão entre as espécies de mercúrio, como no caso quando ácidos são utilizados. A solução resultante da solubilização do material biológico apresenta um aspecto semelhante ao de uma suspensão [10]. Outros reagentes também são usados para solubilização seguida da determinação de Hg, tal como ácido fórmico [6, 12] e hidróxido de potássio em meio de metanol [17].

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e sem uso de técnicas cromatográficas, para a determinação de espécies de mercúrio (Hg total, Hg^{2+} e CH_3Hg^+ por método indireto) em amostras biológicas solubilizadas em meio de TMAH com posterior determinação por CV AAS usando um sistema em batelada. As concentrações obtidas para Hg total serão comparadas com as medidas após retenção do vapor frio em tubo de grafite tratado com Au.

3. Materiais e Métodos

3.1 Instrumentação

CV AAS. As medidas das espécies de mercúrio (Hg^{2+} e Hg orgânico) nas amostras biológicas foram realizadas em um sistema de geração química de vapor (MHS 15 – Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) operado em modo batelada e acoplado ao espectrômetro de absorção atômica (AAnalyst 100, PerkinElmer) equipado com uma lâmpada de cátodo oco de mercúrio e o corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério, sob as seguintes condições de operação: comprimento de onda: 253,7 nm; fenda espectral: 0,7 nm; corrente: 6 mA. Para a determinação do mercúrio total, um tubo de quartzo com comprimento de 165 mm e diâmetro de 12 mm, posicionado no caminho ótico, foi aquecido a, aproximadamente, 700 °C em uma chama de ar-acetileno, com vazões de 7,0 L min⁻¹ (ar) e 1,5 L min⁻¹ (acetileno). O mesmo sistema foi usado para se determinar Hg^{2+} , exceto que o tubo de quartzo não foi aquecido, permanecendo a temperatura ambiente. A Fig. 1 mostra o sistema MHS-15 com o atomizador de quartzo.

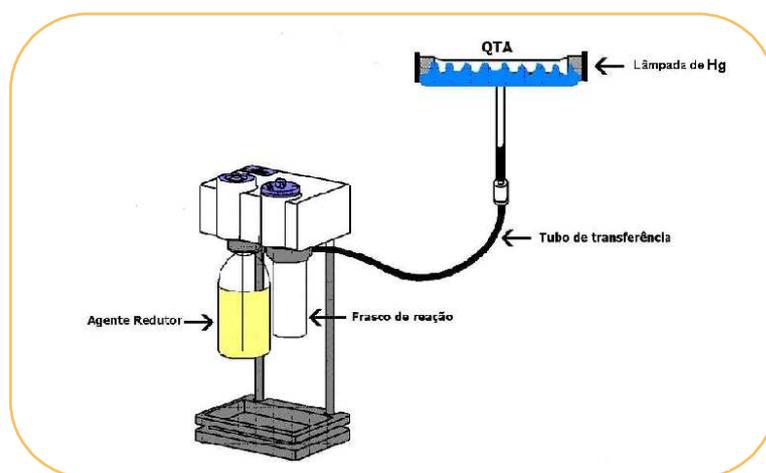


Figura 1. Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo.

A Fig. 2 mostra uma representação esquemática do sistema utilizado neste trabalho no qual, primeiramente, faz-se as medidas de Hg inorgânico, à temperatura ambiente, e

posteriormente, as medidas de Hg total, que é a soma de Hg inorgânico mais Hg na forma orgânica, com o tubo de quartzo aquecido na chama de ar/acetileno.

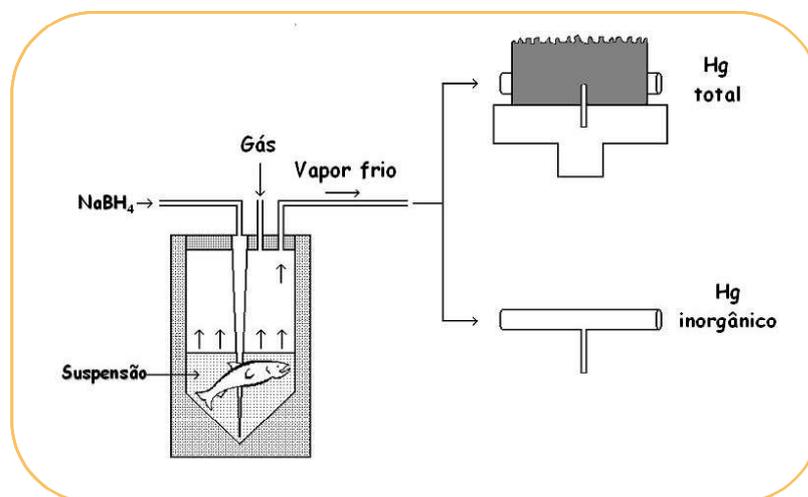


Figura 2. Representação esquemática do sistema CV AAS utilizado para determinação das espécies de Hg.

Uma solução de tetraidroborato de sódio a 3% m/v estabilizada com 1% m/v de hidróxido de sódio foi usada com agente redutor. O agente redutor foi injetado por 5 s, correspondendo a aproximadamente 1,5 mL de solução adicionada ao frasco de reação. O volume de amostra foi de 3 mL. Argônio com uma pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador para os vapores de mercúrio, a uma pressão de 250 kPa. Para esse sistema, área de pico foi usada para avaliação do sinal. Esse sistema é capaz de diferenciar mercúrio total e inorgânico somente pelo aquecimento ou não do tubo de quartzo, respectivamente. O mercúrio orgânico é calculado como a diferença.

CV-GF AAS. As medidas de Hg total nas amostras biológicas, a otimização do tratamento da amostra e as condições de reagentes para análise foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica AAS 5 EA (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com um sistema de correção de fundo com fonte contínua (lâmpada de arco de deutério) e um atomizador eletrotérmico com tubo de grafite aquecido transversalmente. Um sistema de geração química de vapor HS 5 (Analytik Jena) operado em modo de batelada, foi acoplado ao atomizador eletrotérmico via um amostrador automático para forno MPE 5 (Analytik Jena) usado na introdução do vapor de mercúrio no forno de grafite. O vapor de

mercúrio gerado no reator foi transportado ao tubo de grafite através de uma linha de transferência de politetrafluoretileno (PTFE) de 2,0 mm de diâmetro e 1,2 m de comprimento, conectada ao amostrador automático e a um capilar de titânio de 1,0 mm de diâmetro na outra extremidade. O capilar de titânio foi introduzido no orifício do tubo de grafite via amostrador automático. Argônio com uma pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador para o vapor de mercúrio e como gás de purga e de proteção para o atomizador de grafite. Tubos de grafite recobertos piroliticamente sem plataforma (Analytik Jena) foram usados. Altura de pico que é mais sensível do que a área, foi usada exclusivamente para a avaliação do sinal neste sistema, já que os efeitos cinéticos na geração do vapor frio são compensados pela retenção do vapor no tubo de grafite tratado. A lâmpada de cátodo oco de mercúrio (IST-Horseheads, NY) foi operada a 6 mA (comprimento de onda 253,7 nm; fenda espectral 0,5 nm). O sistema de geração de vapor foi operado usando-se as seguintes condições otimizadas: volume de amostra: 3 mL; tempo de bombeamento, 20 s; tempo de reação, 20s; tempo de limpeza, 10 s. A vazão de gás para as etapas de bombeamento, reação e limpeza foi 300 mL min^{-1} . Uma solução 3% m/v de tetrahidroborato de sódio estabilizada em hidróxido de sódio 1% m/v foi usada como agente redutor. A Fig. 3 mostra uma representação do sistema CV-GF AAS usado para determinação de Hg total na suspensão das amostras biológicas.

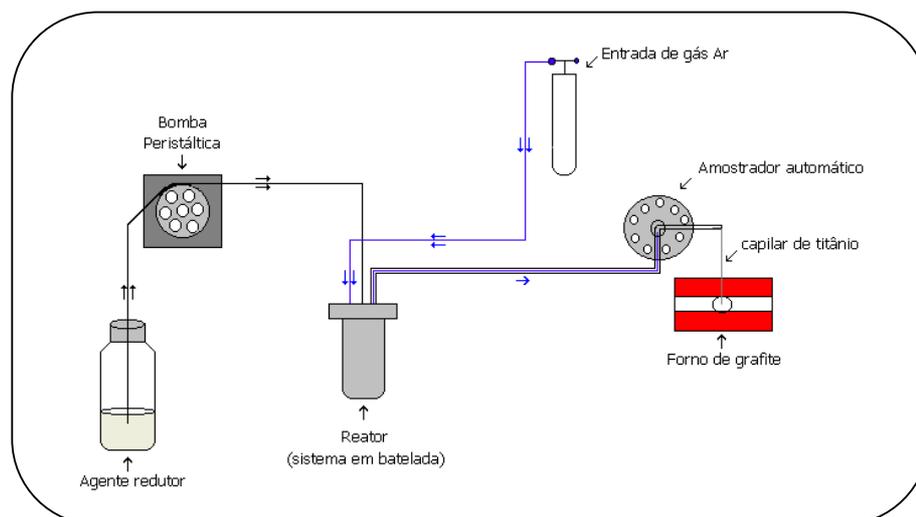


Figura 3. Sistema CV-GF AAS utilizado para determinação de Hg total.

O programa de temperatura do forno de grafite usado para retenção e atomização do mercúrio é mostrado na Tabela 1. O tubo de grafite foi previamente tratado com ouro, como descrito abaixo.

Tabela 1. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de mercúrio total por CV-GF AAS

Etapa	Parâmetros			
	Temperatura/ °C	Rampa/ °C s ⁻¹	Permanência/ s	Vazão de gás/ mL min ⁻¹
Pré-aquecimento ^a	100	25	10	100
Auto Zero	100	0	6	100
Atomização ^b	700	250	5	0
Limpeza	1000	250	5	250

^a Coleta do vapor de mercúrio neste estágio. ^b Registro da absorvância em altura de pico.

3.2 Tratamento do tubo de grafite com um modificador permanente

Tubos de grafite piroliticamente recobertos foram pré-tratados pela pipetagem de 40 µL de uma solução padrão de ouro 500 mg L⁻¹ no tubo e submetendo-o a um programa de temperatura já usado em um trabalho prévio [15], usando-se temperatura de pirólise de 160 °C, atomização de 900 °C e limpeza de 1000 °C. Esse procedimento foi repetido 25 vezes, resultando em uma massa total de 500 µg do modificador depositado na parede do tubo de grafite. Ouro foi escolhido como modificador permanente devido à alta afinidade que apresenta por mercúrio, proporcionando assim uma etapa de retenção muito efetiva.

3.3 Reagente e Materiais de Referência

Todos os reagentes usados foram, no mínimo, de grau analítico e as soluções foram preparadas usando-se água de alta pureza com uma resistividade de 18,2 MΩ cm, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA). O ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha, no. K27703017) foi duplamente destilado em um destilador de quartzo abaixo do ponto de ebulição (Kürner, Analysentechnik, Rosenheim,

Alemanha). Uma solução de TMAH em metanol da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA, lote 40K1265) foi usada para tratar as amostras. A solução de agente redutor foi preparada pela dissolução de NaBH₄ (Merck, no. K1483871) e NaOH sólidos (Merck, no. B665769) e estocada em um frasco de polietileno sob refrigeração. Soluções de referência de mercúrio inorgânico no intervalo entre 1,0 e 50,0 µg L⁻¹ foram preparadas diariamente pela diluição seqüencial de uma solução estoque de mercúrio inorgânico de 1000 mg L⁻¹ (Merck). A solução estoque de CH₃HgCl foi preparada pela dissolução do sal (Fluka 98%) em etanol (Carlo Erba, Milão, Itália) e estocada em um frasco de vidro escuro a 4 °C. Soluções de trabalho de CH₃HgCl para as curvas analíticas foram preparadas pela diluição apropriada da solução estoque com TMAH. O tubo de grafite foi tratado com uma solução estoque padrão de H[AuCl₄] da Fluka (Buchs, Suíça), contendo 500 mg L⁻¹ de Au. Anti-espumante Antifoam A (Sigma, Steinheim, Alemanha, no. 100K0177) foi usado para análise das amostras biológicas. Recipientes de plástico e vidro foram lavados com água de torneira e solução de Extran diluída (Merck). Posteriormente, eles foram imersos em uma solução de ácido nítrico 10% v/v por no mínimo 48 h, e rinsados exaustivamente com água deionizada antes do uso.

Os seguintes materiais de referencia certificados foram usados: BCR 278R (tecido de mexilhão), BCR 397 (cabelo humano) e BCR 186 (rim de porco liofilizado) da Community Bureau of Reference (Brussels, Bélgica), GBW 9101 (Cabelo humano) do Shanghai Institute of Nuclear Research of China, TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), DORM-1 (músculo de peixe) e DOLT-2 (fígado de peixe) do National Research Council of Canada (Ottawa, Ontário, Canadá).

3.4 Preparação da amostra

As amostras foram preparadas pela simples mistura de 50 a 500 mg da amostra biológica em pó com a solução original de TMAH 25% m/v. Um volume de 5 µL de TMAH foi adicionado para cada mg de amostra em ambos os sistemas experimentais, usando um mínimo de 1 mL quando as determinações foram realizadas por CV AAS. A suspensão da amostra foi deixada em repouso por no mínimo 2 h à temperatura ambiente e o volume foi completado para 25 mL com água deionizada. A concentração final de TMAH

foi 1% m/v. Nessas condições, o mercúrio ficou estável na suspensão da amostra. Alíquotas de amostras foram pesadas usando uma microbalança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha).

3.5 Procedimento Analítico

Primeiramente, o preparo de amostra e concentração dos reagentes foram otimizados por CV-GF AAS e então adotados para CV AAS. Já que, pelo uso deste procedimento mercúrio total é determinado, as condições selecionadas garantiram que mercúrio orgânico e inorgânico são eficientemente transformados em suas espécies no vapor, transportados ao atomizador, retidos no tubo de grafite tratado com ouro e determinados. Para ambos os sistemas (CV AAS e CV-GF AAS), uma alíquota de 3 mL de suspensão de amostra ou da solução padrão em meio de TMAH foi transferida ao frasco de reação juntamente com 2 mL de HCl 2,5 mol L⁻¹ e 50 a 200 µL do agente anti-espumante, dependendo da massa de amostra usada na preparação. No sistema CV-GF AAS, o agente redutor foi adicionado ao frasco de reação através de uma bomba peristáltica, enquanto que no sistema CV AAS, o agente redutor foi adicionado ao frasco de reação por 5 s e o vapor gerado foi transportado ao tubo de quartzo. A calibração foi realizada contra padrões aquosos em TMAH 1% m/v (a mesma concentração como na suspensão final da amostra) no intervalo de concentração de 1,0 a 50,0 µg L⁻¹ para CV AAS e de 1,0 a 30,0 µg L⁻¹ para CV-GF AAS.

4. Resultados e discussão

4.1 Otimização do sistema de geração de vapor

Como já foi mencionado, as otimizações foram realizadas usando CV-GF AAS. O efeito da concentração de agente redutor na geração do vapor frio de Hg das amostras biológicas tratadas com TMAH foi investigado, colocando-se um volume fixo de 2 mL de HCl 2,5 mol L⁻¹ no frasco de reação, juntamente com 3 mL da suspensão de amostra. Seguindo esse procedimento, a concentração de HCl ficou em torno de 1 mol L⁻¹, a qual é tipicamente usada em sistemas em batelada.

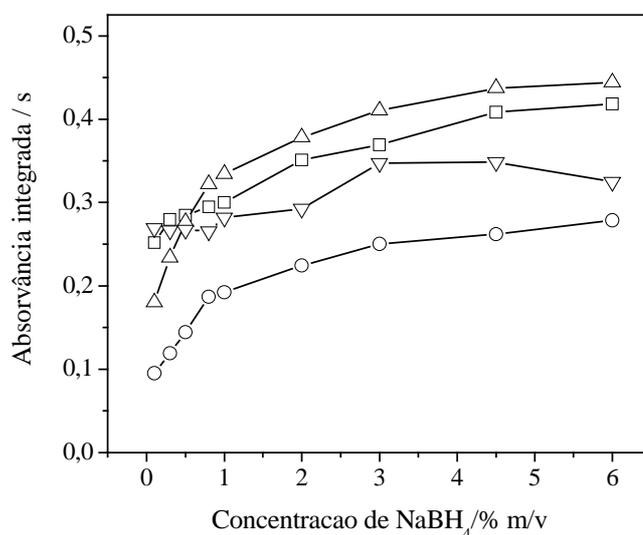


Figura 4. Efeito da concentração de NaBH₄ no sinal de absorvância para a suspensão de algumas amostras e em uma solução aquosa obtida por CV-GF AAS. (— Δ —) BCR 186 (9,9 μg L⁻¹), (—○—) GBW 9101 (10,8 μg L⁻¹), (—Δ—) DOLT-2 (10,8 μg L⁻¹) e (—▽—) solução aquosa em meio de TMAH (Hg²⁺ 10,0 μg L⁻¹).

Como mostrado na Fig. 4, a absorvância aumenta com a concentração de NaBH₄ para os três materiais certificados até a maior concentração estudada de 6% m/v, enquanto que para a solução padrão aquosa em meio de TMAH, contendo 10,0 μg L⁻¹ de Hg²⁺, o sinal é estável para concentrações de 3,0 e 4,5% m/v, decrescendo para concentração maior. O mais provável é que mais agente redutor é requerido para as amostras, em comparação com a solução padrão, porque nas amostras muitos outros elementos formadores de hidreto estão

competindo pelo redutor. Entretanto, a concentração de NaBH_4 foi selecionada como 3,0% m/v em NaOH 1% m/v a fim de reduzir a quantidade de água condensada na linha de transferência, a qual diminui a precisão. Como as amostras foram tratadas com TMAH, as espécies de Hg foram provavelmente extraídas para a fase aquosa. HCl foi diretamente adicionado à suspensão de amostra, imediatamente antes da determinação, para evitar coagulação. Um estudo para avaliar o efeito das diferentes concentrações de HCl é mostrado na Fig. 5 para três amostras e uma solução padrão.

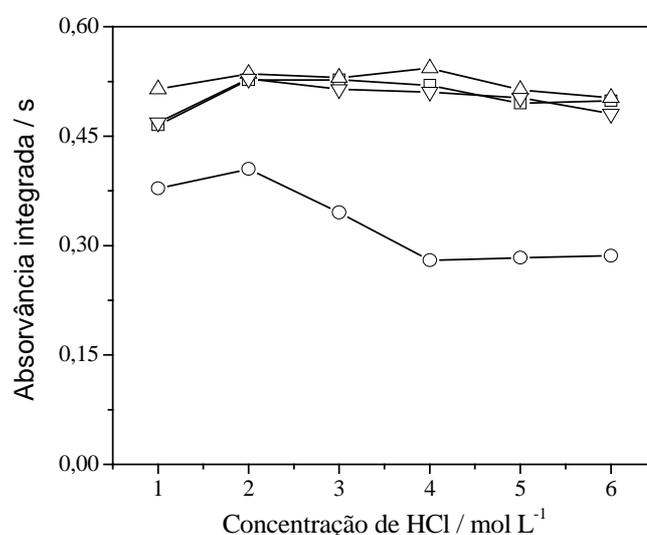


Figura 5. Efeito da concentração de HCl no sinal de absorvância para algumas amostras e em uma solução aquosa obtida por CV-GF AAS. Concentração de HCl no frasco reacional. (— △ —) BCR 186 (9,9 µg L⁻¹), (—○—) GBW 9101 (10,8 µg L⁻¹), (—△—) DOLT-2 (10,8 µg L⁻¹) e (—▽—) solução aquosa em meio de TMAH (10,0 µg L⁻¹).

Para as amostras, exceto para as de cabelo humano, os sinais aumentaram de 1 mol L⁻¹ para 2 mol L⁻¹; permaneceram estáveis de 2 mol L⁻¹ a 4 mol L⁻¹, diminuindo para concentrações maiores, provavelmente devido ao excesso de vapor produzido, o qual pode diluir o analito e/ou prejudicar sua retenção no tubo de grafite. Para a solução padrão de Hg, a absorvância aumenta com o aumento da concentração de HCl de 1 mol L⁻¹ para 2 mol L⁻¹ e então diminui até 4 mol L⁻¹, permanecendo estável para concentrações maiores. A concentração de HCl de 2,5 mol L⁻¹ foi selecionada para os experimentos. O volume de suspensão de amostra selecionado de 3 mL foi otimizado em um trabalho prévio, no qual o

mesmo sistema foi usado para se determinar a concentração de Hg total em amostras ambientais sólidas como suspensão em meio ácido [13]. Este mesmo volume de amostra, permitiu a análise dos materiais certificados estudados.

4.2 Efeito do volume de TMAH

O efeito do volume da solução original de TMAH 25% m/v na altura de pico é mostrado na Fig. 6.

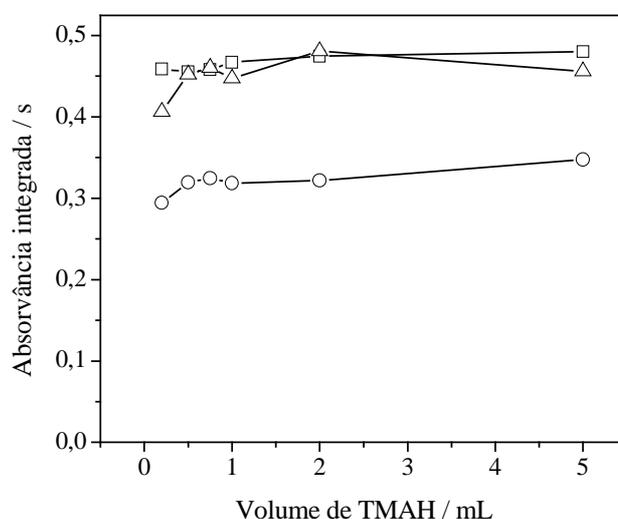


Figura 6. Efeito do volume de TMAH no sinal de absorvância para a suspensão de algumas amostras obtidas por CV-GF AAS. (— □ —) BCR 186 ($7,9 \mu\text{g L}^{-1}$), (—○—) GBW 9101 ($8,6 \mu\text{g L}^{-1}$) e (—△—) DOLT-2 ($8,6 \mu\text{g L}^{-1}$).

Como mostrado na Figura 6, o volume de TMAH não é crítico para volumes de amostra maiores que 0,5 mL, visto que o sinal permanece praticamente constante a partir deste volume até para 5 mL, o maior volume estudado. Como já mencionado, uma suspensão foi obtida. No entanto, muita espuma foi produzida quando volumes de TMAH maiores que 1 mL foram empregados ou quando a massa de amostra foi maior que 100 mg. Esse inconveniente pode ser evitado pelo uso de 5 μL de TMAH por mg de amostra, usando um mínimo de 1 mL do reagente para massas menores que 200 mg. O Hg permanece estável na amostra tratada com TMAH, mesmo depois de uma semana estocada à temperatura ambiente.

4.3 Especificação

Inicialmente, o fato de que os resultados obtidos por CV-GF AAS, com retenção do vapor frio na superfície do tubo de grafite tratado com Au, estavam de acordo com os valores certificados para Hg total, mas estavam sempre maiores que os obtidos por CV AAS, com o tubo de quartzo à temperatura ambiente, era intrigante. Ao mesmo tempo, percebia-se que a diferença estava muito próxima da concentração de metilmercúrio reportada por alguns dos certificados das amostras biológicas. Posteriormente, houve a oportunidade de assistir a uma apresentação oral do trabalho de Dressler *et al.* no 8th Rio Symposium on Atomic Absorption Spectrometry [20]. De acordo com eles, depois da extração do Hg da amostra com HCl 6,0 mol L⁻¹, Hg inorgânico foi determinado por FI-CV AAS, mantendo o tubo de quartzo à temperatura ambiente, enquanto Hg total pode ser determinado pelo simples aquecimento do tubo de quartzo por volta de 700 °C. Depois disso, ficou muito claro que era somente necessário aquecer o tubo de quartzo para romper a ligação entre o mercúrio e o radical orgânico para ter os resultados obtidos para a concentração de Hg total nas amostras concordantes com os valores certificados. Segundo Tseng *et al.* [21], hidrogênio, ou intermediários, de acordo com propostas mais recentes [22 – 24], produzidos na reação de HCl com NaBH₄ reduz Hg²⁺ da amostra para Hg⁰ e também reage, por exemplo, com CH₃Hg⁺ da amostra para formar CH₃HgH, o qual é volátil. As espécies voláteis Hg⁰ e CH₃HgH são então transportadas ao tubo de quartzo pelo gás argônio. Neste trabalho, as amostras foram tratadas com TMAH, ao invés de serem submetidas à extração com HCl.

Como apresentado na Tabela 2, a inclinação das curvas de calibração obtidas por CV AAS usando CH₃Hg⁺ ou Hg²⁺ em TMAH demonstram que ambas as espécies são detectadas com, aproximadamente, a mesma sensibilidade, quando o tubo de quartzo é aquecido. Entretanto, como é também mostrado nessa tabela, sem o aquecimento, somente a espécie inorgânica é detectada, significando que o mercúrio orgânico não é atomizado à temperatura ambiente. Usando CV-GF AAS, as sensibilidades para CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ são similares, como mostrado na Tabela 2, confirmando que mercúrio total é detectado por esta técnica. As mesmas espécies de Hg devem ser formadas durante a geração de vapor em ambos os sistemas (CV-GF AAS e CV AAS), visto que o mesmo preparo de amostra e

concentração dos reagentes foi usado. Entretanto, átomos de Hg de diferentes espécies são produzidos durante o aquecimento do tubo de grafite e mercúrio total é obtido.

Tabela 2. Figuras de mérito para determinação de Hg total, Hg^{2+} em solução aquosa de CH_3Hg^+ e de Hg^{2+} em TMAH 1% m/v por CV-GF AAS e por CV AAS, com ou sem o aquecimento do tubo de quartzo

Sistema	Inclinação/ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ⁻¹ s	R	LOD/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Calibração/ $\mu\text{g L}^{-1}$
CV-GF AAS				
Hg^{2+} aquoso	0,03159 ^a	0,9992	0,001	1,0 – 30,0
CH_3Hg^+ aquoso	0,03235 ^a	1	0,001	1,0 – 10,0
CV AAS^b				
Hg^{2+} aquoso	0,00963	0,9992	0,13	1,0 – 50,0
CH_3Hg^+ aquoso	0,00815	0,9989	0,15	1,0 – 50,0
CV AAS^c				
Hg^{2+} aquoso	0,03253	0,9990	0,025	1,0 – 50,0
CH_3Hg^+ aquoso	0,00034	0,9502	–	1,0 – 50,0

^a A unidade para esta inclinação é ($\mu\text{g L}^{-1}$)⁻¹, já que altura de pico foi usada no sistema CV-GF AAS. ^b Aquecendo o tubo de quartzo na chama de ar-acetileno. ^c Tubo de quartzo à temperatura ambiente.

As curvas de calibração correspondentes às figuras de mérito da Tabela 2 são apresentadas na Fig. 7. O LOD, em $\mu\text{g g}^{-1}$, foi obtido da seguinte forma:

$$LOD(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{3 \times s}{\alpha} \times \frac{0,025L}{0,1g}$$

Onde, s é o desvio padrão de 10 leituras do branco; α é a inclinação da curva de calibração; 0,025 L é o volume final (amostras e padrões) e 0,1 g é a massa utilizada para a maioria das amostras.

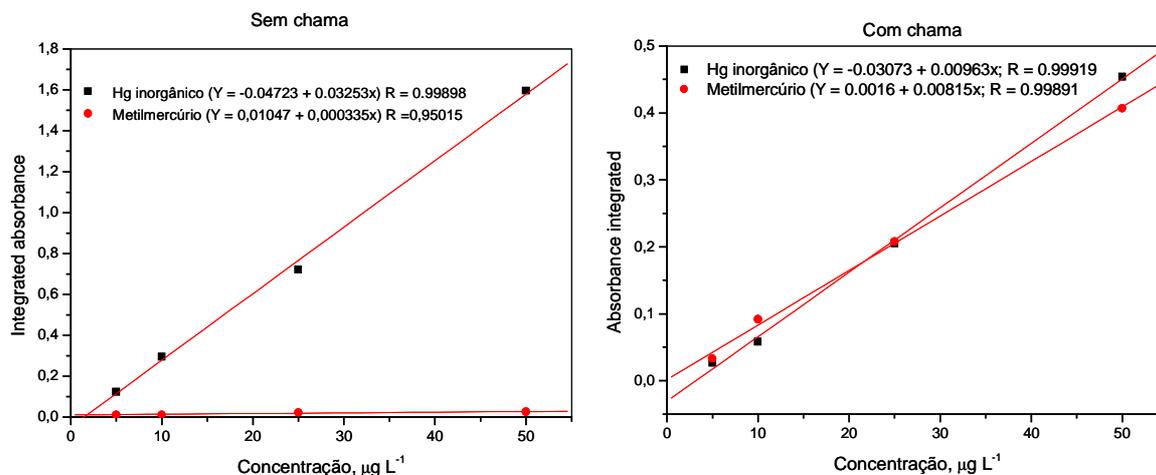


Figura 7. Curvas de calibração obtidas para Hg^{2+} e metilmercúrio por CV AAS, sem e com o aquecimento do tubo de quartzo.

4.4 Temperatura de Retenção

Na Fig. 8, o efeito da temperatura do tubo de grafite no sinal de absorvância é mostrado para soluções aquosas contendo CH_3Hg^+ e Hg^{2+} ou uma mistura dos dois em TMAH 1% m/v. É interessante observar que todas as curvas mostram um comportamento similar, especialmente para temperaturas do tubo ≥ 100 °C.

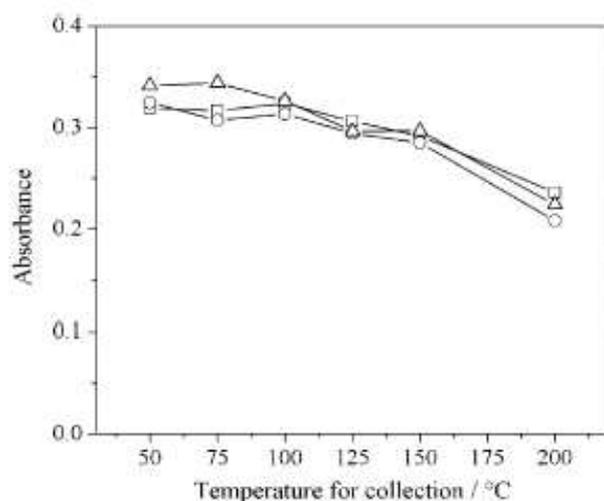


Figura 8. Efeito da temperatura do tubo de grafite para retenção do vapor no sinal de absorvância para solução aquosa contendo (— □ —) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , (—○—) $5 \mu\text{g/L}$ de CH_3Hg^+ mais $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e (—△—) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg^{2+} , todos em TMAH 1% m/v.

A temperatura do tubo de grafite de 100 °C foi adotada para a retenção do vapor.

4.5 Condições da Chama

No sistema CV AAS, duas condições diferentes de chama foram estudadas para checar os possíveis efeitos da temperatura de atomização no tubo de quartzo. Usando a vazão mínima de ar e acetileno (4 L min⁻¹ de ar e 0,5 L min⁻¹ de acetileno) ou a maior vazão (7 L min⁻¹ de ar e 1,5 L min⁻¹ de acetileno), não foram obtidas diferenças para soluções contendo CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ em TMAH, demonstrando que metilmercúrio é atomizado mesmo usando uma chama escassa. A maior vazão de 7 L min⁻¹ de ar e 1,5 L min⁻¹ de acetileno foi adotado. De acordo com Dressler *et al.* [9, 20], a temperatura no tubo para essas condições deve estar em torno de 700 °C.

4.6 Figuras de Mérito

As figuras analíticas de mérito para ambas as técnicas foram obtidas pelo uso de soluções aquosa de CH₃Hg⁺ e de Hg²⁺ em TMAH 1% m/v. Como mostrado na Tabela 2, um menor limite de detecção (LOD) foi obtido para a determinação de Hg total por CV-GF AAS. Sensibilidade, precisão e linearidade da curva de calibração ($R > 0,999$) foram melhores para essa técnica. O limite de detecção foi definido como 3 vezes o desvio padrão de dez leituras do branco, dividido pela inclinação da curva. A sensibilidade obtida por CV AAS foi mais que 4 vezes superior quando o tubo de quartzo foi mantido à temperatura ambiente em comparação com a situação na qual o tubo foi aquecido na chama de ar-acetileno. O tempo de residência do analito no tubo aquecido deve ser muito menor, devido à difusão e à expansão do gás no tubo. O LOD na amostra por CV AAS sem o aquecimento do tubo foi cerca de 25 vezes maior e aquecendo o tubo foi mais que 100 vezes maior que o obtido por CV-GF AAS. Em geral, os LODs obtidos foram perfeitamente adequados para as amostras biológicas analisadas e, tendo em vista que o tratamento da amostra com TMAH é muito flexível, pode-se usar diferentes massas de amostra, de acordo com o nível de concentração na mesma.

5. Resultados Analíticos

Os resultados obtidos para Hg total, Hg^{2+} e CH_3Hg^+ são mostrados na Tabela 3. Pela comparação das concentrações de Hg total obtidas usando ambas as técnicas, CV AAS com tubo de quartzo aquecido e CV-GF AAS, elas estão concordantes entre si e também com os valores certificados, de acordo com o teste-*t* para um nível de confiança de 95%. A calibração foi realizada usando uma solução aquosa de Hg^{2+} em TMAH para todas as amostra para ambos os sistemas instrumentais. As concentrações obtidas para CV AAS com o tubo de quartzo à temperatura ambiente concordam com a diferença entre os valores certificados das concentrações de mercúrio total e metilmercúrio. A concentração de metilmercúrio é reportada para 4 amostras certificadas das 7 analisadas. Essa é a evidência que o valor obtido por CV AAS sem o aquecimento do tubo de quartzo é realmente a concentração de Hg^{2+} . A concentração de Hg orgânico calculada como a diferença entre os valores obtidos por CV AAS, com e sem o aquecimento do tubo de quartzo, respectivamente, também concorda com a concentração de metilmercúrio certificada, de acordo com o teste-*t* para um nível de confiança de 95%. Essa é uma confirmação que a maior parte do mercúrio orgânico obtido pela diferença mencionada é realmente metilmercúrio, indicando que as concentrações das outras espécies orgânicas, que são detectadas pelo método proposto, não são significativas. No caso das outras espécies de mercúrio orgânico não produzirem espécies poliatômicas voláteis, ou não serem atomizadas no tubo de quartzo aquecido, elas não seriam detectadas. O desvio padrão relativo para todas as concentrações obtidas foram menores que 10% para a maioria das amostras, exceto para valores de concentração próximos ao LOD.

Tabela 3. Resultados para a determinação de mercúrio total, inorgânico e metilmercúrio em materiais biológicos de referência certificada por CV AAS e CV-GF AAS. Valores obtidos (média \pm desvio padrão) em $\mu\text{g g}^{-1}$ e $n = 3$.

Amostra	Certificado			Determinado			
	Hg Total	MetilHg ⁺	Hg ²⁺ ^a	CV AAS			CV- GF AAS
				Hg total	MetilHg ⁺ ^b	Hg ²⁺	Total Hg
DOLT-2	2.14 \pm 0.28	0.693 \pm 0.053	1.495 \pm 0.284	2.21 \pm 0.02	0.766 \pm 0.040	1.491 \pm 0.032	2.25 \pm 0.06
DORM-1	0.798 \pm 0.074	0.731 \pm 0.060	0.118 \pm 0.093	0.628 \pm 0.022	0.495 \pm 0.027	0.163 \pm 0.012	0.673 \pm 0.016
TORT-2	0.27 \pm 0.06	0.152 \pm 0.013	0.129 \pm 0.061	0.25 \pm 0.05	0.124 \pm 0.058	0.134 \pm 0.022	0.14 \pm 0.02
BCR 186	1.97 \pm 0.04	nc ^d	nc ^d	2.05 \pm 0.27	0.618 \pm 0.32	1.47 \pm 0.14	2.00 \pm 0.02
BCR 278R	0.196 \pm 0.009	nc ^d	nc ^d	0.179 \pm 0.008	0.091 \pm 0.034	0.094 \pm 0.031	0.191 \pm 0.020
BCR 397	12.3 \pm 0.5	0.87 ^c	11.49 \pm 0.5	12.5 \pm 0.4	0.64 \pm 0.48	11.9 \pm 0.2	12.8 \pm 0.6
GBW 9101	2.16 \pm 0.21	nc ^d	nc ^d	1.80 \pm 0.01	1.28 \pm 0.04	0.60 \pm 0.04	2.02 \pm 0.04

^a Calculado como sendo a diferença do Hg total menos o Hg como CH₃Hg⁺;

^b Calculado a partir da diferença entre o Hg total menos o mercúrio inorgânico;

^c valor informado;

^d nc: não certificado.

6. Conclusão

Um método extremamente simples para determinação de Hg^{2+} e Hg total em materiais biológicos tratados com TMAH por CV AAS é proposto. Os limites de detecção obtidos são adequados para as amostras analisadas, já que a massa de amostra pode ser facilmente variada na preparação da suspensão. Além disso, o procedimento proposto não usa técnicas cromatográficas, requerendo somente um instrumento de AAS com chama e um simples dispositivo para geração do vapor frio. No preparo da amostra, são empregadas pequenas quantidades de reagentes e não é necessário aquecimento, diminuindo os riscos de contaminação ou perdas. A interpretação do processo envolvido é que, junto com Hg elementar, CH_3HgH volátil também é formado. Mantendo o tubo de quartzo a temperatura ambiente, esta espécie não é atomizada, e somente Hg^{2+} é detectado, enquanto pelo aquecimento do tubo na chama de ar-acetileno, as espécies poliatômicas originadas das espécies de Hg orgânico na amostra são atomizadas e Hg total é detectado. Aparentemente, o tratamento com TMAH não destrói as espécies de Hg na amostra e não produz interconversão das espécies.

7. Referências

1. Azevedo, F. A., *Toxicologia do mercúrio*, Primeira edição, RiMa, São Carlos, SP, Brasil, **2003** (Capítulo 1), p. 9.
2. Bisinoti, C. M.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 593.
3. Micaroni, R. C. C. M.; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 487.
4. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M.; *Trends in Anal. Chem.* **2005**, *24*, 383.
5. Qvarnström, J.; Frech, W.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, *17*, 1486-1491.
6. Kan, M.; Willie, S. N.; Scriver, C.; Sturgeon, R. E.; *Talanta*, **2006**, *68*, 1259-1263.
7. Chen, S. S.; Chou, S. S.; Hwang, D. F.; *J. of Chromatogr. A*, **2004**, *1024*, 209-215.
8. Jimenez, M. S.; Sturgeon, R. E.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, *12*, 597-601.
9. Kaercher, L. E.; Goldschmidt, F.; Paniz, J. N. G.; Flores, E. M. M.; Dressler, V. L.; *Spectrochimica Acta Part B*, **2005**, *60*, 705-710.
10. Torres, D. P.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, *20*, 289-294.
11. Tao, G.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E.; *Analyst*, **1998**, *123*, 1215-1218.
12. Scriver, C.; Kan, M.; Willie, S. N.; Soo, C.; Birnboim, H.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *381*, 1460-1466.
13. Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Curtius, A. J.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, *15*, 825-831.
14. Tao, G.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, *14*, 1929-1931.
15. Flores, E. M. M.; Welz, B.; Curtius, A. J.; *Spectrochim. Acta Part B*, **2001**, *56B*, 1605-1614.
16. Willie, S. N.; Grégoire, D. C.; Sturgeon, R. E.; *Analyst*, **1997**, *122*, 751-754.
17. Cal-Prieto, M.J.; Felipe-Sotelo, M.; Carlosena A.; Andrade, J.M.; López-Mahía, P.; Muniategui, S.; Prada D.; *Talanta*, **2002**, *56*, 1-51.
18. Dos Santos, E. J.; Herrmann, A. B.; Vieira M. A.; Frescura, Vera L. A.; Curtius, A. J.; *Spectrochim. Acta Part B*, **2005**, *60*, 659-665.
19. Canário, J.; Antunes, P.; Lavrado, J.; Vale, C.; *Trends in Anal. Chem.*, **2004**, *23*, 799-806.

20. Kaercher, L. E.; Goldschmidt, F.; Flores, E. M. M.; Dressler, V. L.; *Determination of mercury species using vapor generation atomic absorption spectrometry. In the Book of Abstract of 8th Rio Symposium on Atomic Spectrometry—Brazil, 2004*, OP
21. Tseng, C. M.; Diego, A. de; Martin, F. M.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X.; *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, *12*, 743-750.
22. D'Ulivo, A.; Onor, M.; Pitzalis, E.; *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 6342-6352.
23. Pohl, P.; *Trends in Anal. Chem.*, **2004**, *23*(1), 21-27.
24. D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; *Spectrochim. Acta Part B*, **2005**, *60*, 423-438.