



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Determinação de mercúrio em materiais de referência
certificados de amostras biológicas por espectrometria de
fluorescência atômica com geração de vapor frio após
tratamento com hidróxido de tetrametilamônio**

Rodolpho Merlo de Andrade

Florianópolis
Novembro/2010

Rodolpho Merlo de Andrade

**Determinação de mercúrio em materiais de referência certificados
de amostras biológicas por espectrometria de fluorescência
atômica com geração de vapor frio após tratamento com hidróxido
de tetrametilamônio**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**Orientador (a): Dra. Vera Frescura Bascuñan
Co-orientador: Luciano Tormen**

Florianópolis
Novembro/2010

Rodolpho Merlo de Andrade

**Determinação de mercúrio em materiais de referência certificados
de amostras biológicas por espectrometria de fluorescência
atômica com geração de vapor frio após tratamento com hidróxido
de tetrametilamônio**

Prof (a). Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof (a). Dra. Vera Frescura Bascuñan
Orientadora

Prof (a). Dra. Haidi D. Lentz Fiedler

Prof. Dr. Fábio Grandis Lepri

Florianópolis
Novembro/2010

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	VII
RESUMO.....	VIII
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 História do Mercúrio.....	1
1.2 Ocorrência.....	3
1.3 Justificativa do trabalho.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Técnicas para Determinação de Hg.....	8
2.2 Espectrometria de Fluorescência Atômica.....	10
2.3 Geração Química de Vapor.....	14
2.4 Preparação de Amostras para a Determinação de Hg.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 Instrumentação.....	19
4.2 Reagentes.....	20
4.3 Procedimentos.....	21
4.4 Digestão das Amostras.....	21
4.5 Otimização do Agente Redutor, Ácidos, Permanganato de Potássio e Anti-Espumante.....	21
4.6 Quantificação de Mercúrio Total nas Amostras Digeridas.....	22
4.7 Quantificação de Mercúrio Inorgânico e Total nas Amostras tratadas com TMAH.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Otimização das condições para a geração de vapor.....	23
5.2 Determinação de mercúrio total nas amostras digeridas em forno microondas.....	28

5.3	Determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas tratadas com TMAH.....	29
6	CONCLUSÕES.....	34
7	REFERÊNCIAS.....	35

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por ter me concebido uma ótima família e iluminado meu caminho

A minha família,

Por sempre ter me apoiado e ensinado a trilhar a difícil estrada da vida

A UFSC,

Por ter me oferecido uma profissão que amo e um futuro promissor

OFEREÇO

Aos amigos que me auxiliaram na tarefa de realizar este trabalho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Preciso agradecer, com muito gosto ao professor Adilson José Curtius, professora Vera Frescura Bascuñan e professor Daniel Lázaro Gallindo Borges ao Laboratório de Espectrometria Atômica, que me acolheu e ofereceu esta oportunidade de enobrecimento de meus conhecimentos.

Com muito carinho, gostaria de referir-me ao colega de trabalho e co-orientador, doutorando Luciano Tormen, que além de bom amigo dedicou-me um bom tempo de ensinamentos, sermões e conselhos.

Por final, mas não menos importante, refere-me a todos os amigos que durante todo o tempo de graduação auxiliaram-me a superar este importante estágio de minha vida, em principal aos vários amigos que conquistei no Laboratório de Espectrometria Atômica, pelos inúmeros momentos de risos e amizades que levarei para sempre no decorrer da vida.

A todos, meu sincero OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo do Mercúrio.....	4
FIGURA 2	Tipos de Fluorescência.....	11
FIGURA 3	Esquema ilustrativo de um espectrômetro de a)absorção atômica, b)fluorescência atômica.....	12
FIGURA 4	Esquema de operação do sistema de CV AFS.....	19
FIGURA 5	Efeito da concentração de HCl na geração de vapor frio.....	24
FIGURA 6	Efeito da concentração de SnCl ₂ na geração de vapor frio.....	25
FIGURA 7	Efeito da concentração de KMnO ₄ sobre os reagentes.....	26
FIGURA 8	Efeito da concentração de HNO ₃ sobre os reagentes.....	27
FIGURA 9	Efeito da concentração de anti-espumante sobre os reagentes.....	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Evolução do consumo de mercúrio no Brasil entre 1979 e 1989.....	6
TABELA 2	Produção anual de ouro e emissão de mercúrio no período de 1985 a 1988.....	6
TABELA 3	Condições de operação do sistema CV AFS.....	20
TABELA 4	Resultados analíticos para a determinação de Hg total em amostras digeridas.....	29
TABELA 5	Figuras de mérito obtidas na determinação de mercúrio total em amostras biológicas digeridas.....	29
TABELA 6	Figuras de mérito obtidas na determinação de mercúrio usando diferentes estratégias de calibração.....	30
TABELA 7	Concentrações de Hg total e inorgânico em amostras biológicas tratadas com TMAH.....	32
TABELA 8	Concentrações de Hg total pela curva de calibração com adição do analito.....	33
TABELA 9	Concentrações de Hg orgânico em amostras biológicas tratadas com TMAH.....	34

LISTA DE ABREVIações

TMAH	Hidróxido de Tetrametilamônio.
CV AFS	Espectrometria de fluorescência atômica acoplada com geração de vapor frio.
LOQ	Limite de Quantificação
CVG	Geração química de vapor frio.
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama.
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.
GC-ICP- MS	Cromatografia gasosas acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica.
OES	Espectrometria de emissão ótica.
ICP	Plasma indutivamente acoplado.
CRM	Materiais de referência certificado

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um método rápido, simples e preciso para a quantificação e fracionamento de mercúrio em materiais de referência certificados tratados com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) por geração de vapor a frio acoplada com espectrometria de fluorescência atômica (CV AFS). As investigações realizadas neste estudo mostraram que as condições ótimas de compromisso para a determinação de Hg total em amostras biológicas são 6% (v/v) de HCl, 4% (m/v) de SnCl₂, 0,05% (m/v) de KMnO₄. Tanto para as amostras digeridas quanto para as amostras tratadas com TMAH deve-se adicionar 0,4% v/v de anti-espumante e 1% v/v de HNO₃. Já para a determinação de mercúrio inorgânico em amostras biológicas tratadas com TMAH utilizam-se as mesmas condições utilizadas para o mercúrio total, entretanto não é adicionado o permanganato de potássio. A determinação de mercúrio total nas amostras digeridas foi realizada com sucesso, no qual os valores encontrados estão de acordo com os valores de referência considerando um limite de confiança de 95% (pelo teste t simples) e os parâmetros de mérito da análise foram satisfatórios com limite de quantificação (LOQ) de 7 µg kg⁻¹. Não foi possível a determinação de Hg total nas amostras tratadas com TMAH, dificuldades associadas à geração de vapor atômico do mercúrio orgânico, mesmo quando utilizado KMnO₄ como agente oxidante. Entretanto, foi possível a determinação de mercúrio inorgânico (LOQ de 13 µg kg⁻¹), que descontado da concentração de mercúrio total (análise das amostras digeridas) obteve-se a concentração de mercúrio orgânico, que estiveram de acordo com os valores de referência.

Palavras-chave: *Espectrometria de fluorescência atômica, mercúrio, TMAH, amostras biológicas.*

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 História do Mercúrio

Na mitologia romana, *Mercúrio* representa o mensageiro dos deuses, sendo patrono dos interpretes, das línguas, protetor dos comerciantes, das viagens e dos sonhos. Apesar de algumas das boas qualidades de seu representante, o mercúrio no organismo é tóxico.¹

O fascínio que este metal exerce no homem se perde no tempo e ultrapassa gerações. Desde os tempos mais remotos; o cinábrio, devido a sua coloração vermelha intensa, foi utilizado pelo homem em pinturas rupestres. Era amplamente utilizado desde decoração de vilas romanas até cosméticos. Há indícios do uso do cinábrio como pigmentos em tumbas egípcias datadas de épocas anteriores a 1500 a.C.¹

O primeiro uso, não decorativo do mercúrio foi elaborado por Vitruvius, famoso arquiteto romano, na amalgamação. Ele descobriu que o mercúrio forma facilmente amálgamas, soluções ou ligas com um ou mais metais e descreveu esse método para a recuperação do ouro utilizado em vestimentas nobres (método que futuramente seria utilizado no garimpo e em obturações de cáries dentárias). Posteriormente o mercúrio foi empregado na medicina até meados da idade média. Muitos imperadores, por acreditarem que o mercúrio possuía propriedades medicinais que prolongavam a vida, sucumbiram ao tentarem assegurar a imortalidade pela ingestão constante desse metal. Seu uso medicinal se deve a suas propriedades antibactericidas, tendo por isso seus compostos utilizados para diversas doenças de pele. A partir do século XVI na Europa, Paracelsus, médico, alquimista, físico e astrólogo suíço, tornou famoso seu uso para o tratamento da sífilis.²

Durante a idade média, seu lugar na alquimia era garantido, pois acreditava-se que poderia transmutar o ouro através do chumbo, caso empregassem o mercúrio. De pigmento a elixir prolongador de vida, suas propriedades físico-químicas só começaram a ser descobertas em meados do

século XVIII, até então devido a sua natureza líquida não era considerado um metal.

Paracelsus no século XVI escrevera um livro relatando doenças ocupacionais entre elas incluía a intoxicação de garimpeiros por mercúrio (doença que mais tarde viria a ser chamada de mercurilismo ou hidrargirismo). Anos depois Jean Fernel descrevera os sintomas decorrentes da intoxicação por mercúrio, na época sais de mercúrio eram bastante utilizados como antibactericidas, anti-sépticos e até diuréticos (no caso do calomelano, dicloreto de mercúrio (II), HgCl_2). Entre os casos mais famosos de hidrargirismo podemos citar a intoxicação ocasionada pela exposição ao mercúrio de fabricantes de chapéus de feltros, na Inglaterra, desenvolvendo tremores e distúrbios psiquiátricos, mais tarde dando origem ao termo “loucura dos chapeleiros” (caso que inspirou Lewis Carrol a criação de seu personagem *chapeleiro maluco* em “Alice nos Países das Maravilhas”)³, destaca-se também, o da baía de Minamata, ocorrido no Japão nas décadas de 1950 e 1960. Nele, resíduos contendo mercúrio, de uma planta química foram despejados diretamente na baía. Após convertido a sua forma orgânica, o mercúrio foi absorvido por peixes que compunham a dieta dos habitantes locais. Até 1970 pelo menos 107 mortes foram atribuídas à intoxicação por mercúrio e 800 casos da conhecida doença de Minamata foram registrados. Mesmo aparentemente saudáveis vários habitantes vieram a ter filhos com má formação do sistema nervoso e conseqüentes problemas de desenvolvimento cognitivo. Esse acontecimento veio a ser tornar mundialmente famoso chamando a atenção para os riscos que envolviam a utilização do mercúrio e tornando o século XX um marco para a história de toxicologia deste metal.⁴

A partir de então, o mercúrio e seus compostos passaram a ser substituídos e eliminados de vários processos industriais. Devido a sua toxicidade, abundância, persistência no meio ambiente, volatilidade, capacidade de bioacumulação e biomagnificância, o mercúrio está incluído em programas de vigilância com respaldo da Organização Mundial de Saúde.⁵

1.2 Ocorrência:

O mercúrio se encontra distribuído em baixas concentrações por toda a crosta terrestre nas mais variadas formas, conseqüentemente possuindo as mais variadas propriedades.⁶ Raramente é encontrado como elemento livre na natureza, normalmente compõe diversas rochas como o carvão mineral.⁷ Sua principal fonte é a do minério cinábrio (HgS), encontrado em rochas vulcânicas recentes, em veios ou fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais. O mercúrio, pode existir em três formas de oxidação, mercúrio metálico (Hg⁰) e nas duas formas oxidadas, íon mercurioso (Hg(I) ou Hg₂²⁺) e íon mercúrico (Hg(II) ou Hg²⁺) sendo classificado em mercúrio elementar, inorgânico e orgânico. Através da especiação o mercúrio elementar dá origem a outras duas espécies citadas.⁸

Sua toxicidade está relacionada a forma química no qual o elemento se apresenta^{4,9} e no tempo da exposição ao metal, podendo ser classificada como aguda (a curto prazo) ou crônica (a longo prazo). Na intoxicação aguda, os sintomas tendem a aparecer após uma ou mais semanas da exposição, dependendo da concentração do metal. Já na crônica ocorre geralmente em pessoas que trabalham diariamente (exposição ocupacional) ou fazem uso de medicamentos contendo seus sais. Devido a sua afinidade por grupos sulfidrilas, presente em proteínas e enzimas, o mercúrio manifesta sua toxicidade em órgãos do sistema nervoso, respiratório, renal, digestivo, cardíaco entre outros.¹⁰ Compostos orgânicos de mercúrio, que possuem grupos alquilas ligados ao Hg, por apresentarem uma alta afinidade lipofílica podem ser solúveis em tecido animal sendo considerados as formas mais devastadoras ao organismo. Entre estas formas, ganha destaque o metilmercúrio por ser extremamente tóxico, bioacumulativo e devido à maior parte do mercúrio presente em seres humanos encontrar-se nessa forma.⁹

Através do ciclo do mercúrio podemos entender melhor o motivo do metil mercúrio ser o composto mais encontrado em seres humanos.

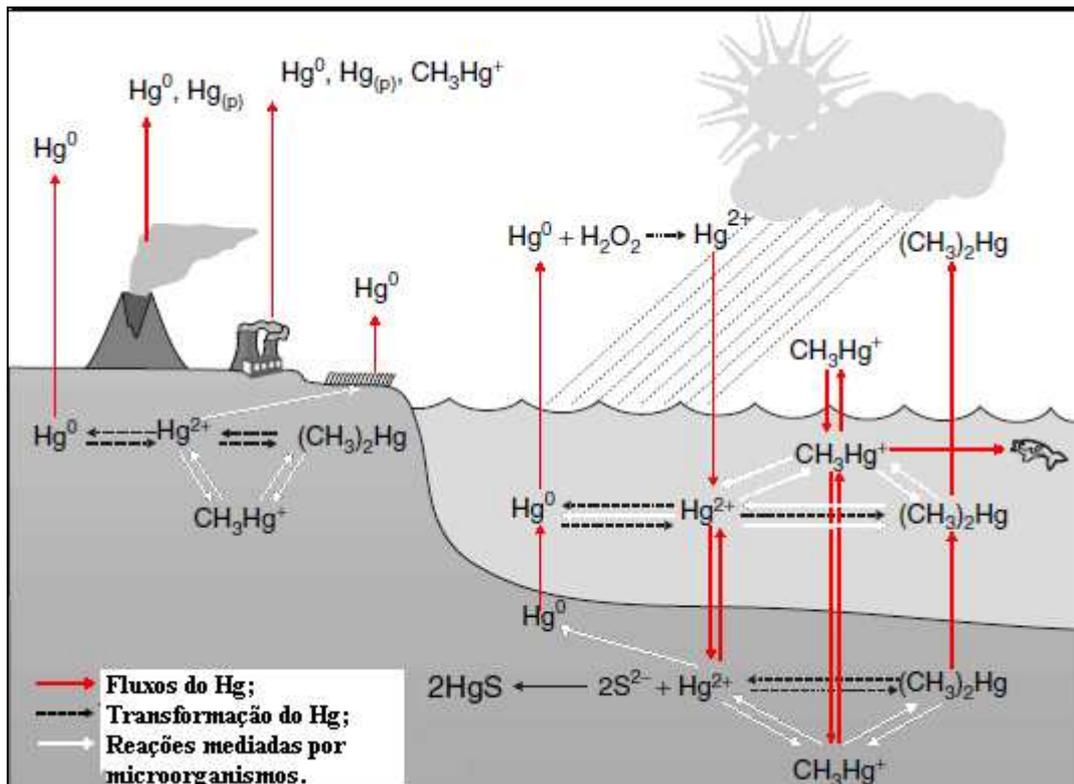
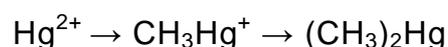


Figura 1: Ciclo do mercúrio¹¹.

Uma vez liberado ao meio ambiente pela natureza ou ações antropogênicas (como queima de carvão mineral⁷) o mercúrio elementar volatiliza para posteriormente ser oxidado por peróxido de oxigênio a Hg^{2+} em presença da radiação. Oxidado o mercúrio chega ao meio ambiente aquático pela ação de chuvas dando início a segunda parte de seu ciclo. Como Hg^{2+} , o mercúrio pode ser complexado por substâncias húmicas ou outros elementos ou ainda ser convertido em $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ por microorganismos de acordo com as condições de pH e oxigenação do ambiente.¹²

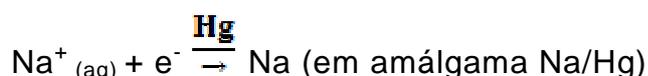
O processo de formação de metilmercúrio e dimetil mercúrio (metilação) ocorre nos sedimentos de rios e lagos, quando microorganismos convertem Hg^{2+} em CH_3Hg^+ e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$:



O agente ativo do processo de metilação é um constituinte comum dos microorganismos; um derivado da vitamina B₁₂ com um ânion CH₃⁻ ligado a um cobalto chamado metilcobalamina.^{4,9}

Formados, metilmercúrio e dimetilmercúrio volatilizam-se da água com relativa rapidez, a menos que sejam transformados sob condições ácidas, em outra espécie. Em soluções aquosas neutras ou ácidas, a produção de metilmercúrio predomina sobre a de dimetilmercúrio.¹² O metilmercúrio pode ser absorvido por peixes à medida que passa através de suas brânquias e/ou também por meio de sua dieta alimentar, bioacumulando-se. No decorrer da cadeia alimentar ocorre o fenômeno da biomagnificação, onde a concentração de mercúrio é aumentada progressivamente.^{3,4,9,10}

No Brasil, as duas principais fontes de contaminação antropogênicas são as indústrias de álcalis-clorados, criadas após Segunda Guerra Mundial, localizadas principalmente no Sul e Sudoeste do país; e o garimpo de ouro que utiliza o Hg na amalgamação na região Amazônica que teve seu início na década de 1970.^{13,14} As indústrias de álcalis-clorados utilizam um amalgama de sódio e mercúrio no processo que converte cloreto de sódio aquoso nos produtos comerciais cloro e hidróxido de sódio por eletrólise. Com o objetivo de formar uma solução pura e concentrada de NaOH, é usado mercúrio líquido como eletrodo negativo (cátodo) da célula eletroquímica.



Embora o mercúrio líquido não seja solúvel em água ou em ácido diluído, ele pode ser oxidado até formas mais solúveis mediante a intervenção de bactérias presentes nas águas naturais, tornando-o acessível aos peixes.¹³

Apesar do risco que estas indústrias oferecem ao meio ambiente, desde a década de 60, devido às leis de proteção ambiental, o mercúrio tem sido substituído gradativamente, por membranas à base de fluorcarbonetos para separar a solução de cloreto de sódio da solução livre de cloretos no

eletrodo negativo.⁹ A Tabela 1 nos mostra a evolução do uso do mercúrio no Brasil nas décadas de 80 a 90.

Tabela 1: Evolução do uso de mercúrio no Brasil entre 1979 e 1989. Dados em % do total consumido por ano.¹⁴

Ano (toneladas)	Cloro- soda	Tintas	Odonto- farmacêutica	Elétrico- eletrônicos	Revenda	Usos não especificados
1979 (158)	52,0	13,8	11,2	-	15,2	8,8
1985(186)	10,1	24,5	11,1	1,8	29,6	22,9
1989(337)	4,9	10,1	4,1	2,7	48,2	30,1

Com leis ambientais promulgadas na década de 1990 o mercúrio passou a ser limitado das indústrias de álcalis clorados. Atualmente a maior fonte de contaminação de mercúrio no Brasil se deve ao garimpo.^{13,14} A Tabela 2, apresenta uma estimativa da concentração de mercúrio perdido na natureza pelo processo de mineração do ouro.

Tabela 2: Produção anual de ouro e emissão de mercúrio no período de 1985 a 1988¹³

Parâmetros	Valores (tonelada/ano)	Média (tonelada/ano)
Produção de Ouro	44-277	148
Perda de Hg para a atmosfera	40-509	137
Perda de Hg para rios e lagos	13-83	44
Perda total de Hg	57-554	181

1.3 Justificativa do trabalho

A alta toxicidade do mercúrio, sua natureza volátil e sua bioacumulação geraram um grande interesse em qualificar e quantificar suas espécies no meio ambiente e em seres vivos expostos ao metal.^{9,11}

Devido à baixa concentração nas mais variadas amostras e às diferentes formas que o Hg pode se apresentar; é de extrema importância o desenvolvimento de métodos sensíveis e capazes de quantificar as diferentes espécies deste metal, principalmente quantificar separadamente o Hg inorgânico (Hg^0 , Hg^+ e Hg^{2+}) do Hg orgânico.¹⁵ Para isso, são necessárias diferentes estratégias para o preparo das amostras em relação às utilizadas para a determinação de outros elementos, pois além de perdas por volatilização, quando não estabilizado, pode ter sua especiação comprometida por causa da transformação de suas espécies durante o processo de tratamento das amostras.¹⁶

Diversos métodos de preparo de amostras para a quantificação de Hg com o objetivo de fracionar e/ou especiar Hg já foram propostos na literatura. Apesar do sucesso destas metodologias, ainda são necessárias metodologias mais sensíveis, a fim de se conseguir quantificar em níveis cada vez mais baixos o Hg e suas diferentes espécies. Neste sentido, a geração de vapor frio acoplada a espectrometria de fluorescência atômica (CV AFS), por ser livre de interferências espectrais, ter ampla faixa linear e baixos limites de detecção, tornou-se uma das técnicas mais promissoras para a determinação de Hg.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Técnicas para a determinação de Hg

Devido ao grande interesse na determinação de Hg, estão sendo desenvolvidas técnicas cada vez mais sensíveis e precisas para a determinação desse metal em diferentes tipos de matrizes. Dependendo da natureza da amostra e da concentração de Hg, diferentes métodos analíticos podem ser empregados.¹⁵

Um dos métodos mais tradicionais para a determinação de mercúrio devido a sua simplicidade, baixo custo e rapidez, o método colorimétrico é baseado na supressão de fluorescência ocasionada pela associação de íons formando complexos com mercúrio (II), para isso, são utilizadas diferentes espécies, como porfirinas, rodamina B, entre outras. Apesar de conseguir limites de detecção de até $1,4 \mu\text{gL}^{-1}$ ¹⁷ este método está sujeito a interferências ocasionadas por outros metais, como o Cd, Zn, Pb, Pd, Tl que concorrem diretamente com o mercúrio para formar complexos, exigindo diversas etapas de separação.^{17,18}

A espectrometria atômica ainda é a técnica mais utilizada para a determinação de Hg, sendo que, os métodos empregados podem ser separados em função do método empregado (emissão, absorção ou fluorescência atômica) e ainda, de acordo com o atomizador utilizado, chama, forno de grafite, geração química de vapor (CVG), plasma, entre outros. Um dos primeiros atomizadores a ser utilizado em conjunto com a espectrometria de absorção e fluorescência atômica, foi a chama. Esta técnica apresenta baixa sensibilidade para a determinação de mercúrio, além disso, os gases utilizados pela chama podem ocasionar interferências como a supressão de fluorescência ou elevados valores de fundo. Portanto esta técnica de atomização tornou-se desaconselhável para a determinação de mercúrio.^{19,20}

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) oferece maior sensibilidade em comparação com a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (F AAS), além de necessitar uma menor quantidade de amostra e possibilitar a análise direta de amostras sólidas. Entretanto, para a determinação de mercúrio é necessário a adição de modificadores

químicos que tem a função é converter o analito em uma forma menos volátil permitindo assim atingir temperaturas de pirólise maiores (etapa onde ocorre a eliminação da matriz sem que haja a volatilização do analito) com isso separando o analito dos concomitantes. A alta volatilidade do mercúrio compromete a temperatura de pirólise e com isso a matriz não é totalmente eliminada, ocasionando interferências. Para evitar estes problemas foi proposto o uso diversos tipos de modificadores, modelos de fornos de grafite e procedimentos para diminuir a volatilidade do mercúrio no forno. Entre as estratégias utilizadas estão as plataformas de grafite composta por fios de ouro, ouro/paládio e platina/ródio²¹ e o uso paládio como modificador permanente, alcançando estabilidade térmica do Hg a 500 graus Celsius²².

Também é possível o uso da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), que tem como principal vantagem o fato do mercúrio não necessitar estar reduzido a sua forma elementar.²³ Foi comparado o uso da cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (GC-ICP-MS) com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) concluindo que GC-ICP-MS é uma técnica mais sensível que o GC-MS, obtendo por final um limite de detecção de 0,3 µg/L.²⁴ Apesar dessas vantagens como ampla resposta, alta velocidade analítica e excelente sensibilidade, ICP-MS é de pouca valia caso no sistema de introdução de amostra ocorra o efeito de memória. Este efeito ocorre em particular com elementos voláteis como o mercúrio, em que este é retido no sistema de introdução de amostras, especialmente no injetor da tocha. Outro problema ligado ao mercúrio está no fato de ser pouco ionizado no plasma de argônio, de maneira que a sensibilidade da técnica para este elemento é baixa comparada a de outros elementos.²⁵ Enquanto ICP-MS permite análises multielementares e multi-isotópicas, a espectrometria de fluorescência atômica é um método de baixo custo, de fácil operação e mais sensível quando comparadas as duas técnicas.²⁶

2.2 Espectrometria de fluorescência atômica

Utilizada pela primeira vez por Winefordner e Vickers em 1964, para fins analíticos ^{19,20,31,32} a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma técnica de emissão atômica, caracterizada por sua alta sensibilidade e ampla faixa linear. ^{19,20,33} Nela os elétrons são promovidos a um nível energético excitado através da radiação de um comprimento de onda característico, emitido por uma fonte de linha ou contínua, para logo em seguida, retornar a um estado de menor energia, emitindo uma radiação de comprimento de onda similar ou diferente do comprimento de onda de excitação. ^{15,19,20,31,32,33} Devido à existência de diversas maneiras pelas quais o átomo pode absorver e emitir a radiação existem diferentes tipos de fluorescências, entre elas: ^{19,20,31,32,33}

- a. Fluorescência de ressonância: Elétrons no estado fundamental absorvem radiação e são promovidos a um estado de maior energia, após alcançarem tal estado os elétrons retornam diretamente ao estado fundamental emitindo radiação do mesmo comprimento de onda que absorveram;
- b. Fluorescência de linha direta: Nela, o átomo já em estado excitado, é excitado a um nível de maior energia (diferente do fundamental) para depois re-emitir uma energia de comprimento de onda similar ao comprimento de energia absorvido;
- c. Fluorescência de linha direta de Stokes: Elétrons no estado fundamental absorvem radiação e são promovidos a um estado de maior energia, após alcançarem tal estado, os elétrons retornam a um nível de energia diferente do fundamental emitindo radiação com λ maior do que o λ de excitação;
- d. Fluorescência de linha direta anti-Stokes: O átomo já num estado excitado é excitado a um nível de maior energia (diferente do fundamental) para depois re-emitir uma energia de comprimento de onda menor do que a λ de excitação;

- e. Fluorescência de linha passo a passo (stepwise): Envolve diferentes níveis superiores na radiação absorvida e/ou emitida, envolvendo ganhos e perdas de energia;
- f. Fluorescência *Sensitized*: O átomo excitado transfere parte ou toda sua energia para outro átomo de um elemento diferente. O átomo agora excitado emite radiação, retornando ao seu estado original.

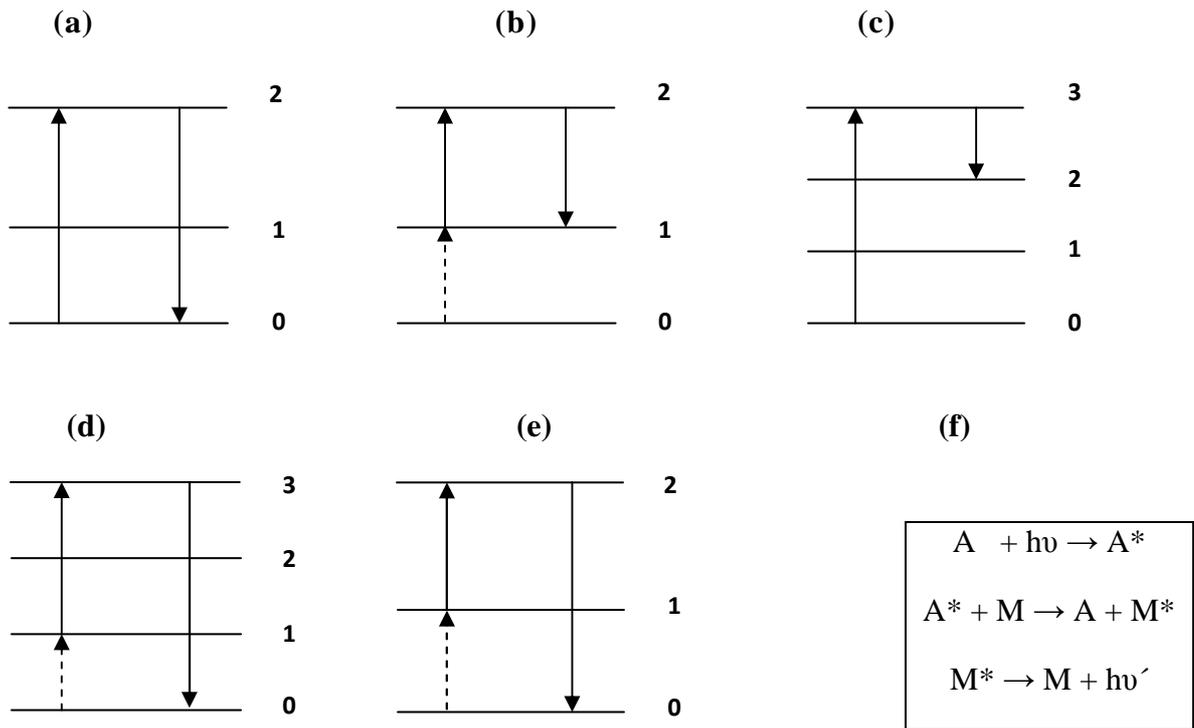


Figura 2: Tipos de Fluorescência: a) Fluorescência de ressonância; b) Fluorescência de Linha Direta; c) Fluorescência de linha direta de Stokes; d) fluorescência linha direta anti-Stokes; e) Fluorescência de linha passo-a-passo; f) *Sensitized* (onde: A, doador de energia; M, receptor de energia).

Tanto na AAS quanto na AFS, os elétrons dos átomos do analito são promovidos a estados de maior energia através da radiação de uma fonte externa. Já na espectrometria de emissão ótica (OES), os átomos são excitados por colisões termicamente induzidas por uma chama/plasma sem a utilização de uma fonte de radiação. Conseqüentemente, na AFS e AAS existem menos interferências espectrais comparadas com a OES, uma vez que

a chama ou o plasma promovem a excitação de todos os elementos e moléculas presentes na amostra, gerando um espectro muito complexo.³³

Na AAS é medida a razão da radiação resultante do processo de absorção atômica enquanto na AFS é medida a intensidade total emitida, a partir de um valor nulo e não uma razão, resultando numa maior sensibilidade em comparação com outras técnicas.^{19,20,31} Os espectrômetros de fluorescência atômica, geralmente são equipados de uma fonte de radiação; atomizador, filtro de comprimento de onda e detector. Para realizar as medidas de fluorescência o detector deve estar perpendicular ao eixo da fonte de radiação, diferente da AAS, no qual o detector e a fonte estão alinhados.^{19,32,33} A Figura 2 ilustra a disposição dos componentes em ambas as técnicas.

a) Espectrometria de absorção atômica



b) Espectrometria de fluorescência atômica

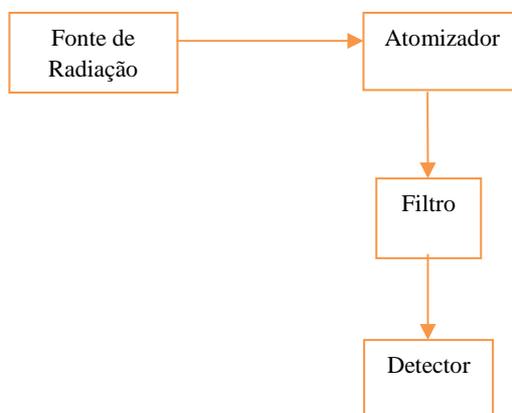


Figura 3: Esquema ilustrativo de: a) Espectrômetro de absorção atômica; b) Espectrômetro de fluorescência atômica.

Uma das características mais importantes da AFS é que a intensidade fluorescência é proporcional a intensidade da fonte de radiação utilizada, para isso, podem ser empregadas diferentes fontes de radiação, que vão desde lâmpadas de

cátodo oco, plasmas, e lasers.^{19,20,33} A princípio, considerava-se que devido a sua forte intensidade, as lâmpadas de arco de xenônio poderiam prover um limite de detecção menor do que os oferecidos por fontes de linha como lâmpada de cátodo oco ou lâmpada de descarga de elétrons. Porém, foi demonstrado que lâmpadas de fonte contínua estão muito mais sujeitas a interferências espectrais. Lâmpadas de cátodo oco como fontes de radiação possuem baixa intensidade, limitando o seu uso na AFS, já as lâmpadas de descarga de elétrons por sua vez apresentam uma intensidade muito maior, porém apresentam menor estabilidade e menor tempo de vida.¹⁹ É possível a utilização de laser como fonte radiação, gerando uma forte intensidade, porém esta fonte de radiação está sujeita a promover interferências espectrais.³⁴

Durante o desenvolvimento da AFS, os atomizadores em chama foram os primeiros a serem utilizados. O uso de chama ar-hidrogênio produzem uma série de interferências como a volatilização incompleta das amostras, assim, a AFS ficava restringida a determinação de elementos voláteis. Uma alternativa foi o uso de chamas que atingiam maiores temperaturas, como chamas geradas por óxido-nitroso e acetileno, entretanto o uso dessa chama apresentou elevados valores de fundo, além de estes gases ocasionarem a supressão de fluorescência. Estes problemas levaram a marginalização da AFS cedendo lugar a AAS, tendo em vista que por AFS poucos elementos eram viáveis de serem determinados.¹⁹ Anos depois, com o uso do plasma indutivamente acoplado (ICP) como atomizador, tornou-se possível determinar diferentes elementos por AFS. O ICP permite alcançar temperaturas elevadas em relação à chama diminuindo as interferências não espectrais. Além disso, o alto grau de volatilização da amostra reduz as interferências por espalhamento de radiação e a atmosfera inerte de argônio reduz as interferências por supressão de fluorescência.²⁰

Entre as principais interferências da AFS, ganham destaque à supressão de fluorescência e o espalhamento da radiação.^{19,20,31,33} O espalhamento da radiação, gera sinais com intensidade maiores que os valores reais, ocasionado tanto por partículas não volatilizadas da matriz da amostra, quanto pelos componentes do próprio equipamento. Neste tipo de interferência ocorre a reflexão da radiação (emitida pela fonte) diretamente ao detector, produzindo assim, um sinal maior do que o real. Para a correção do espalhamento de radiação causado pelos

componentes do aparelho, a medida do branco é suficiente, já o espalhamento ocasionado por partículas, requer outras maneiras, como a troca do gás utilizado como combustível da chama ou até mesmo, a troca do atomizador.^{19,20,31,32,33} A atomização em chamas é bastante problemática, por não volatilizar a amostra completamente. Ocasionalmente ocorre o espalhamento por partículas presentes nos gases usados como combustível, restringindo bastante seu uso na AFS.^{19,20}

A supressão de fluorescência é caracterizada por gerar valores de intensidade menores do que os reais, ela ocorre pela colisão dos átomos excitados do analito com outros átomos ou moléculas presentes no atomizador. Após a colisão ocorre a desativação do estado excitado, suprimindo assim, a emissão de radiação.^{19,20,31,32,33} Essa interferência, assim como o espalhamento da radiação depende bastante do tipo de atomizador empregado, sendo muito comum em atomizadores em chama devido a não volatilização completa da amostra ou a partículas presentes no gás. Moléculas presentes nos gases como H₂, C₂H₂, podem se chocar com os átomos do analito excitado, impedindo a emissão de radiação.^{19,20}

Devido a alta volatilidade do mercúrio é possível dispensar o uso de um atomizador. Para garantir que o mercúrio esteja em seu estado elementar é empregada a geração química de vapor, técnica que será detalhada na seção a seguir. Quando determinado por AFS o Hg geralmente é excitado por uma radiação de comprimento de onda específico do estado excitado 6³P₁, que retorna ao estado fundamental 6¹S₁, emitindo uma linha de transição de comprimento de 253,7 nm.³¹

2.3 Geração Química de Vapor

A geração química de vapor é uma técnica bastante sensível, que visa a transformação de espécies químicas em compostos voláteis à temperatura ambiente. Esta transformação ocorre através de reações químicas, envolvendo um ácido, um agente redutor (este pode ser o cloreto estânico ou borohidreto de sódio), além do analito, para que posteriormente o vapor formado (espécie volátil do analito) seja transportado à uma cela de absorção mantida a temperatura ambiente ou aquecida. O uso do borohidreto de sódio como agente redutor, apesar de bem difundido, por ser efetivo e oferecer uma redução rápida do mercúrio elementar e suas espécies orgânicas³⁵, gera elevado valor de branco por produzir em companhia

dos vapores de mercúrio, gás hidrogênio e vapor de água. Outro problema decorrente de seu uso ocorre devido alguns metais em solução (como o Fe e Cu) serem reduzidos, formando amálgamas com o mercúrio, além da possível geração de hidretos com outros metais (como o Se(IV)) ocasionando as interferências características da técnica ³⁶. Já o cloreto estanoso apesar de ser um redutor mais fraco e não permitir a redução do mercúrio em sua forma orgânica possibilita o uso da pré-concentração obtendo assim uma maior sensibilidade. O mesmo, não ocorre para o borohidreto, ao utilizá-lo há formação de espuma no separador gás/líquido podendo acarretar em medidas errôneas ou então impedir o correto funcionamento da armadilha de ouro (sistema de pré-concentração) seja por cobri-la com produtos da reação gasosa ou por gotículas de água.³⁷ Além disso o cloreto estanoso, permite a quantificação de amostras em meio salino sem a presença de um elevado valor de branco. Para o Hg e o Cd é formado diretamente o vapor atômico, de maneira que não há necessidade de um atomizador, simplificando a instrumentação.^{38,39}

Como vantagens da geração de vapor pode-se citar:

- Separação do analito da matriz;
- Alta eficiência de introdução da amostra podendo chegar a 100%;
- Aumento da seletividade pela redução de interferentes;
- Possibilidade de estudos de especificação;
- Obtenção de melhores limites de detecção através da pré-concentração;
- Pode ser utilizada em conjunto com técnicas diferentes.

Entretanto, como toda técnica, também está sujeita a problemas como:

- Está sujeita a interferências não espectrais;
- O estado de oxidação do analito, assim como a forma do composto são críticos;
- O pH da solução e a concentração dos reagentes podem ser críticos;
- A cinética da reação e liberação dos vapores podem ser afetadas por fatores físicos da solução;
- Utiliza um grande volume da solução;

Usando a geração química de vapor frio é possível aumentar a sensibilidade dos métodos contornando os problemas já citados. Entre as vantagens de se utilizar CV estão a perda mínima da quantidade de analito durante sua introdução, a possibilidade de pré-concentração aumentando a sensibilidade, separação do analito da matriz diminuindo consideravelmente interferências.²⁷ Em trabalhos recentes foi determinado mercúrio total e inorgânico, primeiramente usando uma cela de quartzo aquecida em conjunto com forno de grafite recoberto com ouro e posteriormente determinado mercúrio sem a necessidade de aquecer a cela, apenas empregando a digestão total das amostras e a solubilização das amostras com TMAH para mercúrio inorgânico.³⁰ Assim como a AAS, outras técnicas podem também se beneficiar da CV, tornando-se mais sensíveis e adequadas para a determinação de Hg.

2.3 Preparação de amostras para a determinação de Hg

Antes de ser submetida à análise, qualquer amostra deve ser tratada de acordo com o método a ser empregado na determinação do analito. Estes tratamentos podem variar desde uma simples moagem até a total transformação da amostra sólida em uma solução compatível com sua análise e que em alguns casos visam extrair o analito da matriz.⁴⁰

Antes e após do tratamento da amostra o mercúrio pode vir a ter sua concentração alterada por ser extremamente volátil e móvel. Essas perdas ocorrem caso seja armazenado em frasco aberto ou feito de polímeros orgânicos.³⁸ Logo, é necessário que a amostra seja armazenada em frascos não feitos de plástico, como o vidro, evitando assim, a difusão do metal através do frasco.⁴⁰ Além dessas perdas, o mercúrio por ser instável, quando não estabilizado, pode ter sua especiação comprometida devido à transformação de suas espécies químicas durante o processo de tratamento, tornando necessária a estabilização de suas espécies.¹⁶

Devido a sua alta mobilidade, as amostras contendo mercúrio estão sujeitas a perdas quando não estabilizadas. Entre os mecanismos mais comuns de perda, podemos citar:³⁸

- a) Volatilização;
- b) Redução dos compostos seguidos pela vaporização;
- c) Adsorção do metal nas paredes do frasco;
- d) Adsorção do metal na superfície de partículas presentes em solução;
- e) Inclusão do mercúrio em complexos e metais formando amálgamas.

A melhor combinação a ser empregada para a estabilização é composta pelo ácido nítrico em conjunto com dicromato. O uso de permanganato na solução pode formar dióxido de manganês, além de possuir brancos elevados.³⁸

Para que a determinação de mercúrio seja bem sucedida é imprescindível que o metal presente na amostra seja extraído da matriz orgânica e estabilizado, para isso são empregados ácidos fortes (HNO_3 , HCl , H_2SO_4), fortes agentes oxidantes (KMnO_4 , H_2O_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$); cuja função é a suspensão da atividade biológica, como formação de algas e evitar a redução do mercúrio inorgânico à mercúrio elementar (Hg^0) impedindo sua volatilização; como também, elevadas temperaturas, radiação ultravioleta, além da exposição a radiação de microondas.^{29,41}

O hidróxido de tetrametilamônio ($\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$) conhecido por TMAH, é uma base forte, solúvel em água, conhecida por ser um eficiente solubilizante de amostras biológicas. Entre suas principais vantagens podemos citar a extração dos analitos a temperatura ambiente, não modificar o estado de oxidação do analito, permitir a especiação, ser um método rápido e simples para o preparo de amostra.^{29,41,42,43} Outro método empregado com sucesso solubilização de tecidos biológicos é o uso de ácido fórmico e que apresenta praticamente as mesmas vantagens do TMAH.⁴⁴

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método simples, rápido e preciso para a quantificação e o fracionamento de Hg em amostras biológicas tratadas com TMAH por geração de vapor frio acoplada a espectrometria de fluorescência atômica. Entre os objetivos específicos estão:

- Otimização da quantidade de agente redutor;
- Otimização da quantidade de ácido;
- Quantificação do Hg total em amostras biológicas;
- Quantificação do Hg orgânico em amostras biológicas;

4. METODOLOGIA

4.1 Instrumentação

As quantificações foram realizadas utilizando um espectrômetro de fluorescência atômica MERCUR DUO da *Analytik Jena* (Jena, Alemanha). O instrumento é equipado com uma lâmpada de Hg de baixa pressão (UVU5), sendo de 253,7 nm o comprimento de onda de excitação e de medida. Dois estágios de enriquecimento podem ser utilizados com coletores de ouro-platina (AuPt10). Para a geração química de vapor o instrumento é equipado com um reator PEEK com ângulo de incidência de 60° entre amostra/ácido e agente, um separador gás líquido e uma membrana dessolvadora que usa argônio em contrafluxo. Argônio com pureza de 99,996% *White Martins* (São Paulo, Brasil) foi utilizado como gás carregador para a amostra. As amostras foram pesadas usando uma microbalança AG204 *Mettler Toledo* (Giessen, Suíça). Para a digestão das amostras foi utilizado um forno de microondas Ethos Plus, *Milestone Milestone* (Sorisole, Itália) equipado com frascos de PTFE. Abaixo é mostrado na Figura 4 e Tabela 3 o esquema de operação do sistema e suas condições de operação, respectivamente.

Figura 4: Esquema de operação do sistema de CV AFS.

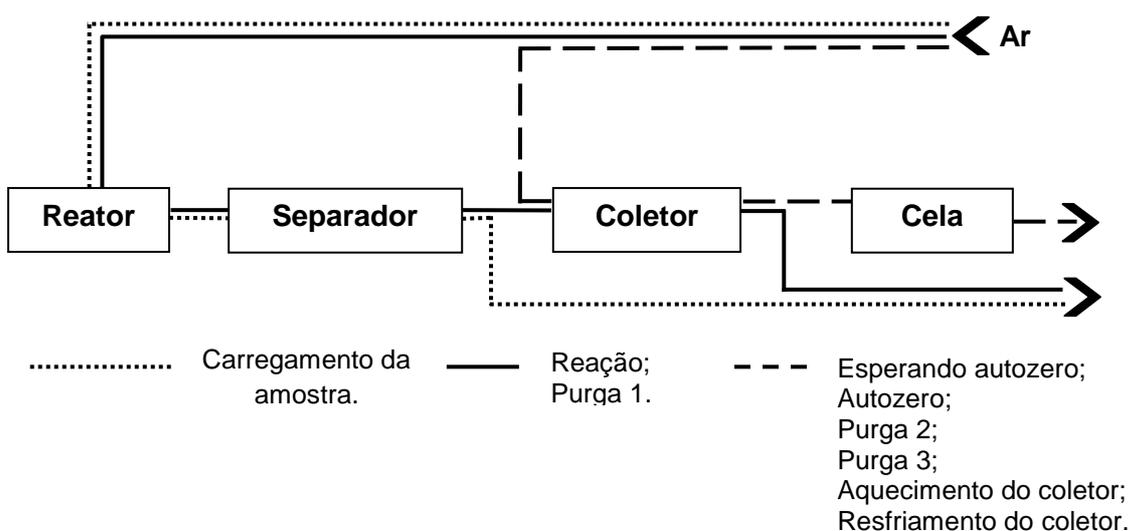


Tabela 3: Condições de operação do sistema CV AFS.

Etapa	Tempo (s)	Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	Vazão dos reagentes (mL min ⁻¹)	Vazão do gás (L h ⁻¹)
Carregamento da amostra*	10	9,2	2	10
Reação	10	9,2	4,3	10
Purga 1	30	0	2	10
Esperando autozero	10	0	0	5
Autozero	5	0	0	5
Purga 2	15	0	0	10
Purga 3	20	0	0	5
Aquecimento do coletor	15	0	0	5
Resfriamento do coletor	20	0	0	5

* Utilizado apenas na medida cega.

4.2 Reagentes

Foi utilizada uma solução padrão de Hg da *Merck* (Darmstadt, Alemanha). Para a preparação das amostras e solução padrão foi utilizado ácido clorídrico (HCl) 37% v/v, ácido nítrico (HNO₃) 65% v/v e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% v/v ambos adquiridos de *Merck* (Darmstadt, Alemanha), permanganato de potássio (KMnO₄) e cloridrato de hidroxilamina (HONH₃Cl) da *Merck* (Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto estanoso (SnCl₂.H₂O) de *Cromato Produtos Químicos* (Diadema, Brasil). Para a solubilização das amostras foi utilizado hidróxido de tetrametilamônio 25% m/v em metanol, *Fluka* (Steinheim, Alemanha) Após o preparo das soluções de ácido e agente redutor foi purgado argônio durante 15 minutos para eliminar o Hg presente como contaminante.

As amostras de referencia certificadas utilizadas foram: BCR 186 (rim de porco), DORM-3 (proteína de peixe), TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), DOLT-3 (fígado de peixe) do National Research Council Canadá- NRCC (Ottawa, Canadá).

4.3 Procedimentos

4.3.1 Digestão das amostras

Para a digestão das amostras foram pesados aproximadamente 300 mg de cada amostra em frascos de PTFE, adicionados 4 mL de ácido nítrico, 2 ml de peróxido de hidrogênio e 2 ml de água. Os frascos foram fechados e submetidos ao tratamento térmico em forno microondas seguindo o seguinte programa de temperatura: Etapa 1) 20 a 90 graus em 2:30 minutos; etapa 2) de 90 a 130 graus em 5 minutos; etapa 3) de 130 a 190 graus em 3:30 minutos; etapa 4) 190 graus constantes por 10 minutos. Após o programa de temperatura, os frascos foram abertos, a solução resultante foi transferida para frascos de polipropileno e o volume foi completado para 30 mL.

4.3.2 Otimização de agente redutor, ácidos e permanganato de potássio e anti-espumante

A otimização de agente redutor e ácido clorídrico e ácido nítrico foi realizada para o padrão inorgânico, amostra digerida e amostra tratada com TMAH. A concentração de ácido clorídrico foi variada de 1 até 6% (v/v) e as de cloreto estano 0 até 10 % (m/v). As soluções de cloreto estano foram preparadas solubilizando o reagente em HCl 4% (v/v).

Para a otimização da concentração de ácido nítrico e de anti-espumante também foram realizadas para o padrão aquoso, amostra digerida e amostra tratada com TMAH. A concentração de permanganato de potássio e de cloridrato de hidroxilamina foi mantida constante, 0,05 e 0,025% m/v respectivamente, enquanto que a de ácido nítrico foi variada de 0 até 5% (v/v), já a concentração de anti espumante foi variada de 0 até 2 % (v/v). A otimização da concentração de permanganato de potássio foi realizada para o padrão aquoso, amostra digerida e amostra tratada com TMAH variando a concentração de 0 à 0,4% m/v.

4.3.3 Quantificação de mercúrio total nas amostras digeridas

Para a determinação de mercúrio total, alíquotas das amostras digeridas foram diluídas em frascos de polipropileno de 15 mL com KMnO_4 0,05% m/v, HNO_3 5% v/v e cloridrato de hidróxilamina 0,025% v/v. Padrões de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng L^{-1} de Hg foram preparados com KMnO_4 0,05% m/v e cloridrato de hidróxilamina 0,025% v/v. Foram utilizadas concentrações de agente redutor e ácido, otimizadas.

4.3.4 Quantificação de mercúrio inorgânico e total nas amostras tratadas com TMAH

Para a determinação de mercúrio nas amostras tratadas com TMAH aproximadamente 100 mg de cada amostra foram pesados em frascos de polipropileno e adicionado 0,5 mL de TMAH. A mistura foi aquecida a 60 °C durante uma hora e posteriormente avolumada para 10 mL. Para a determinação de Hg inorgânico, alíquotas de 2 mL foram transferidas para frascos de polipropileno e adicionou-se anti-espumante para concentração final de 0,4% v/v (valor otimizado). Padrões de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng L^{-1} de Hg foram preparados em HNO_3 1% v/v e anti-espumante 0,4% v/v.

Para a determinação de mercúrio total alíquotas de 2 mL foram transferidas para frascos de polipropileno e adicionou-se anti-espumante para concentração final de 0,4% v/v (valor otimizado) e KMnO_4 0,05% m/v e cloridrato de hidróxilamina 0,025% v/v (otimizados). Padrões de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng L^{-1} de Hg foram preparados com KMnO_4 0,05% m/v e cloridrato de hidróxilamina 0,025% v/v e anti-espumante 0,4% v/v.

Pela diferença entre o mercúrio total e o inorgânico determinamos mercúrio orgânico, que preferencialmente está na forma de metilmercúrio e etilmercúrio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização das condições para a geração de vapor

A Figura 5 mostra o efeito da concentração de ácido clorídrico na geração de vapor de mercúrio. A otimização foi realizada para a amostra tratada com TMAH, para o padrão aquoso e para a amostra digerida. De acordo com a Figura 5, para padrão aquoso e amostra solubilizada com TMAH a presença de ácido clorídrico não tem efeito sobre a geração de vapor de mercúrio, entretanto para a amostra digerida a presença de HCl causou um aumento no sinal que chegou a 25% quando comparado com aquele obtido na ausência de HCl. Supostamente para a amostra solubilizada com TMAH e para o padrão aquoso não foi observada nenhuma mudança em virtude do agente redutor ter sido preparado em HCl 4% v/v, assim é garantido 4% v/v de HCl para que a reação de redução ocorra. Para a amostra digerida, é provável que a necessidade de uma quantidade maior de Hg seja necessária devido a solução conter HNO_3 e H_2O_2 que foram utilizados no processo de digestão. Como condição de compromisso para a determinação de Hg em diferentes meios foi selecionada a concentração ótima de 6% v/v de HCl.

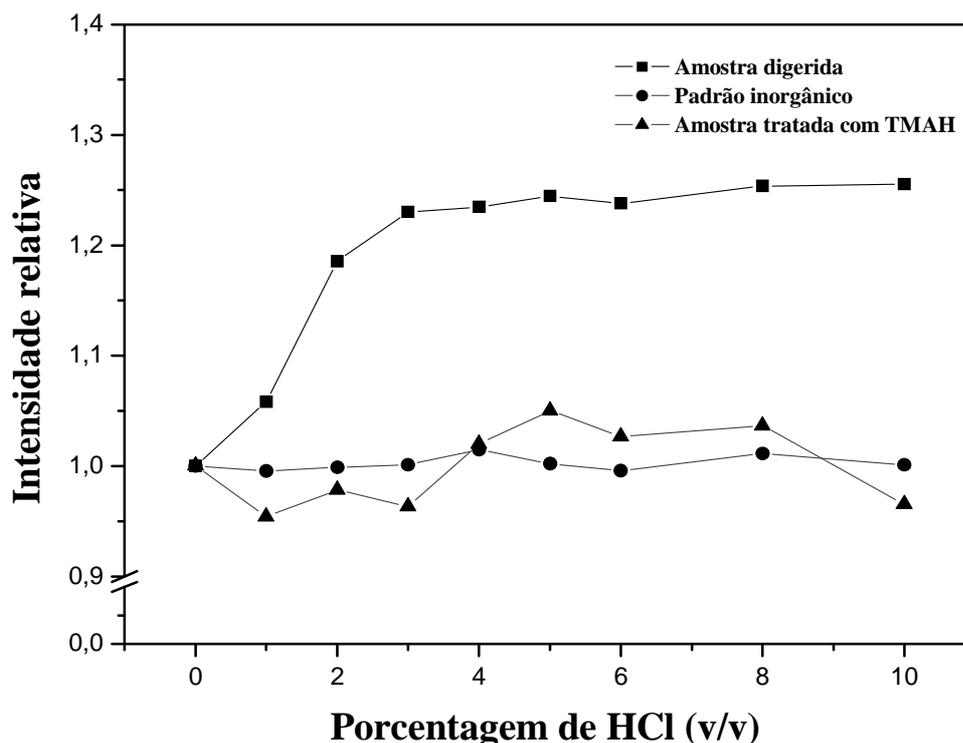


Figura 5: Efeito da concentração de HCl na geração de vapor frio de mercúrio em diferentes meios.

A otimização do agente redutor (SnCl_2) é mostrada na Figura 6. Podemos observar que para a amostra digerida e para o padrão aquoso a presença de SnCl_2 é fundamental para a formação de vapor atômico de Hg, e que a concentração de SnCl_2 acima de 2% m/v não tem efeito significativo sobre o sinal analítico. Já para a amostra tratada com TMAH o efeito do agente redutor foi menor em virtude de que o meio alcalino naturalmente favorece a formação de vapor atômico de Hg, entretanto a maior resposta foi obtida com SnCl_2 entre 1-2% m/v. Como condição de compromisso para a determinação de Hg em diferentes meios foi selecionada a concentração ótima de 4% v/v.

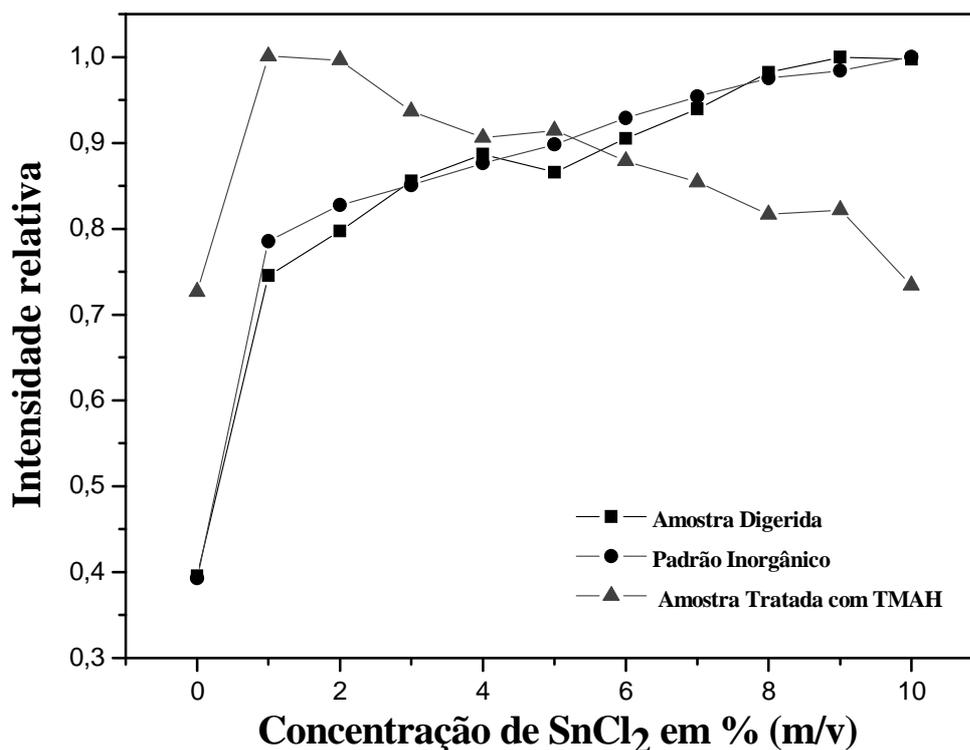


Figura 6: Efeito da concentração de SnCl₂ sobre o sinal de fluorescência para amostras e padrão inorgânico.

A otimização da concentração de permanganato de potássio foi realizada apenas para o padrão inorgânico e para a amostra tratada com TMAH e é mostrada na Figura 7. Não se utilizou a amostra digerida devido a sua similaridade com o padrão inorgânico e por o processo de digestão decompor todas as espécies de Hg. Enquanto o processo de digestão é capaz de decompor totalmente a amostra, inclusive as espécies orgânicas de mercúrio, o procedimento de solubilização com TMAH não é capaz. Assim, para determinar mercúrio total em amostras tratadas com TMAH é necessário algum procedimento para “quebra” das ligações entre o Hg e compostos orgânicos, de maneira que este fique livre para ser reduzido para posterior quantificação. Para decompor as formas orgânicas de mercúrio foi utilizado o KMnO₄.^{31,40} Observou-se que para os padrões aquosos a adição de KMnO₄ causou uma pequena melhora de sensibilidade, menor do que 50%, o que já foi observado em outros trabalhos na literatura mas que não é perfeitamente compreendida. Entretanto, para a amostra tratada com TMAH a presença de KMnO₄ causou um aumento maior do que 300% na sensibilidade, aumento causado pela possível quebra de ligações Hg – C permitindo que o

mercúrio seja reduzido a mercúrio atômico. Em concentrações maiores que 0,08% m/v nota-se um decréscimo da intensidade do sinal de fluorescência na amostra tratada em meio alcalino, devido o excesso de reagente formar óxido de manganês (MnO_2) que, segundo a literatura³⁸, dificulta a redução do mercúrio. A condição de compromisso escolhida para a determinação de mercúrio total foi de 0,05% m/v de $KMnO_4$.

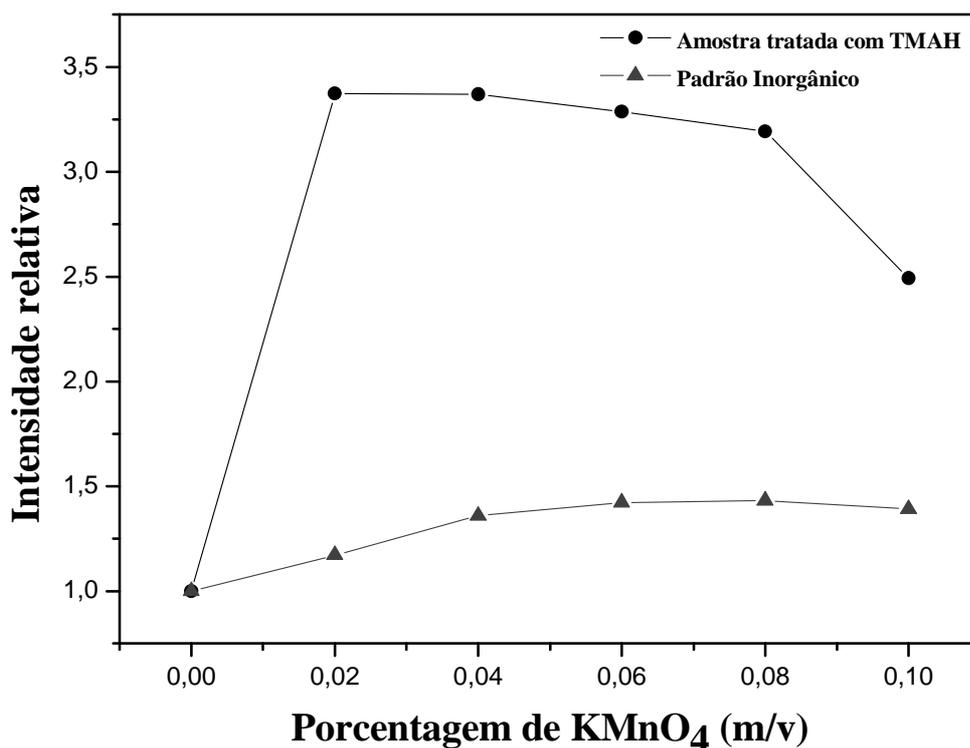


Figura 7: Efeito da concentração de $KMnO_4$ sobre o sinal de fluorescência de mercúrio.

Na Figura 8 é mostrada a variação do sinal de analítico em função da porcentagem de ácido nítrico em soluções contendo o padrão aquoso e em soluções contendo a amostra tratada com TMAH. Para a amostra tratada com TMAH observou-se que a concentração de HNO_3 não teve qualquer efeito, entretanto para o padrão aquoso a intensidade do sinal de Hg aumentou até 2,5% v/v de HNO_3 e posteriormente houve uma pequena diminuição do sinal. Embora não foi observada grandes diferenças na ausência de HNO_3 após poucos minutos foi observada a formação de um precipitado marrom (MnO_2). A concentração de compromisso selecionada foi de 2,5% v/v. Para que o processo de oxidação usando $KMnO_4$ seja

efetivo e evitar a formação de dióxido de manganês, é indispensável que o meio seja ácido. Além disso, pH ácido é necessário para que o processo de redução de Hg usando SnCl_2 seja efetivo.

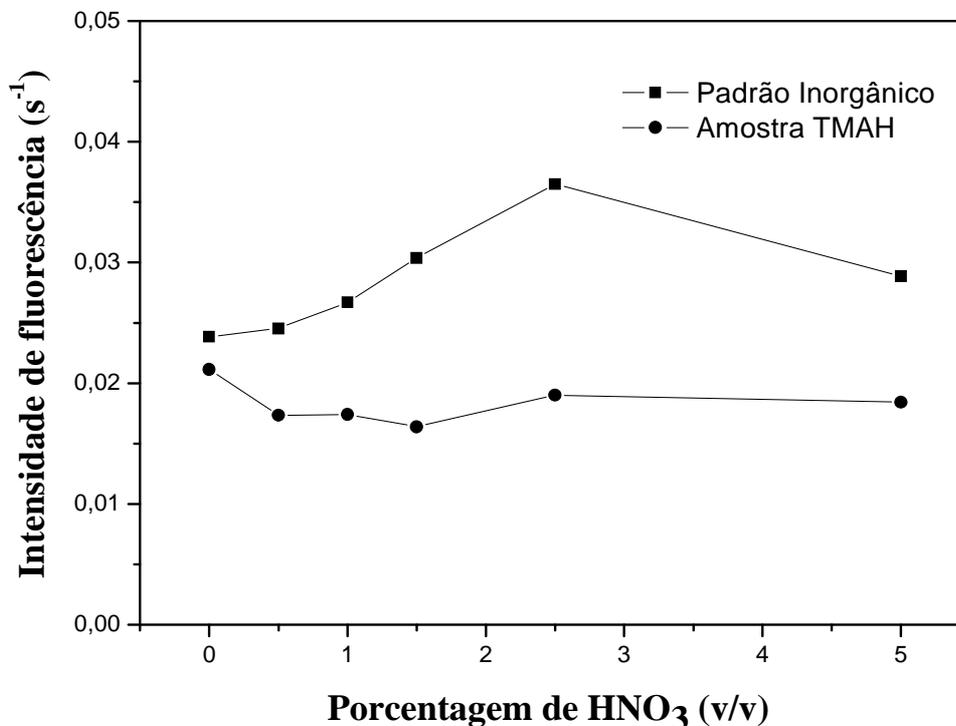


Figura 8: Efeito da concentração de HNO_3 sobre o sinal de fluorescência para mercúrio na amostra tratada com TMAH e no padrão inorgânico.

Devido a formação de grande quantidade de espuma nas amostras biológicas tratadas com TMAH existe a necessidade de se utilizar alguma substância que evite a sua formação, uma vez formada, a espuma poderá causar efeitos negativos durante a liberação dos vapores de Hg das soluções. Na otimização de anti-espumante (Figura 9), observou-se que para a amostra tratada com TMAH e para o padrão inorgânico, houve um considerável aumento da intensidade do sinal, sendo mais notável para a amostra tratada em meio alcalino, tal como o esperado, devido a formação de espuma. A concentração de compromisso escolhida foi de 0,4% v/v. O aumento observado para o padrão aquoso ocorre possivelmente por alterações nas propriedades físico-químicas da solução, especialmente da tensão superficial, favorecendo a liberação dos vapores de mercúrio das soluções.

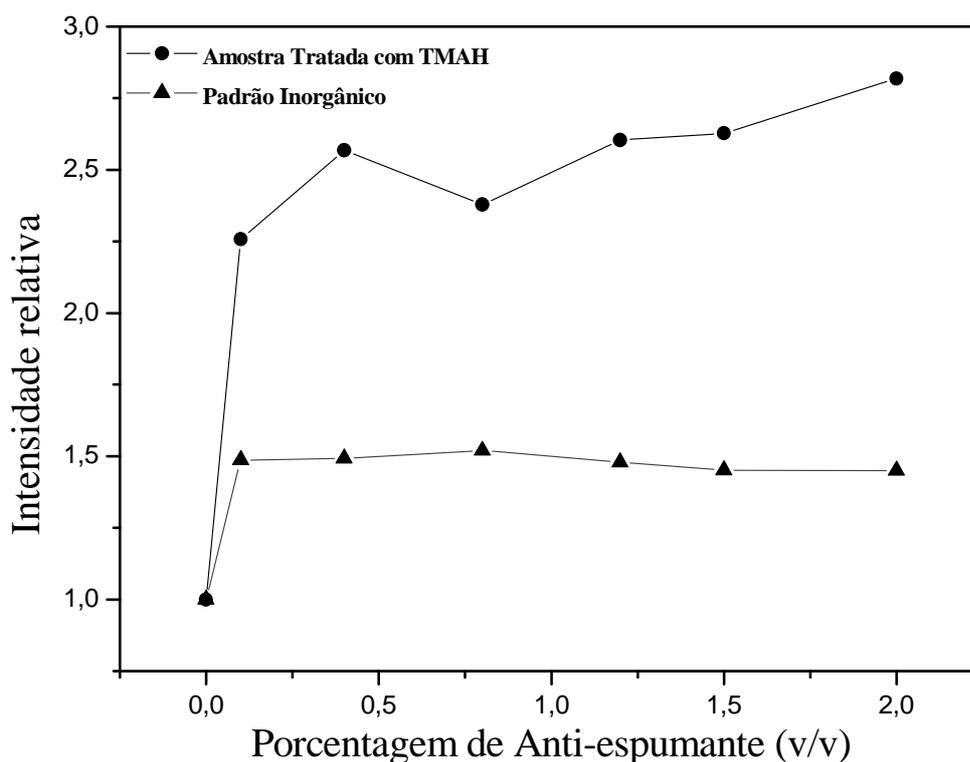


Figura 9: Efeito da concentração de anti-espumante sobre o sinal de fluorescência de mercúrio.

5.2 Determinação de mercúrio total nos materiais de referência certificados em forno microondas

A determinação de mercúrio total nas amostras digeridas foi realizado utilizando as condições previamente otimizadas: 4% m/v de SnCl₂, 6% v/v de HCl, 0,05% m/v de permanganato de potássio, entretanto não foi utilizado anti-espumante pois não existe a necessidade do mesmo na análise de amostras digeridas. Na Tabela 4 são mostradas as figuras de mérito obtidas na determinação de mercúrio total nas amostras digeridas. Como podemos observar, o limite de detecção (LOD) instrumental é muito baixo, 0,4 ng L⁻¹ comprovando a alta sensibilidade da técnica. O LOQ, que foi determinado multiplicando-se o limite de detecção do método por 3,3 é, suficientemente baixo para quantificar mercúrio em todas as amostras avaliadas. Além disso, o método apresentou coeficiente de correlação muito próximo a unidade, indicando a boa linearidade da curva de calibração e boa precisão. O LOD foi

calculado como 3x sd (n=10, branco do processo de digestão) dividido pela inclinação da curva de calibração.

Tabela 4: Figuras de mérito obtidas na determinação de mercúrio total nos CRM's digeridos por AFS.

Limite de detecção instrumental	0,4 ng L ⁻¹
Limite de detecção do método	2 µg kg ⁻¹
Limite de quantificação	7 µg kg ⁻¹
R ²	0,9998
inclinação	0,00077 ng ⁻¹ L

Na Tabela 5 são mostradas as concentrações de mercúrio determinadas nas amostras. Os valores de concentração são expressos pela média (n=3) ± limite de confiança de 95% calculado pelo teste t simples. Os valores estiveram em concordância com os valores de referência, considerando os limites de confiança, mostrando a exatidão do método.

Tabela 5: Resultados analíticos para a determinação de Hg total nos CRM's.

Amostra	Determinado (mg kg ⁻¹)	Certificado (mg kg ⁻¹)
Dolt 3	3,214 ± 0,226	3,37 ± 0,14
Dorm 3	0,380 ± 0,045	0,382 ± 0,06
BCR 186	1,788 ± 0,186	1,97 ± 0,04
Tort 2	0,269 ± 0,027	0,27 ± 0,06

5.3 Determinação de mercúrio total e inorgânico em materiais de referência certificados tratadas com TMAH

A determinação de mercúrio total em CRM's de amostras biológicas tratadas com TMAH foi realizada utilizando as condições previamente otimizadas: 4% m/v de SnCl₂, 6% v/v de HCl, 0,05% m/v de permanganato de potássio, 2,5% v/v de HNO₃ e 0,4% v/v de anti espumante. Já a determinação de mercúrio inorgânico

foi realizado da mesma maneira como a determinação de Hg total, exceto pela não utilização de permanganato de potássio e cloridrato de hidroxilamina. Inicialmente foi estudada a influência da matriz orgânica na geração de vapor de mercúrio. Foram preparadas as curvas de calibração por adição do analito e curvas de calibração em meio aquoso para checar a inclinação das curvas. Na tabela 6 são mostradas as figuras de mérito das curvas de calibração preparadas de diferentes maneiras.

Tabela 6: Figuras de mérito obtidas na determinação de mercúrio usando diferentes estratégias de calibração por AFS.

Curva		
1	Padrão inorgânico + HNO₃	
	R ²	0,9988
	Inclinação (ng ⁻¹ L)	0,00037
2	Padrão inorgânico + HNO₃ + KMnO₄ + Cloridrato de hidroxilamina	
	R ²	0,9997
	Inclinação (ng ⁻¹ L)	0,00066
3	Amostra + Padrão inorgânico + HNO₃	
	R ²	0,9912
	Inclinação (ng ⁻¹ L)	0,00017
4	Amostra + Padrão inorgânico + HNO₃ + KMnO₄ + Cloridrato de hidroxilamina	
	R ²	0,9997
	Inclinação (ng ⁻¹ L)	0,00067

Como podemos observar na Tabela 6, as curvas da calibração com e sem permanganato de potássio (1 e 2) apresentam uma diferença significativa de sensibilidade (44%), no qual a curva com permanganato apresentou maior sensibilidade. Esse efeito já era esperado, pois foi mostrado na Figura 7 que a presença de permanganato de potássio causa um aumento de sensibilidade.

Ao comparar a sensibilidade das curvas de calibração sem permanganato de potássio (1 e 3), observamos que a curva realizada por adição do

analito (3) apresentou baixa sensibilidade, aproximadamente 57% inferior do que a curva preparada em meio aquoso sem amostra, efeito causado por algum componente da matriz da amostra, caracterizando assim uma interferência, que pode ser devido aos componentes da amostra ou devido ao TMAH. Para descobrir a origem das diferenças de inclinação entre as curvas de calibração em meio aquoso e por adição do analito, realizou-se uma curva de calibração em meio aquoso (semelhante a curva 1), entretanto adicionando TMAH. A curva em TMAH (figuras de mérito não mostradas na tabela 6) apresentou inclinação praticamente idêntica a curva em meio aquoso, demonstrando que algum componente da amostra é a causa da interferência observada, que causa uma diminuição da sensibilidade.

As curvas 2 e 4, são semelhantes a 1 e 3 respectivamente, exceto pela adição de permanganato de potássio e de cloridrato de hidróxilamina. Nestas curvas (2 e 4), as inclinações são semelhantes, indicando que a determinação de mercúrio total pode ser realizada sem quaisquer interferências usando as condições pré estabelecidas. A adição de permanganato de potássio permitiu com que se pudesse eliminar / ou diminuir consideravelmente as interferências observadas pela diferença de sensibilidade das curvas 1 e 3, que possivelmente se devem ao uso do cloreto estanoso, que é um agente redutor menos eficiente (mais fraco) do que o borohidreto de sódio. Na literatura são encontrados trabalhos que descrevem a determinação de mercúrio em amostras biológicas tratadas com TMAH, entretanto, todos utilizam borohidreto de sódio^{39,41}.

Os dados da Tabela 6 comprovam, que utilizando a calibração convencional com padrões aquosos sem permanganato de potássio, não é possível determinar mercúrio inorgânico em amostras tratadas com TMAH, entretanto parece ser possível a determinação de mercúrio total, pois para este caso é utilizado o permanganato de potássio. Na Tabela 7 são mostradas as concentrações de mercúrio determinadas nos materiais de referência certificados tratados com TMAH, Os valores de concentração são expressos pela média (n=3) \pm limite de confiança de 95% calculado pelo teste t simples. Foram realizadas as determinações usando a calibração em meio aquoso sem permanganato de potássio (determinação de mercúrio inorgânico) e com permanganato de potássio tanto nos padrões como nas amostras (determinação de mercúrio total). Observando os valores mostrados na Tabela concluímos que tanto para a determinação de mercúrio inorgânico quanto a

determinação de mercúrio total foram obtidos valores discordantes com os valores de referência. Entretanto, ao fazer uma observação mais cuidadosa, podemos constatar que os valores determinados para mercúrio total são compatíveis com os valores de referência de mercúrio inorgânico. Assim, concluímos que o método previamente otimizado para a determinação de mercúrio inorgânico não é adequado para nenhuma situação, tal como já observado pelas diferenças nas inclinações das curvas de calibração 1 e 3 da Tabela 6, enquanto que, o método previamente otimizado para a determinação de mercúrio total apenas pode ser utilizado para a determinação de mercúrio inorgânico, oferecendo excelentes resultados. Usando o método que faz o uso de permanganato de potássio foi obtido limite de detecção de $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, já considerando o fator de diluição, LOD calculado como $3 \times \text{sd}(n=10, \text{branco contendo TMAH})$ dividido de inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação é facilmente calculado multiplicando o LOD por 3,3.

Embora na Figura 7 tenha sido proposto que, o aumento de sinal causado pela adição de permanganato de potássio ocorreu devido a quebra das ligações Hg-C, esta hipótese não pode ser realmente comprovada, pois não foi possível a determinação de mercúrio total nas amostras tratadas com TMAH. Portanto, o comportamento observado na Figura 7 pode ser apenas atribuído a algum efeito que o permanganato de potássio tem de facilitar a geração de vapor de mercúrio em meio orgânico, uma vez que o agente redutor utilizado (SnCl_2) é um agente redutor fraco e em meio orgânico pode ter a sua ação prejudicada.

Tabela 7: Concentrações de Hg total e inorgânico em materiais de referência certificados tratados com TMAH por AFS. Valores expressos como média (n =3) ± limite confiança 95% obtido pelo teste t simples.

Amostra	Hg inorgânico (mg kg ⁻¹)		Hg Total (mg kg ⁻¹)		Metilmercúrio
	Determinado	Certificado**	Determinado	Certificado	Certificado
Dolt 3	0,400 ± 0,026	1,78	1,642 ± 0,035	3,37 ± 0,14	1,59 ± 0,12
Dorm 3	0,001 ± 0,002	0,027	0,051 ± 0,006	0,382 ± 0,06	0,355 ± 0,056
BCR 186	1,037 ± 0,016	1,5 ± 0,1 *	1,520 ± 0,006	1,97 ± 0,04	0,60 ± 0,20 *
Tort 2	0,029 ± 0,003	0,118	0,150 ± 0,004	0,27 ± 0,06	0,152 ± 0,013

* Valor não certificado, mas determinado por *Torres et. Al.*³⁹.

** Diferença entre Hg total e metilmercúrio.

NI: Não informado.

Na Tabela 8, são mostrados os resultados obtidos para a determinação de mercúrio total nos CRM's tratados com TMAH utilizando a calibração por adição de analito e permanganato de potássio (nos padrões e nas amostras). Como podemos observar, foram obtidos valores compatíveis com aqueles mostrados na Tabela 7, que invés de ser de mercúrio total, são muito parecidos com os valores de referência de mercúrio inorgânico. A única discrepância foi para a amostra TORT 2, que foi obtido um valor elevado, possivelmente atribuído por alguma contaminação durante a etapa de preparo da amostra. Dos valores de mercúrio total obtidos nas amostras digeridas, Tabela 4, podemos descontar o valor de mercúrio inorgânico (Tabela 7) e obter a concentração de mercúrio orgânico, que em sua maioria é metilmercúrio, resultados são mostrados na Tabela 9. Nota-se que para a amostra BCR 186, devido ao alto limite de confiança da concentração de mercúrio total (Tabela 4) e do valor obtido na literatura³⁹ para metilmercúrio, podemos considerar que o valor obtido neste estudo é adequado.

Tabela 8: Concentrações de Hg total usando a calibração por adição do analito. Valores expressos como média (n = 3) ± limite confiança 95% obtido pelo teste t simples.

Amostra	Hg Total (mg kg ⁻¹)	
	Determinado	Certificado
Dolt 3	1,668 ± 0,001	3,37 ± 0,14
Dorm 3	0,062 ± 0,012	0,382 ± 0,06
BCR 186	1,878 ± 0,265	1,97 ± 0,04
Tort 2	0,332 ± 0,030	0,27 ± 0,06

Tabela 9: Concentrações de Hg orgânico em materiais de referência certificados tratados com TMAH.

Amostra	Metilmercúrio (mg kg ⁻¹)	
	Determinado	Certificado
DOLT 3	1,572	1,59 ± 0,12
DORM 3	0,329	0,355 ± 0,056
BCR 186	0,268	0,60 ± 0,20 *
TORT 2	0,119	0,152 ± 0,013

* Não certificado, mas determinado por Torres *et. al.*³⁹.

6. CONCLUSÕES

As investigações realizadas neste estudo mostraram que, as condições ótimas de compromisso, para a determinação de Hg total em CRM's de amostras biológicas digeridas são: HCl 6% (v/v), SnCl₂ 4% (m/v), KMnO₄ 0,05% (m/v). As concentrações de Hg total determinadas, estiveram de acordo, com os valores de referência e os parâmetros de mérito da análise foram satisfatórios, com limite de quantificação de 7 µg kg⁻¹. Entretanto, a determinação de Hg total nas amostras solubilizadas com TMAH não é possível, devido a interferências, que impedem a geração do vapor atômico do mercúrio ligado a moléculas orgânicas, quando utilizado o cloreto estanoso como agente redutor.

Para a determinação de mercúrio inorgânico nas amostras tratadas com TMAH, utilizou-se as mesmas condições da determinação de mercúrio total nas amostras digeridas, HCl 6% (v/v), SnCl₂ 4% (m/v), KMnO₄ 0,05% (m/v), entretanto deve-se adicionar anti-espumante (0,04% v/v) e HNO₃ (2,5% v/v). Os resultados obtidos estão de acordo com os valores de referência e permite a quantificação de concentrações tão baixas quanto 13 µg kg⁻¹.

Subtraindo a concentração de mercúrio inorgânico (amostra tratada com TMAH) da concentração de mercúrio total (amostra digerida) foram obtidos as concentrações de mercúrio orgânico que também estão de acordo com os valores de referência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Graeme, A.K.; Pollack, C.V.; **Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury**. J. Emerg. Med. 16, 1, 1998, pg 45-56.

2 D'Itri, F.M.; **The Environmental Mercury Problem**. CRC Unisciences Series (USA), Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1972.)

3 Azevedo, F. A.; Toxicologia do Mercúrio. Ed. RIMA, 2003

4 Hodgson, E. A. **Textbook of Modern Toxicology**. 3rd ed, Ed. John Wiley & Sons, 2004

5 Camara, V.M.; Silva, A.P.; Cancio, J.A. **Notas para a constituição de um programa de vigilância ambiental dos riscos e efeitos da exposição do mercúrio metálico em áreas de produção de ouro**. IESUS Vol. 7, pg 35-44, 1998.

6 Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M.; **Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation**. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, pg. 383-393, 2005.

7 Yudovich, Y.E.; Ketris, M.P. **Mercury in coal: a review Part 2. Coal use and environmental problems**. International Journal of Coal Geology. Vol. 62, pg. 135-165, 2005.

8 United Nations Environment Programme. Global Mercury Assessment. UNEP, Chemicals em : <http://www.chem.unep.ch/> . Último acesso em outubro de 2010.

9 Baird, C. **Química Ambiental**. Ed. Bookman, 2002.

- 10 Holmes, P.; James, K.A.F.; Levy, L.S. **Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health ?** Science of the Total Environment, Vol. 408, pg. 171-182, 2009.
- 11 Conellis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K. G. **Handbook of Elemental Speciation**. Vol. II, Ed. Wiley, 2005.
- 12 Jardim, M. C.; Jardim, W. F. **Production of organic mercury from Hg^0 : experiments using microcosm**, J. Braz. Chem. Soc., Vol.14, pg. 244-248, 2003.
- 13 Lacerda, L.D. **Evolution of mercury contamination in Brazil. Water, Air and Soil Pollution**, Vol. 97, pg. 247-255, 1997.
- 14 Lacerda, L.D. **Contaminação por mercúrio no Brasil: Fontes Industriais vs Garimpos de Ouros**, Química Nova, Vol. 20, pg. 196-199, 1997.
- 15 Micaroni, R. C. C. M. ; Bueno, M. I. M. S. ; Jardim, W. F. **Compostos de Mercúrio, Revisão de Métodos de Determinação, Tratamento e Descarte**. Química Nova, Vol. 23, p. 487-495, 2000.
- 16 Qvarnstrom, J.; Frech, W. **Mercury species transformation during sample pré-tratament of biological tissues studied by HLPC-ICP-MS**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol. 17, p. 1486-1491, 2002.
- 17 Plaschek, M., Czolk, R., Ache, H.J. **Fluorimetric determination of mercury with a water-soluble porphyrin and porphyrin-doped sol-gel films**. Analytical Chimica Acta, Vol. 304, pg. 107-113, 1995.
- 18 Oshima, G.; Nagasawa, K. **Fluorometric Method for Determination of Mercury(II) with Rhodamine B**. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol 18, pg. 687-692, 1970.

19 Greenfield, S. **Atomic Fluorescence Spectrometry: Progress and future prospects.** Trends in Analytical Chemistry, Vol. 14, pg. 435-442, 1995.

20 Greenfield, S. **Inductively Coupled Plasma in Atomic Fluorescence Spectrometry A Review.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Vol. 9, pg. 565-592, 1994.

21 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.** Atomic Spectroscopy, Vol. 18, pg. 166-168, 1997.

22 Silva, A. F.; Bernhard, W.; 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.** Spectrochimica Acta Part B, Vol.57, pg. 2031-2045, 2002.

23 Park, C.J.; Do. H. **Determination of inorganic and total mercury in marine biological samples by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry after tetramethylammonium hydroxide digestion.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry; Vol. 23, pg. 997-1002, 2008.

24 Hippler, J.; Hoppe, H.W.; Mosel, F.; Rettenemier, A.W.; Hirner, A.V. **Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques.** Journal of Chromatography B, Vol. 877, pg 2465-2470, 2009.

25 Jarvis, K. E., Gray, A. L. **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.** Ed. Blackie Glasgow and London, 1992.

26 Armstrong, H.E.L.; Corns, W.T.; Stockwell, P.B.; O'Connor, G. Ebdon, L.; Evans, E. H. **Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas**

chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. Analytical Chimica Acta, Vol. 390, pg. 245-253, 1999.

27 Tsalev, D. L. **Vapor Generation or Electrothermal atomic absorption spectrometry? - Both !.** Spectrochimica Acta Part B, Vol.55, pg. 917-933, 2000.

28 Guo, T.; Baasner, J.; Gradl, M.; Kistner, A. **Determination of mercury in saliva with a flow-injection system.** Analytical Chimica Acta, Vol. 320, pg. 171-176, 1996.

29 Tao, G.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E. **Determination of total Hg in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion.** The Analyst, Vol. 123, pg.1215-1218, 1998.

30 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 spectrometry using different temperatures in quartz cell.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol. 20, pg. 289-294, 2005.

31 Hideyoshi, M.; Tanaka, H.; Shimomura, S. **Atomic Fluorescence Spectrometry of Mercury: Principles and Developments.** Spectrochimica Acta, Vol. 50B, No 1, pg. 69-84, 1995.

32 Browner, R. **Atomic-fluorescence Spectrometry as an Analytical Technique.** The Analyst, Vol.99, No 1183, pg. 617-643, 1974.

33 Vandecasteele, C.; Block, C. B.; **Modern Methods for Trace Element Determination.** Ed. John Wiley & Sons,1993.

34 Stchur, P.; Yang, K.X., Hou X., Sun, T.; Michel, R.G. **Laser Excited Atomic Fluorescence Spectrometry a Review.** Spectrochimica Acta Part B, Vol. 56, pg. 1565-1592, 2001.

35 Yin, X.; Frech, W.; Hoffmann, E.; Lüdke, C.; Skole, J.; **Mercury speciation by coupling cold vapour atomic absorption spectrometry with flow injection on-line preconcentration and liquid chromatographic separation**, Journal Analytical Chemistry, Vol. 361, pg. 761-766, 1998.

36 Krata, A.; Pyrzynska K.; Bulska, E.; **Use of solid-phase extraction to eliminate interferences in the determination of mercury by flow-injection CV AAS**, Anal. Bioanal. Chem., Vol. 377, pg. 735-739, 2003.

37 Haase, O.; Klare, M.; Rothensee, K.K.; Broekaert, J.A.C.; **Evaluation of the determination of mercury at the trace and ultra-trace levels in the presence of high concentrations of NaCl by flow injection-cold vapour atomic spectrometry using SnCl₂ and NaBH₄ as reductants**, The Analyst, Vol. 123, pg. 1219-1222, 1998.

38 Welz, B.; Sperling, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3rd ed, Ed. Wiley-Vch, 1999.

39 Torres, D. P. **Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio**. Dissertação de Mestrado, UFSC, 2009.

40 Krug, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1. Ed, Ed Piracicaba, 2008.

41 Torres, D. P.; Frescura, V.; Curtius, A. J. **Simple Mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment**. Microchemical Journal, 2009, (In press).

42 Willie, S. N.; Gregoire, C. D.; Sturgeon, R. E. **Determination of Inorganic and Total Mercury in Biological Tissues by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**. The Analyst, Vol. 122, pg. 751-754, 1997.

43 Nobrega, J.A., Santos, M.C., Sousa R.A., Cadore, S., Barnes, R.M., Tatro, M., **Sample preparation in alkaline media**, Spectrochimica Acta Part B, Vol. 61, pg. 465-495, 2006.

44 Kan, M.; Willie, S. N.; Scriver, C.; Sturgeon, R. E. **Determination of total mercury in biological samples using flow injection CVAAS following tissue solubilization in formic acid**. Talanta, Vol. 68, p. 1259-1263, 2006.