

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAOLLA RISSI SILVA HERMANN

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE MERCÚRIO ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) EM  
MATERIAL BIOLÓGICO POR GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (CVG-AAS)**

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PAOLLA RISSI SILVA HERMANN

**ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE MERCÚRIO ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) EM  
MATERIAL BIOLÓGICO POR GERAÇÃO QUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA (CVG-AAS)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes

Orientador

Porto Alegre

2020

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela formação de excelência e crescimento pessoal e científico. Aos docentes do Instituto de Química por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes por me acolher em seu laboratório e pela orientação e paciência ao longo de todos os anos no qual fui bolsista de iniciação científica. Obrigada pela amizade construída e pelas discussões científicas que foram essenciais para minha formação.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Química Analítica Aplicada pela amizade e colaboração. Em especial à Camila e ao técnico Alan por toda ajuda. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Rosângela e Paulo, por priorizarem e apoiarem minha educação. Obrigada por todo o amor e dedicação, e por me proporcionarem o privilégio de me dedicar exclusivamente aos estudos.

Ao Fabiano pela paciência e companheirismo ao longo dessa jornada. Obrigada pela motivação e apoio, tornando tudo isso mais fácil.

Aos meus avós e ao meu irmão por todo o auxílio e por compreenderem a minha ausência.

À todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A ingestão de alimentos, seja de origem animal ou vegetal, é atualmente uma das principais causas de exposição a elementos químicos potencialmente tóxicos. Embora seja extensamente discutido na literatura que alguns elementos são essenciais à saúde humana, outros, como é o caso do mercúrio (Hg), possuem elevada toxicidade e efeito acumulativo. Os peixes, ainda que se destaquem por compor uma fonte saudável de proteínas e minerais, são uma das principais vias de intoxicação por Hg. Com relação às formas de apresentação do elemento, a espécie orgânica, principalmente encontrada na forma de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), possui maior toxicidade em comparação com a forma inorgânica  $\text{Hg}^{2+}$ . Com isso, destaca-se a importância da análise de especiação química de Hg para avaliação dos potenciais riscos à saúde humana. Nesse contexto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia analítica para análise de especiação química de Hg em peixes. Uma mistura de  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada como solução extratora sob aquecimento assistido por radiação micro-ondas (MAE). Os principais parâmetros reacionais da técnica de geração química de vapor (CVG) acoplada à espectrometria de absorção atômica (AAS) foram otimizados para a determinação quantitativa de  $\text{Hg}^{2+}$  e Hg total. Para a determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{HCl}$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaBH}_4$   $0,1\%$  (m/v) foram utilizados, enquanto que para Hg total usou-se  $\text{HCl}$   $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaBH}_4$   $0,2\%$  (m/v) após oxidação química com  $\text{KMnO}_4$   $2\%$  (m/v). O fluxo de Ar permaneceu constante em  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . Os limites de detecção obtidos para  $\text{Hg}^{2+}$  e Hg total foram de  $28,2$  e  $10,8 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente. A exatidão do método foi avaliada através do uso de material de referência certificado, de matriz sedimento de estuário, e testes de adição de analito, alcançando-se recuperações quantitativas para ambas as espécies de Hg. Ainda, a exatidão foi avaliada comparando a concentração de Hg total obtida após MW-AD, que apresentou limite de detecção de  $14,7 \text{ ng g}^{-1}$ . Posteriormente, o método desenvolvido foi aplicado para análise de 6 amostras de peixe. Três amostras apresentaram valores de Hg total de 4 a 9 vezes superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira, de  $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Por fim, o método mostrou-se com precisão e exatidão adequadas para análise de especiação química de Hg em peixes, atendendo limites estabelecidos tanto pela legislação brasileira quanto por legislações internacionais.

**Palavras-Chave:** Mercúrio, Peixes, Análise de Especiação Química, CVG-AAS, Contaminação Alimentar.

## ABSTRACT

The consumption of contaminated food of animal or vegetal origin is the main source of human exposure to toxic elements. Although some elements are essential to human metabolism and toward enzymatic functions of body, others such as mercury (Hg) are harmful and has a bioaccumulative effect. Fish is classified as a healthy food due to high content of minerals, proteins, and unsaturated fatty acids. However, the consumption of fish can be a main source of exposure to Hg contamination. Moreover, the toxicity effect of Hg is dependent on chemical form, and the organic form of methylmercury ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) has higher toxicity than inorganic form ( $\text{Hg}^{2+}$ ). For these reasons, the individual concentrations of chemicals species should be reported instead of total concentration of analyte to assessment potential risks of exposure to contaminated food. In view of this aspect, the target of this study was to develop an analytical method to perform the chemical speciation analysis of Hg in fish. A microwave-assisted extraction (MAE) using  $6 \text{ mol L}^{-1}$  HCl and  $0.25 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl was applied in the sample preparation step. The operational parameters of atomic absorption spectrometry (AAS) coupled to chemical vapor generation (CVG) were optimized for quantitative determination of  $\text{Hg}^{2+}$  and total Hg. For determination of  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl and 0.1% (m/v)  $\text{NaBH}_4$  were used as carrier and reducing agent, respectively. Prior to determination of total Hg, 2% (m/v)  $\text{KMnO}_4$  was added to sample aliquot to convert the organic form ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) to inorganic form ( $\text{Hg}^{2+}$ ). The CVG conditions of  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  HCl and 0.2% (m/v)  $\text{NaBH}_4$  were used as carrier and reducing agent, respectively. Argon was used as carrier gas at flow rate of  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . The limits of detection for determination of  $\text{Hg}^{2+}$  and total Hg were  $28.2$  e  $10.8 \text{ ng g}^{-1}$ , respectively. The accuracy of proposed method was evaluated using a certified reference material of estuarine sediment and analyte addition tests. An agreement with certified values and a quantitative recoveries were achieved for both species of Hg. Accuracy was also evaluated by correlation between the sum of  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  from the speciation analysis and total Hg determination after microwave-assisted digestion (MW-AD). Using MW-AD method, the limit of detection was  $14.7 \text{ ng g}^{-1}$ . After optimization of proposed CVG-AAS method, six commercial samples were analyzed and three of the analyzed samples showed concentration of total Hg of 4 to 9 times higher than the maximum limit specified in the Brazilian Regulatory Standards of  $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . The level of accuracy and precision of proposed method agreed with recommended quality control criteria to perform the chemical speciation analysis of Hg in fish samples required the maximum limits by Brazilian and International Legislation.

**Keywords:** Mercury, Fish, Chemical Speciation Analysis, CVG-AAS, Food Contamination.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das amostras analisadas.....	19
Tabela 2 – Parâmetros operacionais para análise de especiação química de Hg por CVG-AAS.....	31
Tabela 3 – Parâmetros de mérito para análise de especiação química de Hg por CVG-AAS.....	32
Tabela 4 – Resultados para determinação de Hg total, após MW-AD, e das espécies químicas, após MAE. ....	34
Tabela 5 – Resultados para avaliação da estabilidade das espécies de Hg durante o processo de extração. ....	35
Tabela 6 – Avaliação da exatidão pelo uso de material de referência certificado. ....	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático dos métodos de preparo de amostra para determinação de Hg total e análise de especiação química. ....	20
Figura 2 – Esquema do sistema de injeção para determinação de Hg via CVG-AAS. ....	21
Figura 3 – Avaliação da influência das vazões de HCl e NaBH <sub>4</sub> na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl 1 mol L <sup>-1</sup> , NaBH <sub>4</sub> 0,5% (m/v) e Ar 50 mL min <sup>-1</sup> . Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de 10 µg L <sup>-1</sup> de Hg. ....	23
Figura 4 – Avaliação da influência da concentração de NaBH <sub>4</sub> na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl 1 mol L <sup>-1</sup> e 6,2 mL min <sup>-1</sup> , NaBH <sub>4</sub> 3,0 mL min <sup>-1</sup> e Ar 50 mL min <sup>-1</sup> . Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de 10 µg L <sup>-1</sup> de Hg.....	24
Figura 5 – Avaliação da influência da vazão de Ar na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl 1 mol L <sup>-1</sup> e 6,2 mL min <sup>-1</sup> , NaBH <sub>4</sub> 0,75% (m/v) e 3,0 mL min <sup>-1</sup> . Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de 10 µg L <sup>-1</sup> de Hg. ....	25
Figura 6 – Perfil analítico para uma solução de referência de 10 µg L <sup>-1</sup> de Hg <sup>2+</sup> para diferentes vazões de Ar.....	26

## LISTA DE ABREVIações

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CRM – Material de Referência Certificado (do inglês, *Certified Reference Material*)

CVG – Geração Química de Vapor (do inglês, *Chemical Vapor Generation*)

EDL – Lâmpada de Descarga sem Eletrodo (do inglês, *Electrodeless Discharge Lamp*)

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês, *European Food Safety Authority*)

FDA – Administração de Alimentos e Fármacos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

FIAS – Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis System*)

GLS – Separador Gás-Líquido (do inglês, *Gas-Liquid Separator*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

$m_0$  – Massa Característica

MAE – Extração Assistida por Radiação Micro-ondas (do inglês, *Micro-wave Assisted Extraction*)



MW – Micro-ondas (do inglês, *Micro-wave*)

MW-AD – Decomposição Assistida por Radiação Micro-ondas (do inglês, *Micro-wave Assisted Digestion*)

PP – Polipropileno

PTFE – Politetrafluoretileno

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – Rotações por Minuto

SD – Desvio Padrão (do inglês, *Standard Deviation*)

TMAH – Hidróxido de tetrametilamônio

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 MERCÚRIO .....	10
1.2 CONTAMINAÇÃO DE Hg EM PEIXES.....	11
1.3 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Hg.....	12
<b>1.3.1 Técnicas de preparo de amostras para análise de especiação química de Hg</b> .....	13
<b>1.3.2 Análise de especiação química de Hg por CVG-AAS</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	18
3.1 MATERIAIS E REAGENTES .....	18
3.2 AMOSTRAS.....	18
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	19
<b>3.3.1 Decomposição Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD)</b> .....	19
<b>3.3.2 Extração Assistida por Radiação Micro-ondas (MAE)</b> .....	19
3.4 INSTRUMENTAÇÃO CVG-AAS .....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
4.1 AVALIAÇÃO DO USO DA LÂMPADA DE DEUTÉRIO COMO CORRETOR DE FUNDO .....	22
4.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CVG-AAS PARA DETERMINAÇÃO DE Hg APÓS MW-AD .....	22
4.3 AVALIAÇÃO DA MW-AD PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg TOTAL EM PEIXES.....	27
4.4 AVALIAÇÃO DA MAE PARA EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> E Hg <sup>2+</sup> EM PEIXES.....	28
4.5 PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA DETERMINAÇÃO SELETIVA DAS ESPÉCIES DE Hg APÓS MAE.....	30
4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO.....	31
4.7 QUANTIFICAÇÃO SELETIVA DAS ESPÉCIES DE Hg NAS AMOSTRAS DE PEIXE POR CVG-AAS .....	33
4.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES DE Hg DURANTE A MAE	35
4.9 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO .....	36
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) é um elemento químico de ocorrência natural onipresente no meio ambiente, sendo encontrado em rochas, solos e poeira vulcânica. Embora a principal fonte de emissão de Hg seja biogênica, as atividades antropogênicas têm contribuído fortemente para o aumento de seu desprendimento na natureza (STEIN *et al.*, 1996). Sua liberação na atmosfera ocorre, predominantemente, durante a queima de combustíveis fósseis, em especial o gás natural, cuja utilização tem aumentado ao longo dos anos (DE LACERDA *et al.*, 2007). Na indústria, alguns de seus principais usos são: extração de metais, principalmente ouro e prata; produção de cloro-álcali; produtos consumíveis, tais como baterias, termômetros, eletrodos, lâmpadas fluorescentes e produtos farmacêuticos (FAUSER *et al.*, 2011). Todos esses fatores contribuem para a poluição ambiental e, conseqüentemente, aumentam os riscos à saúde humana.

O Hg está disponível na natureza em três diferentes formas: *i*) Hg elementar ( $\text{Hg}^0$ ), *ii*) Hg inorgânico ( $\text{Hg}_2^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ), *iii*) Hg orgânico. Embora a forma elementar seja a mais abundante na atmosfera, a espécie orgânica, mais comumente encontrada na forma de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , MeHg), é a mais tóxica. Sua taxa de absorção, muitas vezes, excede 90% da ingestão oral e apresenta um tempo de vida no corpo humano de 80 dias, aproximadamente o dobro das espécies inorgânicas (EFSA, 2012). Além disso, o MeHg é classificado como potencialmente carcinogênico a humanos, diferentemente das formas elementar e inorgânica do elemento (IARC, 1993).

O principal alvo de ação do MeHg no corpo humano é o sistema nervoso. Uma vez absorvido, sua distribuição se dá em todos os tecidos do corpo, sendo a concentração encontrada no cérebro seis vezes superior à do sangue. Como característica neuropatológica, ocorrem alterações nas funções visuais, auditivas e, principalmente, motoras, ocasionadas pela degeneração do cerebelo. Em casos severos, os danos são irreversíveis devido à destruição das células neurais (WHO, 1900).

## 1.2 CONTAMINAÇÃO DE Hg EM PEIXES

Dentre os alimentos de origem animal, o peixe se destaca por compor uma alimentação saudável, sendo uma importante fonte de proteínas de alta qualidade, minerais e ácidos graxos essenciais, como o ômega-3 (GUARDIA; GUARRIGUES, 2015). Sua produção vem aumentando ao longo dos anos, com um acréscimo de 4,5 e 4,9% nos anos de 2018 e 2019, respectivamente. Estima-se que o consumo anual de peixe no Brasil seja de 9 a 10 kg por habitante (PEIXEBR, 2019, 2020).

Contudo, o peixe é considerado uma das principais vias de intoxicação alimentar de Hg. Isso se deve à sua alta capacidade de bioacumulação, especialmente na forma orgânica. Sendo assim, maiores concentrações de MeHg são encontradas em peixes de maior tamanho e, conseqüentemente, de mais alto nível trófico na cadeia alimentar. Alta estabilidade, lipossolubilidade e tendência à formação de ligações com grupamentos sulfidrilas (-SH) de proteínas favorecem sua bioacumulação (ULLRICH *et al.*, 2001).

Embora  $Hg^0$  seja a forma predominante no meio ambiente, quando depositado no ambiente aquático os agentes oxidantes, como oxigênio e íons nitrito e nitrato, sob condições anaeróbicas, facilmente oxidam o Hg para sua forma mais solúvel, o  $Hg^{2+}$  (STEIN *et al.*, 1996). Uma vez na forma inorgânica, as bactérias redutoras de ferro e sulfato presentes nos estuários realizam o processo de metilação do Hg, convertendo-o à forma de MeHg (KERIN *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2012). O resultado dessa transformação é a geração de uma espécie altamente solúvel, tóxica e com capacidade de bioacumulação. Por sua vez, a absorção do MeHg se dará, primeiramente, no fito e bacterioplâncton, tais como algas e cianobactérias. Esses organismos constituem a base da cadeia alimentar e irão determinar a acumulação de MeHg ao longo dos níveis tróficos superiores. Como prova, enquanto a concentração de MeHg não excede 5% do Hg total existente em estuários e águas marinhas, em peixes predadores seu conteúdo alcança valores superiores a 80% (ULLRICH *et al.*, 2001).

No Brasil, o órgão responsável por estipular os limites máximos de contaminantes em alimentos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 42 de 29 de agosto de 2013, foi estabelecido o limite máximo de Hg total de  $0,5 \mu g g^{-1}$  para peixes não predadores e  $1,0 \mu g g^{-1}$  para peixes predadores. Essa resolução incorpora-se ao

Regulamento Técnico MERCOSUL e vale, portanto, em todos os países participantes (ANVISA, 2013).

Com relação às legislações internacionais, a *European Environment Agency* (EEA), órgão pertencente à União Europeia, através da resolução nº 1881 de 2006, fixou como  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  o limite máximo de Hg total para peixes predadores e de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  para peixes não predadores (EEA, 2006). Já nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) conjuntamente a *Environmental Protection Agency* (EPA) estipulou um limite máximo de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg total em peixes (EPA, 2000).

Entretanto, essas legislações estabelecem critérios apenas para a concentração de Hg total e não sobre suas diferentes espécies químicas. Informações acerca das concentrações das principais espécies de Hg ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) são fundamentais, uma vez que o conteúdo de Hg total não traz evidências sobre a sua toxicidade e a exposição humana ao Hg. Além disso, em peixes, a espécie mais tóxica ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) está presente majoritariamente. Portanto, destaca-se a importância de métodos analíticos que permitam a identificação e a quantificação tanto da forma inorgânica quanto da forma orgânica de Hg, de modo que seja possível garantir a segurança alimentar nacional.

### 1.3 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Hg

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (IUPAC, 2000) define os seguintes termos:

- i) Espécie química: forma específica de um elemento, definida de acordo com sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou estrutura molecular.
- ii) Análise de especiação: atividade analítica de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas individuais presentes em uma amostra.

A relevância da análise de especiação química é representada pelos inúmeros trabalhos publicados acerca do assunto. Diversas matrizes já foram avaliadas, tais como solos, sedimentos, alimentos e materiais biológicos. Dentre os elementos estudados estão o Hg, As, Cr, Se, Sb. (CORNELIS, 2005). Tradicionalmente, a toxicidade desses elementos é avaliada quanto ao estado de oxidação e/ou forma química.

Os principais desafios dos métodos de análise de especiação química estão relacionados ao emprego de técnicas de preparo de amostras que utilizem

condições brandas, a fim de garantir a integridade das espécies químicas. A interconversão das espécies pode ser observada em condições agressivas, como no uso de ácidos inorgânicos concentrados e altas temperaturas. Por outro lado, é preciso utilizar técnicas quantitativas altamente seletivas e com sensibilidade adequada para detecção em níveis de concentração da ordem de partes por bilhão (CORNELIS, 2005).

Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos para análise de especiação química ainda é requerido, principalmente, para estudo de toxicidade alimentar.

### **1.3.1 Técnicas de preparo de amostras para análise de especiação química de Hg**

Uma vez que a maioria dos alimentos, incluindo o peixe, está presente no estado sólido, uma etapa de preparo de amostra prévia à determinação é necessária, tendo em vista que a maior parte das técnicas analíticas exigem a introdução da amostra no estado líquido. Entretanto, para análise de especiação química essa etapa é crítica, pois é fundamental que ocorra a completa remoção do analito da matriz mantendo a integridade das espécies em solução, ou seja, sem que haja conversão de uma espécie química em outra. Para isso, técnicas de extração baseadas no uso de solvente extrator aliado a uma fonte energética, seja ultrassom, micro-ondas ou aquecimento convencional, são frequentemente empregadas.

Ao longo dos anos, inúmeros métodos de extração destinados à análise de especiação química de Hg em peixes foram desenvolvidos. Alguns trabalhos apresentaram propostas para a extração de apenas uma das espécies, seja MeHg (VÁZQUEZ *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2009) ou Hg<sup>2+</sup> (ALONSO *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2009). Com relação à extração de ambas as espécies, que engloba a maioria dos trabalhos publicados, não há um consenso entre os autores. Em estudo desenvolvido por Segade e Tyson (SEGADE; TYSON, 2003), foram avaliadas como soluções extratoras o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% (v/v) e o HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. Os procedimentos de extração avaliados foram agitação magnética por 3 h e aquecimento assistido por radiação micro-ondas (MW) a 60 W por 3 min. Recuperações quantitativas foram obtidas com o uso combinado de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e radiação MW. Embora recuperações similares tenham sido alcançadas com agitação magnética, o tempo foi um fator determinante para a escolha do uso de MW.

Parâmetros semelhantes foram empregados por Kaercher e colaboradores (KAERCHER *et al.*, 2005). O uso de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> aliado ao programa de aquecimento assistido por radiação MW a 80 W por 3 min, promoveu a extração quantitativa das espécies de Hg. Já para Nevado e colaboradores (NEVADO *et al.*, 2006), o procedimento de extração que propiciou recuperações quantitativas fez uso de TMAH 25% (v/v) e radiação MW a 180 °C.

Entretanto, outras soluções extratoras também foram sugeridas. Linhart e colaboradores (LINHART *et al.*, 2019) avaliaram nove diferentes soluções para extração das espécies orgânicas e Hg<sup>2+</sup> em amostras de peixe. O uso da mistura TMAH 6,25% (v/v) e HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> associado ao refluxo a 75 °C por 30 min promoveu alta eficiência de extração sem conversão entre as espécies. Shah e colaboradores (SHAH *et al.*, 2012) propuseram o uso de NaOH 5 mol L<sup>-1</sup> como solução extratora e um programa de aquecimento feito com auxílio de radiação MW a 540 W por 5 min. As recuperações foram quantitativas para todas as amostras analisadas.

Reyes e colaboradores (REYES *et al.*, 2009) estudaram a influência da concentração de HCl na extração das espécies de Hg. Foram avaliadas água e concentrações de HCl 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mol L<sup>-1</sup>. Os autores verificaram que Hg<sup>2+</sup> não era extraído com o uso de água e HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, e que recuperações acima de 80% só eram atingidas a partir de HCl 5 mol L<sup>-1</sup>. Para MeHg, as recuperações foram maiores que 80% utilizando solução ácida a partir de 1 mol L<sup>-1</sup>. Com o objetivo de aumentar a eficiência de extração para Hg<sup>2+</sup>, os autores avaliaram a influência da adição de NaCl em faixas de concentração até 1 mol L<sup>-1</sup>, mantendo a concentração de HCl em 5 mol L<sup>-1</sup>. Observou-se que em concentrações de NaCl a partir de 0,25 mol L<sup>-1</sup> recuperações de 98 a 100% eram alcançadas para Hg<sup>2+</sup>, enquanto que as recuperações para MeHg não foram afetadas em nenhuma faixa de concentração de NaCl. Dessa forma, a solução extratora selecionada foi a mistura de HCl 5 mol L<sup>-1</sup> e NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>. O programa de aquecimento empregado consistiu de radiação MW a 60 °C por 10 min.

Em vista da diversidade dos procedimentos de extração presentes na literatura para análise de especiação química de Hg, faz-se necessária uma avaliação quanto ao procedimento que melhor se aplica à técnica de quantificação, nesse caso, a geração química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica (CVG-AAS).

### 1.3.2 Análise de especiação química de Hg por CVG-AAS

A análise de especiação química de Hg, em sua grande parte, é feita através de métodos cromatográficos, onde há a hifenação de uma técnica de separação com uma técnica de quantificação. Dentre as técnicas de separação, a cromatografia a gás (GC) é a mais usual, sendo aplicada a compostos voláteis e semi-voláteis, embora a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) também seja utilizada (GAO *et al.*, 2012). Dentre as técnicas de quantificação encontram-se a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS), espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (URÍA; SANZ-MEDEL, 1998).

Ainda que os métodos cromatográficos sejam eficientes para análise de especiação química e alcancem limites de detecção extremamente baixos (na faixa de partes por trilhão - ppt), algumas desvantagens são encontradas. Na análise por GC-AFS, amostras com alto teor de íons cloreto e ricas em material orgânico tendem a inibir o pico cromatográfico do MeHg. Além disso, a presença de sulfetos gera uma interferência química em sua determinação, podendo torná-la até impossível (YANG *et al.*, 2009). No caso do tecido muscular de peixe, esses fatores são extremamente relevantes, tendo em vista a sua composição química rica em proteínas com grupamentos -SH.

Nesse sentido, uma alternativa ao uso dos métodos cromatográficos é o emprego da CVG-AAS, que é uma técnica de baixo custo operacional e disponível na maioria dos laboratórios de química analítica. Como vantagens podemos ressaltar a completa separação do analito da matriz e a sua alta eficiência de transporte até o atomizador, contribuindo para aumento de sensibilidade e, conseqüentemente, menores limites de detecção (DÉDINA; TSALEV, 1995). Entretanto, o uso da CVG-AAS para a análise de especiação química de Hg, apresenta como desvantagem a necessidade de duas etapas de quantificação, sendo uma destinada para determinação de Hg total e outra para determinação de  $Hg^{2+}$ , com a concentração de MeHg estimada por diferença. Ainda, como desvantagem, destaca-se a impossibilidade de quantificar mais de uma forma orgânica de Hg, tais como etilmercúrio e fenilmercúrio.



Diferentes métodos para análise de especiação química de Hg a partir da CVG-AAS já foram propostos na literatura. Segade e Tyson (SEGADE; TYSON, 2003) propuseram a redução seletiva com diferentes concentrações de agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) para amostras biológicas e sedimentos. Mercúrio total foi determinado usando  $\text{NaBH}_4$  0,75% (m/v), enquanto que  $\text{Hg}^{2+}$  foi determinado seletivamente após redução com  $\text{NaBH}_4$  0,0001% (m/v). Nessa condição o sinal para MeHg foi insignificante. Kaercher e colaboradores (KAERCHER *et al.*, 2005) desenvolveram um método de especiação química baseada na diferença de temperatura do atomizador, mantendo fixa a concentração dos reagentes. Com a cela de quartzo a temperatura ambiente, apenas o  $\text{Hg}^{2+}$  foi determinado. Por outro lado, quando a cela de quartzo (atomizador) foi aquecida a 650 °C, a decomposição do  $\text{CH}_3\text{HgH}$  foi observada e a sensibilidade de ambas as espécies foram similares. Dessa forma, Hg total foi determinado.

Uma outra alternativa para análise de especiação química, proposta por Torres e colaboradores (TORRES *et al.*, 2009) para amostras biológicas, é baseada no método de oxidação. Primeiramente, é feita apenas a determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ . Em um segundo momento, é adicionado à solução da amostra um agente oxidante ( $\text{KMnO}_4$  2% (m/v)) e, transcorridos 2 minutos, é feita a determinação de Hg total. Nesse caso, há o rompimento da ligação Hg-C, convertendo todo MeHg a  $\text{Hg}^{2+}$ . Uma alternativa ao  $\text{KMnO}_4$  é o uso de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ou  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  como agentes oxidantes (FARIAS *et al.*, 2009; SHAO *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que para todos os métodos citados, a determinação de MeHg se dá pela diferença de concentração entre Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ .

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para análise de especiação química de Hg em peixes empregando a técnica de geração química de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica (CVG-AAS). Ainda, pretende-se aplicar o método proposto a um conjunto de amostras disponível comercialmente, a fim de avaliar o nível de contaminação e riscos à saúde humana.

Tem-se como objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência de diferentes procedimentos de preparo de amostras destinados à análise de especiação química de Hg;
- Investigar a influência dos parâmetros instrumentais do sistema CVG-AAS;
- Avaliar a integridade das espécies de Hg durante o procedimento de preparo de amostras para análise de especiação química, através de testes de adição de analito;
- Avaliar a exatidão do método proposto através do uso de material de referência certificado (CRM), ensaio de recuperação e comparação da concentração de Hg total após decomposição por MW-AD;
- Analisar as amostras de peixe comercializadas no mercado local e comparar os resultados obtidos com o limite máximo permitido pela legislação brasileira;
- Relacionar o conteúdo de Hg presente no peixe com a sua posição na cadeia alimentar marinha.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q®, da Millipore, com resistividade final de 18,2 MΩ cm. Ácido clorídrico (HCl) 10 mol L<sup>-1</sup> e ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 14 mol L<sup>-1</sup>, ambos Merck, foram empregados no preparo das amostras após purificação abaixo do ponto de ebulição em destilador *sub-boiling* (Distillacid, Berghof). Cloreto de sódio (NaCl, Vetec) também foi empregado no preparo das amostras. Soluções de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>, Vetec) foram preparadas diariamente e estabilizadas com hidróxido de sódio (NaOH) 0,2% da mesma marca. Como agente oxidante foi usado permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) 2% (m/v) (Merck) preparado em água a partir da dissolução do sal.

Para a avaliação da exatidão do método proposto, utilizou-se o material de referência certificado (CRM) ERM CC-580, de matriz sedimento de estuário.

A solução padrão estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de Hg<sup>2+</sup> (Merck) foi utilizada, após diluição, para preparo das soluções de calibração e ensaios de recuperação. A solução padrão estoque contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, preparada através da dissolução do sal de CH<sub>3</sub>HgCl (Spectrum Chemical) em água purificada e etanol, foi utilizada para testes de sensibilidade e ensaios de recuperação.

Todas as soluções de referência destinadas à construção das curvas de calibração foram preparadas no mesmo meio ácido das amostras. Nas soluções de calibração para a determinação de Hg total após decomposição, foi mantida a proporção de HNO<sub>3</sub> e HCl. Já para as soluções de referência destinadas à análise de especiação química de Hg após extração, manteve-se a acidez final de HCl em 6 mol L<sup>-1</sup>, porém na ausência da solução de NaCl. Na curva de calibração para a determinação de Hg total, KMnO<sub>4</sub> 2% foi adicionado na mesma proporção das amostras. A faixa de concentração para as curvas de calibração variou de 2,0 a 20,0 µg L<sup>-1</sup>.

#### 3.2 AMOSTRAS

As amostras de peixe utilizadas no presente estudo foram obtidas no comércio local e selecionadas de forma a abranger diferentes níveis tróficos na cadeia alimentar marinha. Peixes de diversas origens foram analisados. Na Tabela 1 são apresentadas as amostras utilizadas no trabalho.

**Tabela 1.** Descrição das amostras analisadas.

<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Origem</b>
Atum	<i>Thunnus spp.</i>	Brasil
Cação azul A	<i>Prionace glauca</i>	Portugal
Cação azul B	<i>Prionace glauca</i>	Taiwan
Cação azul C	<i>Prionace glauca</i>	Espanha
Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Vietnã
Salmão	<i>Salmo salar</i>	Chile

### 3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para os procedimentos de decomposição e extração, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento que consistiu de: *i*) corte do peixe em porções de, aproximadamente, 2 cm; *ii*) secagem em estufa (Ethik Technology) a 60 °C por, aproximadamente, 24 h; *iii*) moagem em moinho criogênico (A11 basic, IKA) com lâmina de impacto; *iv*) seleção granulométrica em peneira metálica com diâmetro de 80 mesh. Todas as amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno (PP) ao abrigo da luz até a análise.

#### 3.3.1 Decomposição Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD)

Para análise de Hg total, uma alíquota de, aproximadamente, 500 mg de amostra foi pesada e transferida aos frascos de quartzo (8NXQ80) do forno de micro-ondas Multiwave PRO (Anton Paar). Após, adicionou-se 1 mL de HCl (10 mol L<sup>-1</sup>) e 5 mL de HNO<sub>3</sub> (14 mol L<sup>-1</sup>). O programa de aquecimento consistiu de duas etapas: *i*) rampa de 10 min até 900 W; *ii*) permanência de 10 min a 900 W. A temperatura máxima atingida foi de, aproximadamente, 200 °C. Após resfriamento, os digeridos foram transferidos a frascos de PP e aferidos a 25 mL com água ultrapura.

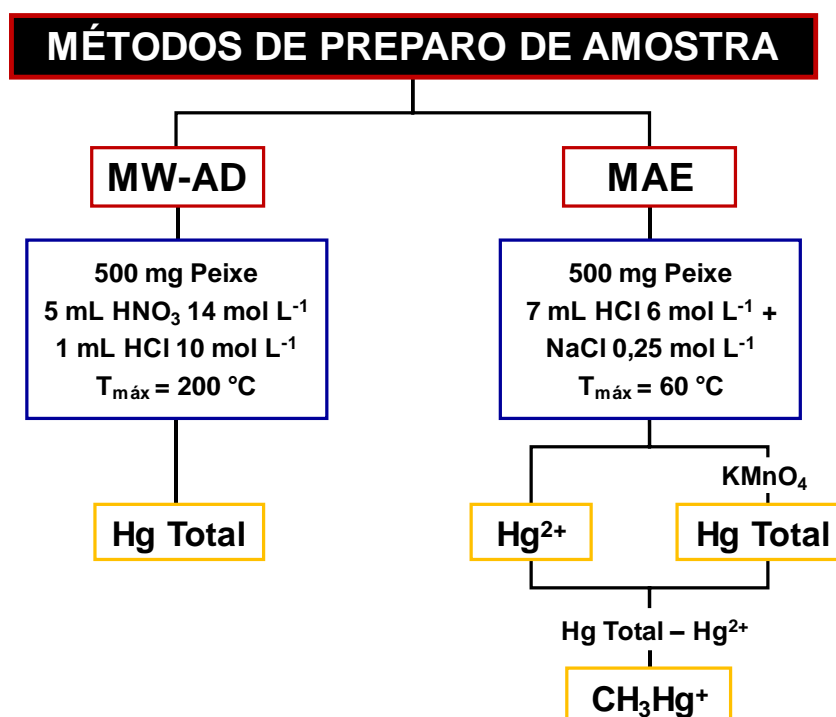
#### 3.3.2 Extração Assistida por Radiação Micro-ondas (MAE)

Para análise de especiação química de Hg, aproximadamente 500 mg de amostra foi pesada e transferida aos frascos de PTFE do forno de micro-ondas Speedwave Four (Berghof). Adicionou-se 7 mL de solução extratora, composta por uma mistura de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>. Os frascos foram submetidos a

um programa de aquecimento que consistiu de duas etapas: *i*) rampa de 3 min até 60 °C; *ii*) permanência de 10 min a 60 °C. A potência utilizada foi de 1305 W (90% da potência máxima de 1450 W).

Os extraídos foram transferidos a frascos de PP, aferidos a 12 mL com água ultrapura e centrifugados (Baby I Centrifuge, Fanem) a 2000 rpm por 5 min para análise do sobrenadante. Todos os frascos foram envoltos em papel pardo e mantidos dentro de um recipiente ao abrigo da luz com o objetivo de evitar a conversão entre as espécies de Hg e assegurar os resultados obtidos. Cabe ressaltar que todas as extrações foram realizadas no mesmo dia da análise.

Um esquema dos métodos de preparo de amostra é apresentado na Figura 1.



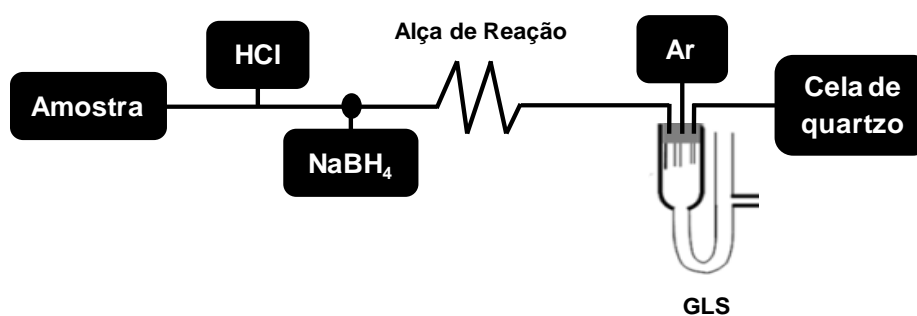
**Figura 1.** Diagrama esquemático dos métodos de preparo de amostra para determinação de Hg total e análise de especiação química.

### 3.4 INSTRUMENTAÇÃO CVG-AAS

As determinações das concentrações de Hg nas amostras foram feitas através da técnica de CVG-AAS, empregando o espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 200, Perkin Elmer) acoplado ao sistema de injeção em fluxo (FIAS 100, Perkin Elmer). A fonte de radiação utilizada foi uma lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL), operando a 220 mA com comprimento de onda de 253,7 nm. A

largura e a altura da fenda espectral foram de 2,7 e 1,05 mm, respectivamente. Todos os resultados foram obtidos em área integrada (abs.s).

O sistema consiste, primeiramente, da injeção da amostra por uma alça de injeção com volume de 500  $\mu\text{L}$ . Após, a amostra entra em contato com o agente carreador (HCl), sendo então acidificada para favorecer a reação de redução. Em seguida, em uma confluência, a solução é misturada ao agente redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) e através da alça de reação, onde ocorre a reação de redução de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$ , é levada ao separador gás-líquido (GLS). No GLS, a matriz é eliminada na forma de resíduo e, com o auxílio de um gás carreador (Argônio, Ar), o vapor de Hg é transportado até a cela de absorção. Uma cela de absorção em quartzo aquecida eletrotermicamente a 100  $^\circ\text{C}$  (controlada pelo sistema FIAS) foi utilizada. A Figura 2 ilustra a montagem do sistema.



**Figura 2.** Esquema do sistema de injeção para determinação de Hg via CVG-AAS.

Para a análise de Hg total a partir do procedimento de extração é necessário promover a completa conversão de MeHg em  $\text{Hg}^{2+}$ . Para isso, previamente à injeção da amostra no sistema, foi adicionado  $\text{KMnO}_4$  2% (m/v) como agente oxidante na proporção de 160  $\mu\text{L}$  para cada 10 mL de amostra, resultando em uma concentração final de 0,032% (m/v). A solução permaneceu em repouso por 3 min, seguida da determinação de Hg total por CVG-AAS.

Assim, a concentração de MeHg é estimada através da Equação 1:

$$[\text{Hg}_{\text{ORGÂNICO}}] = [\text{Hg}_{\text{TOTAL}}] - [\text{Hg}_{\text{INORGÂNICO}}] \quad (1)$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DO USO DA LÂMPADA DE DEUTÉRIO COMO CORRETOR DE FUNDO

Primeiramente, foi feito um estudo para verificar a viabilidade do uso da lâmpada de deutério ( $D_2$ ) como corretor de fundo para determinação de Hg no sistema CVG-AAS. Partindo-se da corrente recomendada pelo fabricante para a lâmpada de EDL de Hg, 220 mA, e das condições de operação padrão para a lâmpada de  $D_2$ , foi observada uma diferença significativa de intensidade, onde a lâmpada de EDL apresentou uma intensidade cerca de 50% superior à de  $D_2$ . Essa observação vai contra um dos princípios de funcionamento do corretor de fundo por fonte contínua, o qual requer que as intensidades de ambas as fontes, primária e contínua, sejam similares (BEATY; KERBER, 1993; LOOS-VOLLEBREGT, 2013).

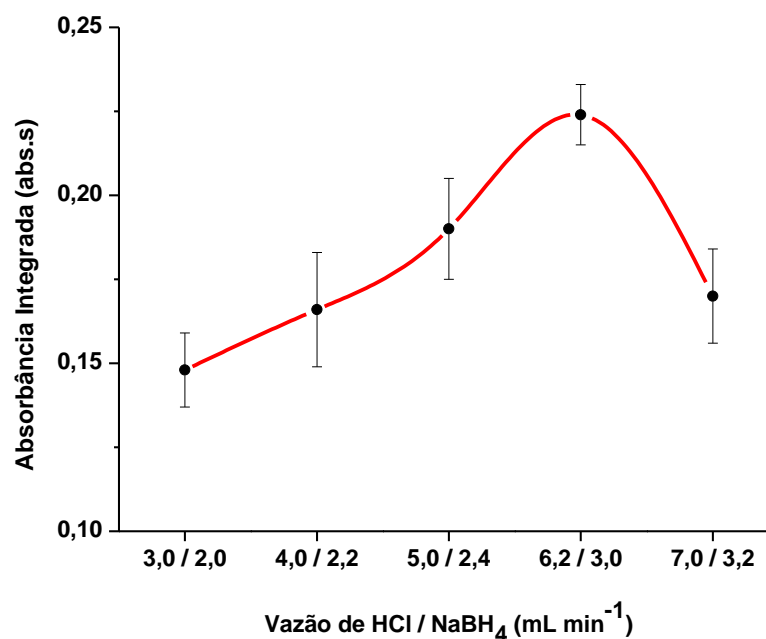
Com o objetivo de suprimir a diferença de intensidade entre as lâmpadas EDL e  $D_2$ , a corrente da lâmpada EDL foi diminuída progressivamente até que intensidades similares fossem alcançadas. Somente foi possível alcançar intensidades equivalentes operando com uma corrente de 110 mA, ou seja, 50% da corrente máxima recomendada pelo fabricante. Entretanto, trabalhando nessa condição foi observado um aumento significativo no ruído instrumental, diminuindo a razão sinal/ruído. Por consequência, diminui-se a precisão dos resultados e limites de detecção maiores são obtidos (WELZ; SPERLING, 1999). Adicionalmente, verificou-se que o efeito de contribuição da absorção não específica (sinal de fundo) foi desprezível. Por essas razões, optou-se por trabalhar sem o uso do corretor de fundo e com a lâmpada EDL operando na corrente de 220 mA.

### 4.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CVG-AAS PARA DETERMINAÇÃO DE Hg APÓS MW-AD

Um estudo univariado dos principais parâmetros reacionais da CVG-AAS foi desenvolvido com o objetivo de encontrar as melhores condições operacionais para determinação de Hg total após o emprego da técnica de MW-AD. A resposta analítica selecionada para avaliação do desempenho foi a absorbância integrada (abs.s) e massa característica ( $m_0$ ). Partindo-se do uso de agente carreador HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, manteve-se essa condição fixa e avaliou-se a influência dos outros parâmetros, tais como concentração de NaBH<sub>4</sub> e vazões de reagentes e de gás carreador. Uma vez que a concentração de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> está bastante

fundamentada nos trabalhos usados como referência (KAERCHER *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2009), optou-se por não avaliá-la. A otimização do sistema CVG-AAS tem por finalidade maximizar a resposta instrumental e, por consequência, a sensibilidade.

Em um primeiro momento, foi feita uma avaliação da influência das vazões de HCl e NaBH<sub>4</sub> na resposta instrumental. Para isso, foi preparada uma solução padrão de 10 µg L<sup>-1</sup> de Hg e manteve-se constante a concentração de NaBH<sub>4</sub> em 0,5% (m/v) e a vazão de Ar em 50 mL min<sup>-1</sup>. O efeito da vazão dos reagentes na eficiência de geração de Hg<sup>0</sup> foi avaliado considerando-se um intervalo de 3,0 a 7,0 mL min<sup>-1</sup> para o HCl e de 2,0 a 3,2 mL min<sup>-1</sup> para o NaBH<sub>4</sub>. Essas vazões correspondem a diferentes rotações da bomba peristáltica do sistema FIAS (45, 60, 75, 90 e 105 rpm), fazendo uso de capilares com diâmetro interno de 1,52 e 1,14 mm para o HCl e NaBH<sub>4</sub>, respectivamente. Os resultados são apresentados na Figura 3.



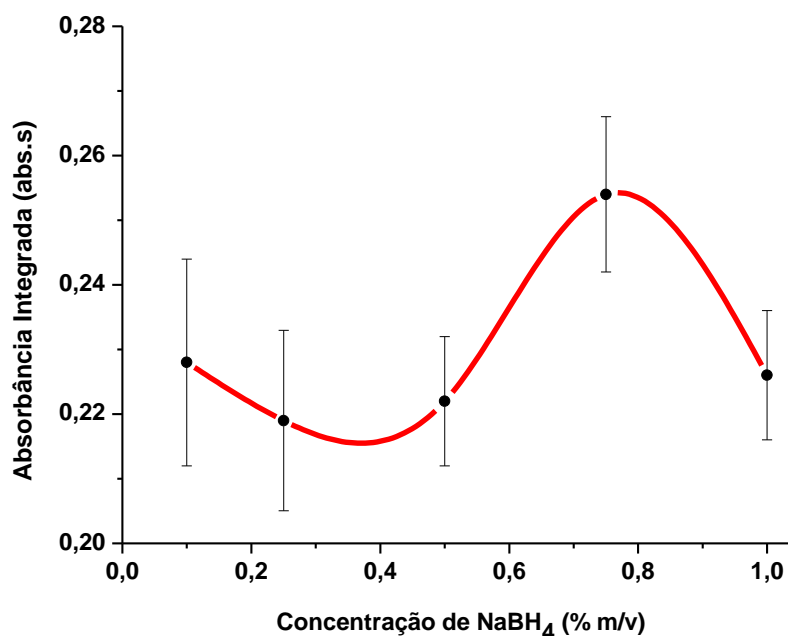
**Figura 3.** Avaliação da influência das vazões de HCl e NaBH<sub>4</sub> na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, NaBH<sub>4</sub> 0,5% (m/v) e Ar 50 mL min<sup>-1</sup>. Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de 10 µg L<sup>-1</sup> de Hg.

De acordo com os resultados, o aumento da vazão até 6,2 mL min<sup>-1</sup> para o HCl e 3,0 mL min<sup>-1</sup> para o NaBH<sub>4</sub> proporcionou um ganho de sensibilidade ao Hg.



Em vazões superiores, uma diminuição do sinal analítico foi observada. Esse comportamento pode estar relacionado com a intensa reação entre os reagentes, favorecendo a efervescência excessiva no GLS e gerando vapor de água que pode condensar na linha de transferência, impedindo o transporte do vapor de Hg até a cela de absorção. Por consequência, uma diminuição de sensibilidade foi observada. Dessa forma, foi escolhida como melhor condição instrumental as vazões de  $6,2 \text{ mL min}^{-1}$  para o HCl e  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  para o  $\text{NaBH}_4$ .

Posteriormente, foi feita a avaliação da influência da concentração de  $\text{NaBH}_4$ , mantendo fixa a vazão dos reagentes e a vazão de Ar em  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . Foram avaliadas concentrações de  $\text{NaBH}_4$  de 0,1 a 1,0% (m/v). Os resultados são mostrados na Figura 4.

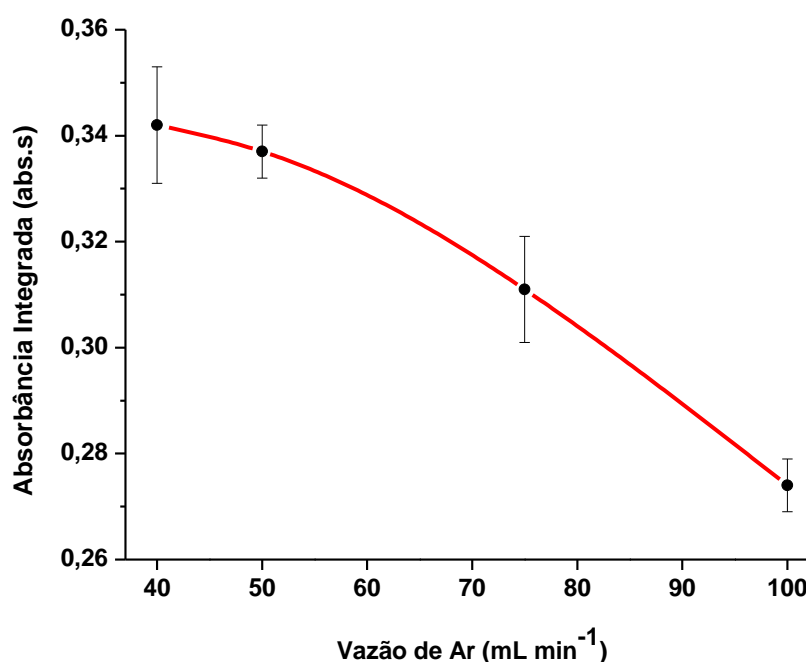


**Figura 4.** Avaliação da influência da concentração de  $\text{NaBH}_4$  na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $6,2 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\text{NaBH}_4$   $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  e Ar  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg.

A partir dos resultados obtidos, a concentração de  $\text{NaBH}_4$  que garantiu uma maior sensibilidade na determinação de Hg foi 0,75% (m/v). Em concentrações inferiores uma diminuição de sensibilidade foi observada, o que pode estar relacionada com a insuficiência de agente redutor, acarretando na incompleta geração de  $\text{Hg}^0$ . Já em concentrações elevadas, como 1,0% (m/v), a alta

efervescência ocasionada pela degradação do  $\text{NaBH}_4$  pode facilitar a transferência de água, bem como impedir o transporte do vapor de Hg ao atomizador, ocasionando perda de sensibilidade. Ainda, altas concentrações de  $\text{NaBH}_4$  acarretam em um aumento da produção de gás  $\text{H}_2$ , diluindo a nuvem atômica e, conseqüentemente, diminuindo a sensibilidade. Sendo assim, a condição escolhida para futuras análises foi  $\text{NaBH}_4$  0,75% (m/v).

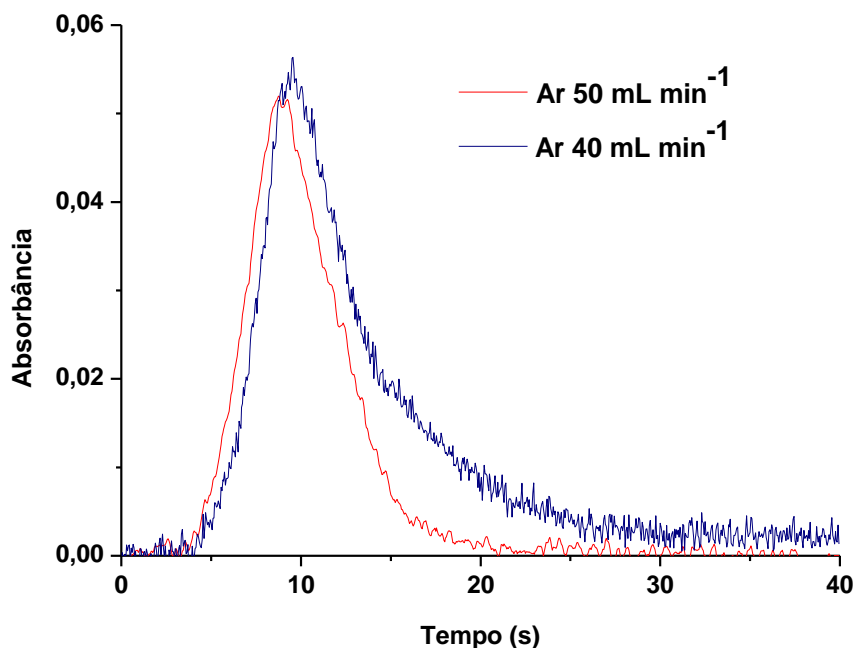
Por fim, após otimizadas as vazões e concentrações de HCl e  $\text{NaBH}_4$ , avaliou-se a influência da vazão de Ar na resposta instrumental. Os resultados estão presentes na Figura 5.



**Figura 5.** Avaliação da influência da vazão de Ar na resposta instrumental, mantendo fixas as seguintes condições: HCl 1 mol L<sup>-1</sup> e 6,2 mL min<sup>-1</sup>,  $\text{NaBH}_4$  0,75% (m/v) e 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Os resultados são reportados com base na média e desvio padrão de 5 determinações de uma solução de referência de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Hg.

Embora a vazão de 40 mL min<sup>-1</sup> tenha alcançado uma maior resposta instrumental, a vazão de 50 mL min<sup>-1</sup> foi a escolhida para prosseguimento do trabalho. Isso se deve a três motivos: *i*) a condição escolhida apresenta menor desvio padrão entre as leituras, *ii*) o perfil analítico gerado em 50 mL min<sup>-1</sup> é gaussiano, enquanto o sinal para a vazão de 40 mL min<sup>-1</sup> é arrastado (Figura 6), *iii*) o sistema FIAS é limitado à graduação de vazão a partir de 50 mL min<sup>-1</sup>, sendo

assim a condição de  $40 \text{ mL min}^{-1}$  é uma medida estimada, gerando flutuação nos resultados.



**Figura 6.** Perfil analítico para uma solução de referência de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  para diferentes vazões de Ar.

A principal dificuldade em se trabalhar com a presença de um sinal arrastado na CVG-AAS está relacionada ao efeito de memória. Essa interferência, diferentemente das geradas por concomitantes, ocorre pela presença de resíduos do próprio analito no caminho óptico, gerando sinais distorcidos e resultados inexatos (WELZ; SPERLING, 1999). Outro ponto negativo são os resultados superestimados. Uma vez que a absorbância é calculada pela área integrada, quanto mais arrastado for o sinal, maior será sua integração e, por consequência, sua absorbância. Uma alternativa para contornar esse problema é fazer uso de menores tempos de integração, a fim de diminuir os ruídos instrumentais e alcançar menores limites de detecção.

Após a otimização, a massa característica ( $m_0$ ) alcançada foi de 49 pg. Esse resultado é da mesma ordem de grandeza que os valores reportados por Kaercher (60 pg) e Silva (38 pg) (KAERCHER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Ainda, é cerca de 2,7 vezes menor que o obtido por Segade e Tyson (135 pg) (SEGADE; TYSON, 2003).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA MW-AD PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE Hg TOTAL EM PEIXES

Com o objetivo de avaliar a exatidão dos resultados da análise de especiação química de Hg em relação aos resultados para a determinação de Hg total após decomposição das amostras (balanço de massa), a MW-AD foi empregada. Inicialmente, o procedimento MW-AD para decomposição de tecido de peixe proposto pelo fabricante do equipamento de MW foi avaliado acerca das condições instrumentais do programa de aquecimento. Para decomposição de 500 mg de tecido de peixe é recomendado o seguinte programa: *i)* rampa de 5 min até 650 W, *ii)* permanência de 10 min a 650 W, *iii)* rampa de 10 min até 1400W, *iv)* permanência de 10 min a 1400 W.

Entretanto, a potência de 1400 W é indicada para a ocupação completa do rotor do equipamento, ou seja, com oito frascos de reação. Para a utilização de apenas quatro frascos de reação, a potência máxima recomendada é de 900 W. Por essa razão, as etapas *iii* e *iv* foram alteradas de 1400 para 900 W, mantendo fixos os tempos de rampa e de permanência. Visto que diversos métodos MW-AD propostos pelo fabricante para decomposição de alimentos compreendem apenas uma única etapa de aquecimento, optou-se por eliminar as etapas *i* e *ii* a fim de reduzir o tempo durante o preparo da amostra. Dessa forma, o programa de aquecimento empregado para a decomposição das amostras de peixe consistiu de duas etapas: *i)* rampa de 10 min até 900 W, *ii)* permanência de 10 min a 900 W.

Com relação aos reagentes usados para a decomposição da amostra, é recomendado pelo fabricante o uso de 6 mL de HNO<sub>3</sub> e 1 mL de HCl, ambos concentrados. O HCl é utilizado como agente complexante, a fim de manter o Hg em solução através da formação de clorocomplexos ([HgCl<sub>3</sub>]<sup>-</sup> e [HgCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>), e o HNO<sub>3</sub> atua como agente oxidante para degradação da matéria orgânica. Uma vez que o volume mínimo de reagentes exigido pelo fabricante é de 6 mL, optou-se por trabalhar com o uso de 5 mL de HNO<sub>3</sub> e 1 mL de HCl. Isso se deve ao menor consumo de reagente, bem como à redução da acidez residual que pode interferir na etapa de determinação por CVG-AAS.

É importante ressaltar que, embora o Hg total possa ser determinado após a MAE, a MW-AD foi empregada para avaliação da exatidão do método proposto, uma vez que possíveis interferências na etapa de determinação por CVG-AAS ocasionadas por materiais orgânicos não digeridos, como proteínas e gorduras, são

eliminados através do uso de ácidos concentrados combinados com altas temperaturas de decomposição.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA MAE PARA EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ E $\text{Hg}^{2+}$ EM PEIXES

A avaliação da MAE foi feita a partir de um balanço de massa entre as concentrações de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . Dessa forma, o somatório das espécies após MAE, que corresponde à concentração de Hg total, foi comparado aos resultados obtidos após MW-AD. Primeiramente, o procedimento de extração desenvolvido por Karcher e colaboradores foi empregado (KAERCHER *et al.*, 2005). O método consiste na utilização de  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  e aquecimento em forno de MW convencional por 3 min a 80 W. Em seguida, a análise de especiação química de Hg é feita através da diferença de temperatura do atomizador, sendo o Hg total determinado a  $650 \text{ }^\circ\text{C}$  e o  $\text{Hg}^{2+}$  determinado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os resultados obtidos após MAE, com relação ao Hg total, representaram apenas 36% ( $3,13 \pm 0,18 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) do alcançado após MW-AD ( $8,62 \pm 0,56 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ). Esse resultado é discordante do obtido pelos autores, onde é relatada uma extração quantitativa de todas as espécies de Hg. Dessa forma, foram executados testes utilizando soluções padrão de  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , a fim de investigar a sensibilidade de ambas as espécies nas diferentes temperaturas do atomizador. Optou-se por trabalhar na temperatura de  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  ao invés de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para evitar a deposição de gotículas de água na cela de quartzo, o que pode contribuir para a perda de sensibilidade e precisão.

Na temperatura de  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , como era esperado, nenhum sinal analítico foi gerado para a solução padrão de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . Entretanto, quando a cela de quartzo foi aquecida a  $650 \text{ }^\circ\text{C}$ , o padrão de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  apresentou uma sensibilidade cerca de 3 vezes menor que o padrão de  $\text{Hg}^{2+}$ . Logo, a análise de especiação química por esse método foi inviável, uma vez que, para a quantificação de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , seriam necessários parâmetros reacionais de geração ou métodos de extração extremamente seletivos para essa única espécie. Caso contrário, os resultados seriam superestimados e o método seria inexato. Não foi possível afirmar se a menor sensibilidade resulta da menor eficiência de geração a partir da espécie orgânica de Hg ou se a atomização não é suficientemente efetiva nessa condição de temperatura.

O método de especiação química de Hg baseado na diferença de concentração do NaBH<sub>4</sub> também foi inviável. Os autores (SEGADE; TYSON, 2003) relatam a possibilidade de determinação de Hg total a partir de uma solução de NaBH<sub>4</sub> 0,75% (m/v), enquanto Hg<sup>2+</sup> pode ser determinado com o uso de NaBH<sub>4</sub> 0,0001% (m/v). Entretanto, no sistema CVG-AAS do presente estudo, não há geração de sinal analítico para CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> a partir de NaBH<sub>4</sub> 0,75% (m/v), o que impossibilita a determinação de Hg total nessas condições. Além disso, uma redução de 50% na sensibilidade ao Hg<sup>2+</sup> foi observada quando diminuiu-se a concentração de NaBH<sub>4</sub> de 0,75 para 0,1% (m/v). Dessa forma, a determinação de Hg<sup>2+</sup> em baixos níveis de concentração fazendo uso de NaBH<sub>4</sub> 0,0001% é dificultada.

Tendo em vista esses resultados, optou-se por avaliar o método de oxidação química por meio da adição de agente oxidante, conforme descrito por Torres e colaboradores (TORRES *et al.*, 2009). Os resultados obtidos demonstraram que a sensibilidade do CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> a 100 °C após a adição de KMnO<sub>4</sub> foi similar à do Hg<sup>2+</sup>, o que comprova a oxidação quantitativa de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> em Hg<sup>2+</sup>. Desse modo, é possível calibrar o equipamento somente com uma espécie de Hg e utilizando uma única etapa de calibração.

Após avaliação da seletividade para as duas espécies químicas de Hg, o agente oxidante foi adicionado a uma alíquota da amostra extraída pelo método desenvolvido por Kaercher e seguiu-se a determinação de Hg total. Contudo, novamente os resultados não foram satisfatórios, apresentando recuperação de 62% (5,38 ± 0,14 µg g<sup>-1</sup>) em relação ao Hg total alcançado após MW-AD. Considerando esses resultados, um novo método de preparo de amostra foi aplicado com o objetivo de aumentar a eficiência de extração. Conforme proposto por Reyes e colaboradores (REYES *et al.*, 2009), adicionou-se à solução extratora NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>; entretanto, manteve-se a concentração de HCl em 6 mol L<sup>-1</sup> de acordo com o trabalho anterior. O procedimento de extração é auxiliado pelo uso de radiação MW a 60 °C por 10 min. Após o procedimento MAE, foi adicionado KMnO<sub>4</sub> a uma alíquota da amostra e o Hg total foi determinado. Recuperações quantitativas de 92% (7,90 ± 0,14 µg g<sup>-1</sup>) foram alcançadas. Os resultados obtidos após MAE foram concordantes com os obtidos após MW-AD, não apresentando diferença estatística significativa a um nível de confiança de 95% (*t-student*). Isso demonstra que a solução extratora composta por HCl 6 mol L<sup>-1</sup> e NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> é eficiente

para extração das espécies de Hg em peixe e, portanto, foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho.

#### 4.5 PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA DETERMINAÇÃO SELETIVA DAS ESPÉCIES DE Hg APÓS MAE

Em consequência do alto teor de matéria orgânica dissolvida na solução final após a MAE, as condições otimizadas anteriormente para determinação de Hg total não puderam ser utilizadas. Isso se deve à alta formação de espuma no GLS, que impede o transporte de  $\text{Hg}^0$  à cela de quartzo e inviabiliza a quantificação de Hg. Essa interferência na resposta instrumental é conhecida como interferência de transporte ou interferência causada por concomitantes (WELZ; SPERLING, 1999).

Para contornar esse problema, duas alternativas são relatadas na literatura: *i)* fazer uso de agente antiespumante, ou *ii)* diminuir significativamente a concentração de HCl e  $\text{NaBH}_4$ . Dessa forma, optou-se pela segunda alternativa e teve-se como base o trabalho desenvolvido por Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2006). Nesse estudo, os autores fazem uso de HCl 3% (v/v) com vazão de  $11 \text{ mL min}^{-1}$  e  $\text{NaBH}_4$  0,02% (m/v) com vazão de  $6 \text{ mL min}^{-1}$ . A vazão de Ar utilizada foi de  $70 \text{ mL min}^{-1}$ .

Embora o trabalho usado como referência faça uso de  $\text{NaBH}_4$  0,02% (m/v), optou-se por usar  $\text{NaBH}_4$  0,1% (m/v) para determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ . Isso se deve pois, como já relatado anteriormente, há uma perda de sensibilidade para o  $\text{Hg}^{2+}$  a partir da redução da concentração de  $\text{NaBH}_4$  de 0,75 para 0,1% (m/v). Portanto,  $\text{NaBH}_4$  0,1% (m/v) foi escolhido como condição de compromisso sem que ocorra redução significativa da sensibilidade da técnica de CVG-AAS. Entretanto, visto a baixa concentração de  $\text{Hg}^{2+}$  presente na amostra e a impossibilidade de uma etapa de diluição, a formação de espuma só pôde ser controlada totalmente com o auxílio de algumas gotas de octanol, usado como agente tensoativo (SILVA, 2015). Contudo, na determinação de Hg total, não foi observada a formação vigorosa de espuma, uma vez que há a etapa de diluição devido à alta concentração de Hg na solução da amostra. Além disso, a adição de  $\text{KMnO}_4$  contribui para a degradação da matéria orgânica, diminuindo a formação de espuma. Dessa forma, foi possível trabalhar com  $\text{NaBH}_4$  0,2% (m/v), que representa uma maior sensibilidade e permite a quantificação do analito em baixas concentrações.

Após modificações, as condições finais que foram utilizadas são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros operacionais para análise de especiação química de Hg por CVG-AAS.

<b>Parâmetro</b>	<b>Hg<sup>2+</sup></b>	<b>Hg total</b>
HCl (mol L <sup>-1</sup> )	0,3	0,3
NaBH <sub>4</sub> (% m/v)	0,1	0,2
Ar (mL min <sup>-1</sup> )	50	50
Vazão de HCl (mL min <sup>-1</sup> )	10,7	10,7
Vazão de NaBH <sub>4</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	6,2	6,2

Cabe ressaltar que nessas condições não há geração de sinal analítico para CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e que, após a adição de KMnO<sub>4</sub>, tanto Hg<sup>2+</sup> quanto CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> alcançam a mesma sensibilidade, conforme testes realizados em solução padrão contendo 10 µg L<sup>-1</sup> de cada espécie separadamente. Isso comprova a possibilidade da análise de especiação química de Hg empregando o sistema CVG-AAS e agente oxidante.

#### 4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os parâmetros de mérito do método para análise de especiação química de Hg em peixes são apresentados na Tabela 3. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados seguindo o critério de 3 e 10 vezes o desvio padrão, respectivamente, de dez determinações consecutivas do branco analítico dividido pelo *slope* da curva de calibração. As médias dos brancos analíticos não foram levadas em consideração no cálculo devido aos valores negativos. Para a MAE, considerou-se o uso de 500 mg de amostra em um volume final de 12 mL, enquanto que para MW-AD considerou-se o uso de 500 mg em um volume final de 25 mL, para o cálculo do LD e do LQ em ng g<sup>-1</sup>.



**Tabela 3.** Parâmetros de mérito para análise de especiação química de Hg por CVG-AAS.

Parâmetro	Hg total <sup>a</sup>	Hg <sup>2+</sup> b	Hg total <sup>b</sup>
LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	0,293	1,18	0,452
LD, $\eta\text{g g}^{-1}$	14,7	28,2	10,8
LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$	0,978	3,92	1,51
LQ, $\eta\text{g g}^{-1}$	48,9	94,1	36,2
Equação de regressão linear	$y=0,045x-0,001$	$y=0,020x-0,003$	$y=0,036x-0,054$
Coeficiente de correlação, r	0,9994	0,9987	0,9964

a. MW-AD

b. MAE

Os LDs obtidos para Hg total e Hg<sup>2+</sup> após MAE foram 10,8 e 28,2  $\text{ng g}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores são da mesma ordem de grandeza dos reportados por Torres e colaboradores utilizando o sistema CVG-AAS, de 16 e 20  $\text{ng g}^{-1}$  para Hg total e Hg<sup>2+</sup>, respectivamente (TORRES *et al.*, 2009). Ainda, o LD obtido para Hg total no presente estudo está cerca de 4 vezes inferior ao reportado em um segundo trabalho de Torres e colaboradores, de 40  $\text{ng g}^{-1}$  (TORRES *et al.*, 2009). Em outro estudo que utiliza o sistema CVG-AAS para análise de especiação química de Hg em peixes, o LD reportado para a espécie Hg<sup>2+</sup> foi de 133  $\text{ng g}^{-1}$ , cerca de 4,7 vezes superior ao encontrado no presente trabalho (SHAH *et al.*, 2012).

O LQ obtido para Hg total após MAE foi 36,2  $\text{ng g}^{-1}$ , cerca de duas vezes inferior ao reportado por Kaercher e colaboradores no sistema CVG-AAS, de 68  $\text{ng g}^{-1}$ . Entretanto, para a espécie Hg<sup>2+</sup>, o LQ obtido foi 94,1  $\text{ng g}^{-1}$ , 1,7 vezes superior ao encontrado pelos autores, de 54  $\text{ng g}^{-1}$  (KAERCHER *et al.*, 2005).

Além disso, o sistema CVG-AAS do presente estudo alcançou limites de detecção de mesma magnitude daqueles obtidos por outras técnicas de determinação. No estudo desenvolvido por Nevado e colaboradores para análise de especiação química de Hg em tecido biológico por CV-AFS, os LDs reportados foram de 4  $\text{ng g}^{-1}$  para Hg total e de 26  $\text{ng g}^{-1}$  para Hg<sup>2+</sup> (NEVADO *et al.*, 2006). Já em relatório desenvolvido pela FDA para determinação de Hg total e CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> em frutos do mar por HPLC-ICP-MS, o LD alcançado para Hg total foi de 6,5  $\text{ng g}^{-1}$ , similar ao encontrado no presente trabalho (FDA, 2008).

Com relação à determinação de Hg total por CVG-AAS após MW-AD, o LD obtido foi 14,7  $\text{ng g}^{-1}$ , cerca de 3 vezes superior ao obtido por Silva e colaboradores,

de 4,8 ng g<sup>-1</sup> (SILVA *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que os LQs alcançados para Hg total após MW-AD e após MAE foram cerca de 10 vezes inferiores ao limite máximo permitido para Hg total em peixes não predadores (0,5 µg g<sup>-1</sup>) e cerca de 20 vezes inferior ao limite máximo para peixes predadores (1,0 µg g<sup>-1</sup>). Esses resultados demonstram que o método proposto atende os limites estabelecidos tanto pela legislação brasileira quanto por legislações internacionais.

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO SELETIVA DAS ESPÉCIES DE Hg NAS AMOSTRAS DE PEIXE POR CVG-AAS

Após os procedimentos de decomposição e extração, foram determinadas as concentrações de Hg total e das espécies químicas (Hg<sup>2+</sup> e CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>), respectivamente. Todos os resultados são expressos como a média e o desvio padrão (SD) da triplicata de amostras. Para MeHg, o SD foi calculado pela forma expandida com base na Equação 2.

$$SD_{\text{ORGÂNICO}} = \sqrt{SD_{\text{TOTAL}}^2 + SD_{\text{INORGÂNICO}}^2} \quad (2)$$

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Para avaliação do método de preparo de amostra, as concentrações de Hg total após MW-AD e MAE foram submetidas a um teste estatístico (*t-student*) e não apresentaram diferença significativa com 95% de confiança. Isso significa que o método MAE foi efetivo, correspondendo à completa remoção do analito da matriz.

Conforme observado na Tabela 4, foi possível quantificar tanto Hg total quanto suas espécies químicas nas amostras, com exceção das amostras de panga e salmão, cujos resultados encontrados estão abaixo do LD nas condições do sistema otimizado, descrito na seção 4.2.

**Tabela 4.** Resultados para determinação de Hg total, após MW-AD, e das espécies químicas, após MAE. n=3.

<b>Amostra</b>	<b>Espécies</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
	Hg total <sup>a</sup>	0,463 $\pm$ 0,010
Atum	Hg total <sup>b</sup>	0,467 $\pm$ 0,035
<i>Brasil</i>	Hg inorgânico <sup>b</sup>	<0,028 (LD)
	Hg orgânico <sup>b*</sup>	0,467 $\pm$ 0,035
	Hg total <sup>a</sup>	8,62 $\pm$ 0,56
Cação azul A	Hg total <sup>b</sup>	7,90 $\pm$ 0,14
<i>Portugal</i>	Hg inorgânico <sup>b</sup>	0,557 $\pm$ 0,004
	Hg orgânico <sup>b*</sup>	7,34 $\pm$ 0,14
	Hg total <sup>a</sup>	5,66 $\pm$ 0,22
Cação azul B	Hg total <sup>b</sup>	4,93 $\pm$ 0,41
<i>Taiwan</i>	Hg inorgânico <sup>b</sup>	0,244 $\pm$ 0,077
	Hg orgânico <sup>b*</sup>	4,69 $\pm$ 0,42
	Hg total <sup>a</sup>	4,40 $\pm$ 0,04
Cação azul C	Hg total <sup>b</sup>	4,32 $\pm$ 0,41
<i>Espanha</i>	Hg inorgânico <sup>b</sup>	0,146 $\pm$ 0,032
	Hg orgânico <sup>b*</sup>	4,17 $\pm$ 0,41
Panga	Hg total <sup>a</sup>	<0,015 (LD)
<i>Vietnã</i>		
Salmão	Hg total <sup>a</sup>	<0,015 (LD)
<i>Chile</i>		

a. MW-AD

b. MAE

\*Diferença estimada entre Hg total e Hg inorgânico

Para a amostra de atum, a concentração de Hg encontrada está abaixo do limite máximo permitido ( $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para peixes predadores. Entretanto, para as três amostras de cação avaliadas, os valores de concentração estão de 4 a 9 vezes superiores à legislação. Além disso, a concentração de MeHg, em todos os casos, representa teores acima de 90% do Hg total presente nas amostras. Esses dois fatores são indicativos da necessidade de um controle mais rigoroso quanto aos peixes que são comercializados à população e da importância de se fazer a

determinação seletiva das espécies de Hg e não apenas expressar sua concentração total, visto que a espécie majoritária, MeHg, é a mais tóxica.

Como esperado, a concentração de Hg presente nas amostras de cação azul (peixe predador que integra o nível superior da cadeia alimentar marinha) é superior ao presente em peixes menores, como o atum. Com relação às concentrações de Hg encontradas, a variação pode estar relacionada com a posição geográfica, o metabolismo, o tamanho e, principalmente, o peso do animal. Ainda, o teor de Hg encontrado no atum é maior que o encontrado nas amostras de panga e salmão, peixes que integram níveis tróficos inferiores. Esses resultados comprovam a bioacumulação e a biomagnificação do Hg no ambiente marinho, onde peixes predadores detêm maior teor de Hg que peixes não predadores, representando, portanto, uma maior toxicidade.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES DE Hg DURANTE A MAE

Com o objetivo de avaliar a estabilidade das espécies de Hg durante o preparo da amostra, ou seja, certificar-se que não há conversão de MeHg em Hg<sup>2+</sup>, foi feita adição de analito de ambas as espécies antes do processo de extração. Para essa avaliação, foram adicionados 3,00 µg g<sup>-1</sup> de CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> e Hg<sup>2+</sup> sobre a amostra de cação azul A. Os resultados obtidos, realizados em triplicata, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados para avaliação da estabilidade das espécies de Hg durante o processo de extração.

Espécies	Na amostra (µg g <sup>-1</sup> )	Adicionado (µg g <sup>-1</sup> )	Encontrado (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Hg total	7,90 ± 0,14	6,00	12,9 ± 0,3	93 ± 2
Hg inorgânico	0,557 ± 0,004	3,00	3,45 ± 0,29	97 ± 8

As recuperações quantitativas, próximas a 100%, comprovam a integridade das espécies de Hg durante o processo de extração, não havendo conversão da forma orgânica na forma inorgânica. Esse resultado indica que o método de preparo de amostra é efetivo para a extração das espécies de Hg em amostras de peixe para análise de especiação química. Ainda, vale destacar que as recuperações estão de acordo com os intervalos estabelecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA)

(FDA, 2015) para fortificação de solução analítica, de 90 a 110%, e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)(MAPA, 2011), de 80 a 110%.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

A exatidão do método foi avaliada através da análise de CRM. Devido à escassez de CRMs destinados à especiação química de Hg disponíveis no laboratório, utilizou-se o CRM de matriz sedimento de estuário (ERM CC-580). Pelo fato da matriz não ser a mesma das amostras analisadas, a avaliação da exatidão também foi feita por meio de ensaios de recuperação de analito, conforme os resultados da seção 4.8.

Os resultados, em triplicata, referentes à análise do CRM estão presentes na Tabela 6.

**Tabela 6.** Avaliação da exatidão pelo uso de material de referência certificado.

<b>Espécies</b>	<b>Certificado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>Encontrado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>
Hg total	$132 \pm 3$	$136 \pm 4$
Hg inorgânico	$131,9 \pm 3^*$	$129 \pm 6$
Hg orgânico	$0,075 \pm 0,004$	$<0,010$ (LD)

\* Diferença estimada entre Hg total e Hg orgânico

Devido à ínfima diferença entre as concentrações certificadas de Hg total e Hg inorgânico, não é possível, com o sistema CVG-AAS utilizado nesse trabalho, certificar-se da concentração de Hg orgânico. Visto que a determinação de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  se dá pela diferença de concentração entre Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ , e não por uma medida direta (Equação 1), o valor encontrado foi menor que o LD. Os resultados encontrados para Hg total e Hg inorgânico foram submetidos a um teste estatístico (*t-student*) e não apresentaram diferença significativa com os valores certificados com 95% de confiança. Ainda, cabe ressaltar que as recuperações estão dentro do intervalo aceitável pela FDA para CRMs, de 80 a 120% (FDA, 2015).

## 5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para análise de especiação química de Hg em peixes empregando o sistema CVG-AAS apresentou sensibilidade, precisão e exatidão adequadas, com resultados satisfatórios que atenderam os limites estabelecidos pelas legislações brasileira e internacional. Com a otimização dos parâmetros instrumentais do sistema CVG-AAS, foi possível quantificar  $\text{Hg}^{2+}$  e Hg total, sem que houvesse interconversão entre as espécies  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$  durante a etapa de determinação. Para análise de especiação química de Hg, foi aplicado o método de oxidação química através do uso de  $\text{KMnO}_4$  para conversão de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  em  $\text{Hg}^{2+}$ , podendo, portanto, determinar Hg total.

Com relação ao método de preparo de amostra, a utilização da solução extratora composta por  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$   $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  promoveu uma extração quantitativa das espécies de Hg das amostras de peixe. No ensaio de recuperação de analito para avaliação da estabilidade das espécies de Hg durante a MAE, recuperações quantitativas de 93 e 97% foram obtidas para Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ , respectivamente. A exatidão do método foi avaliada através do uso de CRM (ERM CC-580), onde os resultados encontrados foram concordantes e não apresentaram diferença significativa aos valores certificados. Além disso, os resultados obtidos após MAE estão em consonância com os obtidos após MW-AD. Os limites de detecção alcançados foram de  $28,2 \text{ ng g}^{-1}$  para  $\text{Hg}^{2+}$  e  $10,8 \text{ ng g}^{-1}$  para Hg total.

A respeito da contribuição de cada espécie de Hg na concentração de Hg total, a espécie orgânica  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  foi majoritária. Em todos os peixes analisados, a contribuição de MeHg frente ao conteúdo de Hg total foi superior a 90%.

Comparando os resultados obtidos com o limite máximo permitido para Hg total em peixes predadores estabelecido pela ANVISA ( $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), três amostras apresentaram valores superiores, com concentrações de  $8,62 \pm 0,56$ ;  $5,66 \pm 0,22$  e  $4,40 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Uma amostra apresentou valor abaixo do limite máximo permitido, com concentração de  $0,463 \pm 0,010 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , e duas amostras tiveram concentração abaixo do limite de detecção. Ainda, os elevados teores de Hg total foram obtidos para peixes de maior tamanho e nível na cadeia alimentar, estando de acordo com o relatado na literatura.

Por fim, pode-se afirmar que os objetivos do presente trabalho foram atingidos. Foi desenvolvido um método eficiente para análise de especiação química de Hg em peixes empregando a técnica CVG-AAS, com limites que atendem a legislação vigente. Ressalta-se que, no Brasil, ainda não há uma legislação que exija a determinação seletiva das espécies de Hg em peixes. Em vista disso, o método proposto torna-se uma alternativa viável e de baixo custo para análise de especiação química de Hg, a fim de avaliar o nível de contaminação e os riscos destinados à saúde humana.

## 6. REFERÊNCIAS

ALONSO, E. V.; CORDERO, M. T. S.; TORRES, A. G.; RUDNER, P. C.; PAVÓN, J. M. C. Mercury speciation in sea food by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction. **Talanta**, v. 77, n. 1, p. 53–59, 2008.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 42, de 29 de agosto de 2013. **Regulamento Técnico MERCOSUL Sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. Disponível em <<http://bvsms.saude.gov.br>>. Acesso em 24 de abril de 2020.

BEATY, R. D.; KERBER, J. D. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry**. 2. ed. The Perkin-Elmer Corporation, 1993. 96 p.

CORNELIS, R.; CARUSO, J.; CREWS, H.; HEUMANN, K. **Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Enviromental, Food, Medicine and Occupational Health**. John Wiley & Sons. 2005. 768 p.

DE LACERDA, L. D.; DOS SANTOS, A. F.; MARINS, R. V. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 366–369, 2007.

DÉDINA, J.; TSALEV, D. L. **Hydride Generation Atomic Absortion Spectrometry**. v. 130. John Wiley & Sons. 1995. 544 p.

EEA. *Commission Regulation* nº 1881, de 19 de dezembro de 2006. **Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs**. Disponível em < <https://eur-lex.europa.eu/>>. Acesso em 23 de novembro de 2020.

EFSA. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. **EFSA Journal**, v. 10, n. 12, p. 1–241, 2012.

EPA. **Risk Assessment and Fish Consumption Limits**. 3. ed. v. 2. U.S. Environmental Protection Agency. 2000. 383 p.



FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A. Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 451–460, 2009.

FAUSER, P.; SAARINEN, K.; AASESTAD, K.; DANIELSSON, H. **Emissions of mercury, PAHs, dioxins and PCBs related to NFR 3: solvent and other product use in Nordic countries**. Norden. 2011, 86 p.

FDA. Elemental Analysis Manual for Food and Related Products: High Performance Liquid Chromatographic- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Methylmercury and Total Mercury in Seafood. **FDA U.S. Food And Drug Administration**, p. 1–11, 2008.

FDA. Elemental Analysis Manual for Food and Related Products: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion. **FDA U.S. Food And Drug Administration**, p. 1–24, 2015.

GAO, Y.; SHI, Z.; LONG, Z.; WU, P.; ZHENG, C.; HOU, X. Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 103, p. 1–14, 2012.

GUARDIA, M. de la; GARRIGUES, S. **Handbook of Mineral Elements in Food**. 1. ed. John Wiley & Sons. 2015. 803 p

IARC. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry**. v. 58. World Health Organization. 1993.

IUPAC. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

KAERCHER, L. E.; GOLDSCHMIDT, F.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 60, n. 5, p. 705–710, 2005.

KERIN, E. J.; GILMOUR, C. C.; RODEN, E.; SUZUKI, M. T.; COATES, J. D.; MASON, R. P. Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7919–7921, 2006.

LINHART, O.; KOLOROSOVÁ-MRÁZOVÁ, A.; KRATZER, J.; HRANÍČEK, J.; ČERVENÝ, V. Mercury Speciation in Fish by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Post-Column Ultraviolet (UV)-Photochemical Vapor Generation (PVG): Comparison of Conventional Line-Source and High-Resolution Continuum Source (HR-CS) Atomic Absorption Spectrometry (AAS). **Analytical Letters**, v. 52, n. 4, p. 613–632, 2019.

LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. Background Correction Methods in Atomic Absorption Spectrometry. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1–17, 2013.

MAPA. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 248, 2011.

NEVADO, J. J. B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; BERNARDO, F. J. G.; MORENO, M. J.. Indirect mercury speciation in biological tissues by closed-vessel microwave-assisted digestion and flow-injection cold-vapor atomic fluorescence detection. **Analytical Letters**, v. 39, n. 14, p. 2657–2669, 2006.

PEIXEBR. Anuário PeixeBr da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2019, 148 p.

PEIXEBR. Anuário PeixeBr da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2020, 136 p.

REYES, L. H.; RAHMAN, G. M. M.; KINGSTON, H. M. S. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, p. 121–128, 2009.

SEGADE, S. R.; TYSON, J. F. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 5, p. 797–807, 2003.

SHAH, A. Q.; KAZI, T. G.; BAIG, J. A.; AFRIDI, H. I.; ARAIN, M. B. Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2345–2349, 2012.

SHAO, L. J.; GAN, W. E.; SU, Q. D. Determination of total and inorganic mercury in fish samples with on-line oxidation coupled to atomic fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 128–133, 2006.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S.; BOCKEL, W. J.; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.

SILVA, M. F.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. Determination of mercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrophotometry using a multicommutated flow injection analysis system. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 6, p. 861–864, 2006.

STEIN, E. D.; COHEN, Y.; WINER, A. M. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 1–43, 1996.

TORRES, D. P.; BORGES, G. L. G.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 8, p. 1118–1122, 2009.

TORRES, D. P.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 2, p. 206–210, 2009.

ULLRICH, S. M.; TANTON, T. W.; ABDRAHITOVA, S. A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 241–293, 2001.

URÍA, J. E. S.; SANZ-MEDEL, A. Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. **Talanta**, v. 47, n. 3, p. 509–524, 1998.

VÁZQUEZ, M. J.; ABUÍN, M. A.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; CELA, R. Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. **Chemosphere**, v. 39, n. 7, p. 1211–1224, 1999.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Wiley-VCH. 1999. 956 p.

WHO. **Methylmercury**. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. 1990. 148 p.

YANG, D. Y.; TRUONG, H. Y. T.; CHEN, Y. W.; BELZILE, N. Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 2, p. 157–164, 2009.

YU, R. Q.; FLANDERS, J. R.; MACK, E. E.; TURNER, R.; MIRZA, M. B.; BARKAY, T. Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 2684–2691, 2012.