



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RENATO SAMPAIO ANDRADE NETO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE Hg**  
**EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZANDO TÉCNICA DE GERAÇÃO**  
**FOTOQUÍMICA DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO**  
**ATÔMICA**

**FORTALEZA**

**2019**

RENATO SAMPAIO ANDRADE NETO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE Hg EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZANDO TÉCNICA DE GERAÇÃO FOTOQUÍMICA  
DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em química. Área de concentração: Química analítica.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.  
Coorientador: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A57d Andrade Neto, Renato Sampaio.  
Desenvolvimento de método analítico para determinação de Hg em amostras biológicas utilizando técnica de geração fotoquímica de vapor acoplada à espectrometria de absorção atômica / Renato Sampaio Andrade Neto. – 2019.  
46 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.  
Coorientação: Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos.
1. PVG. 2. introdução de amostra. 3. Hg. 4. AAS. I. Título.

CDD 540

---

RENATO SAMPAIO ANDRADE NETO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE Hg EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS UTILIZANDO TÉCNICA DE GERAÇÃO FOTOQUÍMICA  
DE VAPOR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em química. Área de concentração: Química analítica.

Aprovada em: 08/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Rivelino Martins Cavalcante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Henrique Barbosa de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco de Assis Freire de  
Moura e Joana D'arc Campelo de Andrade.

## AGRADECIMENTOS

À Instituição Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe, meu pai, meus irmãos, minha tia e minha namorada, Bruna Stephanie, por sempre acreditarem nas minhas conquistas e nunca terem desacreditado do meu sucesso.

Agradeço a todos meus amigos do Laboratório de Química Analítica Aplicada (LEQA): Victor, Tamyres, Eder, Nilvan e Debora, por todos momentos de discussão e descontração. Em especial a Luan, Nandressa e Pedro, por auxiliarem nas mais diversas formas, nos momentos que deram certo e errado em toda pesquisa

Aos integrantes do Laboratório de Análise de Traços (LAT) e Laboratório de Análise de Água (LANAGUA), por toda a infraestrutura cedida para a realização do trabalho.

À Professora Wladiana por todos esses anos de amizade e confiança, auxiliando em todos momentos de dúvidas.

À professora Gisele pela orientação e amizade, por me aceitar como aluno e por sempre estar a postos para auxiliar, não importando com os prazos apertados.

## RESUMO

A geração fotoquímica de vapor (PVG) é uma técnica analítica empregada para a conversão de elementos em espécies voláteis, para o melhoramento da eficiência do transporte desse analito para o sistema de detecção. Nesse trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos para a determinação de Hg em amostras de material de referência certificado (DORM-2, TORT-2 e Oyster Tissue) e amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores submetidos a protocolo de contaminação de Hg para a determinação por espectrometria de absorção atômica (AAS). O analito foi extraído das amostras utilizando solubilização em ácido fórmico. O método foi otimizado utilizando planejamento fatorial completo com pontos axiais utilizando como variáveis o tempo de irradiação UV, a concentração de ácido fórmico e a vazão do gás de arraste e como resposta a absorbância integrada. As concentrações encontradas nas amostras de cerebelo foi de  $2863,01 \pm 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  e de  $776,4 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  nas amostras de gordura abdominal. O método desenvolvido apresentou limites de detecção e quantificação iguais a  $0,04 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $0,12 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. A exatidão do método foi comprovada estatisticamente através da análise de material de referência certificado. O presente método mostrou-se como uma alternativa eficiente para a análise de Hg em amostras de origem animal, alinhando o aumento de sensibilidade com a geração fotoquímica de vapor, além de respeitar os princípios da química verde.

**Palavras-chave:** PVG; introdução de amostra; Hg; AAS.

## ABSTRACT

Photochemical vapor generation (PVG) is an analytical technique used to convert elements into volatile species to improve the efficiency of the transport of this analyte to the detection system. In this work, analytical procedures were developed for the determination of Hg in samples of certified reference material (DORM-2, TORT-2 and Oyster Tissue) and samples of cerebellum and abdominal fat of rodents submitted to Hg contamination protocol for determination by atomic absorption spectrometry (AAS). The analyte was extracted from the samples using solubilization in formic acid. The method was optimized using full factorial design with axial points using as variables: the UV irradiation time, the formic acid concentration and the gas flow and as response the integrated absorbance. Concentrations found in the cerebellum samples were  $2863,01 \pm 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $776,4 \pm 0,08 \text{ mg kg}^{-1}$  in the abdominal fat samples. The method developed showed limits of detection and quantification equal to  $0.04 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  and  $0.12 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The accuracy of the method was statistically proven through the analysis of certified reference material. The present method proved to be an efficient alternative for the analysis of Hg in samples of animal origin, aligning the increase of sensitivity with the photochemical generation of vapor, in addition to respecting the principles of green chemistry.

**Keywords:** PVG; sample introduction; Hg; AAS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Sistema para geração fotoquímica de vapor.....	18
Figura 2	– Esquema do sistema do reator PVG acoplado ao FAAS.....	23
Figura 3	– Esquema ilustrativo dos SGL utilizados na montagem do sistema PVG do trabalho (A- SGL por borbulhamento; B- SGL por arraste.) .....	27
Figura 4	– Variação do sinal analítico de DORM-2 sobre o LMW e sua porcentagem.....	30
Figura 5	– Variação do sinal analítico de Oyster Tissue sobre o LMW e sua porcentagem.....	31
Figura 6	– Variação do sinal analítico de TORT-2 sobre o LMW e sua porcentagem.....	31
Figura 7	– Estudo da vazão de N <sub>2</sub> no sinal analítico de Hg no CRM de estudo.....	32
Figura 8	– Estudo do tempo de radiação sobre o sinal analítico.....	35
Figura 9	– Gráficos de superfícies de resposta obtidos do planejamento experimental para a introdução da amostra de cerebelo usando PVG. (A- Tempo de irradiação x Concentração de AF; B- Concentração x Vazão de gás de arraste; C- Tempo de irradiação x Vazão de gás de arraste).....	36
Figura 10	– Gráficos de superfícies de resposta obtidos do planejamento experimental para a introdução da amostra de gordura abdominal usando PVG. (A- Tempo de irradiação x Concentração de AF; B- Concentração x Vazão de gás de arraste; C- Tempo de irradiação x Vazão de gás de arraste).....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de absorção atômica..	22
Tabela 2 – Parâmetros estudados no sistema PVG em amostras de material de referência certificado.....	23
Tabela 3 – Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo.....	25
Tabela 4 – Parâmetros de desempenho para as curvas obtidas para as amostras de trabalho.....	40
Tabela 5 – Teor de Hg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de material de referência determinado por PVG (média $\pm$ SD; n=3).....	41
Tabela 6 – Teores de Hg ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nas amostras de cerebelo e gordura abdominal por PVG (média $\pm$ SD; n=3).....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	Vapor frio (do inglês “cold vapor”)
HG	Geração de Hidretos (do inglês “hydride generation”)
CVG	Geração química de vapor (do inglês “chemical vapor generation”)
CRM	Material de referência certificado (do inglês “certified reference material”)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês “flame atomic absorption spectrometry”)
HCL	Lâmpada de cátodo oco (do inglês “hollow cathod lamp”)
HG	Geração de hidretos (do inglês “hydride generation”)
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês “inductively coupled plasma optical emission spectrometry”)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LMW	Composto orgânico de baixo peso molecular (do inglês “low molecular weight organic”)
PVG	Geração fotoquímica de vapor (do inglês “photochemical vapor generation”)
SGL	Separador gás-líquido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Título da seção terciária</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e soluções</b> .....	21
<b>4.2</b>	<b>Amostras</b> .....	21
<b>4.3</b>	<b>Instrumentação</b> .....	21
<b>4.4</b>	<b>Montagem do sistema de geração fotoquímico de vapor (PVG)</b> .....	22
<b>4.5</b>	<b>Preparo da amostra com ácido fórmico</b> .....	22
<b>4.6</b>	<b>Avaliação dos parâmetros do método</b> .....	23
<b>4.7</b>	<b>Preparo da amostra com ácido fórmico</b> .....	23
<b>4.8</b>	<b>Construção da curva analítica de calibração</b> .....	25
<b>4.9</b>	<b>Figuras de mérito</b> .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5.1</b>	<b>Montagem do sistema de geração fotoquímica de vapor (PVG)</b> .....	27
<b>5.2</b>	<b>Estudo do método de preparo das amostras</b> .....	28
<b>5.3</b>	<b>Estudo dos parâmetros de forma univariada</b> .....	29
<b>5.4</b>	<b>Estudo do planejamento experimental para as amostras de cerebelo e gordura abdominal</b> .....	34
<b>5.5</b>	<b>Validação estatística do método de determinação de Hg utilizando PVG ...</b>	39
<b>5.6</b>	<b>Determinação do teor de Hg em cerebelo e gordura abdominal dos roedores</b> .....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda crescente por métodos de quantificação mais sensíveis, faz com que as técnicas atuais se modifiquem, afim de atender a necessidade de quantificação de analitos muitas vezes tóxicos e em níveis de ppb.

O Hg é um dos elementos que sofrem deposição no sistema biológico dos seres humanos. Uma vez que a eliminação desse metal é lenta, a exposição a longos prazos de uma concentração pequena ou uma exposição a grandes quantidades desse metal, trazem danos irreparáveis ao ser humano, principalmente ao sistema nervoso (NORDBERG *et al.*, 2014).

A contaminação de aquíferos por Hg é de grande impacto da biosfera, uma vez que a forma iônica ( $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{Hg}_2^{2+}$ ) é convertida na forma complexada com matéria orgânica, sendo essa a forma mais danosa, por micro-organismos, causando uma bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, e em geral sendo o ser humano o ultimo desse ciclo.

Devido essa bioacumulação o ministério da saúde orienta que o limite máximo de mercúrio contido em água própria para consumo deve estar abaixo de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , e para alimentos, em especial peixes, não deve ultrapassar  $1 \text{mg kg}^{-1}$ , para peixes predadores e  $0,5 \text{mg kg}^{-1}$ , para peixes não predadores. Seguindo a mesma linha a Agencia de Proteção Ambiental norte americana, aconselha a mulheres gestantes e lactantes não consumirem certo tipo de peixes.

Sendo assim as técnicas de geração química de vapor (CVG) estão sendo acopladas a métodos de quantificação (AAS, ICP OES, entre outros) já usuais, afim de melhorar a sensibilidade, uma vez que os métodos que se baseia na introdução da amostra em forma de vapor tem eficiência de transporte próximo a 100%.

Dessa forma o presente trabalho visa a aplicação da geração fotoquímica de vapor (PVG), como método de introdução de amostra, com o intuito de melhorar a sensibilidade da espectrometria de absorção atômica na quantificação de Hg em material orgânico de roedores contaminados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver metodologia para determinação de Hg (total) em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores, utilizando a geração fotoquímica de vapor (PVG) acoplada ao espectrômetro de absorção atômica (AAS).

### **2.2 Objetivos específicos**

Montar o sistema de geração fotoquímica de vapor testando diferentes separadores gás-líquido e acoplar ao espectrômetro de absorção atômica;

Estudar de forma univariável os parâmetros que influenciam o sinal analítico de absorção atômica para Hg;

Avaliar a extração de Hg utilizando ácido fórmico em amostras de materiais de referência certificados;

Estudar os parâmetros experimentais de forma multivariada para obtenção de condições ótimas para a determinação de Hg total em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores;

Avaliar a exatidão e a precisão do método desenvolvido, utilizando materiais de referência certificados;

Aplicar o método desenvolvido na determinação de Hg em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O mercúrio circula naturalmente pela biosfera da terra sendo liberado principalmente pela atividade vulcânicas e a intemperização de rochas (PACYNA *et al.*, 2010). O aumento da ocorrência de Hg na biosfera, com ênfase nos recursos hídricos, em sua maior parte ocorre devido às ações de mineração irregulares, produção de energia a partir de fontes não renováveis (em especial o carvão) e descarte ilegais de rejeitos industriais (UNO, 2018).

Como consequência dessas ações, as condições naturais do meio ambiente (pH, ação de bactérias, oxigênio dissolvido) vêm mudando, agravando ainda mais a situação, devido à diluição de materiais nos recursos hídricos, onde em condições normais não haveria (BINGS *et al.*, 2010).

No Brasil a região norte é a mais afetada pela contaminação de metais (exemplo o mercúrio) devido a extração mineradora da região. Devido a dependência direta da população pelos mananciais, a região concentra o maior número de intoxicação de Hg do país, devido a bioacumulação da cadeia alimentar, sendo o ser humano o mais afetado desse ciclo (PINHEIRO, 2000).

A toxicidade do Hg pode variar, dependendo da forma química que ele se encontra. As espécies de Hg que podem ser encontradas são na forma elementar ( $\text{Hg}^0$ ), forma inorgânica ( $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{Hg}_2^{2+}$ ) ou na forma orgânica (Hg-R, Hg-CO, dentre outras) (NORDBERG *et al.*, 2014). A espécie mais nociva de Hg que o ser humano pode ingerir, é a forma orgânica, devido ao prolongado tempo de eliminação pelo corpo, quando comparado as outras espécies (MORITA *et al.*, 1998).

No ambiente aquático a capacidade de bactérias converterem a forma inorgânica de Hg na forma orgânica, faz com que a bioacumulação se prolongue, mesmo após a eliminação da fonte de contaminação (BURGER *et al.*, 2011).

A toxicidade do Hg nos seres humanos varia com a forma química, a dose e a frequência de exposição. O consumo de produtos contaminados por Hg durante longos períodos pode causar desordens neurológicas, como o Alzheimer, demência, Parkinson até problemas de má formação de fetos e infertilidade (KIM *et al.*, 2016).

O Hg na forma orgânica ao se ligar com grupos sulfidrilas (-SH), presentes nas cisteínas, são transportados pelos aminoácidos, depositando-se em regiões do cérebro

(exemplo o cerebelo) e em tecidos adiposos, devido a sua lipofilicidade, onde se depositam e causam um acúmulo excessivo nessas regiões (OZKAN *et al.*, 2013 e SYVERSEN *et al.*, 2012).

A legislação brasileira impõe um limite para os peixes de consumo humano, de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  para peixes não predadores e de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  para peixes predadores, levando em conta a bioacumulação do Hg nesses alimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Devido a necessidade de técnicas de quantificação para analitos em concentrações cada vez mais baixas, os métodos instrumentais vêm sendo melhorados e novos sendo criados, afim de melhorar a sensibilidade das técnicas mais usuais. Técnicas de análise como a espectrometria de absorção atômica (AAS) e espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), são geralmente utilizadas para análise de contaminantes de diversas matrizes analíticas (SKOOG, 2002).

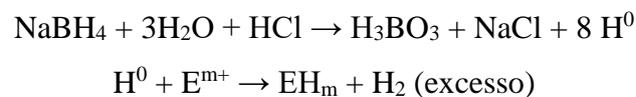
Técnicas utilizadas comumente para a determinação de Hg possuíam limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) com valores que atualmente são considerados muito altos, uma vez que se colocavam em intervalos de concentração de ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) (USDA, 2018). O elevado valor dos limites se dão muitas vezes devido a técnica de introdução das amostras, geralmente líquidas ou em solução, que geralmente se concentram na utilização de nebulização pneumática, que tem como função a formação de um aerossol (SKOOG, 2002), esse processo possui proporciona uma eficiência muito baixa (3-5%), esse fato causa a baixa sensibilidade do método (STURGEON *et al.*, 2005). Afim de sanar essa problemática da eficiência de transporte do analito ao sistema de quantificação, o analito pode ser introduzido na forma de vapor, através da formação de uma espécie volátil do analito de estudo, por meio de técnicas de geração química de vapor (CVG) (STURGEON *et al.*, 2012). A conversão do analito em uma espécie volátil apresenta algumas vantagens, a separação do analito da sua matriz, eficiência de transporte de 100%, melhoramento da eficiência, diminuição dos LD e LQ, análise dos diversos estados de oxidação de um analito e possibilidade de acoplamento com diversas técnicas (YIN *et al.*, 2011).

A CVG, é um método bastante difundido para a determinação de metais (GIERSZ *et al.*, 2017) e alguns amentais (GRINBERG *et al.*, 2009). Contrariando as expectativas a técnica se mostrou de uma aplicabilidade ampla, com um vasto número de elementos que podem estar sujeitos a sua aplicação (YIN *et al.*, 2011). A técnica consiste na transformação química ou físicas de espécies não voláteis (geralmente compostos metálicos

na forma iônica e complexos organometálicos), em espécies voláteis ou semi-voláteis. As principais técnicas de CVG são: geração de hidretos, geração de vapor elementar, geração de haletos, geração de metais-carbonilados, geração eletroquímica e geração fotoquímica (TAKASE *et al.*, 2002)

Dentre as CVG as mais difundidas são a geração de hidretos (HG) e a geração fotoquímica de vapor (PVG). A geração de hidretos baseia-se na redução do analito a uma espécie volátil, atômica (para o Hg e Cd) ou molecular.

A técnica de geração de hidretos utilizava-se da presença do Zn metálico para a formação do hidreto, atualmente esse processo é realizado na presença do borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) ou do cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>) em meio ácido (POHL *et al.*, 2004). O mecanismo para a geração de hidretos é estabelecido em duas etapas (SHEN *et al.*, 2015), sendo a primeira responsável pela formação do hidrogênio atômico, a segunda etapa constitui-se a reação do hidrogênio atômico reage com o analito ocorrendo a formação do hidreto volátil.



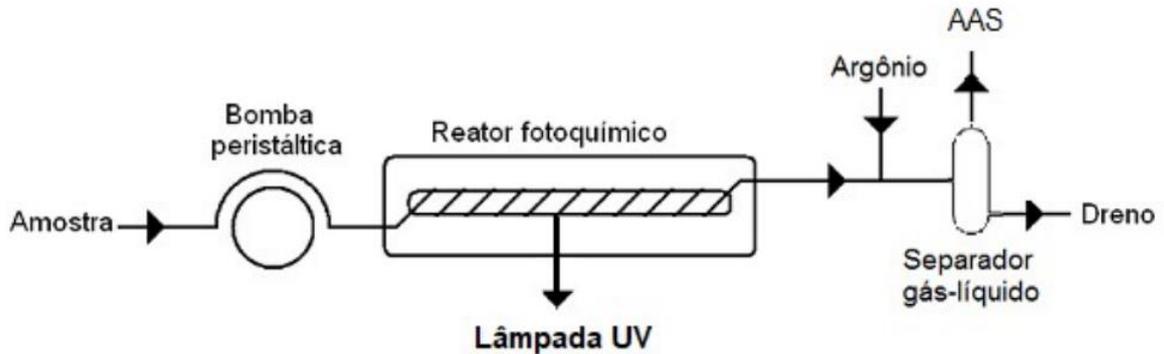
Após a formação da espécie volátil, essa é conduzida a fonte de atomização e quantificada, no entanto quando se aplica a técnica para os elementos Hg e Cd, não necessitasse de uma fonte de atomização pois a reação do H<sup>0</sup> com as formas iônicas dos dois metais gera um vapor elementar desses, por não usar o atomizador essa técnica recebe a denominação de vapor frio (CV) (WELZ *et al.*, 2004).

Com a consolidação das técnicas de HG, a radiação UV vinha sendo utilizada como técnica de separação dos analito por meio dos processos oxidativos, os quais essa radiação pode gerar quando introduzida em um sistema (BENDICHO *et al.*, 2012). No entanto, trabalhos já mostravam a efetividade da utilização da radiação UV na produção de espécies voláteis de analitos, em especial para a alquilação de Hg (AKAGI *et al.*, 1977).

Guo (2003), foram os pioneiros da técnica de PVG, quando propuseram a geração da espécie volátil para Se. A técnica da PVG se baseia na formação de espécies voláteis do analito através da interação da radiação UV, proveniente de um reator fotoquímico, com moléculas orgânicas de baixo peso molecular (como ácidos carboxílicos), adicionados a amostra, sendo essa interação responsável pela formação da espécie volátil.

Vieira (2007), propôs a representação genérica da montagem do sistema da PVG, representado na Figura 1.

Figura 1 - Sistema para geração fotoquímica de vapor.



Fonte: Vieira (2007, com adaptações).

Segundo o sistema desenvolvido por Vieira (2007), vários outros sistemas foram sendo acoplados a diversos equipamentos (AAS, ICP OES e ICP-MS) (YIN *et al.*, 2011), modificando em muitas vezes a estrutura do reator fotoquímico.

A técnica de PVG é uma alternativa para as técnicas de HG, uma vez que as duas podem ser utilizadas para a determinação dos mesmos elementos, no entanto a PVG tem vantagens diante da HG, sendo essas:

- A PVG se baseia na utilização de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (LMW), de alta estabilidade química, além do baixo custo comercial. Enquanto a HG utiliza forte reagentes redutores ( $\text{NaBH}_4$ ), sendo esses sujeitos a uma alta taxa de contaminação, exigindo-se do reagente, pureza elevada, agregando um valor comercial mais elevado e a estabilidade dos redutores são de curto prazo, forçando o preparo diário das soluções de análise (HE *et al.*, 2007).

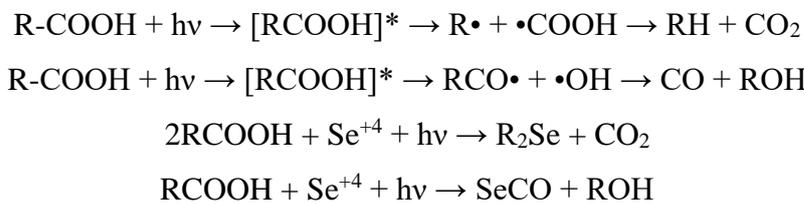
- A PVG confere ao analista menores riscos para o manuseio da técnica, uma vez que não utiliza reagentes químicos de altas classificações de perigo (KARTHIKA *et al.*, 2019).

- A PVG não possui capacidade de reduzir metais de transição, exigindo uma etapa previa para a determinação desses, quando necessário, porém a presença dos metais de transição para a HG é considerada como interferência, pois os redutores utilizados na HG possuem capacidade de reduzir esses metais, ocasionando uma interferência no analito de trabalho (ZHENG *et al.*, 2010).

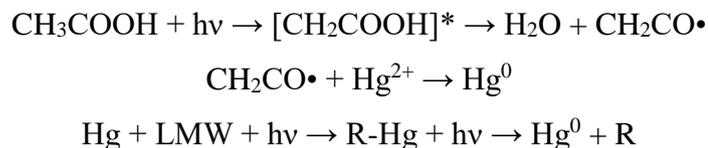
• Os resíduos gerados na PVG são em menores quantidades, diante do fato da HG necessitar do preparo diário dos reagentes. Os LMW usados na PVG são parcialmente degradados pela radiação UV, enquanto os redutores da HG necessitam da neutralização total para o descarte (STURGEON *et al.*, 2012).

A desvantagem da PVG é quanto a presença de oxidantes, uma vez que esses suprimem a capacidade do LMW formar a espécie volátil do analito impossibilitando a maioria das técnicas analíticas de digestão da amostra, porém a extração do analito utilizando ácidos orgânicos em aquecimento brando vêm sendo estudado e se mostrando eficiente (ZHENG *et al.*, 2005).

Embora ainda não consolidado uma rota mecanística para as reações que ocorrem na técnica de PVG, algumas rotas foram propostas na presença de radicais (HO•, O•, CO•, R•, entre outros) (STURGEON *et al.*, 2012). Guo *et al.*, propôs a clivagem homogênea do ácido orgânico de baixo peso molecular (LMW) na presença de radiação UV, sendo o produto dessas reações responsáveis pela formação da espécie volátil para o Se (IV) .



O mecanismo para a determinação de Hg não é bem elucidado, no entanto Yin (2011), demonstrou em seu trabalho o que pode ser considerado como a melhor hipótese para a formação do Hg<sup>0</sup> em matrizes orgânicas, sua proposta mecanística é demonstrada nas equações a seguir.



A proposição (Eq. 9) de Yin (2011) para a formação do Hg volátil não especifica qual o LMW a ser utilizado, no entanto a utilização do HCOOH para a determinação de Hg em matrizes orgânicas apresenta melhores resultados quando comparado a métodos que utilizam H<sub>3</sub>CCOOH (ORESTE *et al.*, 2017).

Nos últimos anos novas técnicas vêm surgindo para a determinação de Hg, técnicas que se baseiam em processos eletroanalíticos (KARTHIKA *et al.*, 2019), nanofiltração (WANG *et al.*, 2017 e ARKHNGELSKY *et al.*, 2019) e adsorção de Hg. Além da investigação de novos métodos, aprimoramentos nas técnicas tradicionais de HG vem sendo investigados (GÓRECKI *et al.*, 2018). Quando as novas técnicas propostas são comparadas a técnica que o presente trabalho propõe (PVG), são observadas algumas desvantagens:

- Altos valores de limites de detecção ( $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (ZHANG *et al.*, 2018) quando comparados a trabalhos de PVG ( $0,02 - 0,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (LIU *et al.*, 2013).
- Aplicabilidade comprovada apenas para meios aquosos, não possuindo nenhuma comprovação para análise em amostras orgânicas, enquanto a aplicabilidade para PVG já está bastante difundida para as mais diversas matrizes (ROMANOVSKIY *et al.*, 2018, JESUS *et al.*, 2014 e POTES *et al.*, 2016).
- Necessidade instrumental com alto valor comercial agregado (WANG *et al.*, 2017) enquanto a técnica de PVG, se mostra eficiente no acoplamento de diversos equipamentos de quantificação.

Outra vantagem da utilização da PVG na determinação de Hg é a possibilidade de especiação das espécies de Hg (orgânica e inorgânica). Em geral, a PVG para o Hg, possibilita a determinação da quantidade total do analito. No entanto, estudos feitos por Chen (2017) comprovaram que a mesma radiação UV utilizada na PVG, pode servir para a separação das espécies de Hg, modificando as radiações entre UV-B e UV-C (311 e 254 nm) em amostras de óleo de peixe. Quadros (2014), confirmou que a eficácia observada em óleo de peixe, pôde ser aplicada em amostras biológicas, para especiação de Hg utilizando a técnica PVG.

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para determinação de metilmercúrio, utilizando a técnica geração fotoquímica de vapor acoplada ao espectrômetro de absorção atômica, em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores submetidos a contaminação. Afim de analisar a relação da contaminação por Hg e quadros clínicos, como foco no sistema nervoso dos indivíduos expostos a contaminação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As vidrarias e frascos foram previamente descontaminados imergindo-os em banho de HNO<sub>3</sub> 10% v v<sup>-1</sup> por 24 horas e enxaguadas com água destilada antes do uso. Nos procedimentos de preparo das amostras e extração de mercúrio utilizou-se CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anidro 98% m m<sup>-1</sup> (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

As soluções padrão, utilizados nas curvas analíticas de calibração, necessários para análise do elemento químico Hg por FAAS, foram preparados a partir de diluições sucessivas de soluções estoque 1000 mg L<sup>-1</sup> (Across Organics, Geel, Bélgica).

### 4.2 Amostras

As amostras utilizadas no processo de validação do método foram os materiais de referência certificados: proteína de peixe DORM-2 (NRC-CNRC, Canadá), hepatopâncreas de lagosta TORT-2 (NRC-CNRC, Canadá), e tecido de ostra SRM 1566b Oyster Tissue (NIST, EUA).

Os experimentos de determinação do teor de Hg foram realizados em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores expostos a contaminação de mercúrio, cedidos pelo Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE), do núcleo de medicina da Universidade Federal do Ceará.

Os protocolos de contaminação dos roedores foram realizados pelos colaboradores do LABICONTE durante um período de 40 dias. Foram utilizados camundongos Black C57. O início do experimento se deu após as cinco primeiras semanas de vida dos roedores, com massa corpórea de aproximadamente 10 g. Nos 20 primeiros dias os roedores foram condicionados a dieta comum (Presence Labina) e água tratada, nos 20 últimos dias do protocolo foram adicionados 20 mg L<sup>-1</sup> de MeHg a água dos roedores, permanecendo a mesma dieta. Após os 40 dias os espécimes foram eutanasiados, colhendo-se as amostras em seguida.

### 4.3 Instrumentação

Na quantificação do Hg utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) (Varian AS 240FS, Mulgrave, Austrália) equipado com lâmpada de deutério para correção de fundo. As medidas foram obtidas usando lâmpada de cátodo oco (HCL) de Hg. Na tabela 1 estão descritos os comprimentos de onda, abertura de fenda e faixa linear utilizados nas determinações do analito nas amostras dos materiais de referência certificados e nas amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores.

Tabela 1- Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de absorção atômica com chama para a determinação de Hg.

Elemento	Linha (nm)	Abertura de fenda (nm)	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Hg	253,7	0,5	1 – 30

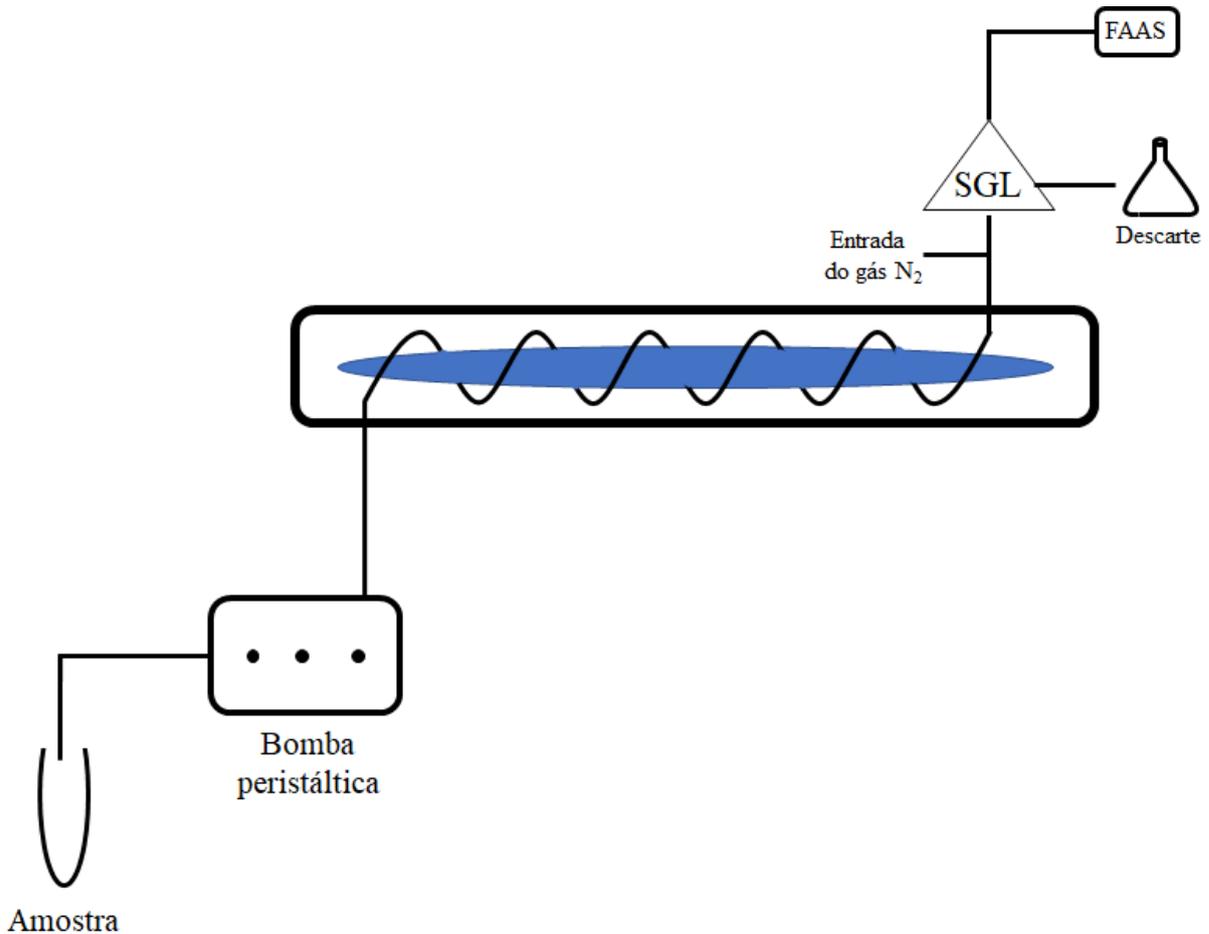
Fonte: elaborado pelo autor.

Um banho termostaticado (MA-095, Marconi, Brasil), foi utilizado nos procedimentos de preparo das amostras.

#### 4.4 Montagem do sistema de geração fotoquímico de vapor (PVG)

O sistema de irradiação UV foi montado e utilizado durante todo o desenvolvimento do presente trabalho. O reator PVG foi montado com uma lâmpada de Hg (germicida) de 30 cm de comprimento e 15 W (220 V), operando no comprimento de onda de 254 nm (Vilber, Alemanha). As soluções das amostras foram introduzidas no sistema com o auxílio de uma bomba peristáltica e expostas à radiação UV por meio de um tubo de PTFE enrolado ao redor da lâmpada, com volume interno 0,8 mL, comprimento de 50 cm e 2 mm de diâmetro. As amostras irradiadas foram conduzidas para um separador gás-líquido (SGL). As espécies voláteis foram carregadas para o equipamento utilizando um fluxo de gás nitrogênio 99,9% a uma vazão controlada por um fluxômetro (VFA-22, Hygro-Therm, Brasil). As vazões de introdução das amostras variaram de 2,2 – 2,7 mL min<sup>-1</sup> dependendo do tipo de amostra em estudo. A parte líquida contendo a matriz da amostra foi conduzida para um descarte com a mesma vazão de entrada.

Figura 2- Esquema do sistema do reator PVG acoplado ao FAAS.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5 Preparo da amostra com ácido fórmico

O método de preparo utilizando ácido fórmico consistiu na adição de 8 mL de HCOOH anidro em 0,25 g da amostra de material de referência certificado. A mistura foi submetida a um aquecimento brando à 60° C em banho termostático, sem agitação, por um período de 3 horas. A solução resultante foi diluída para um volume final de 40 mL com água purificada e filtrada em papel de filtro qualitativo. Após a filtração, foram retiradas alíquotas de 1 mL das soluções contendo as amostras, diluindo-se as alíquotas para um volume final de 40 mL, sendo essa solução final levada para análise.

Para as amostras de cerebelo e gordura abdominal foram utilizadas as massas totais de cada material contida em um indivíduo, sendo a massa retirada de cerebelo igual a 0,0048 g e de gordura abdominal 0,0121 g. O processo de preparo das amostras de cerebelo e

gordura abdominal foi realizado utilizando-se os mesmos parâmetros e procedimentos descritos para o material de referência certificado.

#### 4.6 Avaliação dos parâmetros do método.

Os parâmetros instrumentais foram analisados de forma univariável para cada uma das amostras de materiais de referência certificados, sendo os parâmetros avaliados a seguir: ácido orgânico de baixo peso molecular (ácidos fórmico e acético) utilizado em diferentes concentrações, vazão do gás de arraste, tempo de irradiação na lâmpada. Os intervalos analisados para cada um dos parâmetros são expressos na Tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros estudados no sistema PVG em amostras de material de referência certificado.

Variável	Intervalo estudado
Ácido orgânico	HCOOH e CH <sub>3</sub> COOH
[Ácid. orgânico] (%)	5 - 20
Vazão de gás (mL min <sup>-1</sup> )	50 - 400
Tempo de irradiação (s)	5 - 50

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.7 Preparo da amostra com ácido fórmico

Os procedimentos utilizados no método desenvolvido de geração fotoquímica de vapor (PVG) para as amostras de cerebelo e gordura abdominal, foram otimizados utilizando-se um planejamento fatorial completo, com dois níveis e ponto central. Para a otimização de método de introdução das amostras de cerebelo e gordura abdominal foram escolhidas como variáveis a concentração do ácido fórmico, a vazão do gás carreador e o tempo de exposição à radiação UV da lâmpada no reator.

Tabela 3-Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo.

Variável	Mínimo	Ponto Central	Máximo
[HCOOH] (%)	10	20	30
Vazão de gás (mL min <sup>-1</sup> )	100	150	200
Tempo de irradiação (s)	6	8	10

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.8 Construção da curva analítica de calibração

Na construção da curva analítica de calibração foram utilizadas duas metodologias. Para as amostras de materiais de referência certificados foi utilizado o método da adição de padrão. Para as amostras de cerebelo e de gordura abdominal de roedores, foi utilizado o método de compatibilização de matriz, sendo que por esse método, a curva analítica de calibração é construída em amostras de cerebelo e gordura abdominal de animais roedores que não foram submetidos ao protocolo de contaminação por mercúrio.

#### 4.9 Figuras de mérito

O limite de detecção (LD), expresso como a quantidade mínima detectável com uma dada certeza analítica. O LD foi calculado utilizando o desvio padrão da medida das replicadas do branco ( $\sigma$ ) e o coeficiente angular da curva de calibração (S), conforme a formula descrita por:

$$LD = \frac{3\sigma}{S}$$

O limite de quantificação (LQ), definido com o a menor concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, foi calculado utilizando:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

A precisão do método foi analisada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), calculado a partir da relação do desvio padrão (DP) e a concentração média determinada (CMD), seguindo a relação seguinte:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

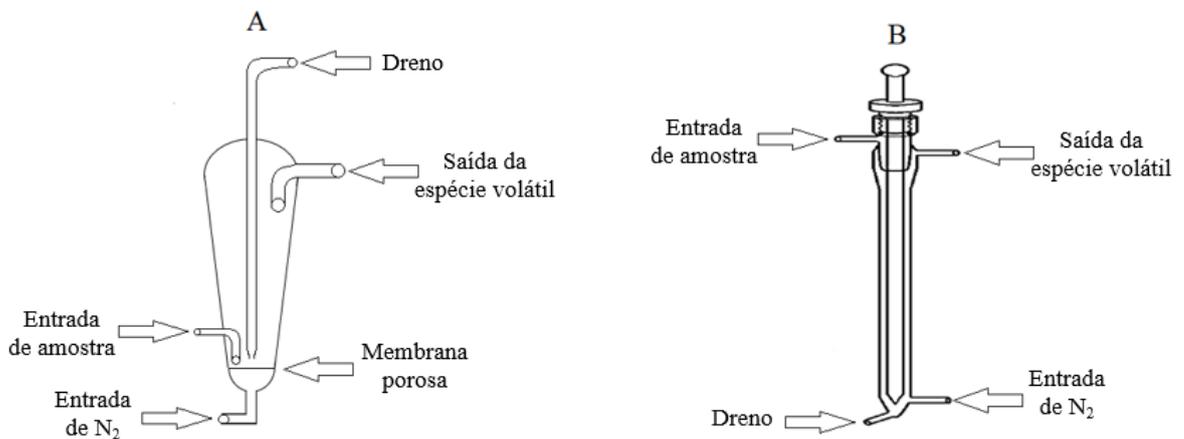
A exatidão foi determinada a partir da comparação da concentração do material de referência certificado e a concentração determinada de Hg para este material utilizando-se o método proposto.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Montagem do sistema de geração fotoquímica de vapor (PVG)

Inicialmente, o sistema de geração fotoquímica de vapor (PVG) foi montado e avaliou-se a eficiência de dois modelos de separadores gás-líquido (SGL) disponíveis para o sistema de PVG proposto, na separação da espécie volátil presente na fase gasosa, da solução contendo a matriz da amostra. Os modelos de SGL estão desenhados na Figura 3.

Figura 3-Esquema ilustrativo dos SGL utilizados na montagem do sistema PVG do trabalho (A- SGL por borbulhamento; B- SGL por arraste.)



Fonte: elaborado pelo autor.

O SGL representado na Figura 3A, tem seu funcionamento baseado no borbulhamento do gás de arraste através da solução, por meio da passagem do gás pela membrana porosa. O SGL representado na Figura 3B, apresenta uma maior superfície de contato entre a solução amostra e o gás de arraste, uma vez que a solução amostra percola sobre a haste interna do SGL, como um filme fino, permitindo o desprendimento da espécie volátil da solução com a passagem do gás de arraste. No entanto, o SGL da Figura 3B apresenta um volume interno maior do que o SGL da Figura 3A, o que pode exigir um fluxo de gás de arraste maior.

O SGL da Figura 3A, apresentou formação vigorosa de espuma quando foram introduzidas as soluções em meio de ácidos orgânicos diluídos, tais como o ácido fórmico e o ácido acético. Esse efeito se tornou ainda mais evidente quando amostras de materiais de referência certificados e amostras reais foram estudadas. O excesso de espuma formada

dificulta a separação das fases o que tornou o SGL da Figura 3A ineficaz para os sistemas propostos neste estudo. Por outro lado, quando foi utilizado o SGL apresentado na Figura 3B, não foi observado formação de espuma, de forma que a separação das fases foi observada de forma eficaz. Sendo assim, optou-se pela utilização do SGL descrito na Figura 3B em todos os experimentos.

Em seguida foram feitos testes para determinação do tempo necessário para o analito (espécie volátil) alcançar a célula de quartzo posicionada sobre o queimador na chama do espectrômetro de absorção atômica, para quantificação do elemento. Analisando no intervalo de tempo de 20 – 200 segundos, contados a partir da entrada da solução no SGL.

Sendo assim, essa última etapa se caracterizou como a determinante da frequência analítica do método.

No sistema proposto foram necessários 100 segundos, da introdução da amostra no sistema PVG até o início da quantificação. Na literatura são reportados tempos entre 30 – 50 segundos, para técnicas de emissão atômica (QIN *et al.*, 2013 e LEONORI *et al.*, 2019) e 70 – 110 segundos, em técnicas de absorção atômica (COVACI *et al.*, 2017).

## 5.2 Estudo do método de preparo das amostras

A técnica PVG pode sofrer grande interferência quando reagentes oxidantes (LIU , 2013), tais como ácido nítrico, estão presentes no meio reacional. Isto ocorre porque, provavelmente, as espécies de nitrato e nitrito capturam os radicais formados a partir dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular na radiação ultravioleta. Sendo assim, métodos de preparo de amostras de amostras orgânicas visando a determinação de elementos traços com ácido nítrico (ZHENG , 2005), que são usualmente empregados, devem ser evitados. Diante disso, optou-se por utilizar um método de extração com ácido fórmico (HCOOH), sob aquecimento brando em banho termostaticado, citado na literatura (PINO , 2018).

O procedimento de extração com HCOOH, descrito na literatura, é realizado com aquecimento de 60 a 90° C. No entanto, sabe-se que a elevação da temperatura pode causar perdas de Hg, com isso, o aquecimento brando (60° C) por longos períodos, em frascos tampados, se torna uma opção (WARFVINGE , 2000).

Observou-se ainda que, há a necessidade de filtração das soluções, após o processo de extração, diferente do que é reportado na literatura (ZHENG , 2010), pois material particulado foi encontrado ao final do procedimento.

Potes , reporta a utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% v v<sup>-1</sup>, como auxiliar do processo de solubilização nos métodos de extração empregando ácido fórmico, não sendo necessário o processo de filtração. No entanto, no presente trabalho, quando se optou pela utilização do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , observou-se a supressão do sinal do analito. Isto pode ser explicado, em particular para o Hg, pela formação de  $\text{Hg}^0$  volátil que é perdido durante esta etapa (WU , 2012).

### 5.3 Estudo dos parâmetros de forma univariada

Inicialmente, o estudo dos parâmetros que influenciam na geração fotoquímica de vapor de Hg foi feito de forma univariada, por se tratar de um sistema complexo, que deve ser estudado ponto a ponto, em diferentes meios e matrizes de amostras.

As variáveis analisadas foram aquelas que influenciam diretamente a PVG. Sendo essas variáveis o ácido orgânico e sua concentração, a vazão do gás de arraste e o tempo de irradiação UV que a solução recebe.

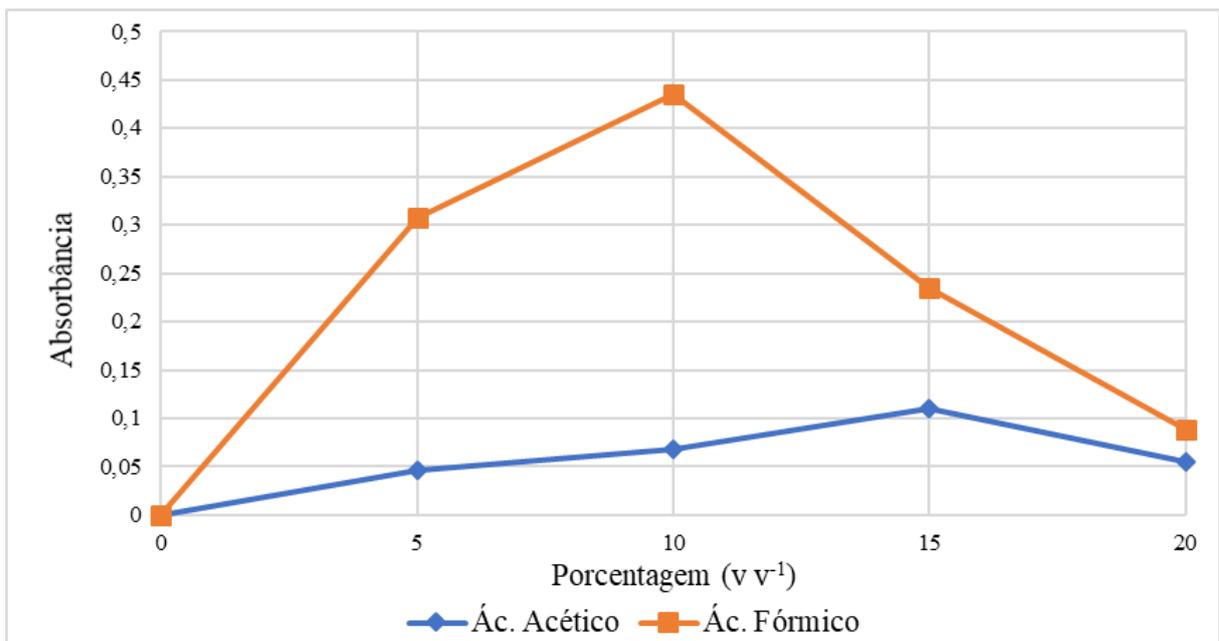
O ácido orgânico é o responsável pela formação dos radicais que levam a formação da espécie volátil (GUO , 2003). O tipo de ácido utilizado, em geral, depende do analito em questão e da natureza da amostra em estudo. No entanto, para o Hg os três ácidos orgânicos de baixo peso molecular (LMW) mais usuais (ác. fórmico, ác. acético e ác. propanóico) são capazes de formar a espécie volátil desse analito, assim, a escolha do ácido depende da matriz da amostra, pois, provavelmente, os mecanismos de formação da espécie volátil sofrerão influencia dessas matrizes (LEONORI , 2019).

A vazão do gás de arraste influencia na eficiência de separação da espécie volátil da solução líquida e o transporte da espécie volátil do SGL à célula de quartzo no espectrômetro de absorção atômica. A maior influência da vazão do gás de arraste na quantificação do Hg está na função de transporte. Utilizando-se uma baixa vazão do gás de arraste, tem-se uma menor eficiência no transporte da espécie contendo o analito para a célula de quantificação, fazendo com que a parte não transportada (dissolvida na solução) seja descartada pelo dreno do SGL. Por outro lado, utilizando-se uma alta vazão do gás de arraste pode-se observar uma diluição do analito dentro da célula de quantificação, pelo próprio gás de arraste (JESUS , 2014).

O tempo de irradiação sobre a amostra está relacionada aos radicais formados, a partir do ácido orgânico, uma vez que, a irradiação UV por um tempo abaixo do ideal, não proporciona energia suficiente para a clivagem das ligações do ácido orgânico, para que ocorra a formação dos radicais. A irradiação UV por um tempo muito prolongado aumenta a reatividade dos radicais, causando uma nova interação entre os radicais formados (QIN , 2013).

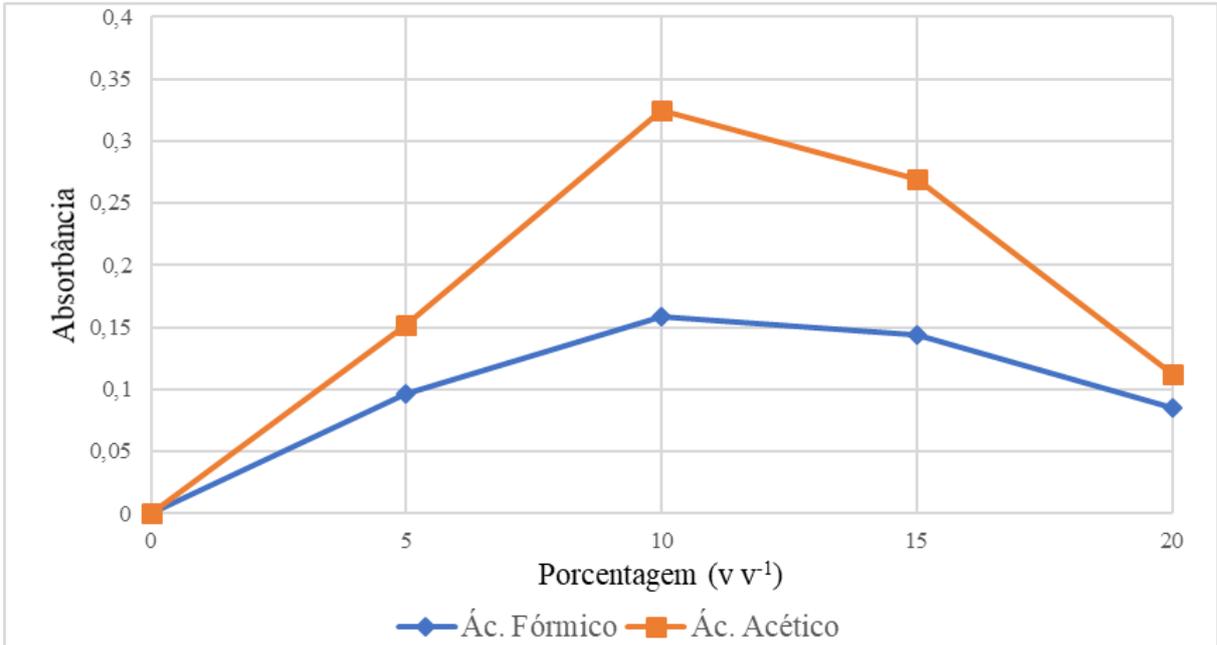
Na avaliação do tipo e da concentração dos LMW optou-se por utilizar apenas os ácidos fórmico e acético, pois segundo a literatura ácido propanoico não agrega reprodutibilidade ao método (GAO , 2015). As figuras mostram a influência de cada um dos ácidos em diferentes concentrações nas amostras de material de referência certificados.

Figura 4- Variação do sinal analítico de DORM-2 sobre o LMW e sua porcentagem.



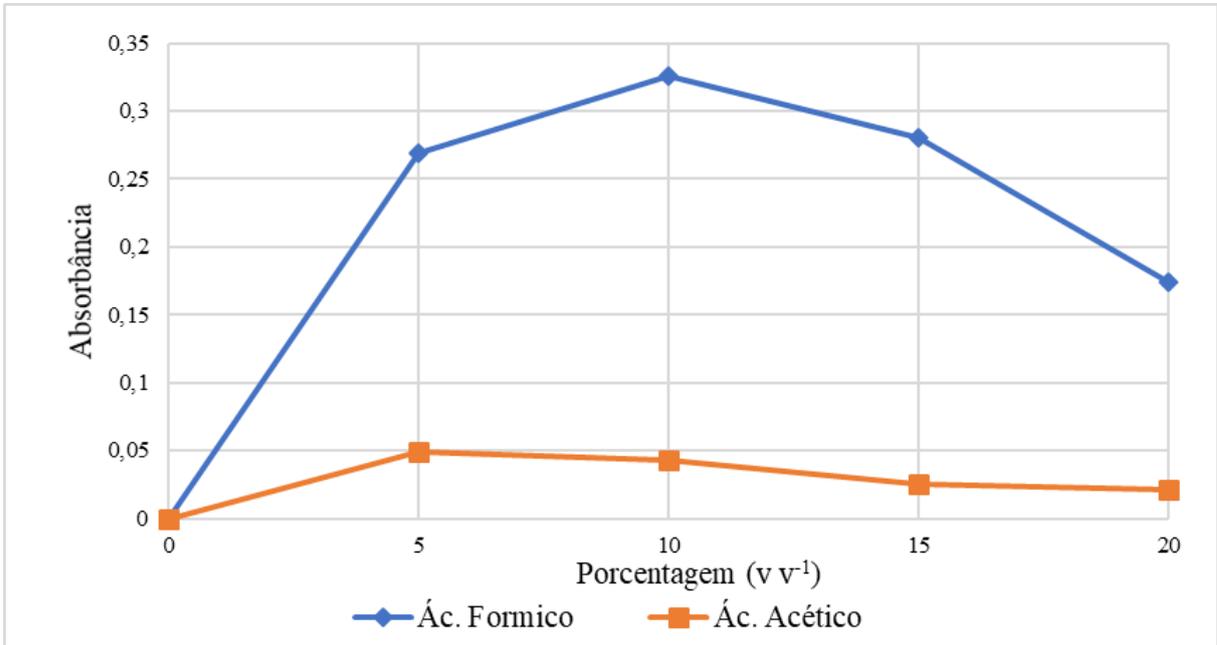
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5-Variação do sinal analítico de Oyster Tissue sobre o LMW e sua porcentagem.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6- Variação do sinal analítico de TORT-2 sobre o LMW e sua porcentagem.



Fonte: elaborado pelo autor.

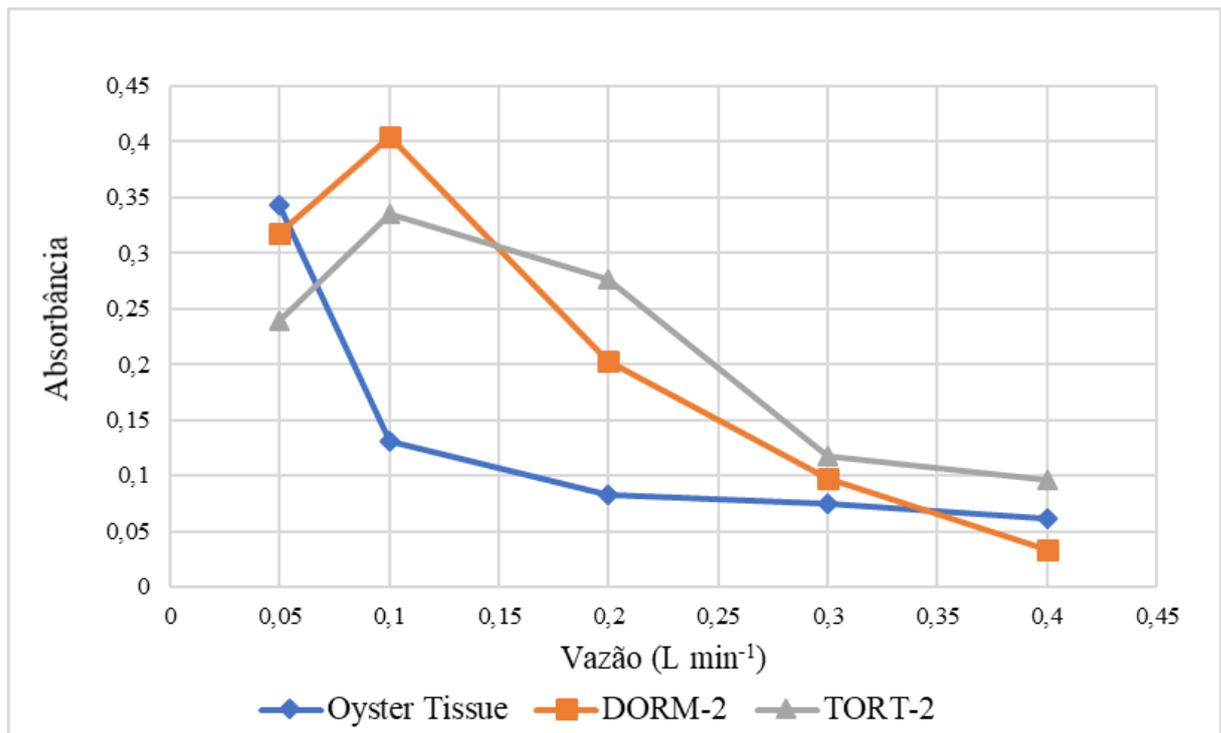
Observa-se que ambos os ácidos orgânicos proporcionaram a formação da espécie volátil do analito, no entanto, para duas das amostras (DORM-2 e TORT-2) o HCOOH gerou maior sinal de absorbância de Hg, enquanto que, para a amostra de Oyster Tissue foi o

CH<sub>3</sub>COOH, seguindo as afirmações de Leonori (2019). Sabe-se que, dependendo da matriz da amostra, a interação do ácido orgânico com o analito pode ser diferente, devido aos mecanismos de formação da espécie volátil serem diferentes.

As amostras de DORM-2 e TORT-2 apresentaram resultados semelhantes aos reportados na literatura, que também reportam uma melhora no sinal do analito quando se utiliza o HCOOH, em cerca de 600%. No entanto a amostra de Oyster Tissue apresentou melhores valores para CH<sub>3</sub>COOH, esse fato é advindo da diferença entre os tipos de matrizes trabalhadas nos materiais de referência certificados.

Para o estudo da vazão do gás de arraste observou-se a influencia no aumento da vazão do gás na absorção do analito. Os ensaios foram feitos utilizando o ácido orgânico que gerou melhor sinal para cada uma das amostras de materiais de referência certificados.

Figura 7- Estudo da vazão de N<sub>2</sub> no sinal analítico de Hg no CRM de estudo.



Fonte: elaborado pelo autor.

Como pode-se observar as taxas de vazão do gás de arraste para as amostras de DORM-2 e TORT-2 foram iguais, apresentando um ganho de 25% no sinal de absorbância de Hg, quando a vazão do gás de arraste foi aumentada de 0,05 L min<sup>-1</sup> para 0,10 L min<sup>-1</sup>. Esses resultados foram semelhantes aos valores encontrados por Covaci (2017). Esse

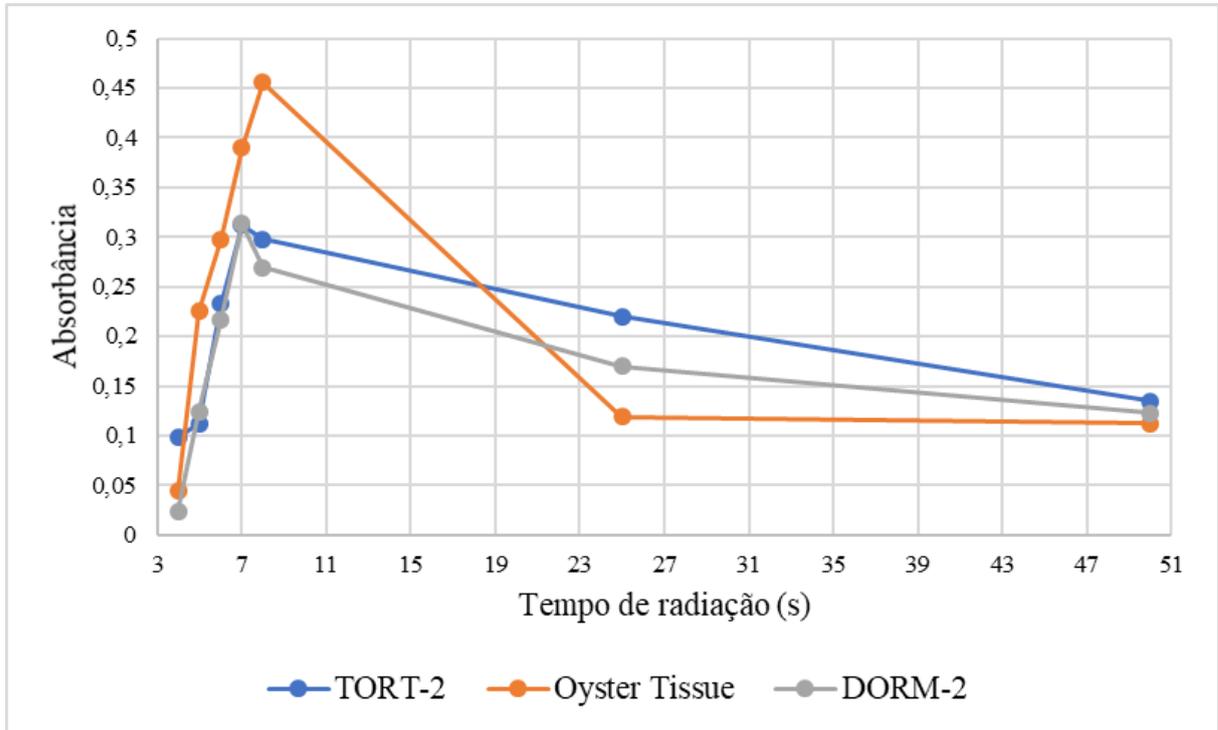
comportamento nos resultados pode estar relacionado aos mecanismos de formação da espécie volátil, que podem ser diferentes dependendo da matriz da amostra. Neste sentido, pode dizer que as amostras DORM-2 (proteína de peixe) e TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta) são semelhantes, possuindo o teor de proteínas entre 20-23%, enquanto para a amostra de Oyster Tissue o teor de proteína não ultrapassa 9%.

Observa-se que, para a amostra de Oyster Tissue (tecido de ostra) a taxa de vazão do gás de arraste que apresentou maior valor de absorvância para Hg foi de  $0,05 \text{ L min}^{-1}$ , sendo que, quando se usa a vazão de  $0,10 \text{ L min}^{-1}$  observa-se uma queda de 37 % do valor da absorvância. Segundo Oreste (2017), amostras biológicas de baixa concentração de Hg apresentam melhores resultados com taxas de gás de arraste entre  $0,045 - 0,06 \text{ L min}^{-1}$ .

Do ponto de vista da teoria da técnica, esperava-se que, para a amostra de Oyster Tissue, melhores sinais de absorvância fossem obtidos em menores vazões de gás de arraste, pois sabe-se que a concentração de Hg é cerca de 10 vezes menor nessa amostra, com relação às outras em estudo. E ainda, altas vazões de gás de arraste resultaram na diluição do analito na célula de quartzo, e conseqüentemente foram obtidos sinais mais baixos de absorvância para o Hg.

O estudo do tempo de radiação necessário para a formação da espécie volátil, foi feito para cada uma das amostras de materiais de referência certificados e seus valores são apresentados nas Figura 8.

Figura 8- Estudo do tempo de radiação sobre o sinal analítico.



Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, observa-se que a mínima variação no tempo de irradiação ( $\pm 1$  seg) ocasiona a alteração do valor de absorbância do analito em 13%. A ocorrência da perda de sinal pode ser devido à instabilidade das espécies formadas, o prolongamento no tempo de exposição à radiação UV leva a perdas da espécie volátil formada, independente da amostra analisada (JESUS , 2014).

A tendência do tempo de radiação UV necessário para formar a espécie volátil para o experimento, está relacionada ao tipo de LWM que foi utilizado, além da matriz da amostra (LEONORI , 2019). Os valores de tempo de irradiação UV determinados no presente trabalho se assemelham aos encontrados por Covaci (2017), essa semelhança já se era esperada, uma vez que o sistema relatado possuía a mesma configuração do reator fotoquímico (formato de bobina) usado no presente trabalho, bem como lâmpadas de radiação UV de mesma potência (15W).

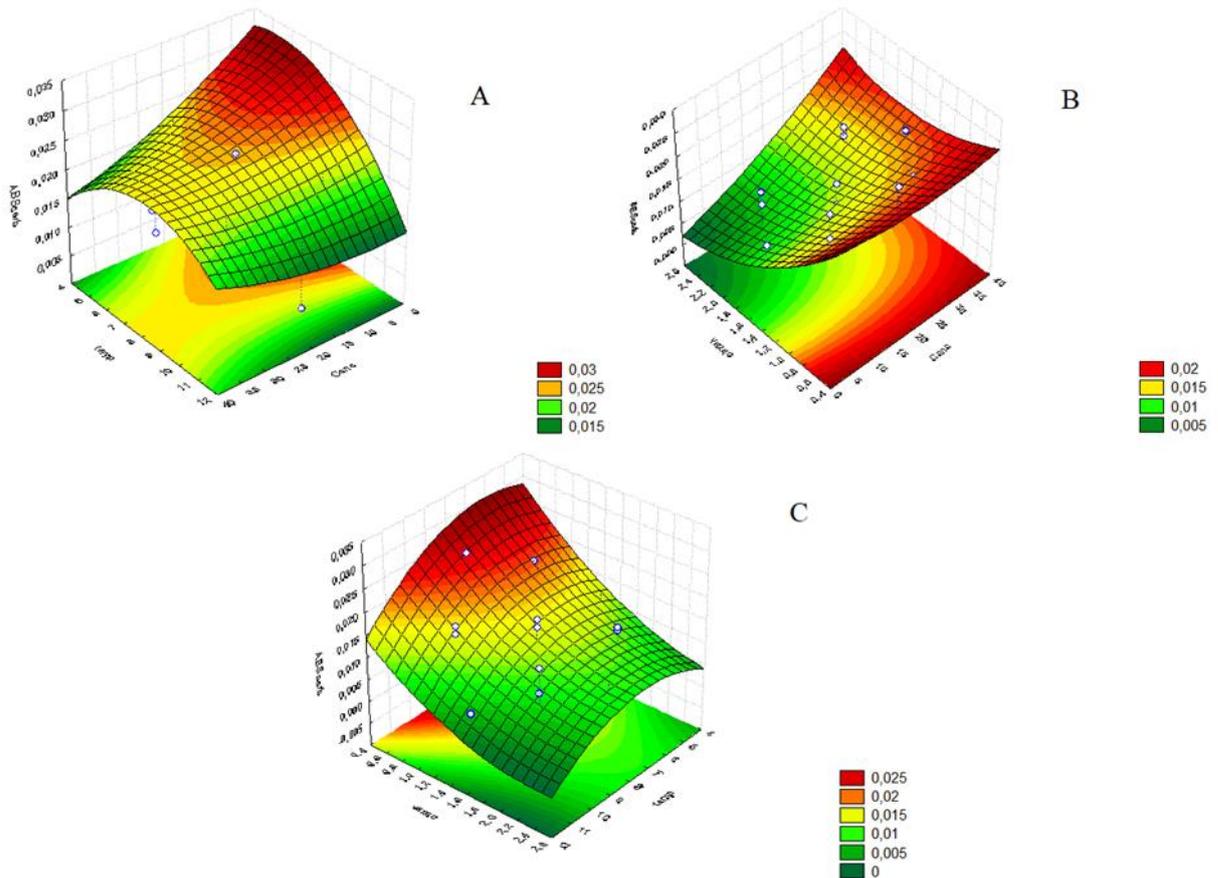
#### 5.4 Estudo do planejamento experimental para as amostras de cerebelo e gordura abdominal

Com os resultados obtidos nos estudos univariados dos parâmetros que influenciam na geração fotoquímica de vapor de Hg, foi possível realizar um planejamento fatorial, ou seja, uma análise multivariada, das condições experimentais para otimização da metodologia proposta para a determinação de Hg em amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores.

Para a otimização do processo de introdução da amostra utilizando a PVG utilizou-se o tempo de irradiação, a vazão do gás de arraste e a concentração do ácido fórmico, que foi o ácido orgânico de baixo peso molecular escolhido como LMW. Utilizando a concentração de Hg detectada como resposta.

Os gráficos de superfícies de resposta (Figura 9) obtidos do planejamento experimental na determinação de Hg na amostra de cerebelo de rato, foram plotados considerando-se o sinal de absorvância obtido em função da variação do tempo de irradiação e a concentração do HCOOH (Figura 9A), em função da concentração do HCOOH e a vazão do gás de arraste (Figura 9B) e em função do tempo de irradiação e a vazão do gás de arraste (Figura 9C).

Figura 9- Gráficos de superfícies de resposta obtidos do planejamento experimental para a introdução da amostra de cerebello usando PVG. (A- Tempo de irradiação x Concentração de AF; B- Concentração x Vazão de gás de arraste; C- Tempo de irradiação x Vazão de gás de arraste)



Fonte: elaborado pelo autor.

No estudo das condições ótimas para a amostra de cerebello, notamos na Figura 9A, que conforme se aumenta o tempo de exposição à radiação UV temos um aumento na absorvância do Hg, até 8 segundos, após este tempo há uma queda no sinal. No entanto, se avaliarmos a variação da concentração do HCOOH, percebemos que a região de absorvância máxima fica em menores tempos de exposição à radiação (até 7 segundos) e menores concentrações de HCOOH (até 10 %).

Avaliando-se a superfície de resposta da Figura 9C, na qual temos a variação do sinal de absorvância em função da vazão do gás de arraste e do tempo de exposição à radiação, verificamos que se podemos obter bons sinais de absorvância se trabalharmos com tempos de 6 a 8 segundos de exposição à radiação UV e vazões de gás de arraste de até 0,08 L min<sup>-1</sup>.

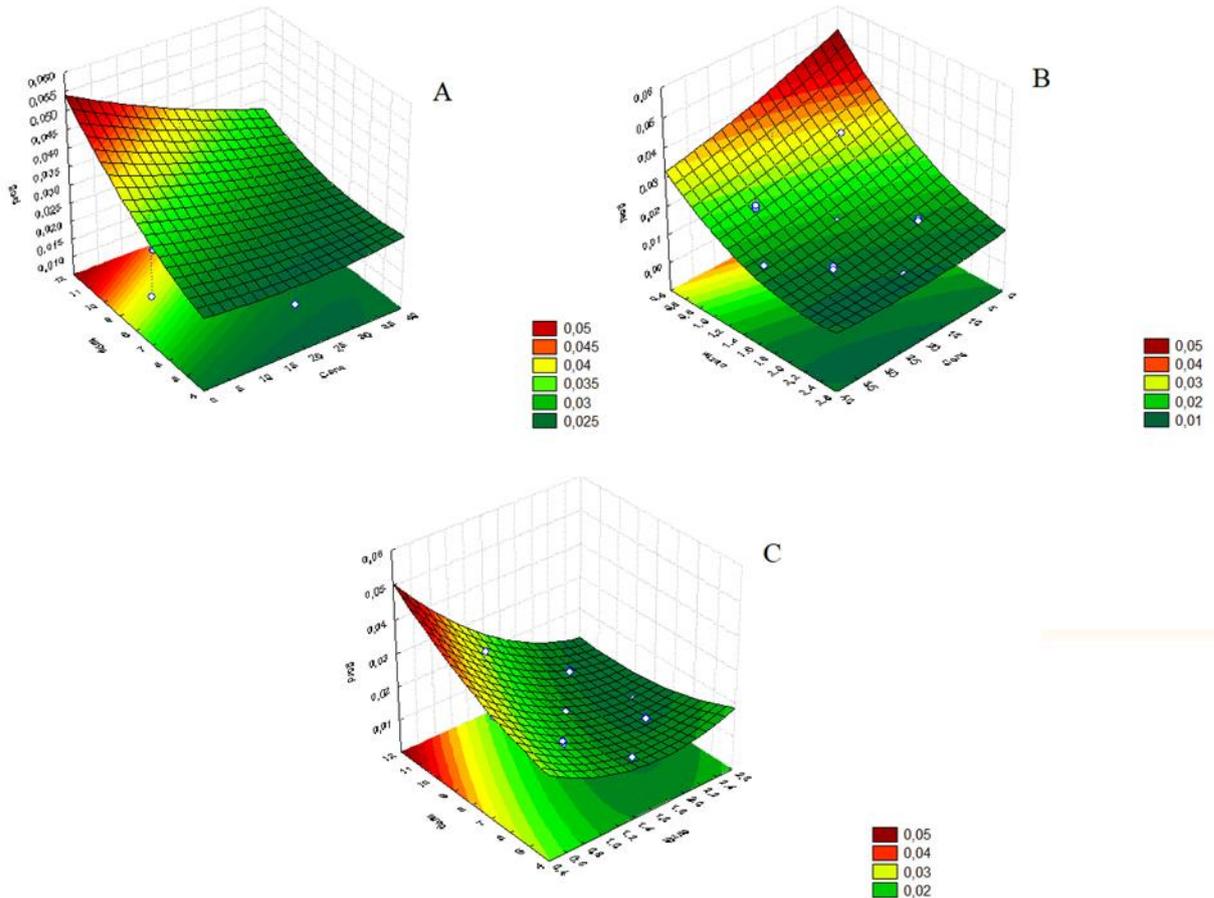
Observando-se a superfície de resposta da Figura 9B, pode-se notar a influência, de forma negativa, da vazão do gás de arraste no sinal de absorvância do analito. Isso acontece porque o uso de uma alta vazão de gás de arraste propicia a diluição do analito volátil ( $\text{Hg}^0$ ) formado e carregado para a célula de quantificação, e neste caso, a variação da concentração do HCOOH não altera o sinal de absorvância do analito. Por outro lado, podemos notar que em vazões mais baixas do gás de arraste ( $0,05 \text{ L min}^{-1}$ ) temos valores de absorvância mais altos. E ainda, quando olhamos para a variação da concentração do HCOOH, podemos inferir que o uso de concentrações mais altas possibilitaria o uso de vazões um pouco mais altas, até  $0,08 \text{ L min}^{-1}$ .

Para a amostra de Oyster Tissue, que também apresentou melhores resultados com vazões mais baixas de gás de arraste, observou-se que a necessidade da diminuição da vazão do gás de arraste se dava devido à baixa concentração de Hg no material, sendo que, no caso das amostras de cerebelo, podemos dizer que a limitação da massa da amostra também nos obrigou a trabalhar com baixas concentrações do analito.

Em relação ao tempo de exposição à radiação UV, o aumento da absorvância do analito no intervalo de tempo entre 6 a 8 segundos, está de acordo com o trabalho de Covaci (2017). Sendo assim, optou-se por utilizar o tempo de 7 segundos de exposição da solução em meio de HCOOH 10 % para as amostras de cerebelo, sendo esse dentro do intervalo, o que melhor se encaixa nos parâmetros instrumentais do método. E ainda, optou-se por seguir os valores reportados na literatura (COVACI , 2017 e LIU , 2013), em especial o que Oreste (2017). propôs para amostra biológicas, como sendo a concentração de HCOOH 10% v v<sup>-1</sup> a mais indicada.

Os gráficos de superfícies de resposta (Figura 10) obtidos do planejamento experimental na determinação de Hg na amostra de gordura abdominal de rato, foram plotados considerando-se o sinal de absorvância obtido em função da variação do tempo de irradiação e a concentração do HCOOH (Figura 10A), em função da concentração do HCOOH e a vazão do gás de arraste (Figura 10B) e em função do tempo de irradiação e a vazão do gás de arraste (Figura 10C).

Figura 10- Gráficos de superfícies de resposta obtidos do planejamento experimental para a introdução da amostra de gordura abdominal usando PVG. (A- Tempo de irradiação x Concentração de AF; B- Concentração x Vazão de gás de arraste; C- Tempo de irradiação x Vazão de gás de arraste).



Fonte: elaborado pelo autor.

Nos gráficos de superfície de respostas para o planejamento experimental da gordura abdominal dos roedores não foi possível observar um ponto de sela, uma vez que o parâmetro de tempo de irradiação UV não gerou sinal para valores acima de 12 segundos, não possibilitando o ajuste das condições de trabalho. Mesmo diante da impossibilidade de ajuste do planejamento experimental, ainda é possível notar um valor de máximo para as condições estudadas.

No estudo das condições ótimas para a amostra de cerebelo, notamos na Figura 10A, que com o aumento do tempo de radiação UV, temos um aumento no sinal de absorvância do analito, a partir de 9 segundos de exposição à radiação UV. Entretanto, considerando a concentração de HCOOH, os valores de máximos de absorvância, estão na

região de maior tempo de irradiação UV (entre 10 e 12 segundos), e concentrações de HCOOH entre 2 e 9 % v v<sup>-1</sup>.

Considerando a variável vazão do gás de arraste (Figura 10C), verificamos que podemos obter melhores valores de absorvância se trabalharmos com vazões de gás de arraste entre 0,05 e 0,08 L min<sup>-1</sup> e ainda valores mais altos para o tempo de irradiação UV (10 a 12 segundos).

Assim, da mesma forma que foi observada no planejamento experimental para a amostra de cerebelo, a Figura 10B demonstra a influência negativa do aumento da vazão do gás arraste na absorvância do analito. Por outro lado, a variação da concentração de HCOOH, apresenta menor influência na absorção do analito, no entanto, com a utilização de concentrações mais baixas de HCOOH (até 15% v v<sup>-1</sup>), tem-se um ganho de 20% na resposta da absorção do analito.

Segundo Covaci (2017), são esperados para o tempo de exposição à radiação UV, valores de até 14 segundos, para amostras biológicas. Dessa forma, optou-se por realizar os experimentos para geração fotoquímica de Hg<sup>0</sup> no tempo máximo de 12 segundos em vazões de gás de arraste de 0,05 L min<sup>-1</sup> e concentração de HCOOH de 10% v v<sup>-1</sup>.

### **5.5 Validação estatística do método de determinação de Hg utilizando PVG**

Diversos autores reportaram na literatura (JESUS , 2014) que a geração fotoquímica de vapor é utilizada com sucesso para a determinação da concentração de Hg total na amostra. Portanto, foi possível estabelecer uma curva analítica a partir da diluição da solução padrão do analito (Hg<sup>+2</sup>), e adicionando-se às amostras orgânicas durante o processo de preparo com ácido fórmico em aquecimento.

A partir das curvas analíticas de calibração para cada amostra em estudo, foi possível determinar as figuras de mérito da metodologia desenvolvida neste trabalho, que estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros de desempenho para as curvas obtidas para as amostras de trabalho.

Parâmetros	Amostras				
	DORM-2	TORT-2	Oyster Tissue	Cerebelo	Gordura Abdominal
Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,15 - 30	0,12- 30	0,21- 30	0,15 - 25	0, 22 - 30
Correlação dos dados ( $R^2$ )	0,9952	0,9923	0,9961	0,9954	0,9931
LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,05	0,04	0,07	0,04	0,08
LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	0,15	0,21	0,13	0,14	0,12
DPR (%)	1,05	2,39	5,94	1,39	2,94

Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, a determinação de Hg nas condições dispostas no trabalho, possibilitam a análise de amostras com concentrações reduzidas, a exemplo, para peixes não predadores, que segundo a legislação devem possuir concentração de até  $0,52 \text{ mg kg}^{-1}$  de Hg.

Segundo Liu (2013), os intervalos esperados para LD e LQ em amostras biológicas, nas condições propostas, são de  $0,02 - 0,06 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $0,09 - 1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Nas condições propostas, o método se mostrou mais sensível do que as técnicas consolidadas, tais como HG-AAS e CV-AFS. Segundo Zheng (2010), os LOD's determinados por HG-AAS e CV-AFS, quando realizado a extração de Hg da amostra utilizando HCOOH, são de  $0,03$  e  $0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

O desvio padrão relativo (DPR%) é um dos parâmetros que podem ser levados em consideração para a determinação da precisão de um método. Os valores mostrados na Tabela 4, demonstram que existe pouca variação dentro de uma análise da mesma amostra utilizando a PVG nas condições descritas no trabalho. A maior discrepância foi observada para a amostra com menor valor de concentração (Oyster Tissue), no entanto, o maior valor na variação ainda pode ser considerado aceitável e o método preciso.

Para a determinação da exatidão do método foi feita a comparação estatística do valor encontrado e do valor certificado, além do cálculo da recuperação percentual do método.

Tabela 5 - Teor de Hg (mg kg<sup>-1</sup>) nas amostras de material de referência determinado por PVG (média ± SD; n=3).

Elemento (mg kg <sup>-1</sup> )	DORM-2		Oyster Tissue		TORT-2	
	Valor observado	Valor referência	Valor observado	Valor referência	Valor observado	Valor referência
Hg	4,59 ± 0,12	4,64 ± 0,26	0,0386 ± 0,0020	0,0371 ± 0,0013	0,28 ± 0,03	0,27±0,06
t <sub>cal</sub>	0,159		2,498		0,487	
Recup. (%)	98,92		104,04		103,70	

Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo o que pode ser observado na Tabela 5, o método é considerado exato, sendo que sua exatidão pode ser comprovada pela semelhança dos valores de concentração de Hg nas amostras dos materiais de referência certificados. O método demonstrou uma recuperação situado dentro do intervalo aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (80 – 120%).

### 5.6 Determinação do teor de Hg em cerebelo e gordura abdominal dos roedores

Para aplicação da metodologia de PVG e detecção por absorção atômica proposta, foi determinado o teor total de Hg nas amostras de cerebelo e gordura abdominal de roedores expostos a uma contaminação controlada de metilmercúrio para estudos da influência dessa contaminação no quadro neurológico dos roedores no LABICONTE (Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos). Os valores determinados encontrados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6- Teores de Hg (mg kg<sup>-1</sup>) nas amostras de cerebelo e gordura abdominal por PVG (média ± SD; n=3).

Amostra	Teor (mg kg <sup>-1</sup> )
Cerebelo	2863,0 ± 0,1
Gordura abdominal	776,4 ± 0,1

Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme descrito na Tabela 6, as análises de cada amostra foram realizadas em triplicata para verificar os desvios relativos às médias apresentadas.

Como mostrado na Tabela 6, a contaminação por Hg realizada pelo grupo LABICONTE, confere um aumento bastante significativo da concentração de Hg depositado (acumulado) nas amostras de cerebelo e gordura abdominal analisadas. Em amostras de pêlo dos roedores expostos ao protocolo de contaminação do grupo LABICONTE, e análises realizadas em outros laboratórios utilizando-se a técnica de vapor frio e detecção por absorção atômica, foram determinados valores de aproximadamente  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de Hg. Esses valores encontrados nas amostras de pêlos são bem superiores aos teores totais determinados de Hg em cabelo de indivíduos que sofreram intoxicação por esse metal ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (PINO , 2018).

Esses valores encontrados na amostra de cerebelo reforçam a teoria da alta probabilidade de deposição de metilHg nessa área do sistema biológico do roedor, superando a concentração encontrada nas demais amostras analisadas (pêlo e gordura abdominal). Estudos relacionados a quantificação de Hg no cerebelo de pessoas contaminadas por Hg apresentam valores consideravelmente abaixo ( $0,69 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (WARFVINGE , 2000). Dessa forma, pode-se afirmar que a ação do protocolo de contaminação do grupo LABICONTE, tem efetividade, e que a maior parte do metilHg administrado para os roedores se deposita na região do cerebelo.

Para a amostra de gordura abdominal esperava-se uma concentração de Hg bem elevada, devido a capacidade lipossolúvel do metil-Hg quando complexado na forma orgânica (GOLDMAN , 2012). A literatura traz alguns trabalhos que fazem associação aos diferentes efeitos da exposição ao Hg em roedores com obesidade (KAWAKAMI , 2012), e ao aumento da concentração de Hg total no sangue em indivíduos com sobrepeso (PARK , 2017) quando submetidos a uma contaminação controlada de Hg.

## 6 CONCLUSÃO

A geração fotoquímica de vapor (PVG) para a determinação de Hg (total) em amostras biológicas, mostrou-se uma técnica viável de baixo custo e alta sensibilidades na quantificação de Hg por AAS.

A extração de Hg por meio da utilização de ácido fórmico sob aquecimento, mostrou-se efetiva, extraíndo a quantidade de Hg total presente nas amostras de materiais de referência certificados, possibilitando a análise posterior do analito pelo método proposto.

A escolha adequada do separador gás-líquido (SGL) empregado no sistema, permitiu a reprodutibilidade do método e a separação efetiva da espécie volátil de Hg formada de sua matriz presente na fase líquida.

O estudo e otimização das variáveis tipo e concentração do ácido orgânico de baixo peso molecular, tempo de irradiação UV e vazão do gás de arraste, resultaram em um ganho de 700% de sinal de absorbância do analito.

A exatidão e a precisão do método foram comprovadas pela análise dos materiais de referência certificados, que apresentaram percentuais de recuperação acima de 98%, com uma variação máxima de 5 % entre as análises realizadas.

A otimização dos parâmetros do método utilizando um planejamento experimental multivariado, possibilitou a quantificação de Hg total nas amostras de cerebelo e de gordura abdominal de roedores.

## REFERÊNCIAS

- AKAGI, Hirokatsu; FUJITA, Yuzaburo; TAKABATAKE, Eigo. METHYLMERCURY: PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATION OF MERCURIC SULFIDE INTO METHYLMERCURY IN AQUEOUS SOLUTIONS1. **Photochemistry And Photobiology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.363-370, out. 1977.
- ARKHANGELSKY, E. *et al.* Nanoparticles as a Powerful Tool for Membrane Pore Size Determination and Mercury Removal. **Nanotechnology In Water And Wastewater Treatment**, [s.l.], p.63-86, 2019. Elsevier.
- BENDICHO, C. *et al.* Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], v. 27, n. 11, p.1831-1835, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).
- BINGS, Nicolas H.; BOGAERTS, Annemie; BROEKAERT, José A. C.. Atomic Spectroscopy: A Review. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 82, n. 12, p.4653-4681, 15 jun. 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília: SVS, 2011
- BURGER, Joanna; GOCHFELD, Michael. Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 409, n. 8, p.1418-1429, mar. 2011. Elsevier BV.
- CHEN, Guoying *et al.* Mercury speciation by differential photochemical vapor generation at UV-B vs. UV-C wavelength. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 137, p.1-7, nov. 2017. Elsevier BV.
- COVACI, Eniko *et al.* Methylmercury determination in seafood by photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 170, p.464-472, ago. 2017. Elsevier BV.
- GAO, Ying *et al.* Multivariate optimization of photochemical vapor generation for direct determination of arsenic in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 901, p.34-40, dez. 2015. Elsevier BV.
- GIERSZ, Jacek; BARTOSIAK, Magdalena; JANKOWSKI, Krzysztof. Sensitive determination of Hg together with Mn, Fe, Cu by combined photochemical vapor generation and pneumatic nebulization in the programmable temperature spray chamber and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 167, p.279-285, maio 2017.
- GOLDMAN, Lee; AUSIELLO, Dennis. **Cecil Medicina Interna**. 24. ed. SaundersElsevier, 2012.

GÓRECKI, Jerzy *et al.* Method development and validation for total mercury determination in coke oven gas combining a trap sampling method with CVAAS detection. **Talanta**, [s.l.], v. 188, p.293-298, out. 2018. Elsevier BV.

GRINBERG, Patricia; STURGEON, Ralph E. Ultra-trace determination of iodine in sediments and biological material using UV photochemical generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.235-241, mar. 2009.

GUO, Xuming *et al.* UV Vapor Generation for Determination of Selenium by Heated Quartz Tube Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 75, n. 9, p.2092-2099, maio 2003.

HE, Yihua *et al.* Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 388, n. 4, p.769-774, 18 jan. 2007.

JESUS, Alexandre de *et al.* Determination of mercury in gasoline by photochemical vapor generation coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 117, p.100-105, nov. 2014.

KARTHIKA, A. *et al.* Electrochemical behaviour and voltammetric determination of mercury (II) ion in cupric oxide/poly vinyl alcohol nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 145, p.737-744, mar. 2019. Elsevier BV.

KAWAKAMI, Takashige *et al.* Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 258, n. 1, p.32-42, jan. 2012. Elsevier BV.

KIM, Ki-hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 306, p.376-385, abr. 2016. Elsevier BV.

LABORDA, Francisco; BOLEA, Eduardo; CASTILLO, Juan R. Electrochemical hydride generation as a sample-introduction technique in atomic spectrometry: fundamentals, interferences, and applications. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 388, n. 4, p.743-751, 25 jan. 2007. Springer Nature.

LEONORI, Daniele; STURGEON, Ralph E. A unified approach to mechanistic aspects of photochemical vapor generation. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], p.320-398, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC).

LIU, Rui *et al.* Determination of total mercury in biological tissue by isotope dilution ICPMS after UV photochemical vapor generation. **Talanta**, [s.l.], v. 117, p.371-375, dez. 2013. Elsevier BV.

MORITA, M.; YOSHINAGA, Jun; EDMONDS, J. S. The determination of mercury species in environmental and biological samples (Technical Report). **Pure And Applied Chemistry**, [s.l.], v. 70, n. 8, p.1585-1615, 30 ago. 1998.

Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Nordberg, M. (Eds.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. Academic Press. 2014

ORESTE, Eliezer *et al.* Determination of Hg in Biological Samples and Ethanol Fuel by Photochemical Vapor Generation after Pre-Concentration in a Gold Trap. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.1779-1787, 2017. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ).

ÖZKAN-YđLMAZ, Ferbal *et al.* Effects of dietary selenium of organic form against lead toxicity on the antioxidant system in *Cyprinus carpio*. **Fish Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.355-363, 24 ago. 2013. Springer Nature.

PACYNA, E.g. *et al.* Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. **Atmospheric Environment**, [s.l.], v. 44, n. 20, p.2487-2499, jun. 2010. Elsevier BV.

PARK, Jong Suk *et al.* Association between Blood Mercury Level and Visceral Adiposity in Adults. **Diabetes & Metabolism Journal**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.113-117, 2017. Korean Diabetes Association (KAMJE).

PINHEIRO, Maria da Conceição Nascimento *et al.* Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.265-269, jun. 2000

PINO, A. *et al.* Determination of mercury in hair of children. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 298, p.25-32, dez. 2018. Elsevier BV.

POHL, Pawel. Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.21-27, jan. 2004.

Potes, M. L.; Jesus, A.; Kolling, L.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B.; Silva, M. M. Determination of mercury in fish by photochemical vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal. Methods**, 8, 8165-8172, 2016

QIN, Deyuan *et al.* Ultraviolet vapor generation atomic fluorescence spectrometric determination of mercury in natural water with enrichment by on-line solid phase extraction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 88, p.10-14, out. 2013. Elsevier BV.

QUADROS, Daiane P.c. de *et al.* Mercury speciation by high-performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry using an integrated microwave/UV interface. Optimization of a single step procedure for the simultaneous photo-oxidation of

mercury species and photo-generation of Hg 0. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s.l.], v. 101, p.312-319, nov. 2014. Elsevier BV.

ROMANOVSKIY, Konstantin A. *et al.* A novel photochemical vapor generator for ICP-MS determination of As, Bi, Hg, Sb, Se and Te. **Talanta**, [s.l.], v. 187, p.370-378, set. 2018. Elsevier BV.

SHEN, Yan *et al.* Integration of hydride generation and photochemical vapor generation for multi-element analysis of traditional Chinese medicine by ICP-OES. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 123, p.164-169, nov. 2015.

SKOOG, HOLLER, NIEMAN, **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Edição, Editora **Bookman**, São Paulo-SP, 2002.

STURGEON, R. E.; GUO, X.; MESTER, Z.. Chemical vapor generation: are further advances yet possible?. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 382, n. 4, p.881-883, 31 mar. 2005.

STURGEON, Ralph E.; GRINBERG, Patricia. Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation. **J. Anal. At. Spectrom.**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.222-231, 2012.

SYVERSEN, Tore; KAUR, Parvinder. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.215-226, out. 2012. Elsevier BV.

TAKASE, Iracema *et al.* A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.1132-1144, dez. 2002.

UNO ENVIRONMENT. **Global Mercury assessment 2018 for comments**. Disponível em: <https://www.unenvironment.org/explore-topics/chemicals-waste/what-we-do/mercury/global-mercury-assessment-2018-comments>. Acesso em: 26 dez 2018.

USDA. **Determination of Mercury by atomic absorption spectrophotometry**. Disponível em: [https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7f248e71-0510-43c2-96ab-bf263f23658a/CLG\\_TM\\_5\\_00.pdf?MOD=AJPERES](https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7f248e71-0510-43c2-96ab-bf263f23658a/CLG_TM_5_00.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em: 26 dez 2018.

VIEIRA, Mariana A.; RIBEIRO, Anderson S.; CURTIUS, Adilson J.; STURGEON, Ralph E.. Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 388, n. 4, p. 837-847, 27 fev. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

WANG, Huaming *et al.* Electrospun nanofibrous mercury filter: Efficient concentration and determination of trace mercury in water with high sensitivity and tunable dynamic range. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 982, p.96-103, ago. 2017. Elsevier BV.

WARFVINGE, Karin. Mercury Distribution in the Neonatal and Adult Cerebellum after Mercury Vapor Exposure of Pregnant Squirrel Monkeys. **Environmental Research**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.93-101, jun. 2000. Elsevier BV.

Welz, B.; Vale, M.G.R; Atomic absorption spectrometry and related techniques. In: Jack Cazes. (Org.). **Analytical Instrumentation Handbook**. 3ed. New York: Marcel Dekker, 2004

WU, Li *et al.* Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, [s.l.], v. 94, p.146-151, maio 2012. Elsevier BV.

YIN, Yongguang; LIU, Jingfu; JIANG, Guibin. Photo-induced chemical-vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 10, p.1672-1684, nov. 2011.

ZHANG, Yanlin; MIRÓ, Manuel; KOLEV, Spas D.. A novel on-line organic mercury digestion method combined with atomic fluorescence spectrometry for automatic mercury speciation. **Talanta**, [s.l.], v. 189, p.220-224, nov. 2018. Elsevier BV.

ZHENG, Chengbin *et al.* Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.746-750, 2005. Royal Society of Chemistry (RSC).

ZHENG, Chengbin *et al.* UV Photochemical Vapor Generation Sample Introduction for Determination of Ni, Fe, and Se in Biological Tissue by Isotope Dilution ICPMS. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 82, n. 9, p.3899-3904, maio 2010. American Chemical Society (ACS).

ZHENG, Chengbin *et al.* UV photochemical vapor generation–atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 95, n. 1, p.32-37, maio 2010.