



FURG

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO
EMPREGANDO MSPD E GC-MS**

Bruno Meira Soares

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2012

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO
EMPREGANDO MSPD E GC-MS**

por

BRUNO MEIRA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2012

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE MERCÚRIO
EMPREGANDO MSPD E GC-MS**

elaborada por

BRUNO MEIRA SOARES

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte - Orientador (FURG - RS)

Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores (UFSM - RS)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG - RS)

Rio Grande, 31 de julho de 2012.

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Arlei e Magda, pelo carinho, apoio, confiança, sacrifício e exemplo pessoal, de trabalho, humildade e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental** da Universidade Federal do Rio Grande pela possibilidade de execução deste trabalho, meus agradecimentos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pelo apoio financeiro prestado.

Ao Prof. Dr. **Fábio Andrei Duarte**, pela orientação, conhecimento compartilhado, amizade, confiança e exemplo profissional, além das inúmeras oportunidades que permitiram meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. **Ednei Gilberto Primel**, pela participação como banca examinadora e, também, pelo aprendizado, amizade e o importante apoio e contribuição durante a execução deste trabalho que sempre estiveram presentes.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que aperfeiçoaram, sobremaneira, esta dissertação, além da disponibilidade de estrutura de trabalho, junto à Universidade Federal de Santa Maria, que contribuíram para a execução deste e outros trabalhos.

A todos os amigos e colegas do **Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais**, pelo grande respeito e amizade, além do importante conhecimento compartilhado, apoio, incentivo e companheirismo demonstrados.

Ao colega **Augusto Alves Vieira** do LACOM, pela amizade, apoio e companheirismo, além do auxílio prestado nas atividades práticas que contribuíram de forma determinante para a execução deste trabalho.

Às colegas **Sergiane Caldas Barbosa e Adriana Neves Dias** do LACOM, pela grande amizade, incentivo e auxílio prestados, principalmente com relação à instrumentação utilizada neste trabalho.

Aos colegas **Éderson Rodrigues Pereira e Juliana Villela Maciel** do LACOM, pelo importante apoio, companheirismo, conhecimento compartilhado e pela grande amizade construída neste período.

À minha ex-professora e colega **Liziara da Costa Cabrera** do LACOM, pelo carinho, apoio e pela amizade que ganhou força nos últimos anos.

À minha namorada **Isis Gonçalves Toralles**, pelo importante carinho, paciência, incentivo, confiança e companheirismo que estiveram presentes em todos os momentos, incentivando de forma efetiva a execução deste trabalho.

Ao secretário do PPGQTA **Diego Goulart Pereira**, pelo auxílio e disposição demonstrados nas questões da pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Mercúrio	4
2.1.1 Espécies inorgânicas	5
2.1.1.1 Mercúrio metálico	5
2.1.1.2 Íons inorgânicos	5
2.1.2 Espécies orgânicas	6
2.2 Análise de especiação de mercúrio	8
2.2.1 Estabilidade das espécies de mercúrio	8
2.2.2 Métodos de extração de espécies de mercúrio	9
2.2.2.1 Dispersão da matriz em fase sólida	13
2.2.3 Técnicas de determinação de espécies de mercúrio	14
2.2.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas	18
2.3 Planejamento de experimentos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Instrumentação	25
3.2 Reagentes	26
3.3 Amostras	27
3.4 Tratamento preliminar das amostras	28

3.5 Digestão das amostras para determinação de mercúrio total	28
3.6 Determinação de mercúrio total por CVG-ICP-MS	28
3.7 Otimização da separação cromatográfica por GC-MS	29
3.8 Determinação das espécies de mercúrio por GC-MS	29
3.9 Otimização da etapa de derivatização das espécies de mercúrio	30
3.10 Extração das espécies de mercúrio empregando MSPD	31
3.11 Otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD	32
3.11.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	32
3.11.2 Planejamento fatorial completo 2^3	34
3.12 Validação do método	35
3.12.1 Limite de detecção e quantificação	35
3.12.2 Linearidade.....	36
3.12.3 Efeito de matriz	36
3.12.4 Exatidão e precisão.....	37
3.12.5 Robustez	38
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	39
4.1 Estudo da separação cromatográfica das espécies de mercúrio por GC-MS	39
4.2 Otimização da etapa de derivatização das espécies de mercúrio	42
4.2.1 Efeito do volume de derivatizante	42
4.2.2 Efeito do tipo de solvente orgânico	44
4.2.3 Efeito do tempo de agitação/reação.....	44
4.2.4 Efeito do pH.....	46
4.3 Otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD	47
4.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	49
4.3.2 Planejamento fatorial completo 2^3	54

4.4 Validação do método	60
4.4.1 Limite de detecção e quantificação	60
4.4.2 Estudo da linearidade.....	60
4.4.3 Estudo do efeito de matriz.....	61
4.4.4 Estudo da exatidão e precisão	63
4.4.5 Estudo da robustez	64
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do método de MSPD original (Adaptado de Barker⁸).13
- Figura 2.** Diagrama dos principais componentes de um equipamento de GC-MS (Adaptado de McMaster⁹¹).19
- Figura 3.** Estruturas químicas do reagente derivatizante tetrafenilborato de sódio Na[B(C₆H₅)₄] e as espécies de mercúrio nas formas derivatizadas metilfenilmercúrio (CH₃HgC₆H₅) e difenilmercúrio [Hg(C₆H₅)₂].22
- Figura 4.** Equipamento de GC-MS utilizado para separação e determinação das espécies de mercúrio.25
- Figura 5.** Fluxograma da extração das espécies de mercúrio empregando a MSPD.32
- Figura 6.** Íons (*m/z*) monitorados no modo SIM referentes à fragmentação das espécies de mercúrio, derivatizadas: (a) CH₃HgC₆H₅ e (b) Hg(C₆H₅)₂. Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL NaB[(C₆H₅)₄] 1% (m/v); 1 mL de hexano.39
- Figura 7.** Cromatogramas de íon total referentes à avaliação da temperatura inicial (a) CH₃HgC₆H₅ e (b) Hg(C₆H₅)₂ e da taxa de aumento da temperatura (c) CH₃HgC₆H₅ e (d) Hg(C₆H₅)₂. Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL NaB[(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 1 mL de hexano.40
- Figura 8.** Cromatograma no modo TIC de uma solução de referência de 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg. Condições: 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL NaB[(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 1 mL de hexano, sob as condições otimizadas do GC-MS.41
- Figura 9.** Estudo do volume de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 0,5 a 2 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 1 min de agitação. As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.43
- Figura 10.** Estudo do tipo de solvente orgânico para a extração das espécies derivatizadas de mercúrio (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 1 min de agitação. As letras a e

- b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.44
- Figura 11.** Estudo do tempo de agitação/reação na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano e 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v). As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.....45
- Figura 12.** Estudo do efeito do pH na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH de 3,0 a 7,0; 1 mL de hexano; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 30 s de agitação. As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas. .46
- Figura 13.** Cromatogramas das espécies de Hg derivatizadas: CH₃HgC₆H₅ e Hg(C₆H₅)₂. Os cromatogramas representam experimentos onde foram utilizados C18 (■); sílica (■) e adição de 10 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg, sem passar pela MSPD (■). Condições: 0,5 g de amostra; 1 g de suporte sólido; extração com 5 mL de uma solução de NaCl 1 mol L⁻¹ e HCl 3 mol L⁻¹; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização. 49
- Figura 14.** Correlação entre os valores preditos pelos modelos de regressão e os valores observados pelo experimento para as espécies (a) CH₃Hg⁺ e (b) Hg²⁺. Condições: 10 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização.57
- Figura 15.** Superfícies de contorno que representam as recuperações para (a) CH₃Hg⁺ e (b) Hg²⁺ como uma função da massa de amostra e da concentração de HCl. Condições: 10 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização.....58
- Figura 16.** Fluxograma simplificado da extração/derivatização das espécies de mercúrio por MSPD e determinação por GC-MS.59
- Figura 17.** Curvas de calibração preparadas no solvente (a) CH₃Hg⁺ e (b) Hg²⁺; e de adição de analito (c) CH₃Hg⁺ e (d) Hg²⁺61
- Figura 18.** Curvas analíticas (x) preparada no solvente e (x) no extrato para as espécies (a) CH₃Hg⁺ e (b) Hg²⁺.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais para a determinação da concentração de mercúrio total por CV-ICP-MS.	29
Tabela 2. Condições operacionais para a separação e determinação das espécies de mercúrio por GC-MS.....	30
Tabela 3. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD.....	33
Tabela 4. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD.....	34
Tabela 5. Efeitos estimados das variáveis independentes na recuperação das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+}	50
Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com as recuperações (R) obtidas para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+}	51
Tabela 7. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.	55
Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com as recuperações observadas no experimento, recuperações preditas pelos modelos e os desvios relativos para cada espécie de mercúrio.....	56
Tabela 9. Valores observados e certificados pelos CRMs e os valores referentes à aplicabilidade do método (resultados em $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ desvio padrão, $n = 3$).	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *atomic fluorescence spectrometry*
2. ANOVA, análise de variância, do inglês *analysis of variance*
3. ASTDR, Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
4. CPE, extração em ponto nuvem, do inglês *cloud point extraction*
5. CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
6. CVG-ET AAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica com geração de vapor, do inglês *cold vapor generation-electrothermal atomic absorption spectrometry*
7. CVG-ICP-MS, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor, do inglês *cold vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry*
8. DCCR, delineamento composto central rotacional
9. EI, impacto de elétrons, do inglês *electron impact*
10. ET AAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*
11. GC, cromatografia em fase gasosa, do inglês *gas chromatography*
12. GC-AFS, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *gas chromatography atomic fluorescence spectrometry*
13. GC-ECD, cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons, do inglês *gas chromatography electron capture detection*
14. GC-FID, cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama, do inglês *gas chromatography flame ionization detection*
15. GC-ICP-MS, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês *gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*.
16. GC-MIP-AES, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês *gas chromatography microwave-induced plasma atomic emission spectrometry*

17. GC-MS, cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled mass spectrometry*
18. HS-SPME, microextração em fase sólida em *headspace*, do inglês *head space solid phase microextraction*
19. ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
20. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
21. IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union for Pure and Applied Chemistry*
22. LC, cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*
23. LC-ICP-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês *liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*
24. *m/z*, razão massa/carga
25. MAD, digestão assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted digestion*
26. MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted extraction*
27. MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*
28. NRCC, do inglês *National Research Council Canada*
29. rpm, rotações por minuto
30. RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
31. SIM, monitoramento de íon selecionado, do inglês *selected ion monitoring*
32. SPE, extração da matriz em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*
33. SPME, microextração em fase sólida, do inglês *solid-phase microextraction*
34. TIC, cromatograma de íons totais, do inglês *total ion chromatogram*
35. TLC, cromatografia em camada delgada, do inglês *thinlayer chromatography*

RESUMO

Título: Desenvolvimento de método para determinação de espécies de mercúrio empregando MSPD e GC-MS

Autor: Bruno Meira Soares

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Neste trabalho é proposto pela primeira vez, o desenvolvimento e validação de um método analítico baseado no emprego da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) modificada, para extração das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de peixe e determinação por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O método de extração utilizando a MSPD combina o rompimento da estrutura física da amostra, através da maceração e do uso de SiO_2 como suporte sólido, com o método da extração ácida, utilizando uma solução de HCl $4,2 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Para otimização da MSPD, foram avaliados parâmetros como massa de amostra, massa de suporte sólido, concentração de HCl , concentração de NaCl , tipo de suporte sólido e o tempo de agitação, com auxílio da metodologia de superfície de resposta. Além disso, a etapa de derivatização e a separação cromatográfica também foram otimizadas na determinação de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} por GC-MS. O método mostrou-se adequado para extração e determinação de espécies de mercúrio através da aplicação em materiais de referência certificados de fígado de peixe (DOLT-3) e músculo de peixe (DORM-2), apresentando boas concordâncias com os valores certificados e desvio padrão relativo inferior a 9,5%. Os limites de detecção foram de $0,06$ e $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Além disso, foi observado um significativo efeito de matriz e, por isso, a calibração foi feita com curvas preparadas com o extrato da MSPD. O método mostrou boa concordância na comparação entre a soma da concentração das espécies e a concentração de mercúrio total determinada por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor frio (CVG-ICP-MS), após digestão assistida por micro-ondas (MAD) em peixes do tipo atum (*Thunnus thynnus*), cação anjo (*Squatina squatina*) e cação viola (*Rhinobatos blochii*).

ABSTRACT

Title: Development of method for mercury species determination employing MSPD and GC-MS

Author: Bruno Meira Soares

Advisor: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

In this work, the development and validation of an analytical method employing matrix solid-phase dispersion modified (MSPD) for extraction of CH_3Hg^+ and Hg^{2+} species in fish, followed of the determination by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was proposed. The extraction method combines the disruption of sample physical structure, through of blending and use of silica as solid support and acid extraction (using a solution composed by HCl 4.2 mol L^{-1} and NaCl 0.5 mol L^{-1}). For MSPD method optimization, parameters such as sample mass, type and mass of solid support, HCl concentration, NaCl concentration, and stirring time were investigated using the surface response methodology. Additionally, the derivatization step and the chromatographic separation were also evaluated for the determination by GC-MS. The method was suitable for extraction and determination of mercury species using certified reference materials of dogfish liver (DOLT-3) and dogfish muscle (DORM-2), showing good agreement with the certified values. The detection limits were $0,06$ and $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ for CH_3Hg^+ and Hg^{2+} , respectively. A matrix effect was observed and the calibration curve was made using the MSPD extract. The method showed good agreement in the comparison among the sum of species concentration and the concentration of total mercury determined by cold vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS), after microwave-assisted digestion (MAD) in tuna fish (*Thunnus thynnus*), shark angel (*Squatina squatina*), and shark violates (*Rhinobatos blochii*).

1. INTRODUÇÃO

A pouca disponibilidade de informações a partir da determinação da concentração total de um elemento tem despertado o interesse pela identificação e determinação das suas espécies químicas, processo chamado de análise de especiação. Isso se deve ao fato das espécies químicas de um elemento, apresentarem diferentes características com relação à sua toxicidade e essencialidade. Tratando-se de avaliações toxicológicas em organismos vivos, o estudo das espécies químicas de um elemento tem sido de grande importância, principalmente em estudos relacionados com a biota aquática.¹

Dentre os elementos mais estudados no contexto da análise de especiação, o mercúrio ganha destaque, pois está entre os elementos tóxicos mais nocivos no que diz respeito à poluição ambiental. Cabe destacar que, além de causar problemas relacionados à exposição ocupacional aos seres humanos, na forma inorgânica (Hg^{2+}) ou elementar (Hg^0), também é considerado um elemento de elevada bioacumulação na cadeia alimentar. Dentre as espécies alquiladas de mercúrio, destaca-se o metilmercúrio (CH_3Hg^+) como a espécie com maior toxicidade para os organismos vivos. Além disso, sua alta solubilidade em tecidos lipídicos de animais marinhos é um dos fatores responsáveis pela bioacumulação e biomagnificação deste elemento na biota.¹⁻³ Por isso, existe uma crescente demanda para o desenvolvimento de métodos analíticos para extração e determinação de espécies de mercúrio em matrizes ambientais, biológicas, industriais, entre outras.

Nos métodos que empregam a análise de especiação, a etapa mais crítica pode ser atribuída à extração dos analitos, principalmente devido à dificuldade em romper sua estrutura física com o objetivo de diminuir a interação entre o analito e os constituintes da matriz. Além disso, a possibilidade de interconversão entre as espécies demanda um estudo cuidadoso de estabilidade durante etapa de extração.¹

Em análise de especiação de mercúrio, métodos que empregam a extração ácida, extração alcalina e o uso de soluções complexantes são bastante utilizados para

¹ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation II*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

² Craig, P. J.; *Organometallic Compounds in the Environment*. John Wiley & Sons, 2003.

³ Ebdon *et al.*; *Trace elements speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, 2001.

extração de espécies de mercúrio em peixes.⁴⁻⁶ No entanto, estes métodos podem ser relativamente demorados quando não assistidos por energias alternativas, como ultrassom e radiação micro-ondas. A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) é um método rápido, simples e eficiente, que não necessita de instrumentação específica, e tem sido bastante utilizado para extração de compostos orgânicos em diferentes matrizes sólidas e semi-sólidas.⁷⁻⁹ Recentemente, alguns trabalhos têm informado a utilização da MSPD para extração de compostos inorgânicos ou organometálicos, como espécies de antimônio, arsênio, brometos e iodetos em peixes e frutos do mar.^{10,11} Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura a respeito da extração de espécies de mercúrio em peixes utilizando a MSPD.

Em análise de especiação de mercúrio, além da etapa de extração, existem outras particularidades que merecem atenção. A sensibilidade e seletividade dos métodos analíticos, requeridas para a determinação de diferentes espécies em níveis traço, podem ser alcançadas utilizando técnicas hífenadas, onde é feito o acoplamento entre uma técnica de separação e uma técnica de detecção. A cromatografia líquida (LC) e a cromatografia em fase gasosa (GC) têm sido muito utilizadas através do seu acoplamento com técnicas de elevada sensibilidade como a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS),¹²⁻¹⁴ a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)^{15,16} e a espectrometria de fluorescência atômica (AFS).^{15,17} No entanto, técnicas de determinação que fornecem alta sensibilidade, também possuem custo relativamente elevado. A técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), bastante utilizada para separação, identificação e determinação de compostos orgânicos,¹⁸ possui um custo relativamente inferior quando

⁴ Reyes *et al.*; *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.

⁵ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation*. John Wiley & Sons Ltd, 2003.

⁶ Mester, Z.; Sturgeon, R.; *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier B. V., 2003.

⁷ Rodrigues *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 82-89.

⁸ Barker, S. A.; *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.

⁹ Criado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 187-194.

¹⁰ Piñeiro *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 9272-9278.

¹¹ Piñeiro *et al.*; *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 110-116.

¹² Batista *et al.*; *Food Chem.* 126 (2011) 2000-2004.

¹³ Chang *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 143-148.

¹⁴ Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4545-4551.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

¹⁸ Iwasaki *et al.*; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3309-3317.

comparada às técnicas citadas anteriormente e, recentemente, tem sido aplicada para especiação de mercúrio após diferentes métodos de extração.¹⁹⁻²¹

Desta forma, este trabalho propõe, pela primeira vez, o desenvolvimento e validação de um método para determinação das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de peixe empregando a MSPD modificada e a técnica de GC-MS. A extração por MSPD foi otimizada com o auxílio da metodologia de superfície de resposta (SRM). Para comparar os resultados obtidos pelo método empregando a MSPD, foi feita a determinação da concentração de mercúrio total nas amostras de peixe utilizando a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor frio (CVG-ICP-MS) após preparo das amostras empregando a digestão assistida por micro-ondas (MAD).

¹⁹ Cai, Y.; Bayona, J. M.; *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113-122.

²⁰ Chen, *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 209-215.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mercúrio

O mercúrio é o único metal líquido a temperatura ambiente quando presente na sua forma elementar (Hg^0). Propriedades únicas permitem seu uso em diversas aplicações industriais e tecnológicas, como termômetros, manômetros, lâmpadas fluorescentes, baterias, entre outras.^{1,22,23} No entanto, o mercúrio é considerado um poluente em potencial para o meio ambiente e sua elevada toxicidade o coloca entre os principais poluentes em nível mundial. Em 2011, a Agência de Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas (ATSDR) dos Estados Unidos classificou o mercúrio em 3º lugar entre 275 substâncias consideradas perigosas.²⁴

O grande crescimento populacional das últimas décadas tem contribuído efetivamente para o aumento das emissões de mercúrio. Sua ocorrência no meio ambiente pode ser proveniente de fontes naturais e/ou antropogênicas. Mais de 2500 toneladas de mercúrio têm sido emitidas anualmente por fontes antropogênicas, as quais representam 32% das emissões de mercúrio total em nível global. Dentre estas, destacam-se os processos de combustão utilizando carvão e óleo e a mineração artesanal de ouro, os quais contribuem com 18 e 5%, respectivamente. Dentre as fontes naturais, os oceanos são os responsáveis por 35% das emissões de mercúrio.²⁵

A exposição ao mercúrio tem sido motivo de preocupação desde o caso de contaminação que ocorreu nas proximidades da cidade de Kumamoto (Japão), em 1953, após despejos constantes de efluentes contendo CH_3Hg^+ pela indústria Chisso Fertilizer Co. Ltd., na Baía de Minamata. Na ocasião, houve contaminação dos peixes da região e, desde 1953, já foram diagnosticados 2263 casos da doença que ficou conhecida como a “doença de Minamata”. Os sintomas são convulsões severas, surtos de psicose, perda da consciência, distúrbios de visão e audição, coma e morte.^{26,27}

¹ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation II*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

²² Miranda *et al.*; *Appl. Catal. B: Environ* 90 (2009) 115-119.

²³ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury, 1999.

²⁴ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority List of Hazardous Substance, 2011.

²⁵ Lubick, N.; *Nature* 459 (2009) 620-621.

²⁶ Takizawa, Y.; Osame, M. *Understanding of Minamata disease - methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan*. Japan Public Health Association, 2001.

²⁷ Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.

A toxicidade, mobilidade e biodisponibilidade do mercúrio no ambiente não estão relacionadas apenas com a concentração total, mas com a forma na qual o mercúrio se apresenta na natureza, sendo que as suas propriedades tóxicas são criticamente dependentes da sua forma química,^{1,28} ocorrendo como espécies orgânicas e inorgânicas.

2.1.1 Espécies inorgânicas

2.1.1.1 Mercúrio metálico

O mercúrio elementar (Hg^0), à temperatura ambiente, caracteriza-se por ser um líquido denso ($d = 13,534 \text{ g cm}^{-3}$) de cor prata e relativamente volátil. Sua toxicidade está relacionada à elevada pressão de vapor ($0,0085 \text{ mm Hg}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) e razoável solubilidade em água ($0,060 \text{ g L}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Além disso, seu caráter lipofílico permite a sua fácil solubilização em tecidos lipídicos.^{1,29}

O vapor de mercúrio, quando inalado, é absorvido pelos pulmões passando para a corrente sanguínea (aproximadamente 80%). Em seguida, é rapidamente distribuído para os demais órgãos, incluindo cérebro e rins, podendo permanecer por semanas ou até meses no organismo, sendo que o maior percentual é excretado pelas fezes e urina.²³

2.1.1.2 Íons inorgânicos

Alguns sais divalentes de mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) são muito tóxicos devido a sua alta solubilidade em água, como o HgCl_2 (62 g L^{-1} , a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). No entanto, os sais de íon mercurioso (Hg_2^{2+}) são insolúveis em água e conseqüentemente o Hg_2Cl_2 é menos tóxico que o HgCl_2 . Além disso, o Hg^{2+} possui forte afinidade por grupamentos sulfidrílica (-SH) de aminoácidos como a cisteína e a metionina o que eleva ainda mais o seu caráter tóxico.¹

¹ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation II*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

²³ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury, 1999.

²⁸ Harris *et al.*; *Science* 301 (2003) 1203.

²⁹ Lee *et al.*; *Ciênc. Saúde Coletiva* 15 (2010) 585-598.

Tanto o HgCl_2 , como o Hg_2Cl_2 , são pouco voláteis à temperatura ambiente e, quando inalados, dificilmente são absorvidos pelo organismo. No entanto, quando ingeridos, 10% dos íons Hg^{2+} podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal e em alguns casos, 40% são absorvidos pelo estômago e intestinos. Além disso, uma pequena quantidade pode ser absorvida através da pele. Após passar para a corrente sanguínea, o mercúrio inorgânico pode ser distribuído para diferentes tecidos do corpo humano. Sua excreção se dá pelas fezes ou urina e pode levar semanas ou meses. Adicionalmente, uma pequena quantidade de Hg^{2+} pode reduzir-se à Hg^0 no organismo e ser eliminado através das vias respiratórias. O principal alvo de acumulação do Hg^{2+} são os rins.²³

2.1.2 Espécies orgânicas

As espécies orgânicas de mercúrio são compostos derivados do íon Hg^{2+} com estruturas químicas lineares (R-Hg-R), caracterizadas pela presença de substituintes orgânicos formados a partir de ligações covalentes. Os principais compostos orgânicos de mercúrio são o CH_3Hg^+ ; o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$); o dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$] e o fenilmercúrio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$). O CH_3Hg^+ é a espécie mais comum e de maior preocupação para o meio ambiente, pois possui a maior toxicidade entre as espécies de mercúrio.¹ As espécies CH_3Hg^+ e $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ já foram muito utilizadas pela indústria como fungicidas, mas seu uso tem sido banido desde a década de 1970, devido aos diversos efeitos causados à saúde. Já as espécies $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ são raramente encontradas no meio ambiente.²² O CH_3Hg^+ é formado, principalmente, por mecanismos biológicos no ambiente, através da ação de bactérias sulfato-redutoras responsáveis pela metilação dos íons Hg^{2+} , em meio anóxico.^{30,31}

Espécies orgânicas iônicas formam sais com ácidos inorgânicos (cloretos, por exemplo). Quando presentes na forma de cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) ou $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, apresentam elevado caráter lipofílico, tornando a espécie facilmente permeável à membranas biológicas. Além disso, as espécies orgânicas iônicas reagem

¹ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation II*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

²² Miranda *et al.*; *Appl. Catal. B: Environ* 90 (2009) 115-119.

²³ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury, 1999.

³⁰ Compeau, G. C.; Bartha, R.; *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 498-502.

³¹ Gllmour *et al.*; *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2281-2287.

com grupamentos sulfidríla, os quais podem estar presentes em importantes sistemas biológicos. Devido a estas características, o CH_3Hg^+ é introduzido facilmente em tecidos de peixes e mamíferos aquáticos pela sua rápida difusão e forte interação com proteínas presentes na biota. Isto ocorre principalmente em espécies de peixes presentes no topo da cadeia alimentar aquática, caracterizando a sua biomagnificação ao longo da cadeia.^{1,2,23} Estudos indicam ainda, que a espécie CH_3Hg^+ encontra-se principalmente na forma de L-cisteinato de metilmercúrio ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cis})$) em tecidos de peixe.^{28,32} No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece um limite de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de mercúrio para pescado de cultivo e captura, respectivamente.³³

Quando presente no organismo humano, o CH_3Hg^+ é a forma de mercúrio absorvida mais rapidamente pelo trato gastrointestinal (aproximadamente 95%). Após ser absorvido, passa para a corrente sanguínea e rapidamente é distribuído para os demais tecidos do corpo. Apenas uma pequena porção de CH_3Hg^+ pode ser absorvida pela pele. No entanto, espécies como o $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ podem ser rapidamente absorvidas pela via cutânea. Além disso, compostos orgânicos de mercúrio tendem a vaporizar lentamente a temperatura ambiente e seus vapores são absorvidos rapidamente pelas vias respiratórias. Após atingir a corrente sanguínea, o CH_3Hg^+ é distribuído principalmente para o cérebro, e em mulheres gestantes, existe a possibilidade da passagem para a corrente sanguínea do feto em desenvolvimento e a subsequente passagem para o cérebro e outros tecidos. O CH_3Hg^+ pode permanecer por muitos meses no organismo e é excretado principalmente pelas fezes.²³

Portanto, devido às diferentes formas químicas de mercúrio e de outros elementos que podem ser encontradas no ambiente com diferentes aspectos toxicológicos, existe uma necessidade crescente de desenvolver métodos analíticos para extração, identificação e quantificação destas espécies nas diversas matrizes, atividade esta conhecida como análise de especiação.

¹ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation II*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.

² Craig, P. J.; *Organometallic Compounds in the Environment*. John Wiley & Sons, 2003.

²³ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury, 1999.

²⁸ Harris *et al.*; *Science* 301 (2003) 1203.

³² Lemes, M.; Wang, F.; *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.

³³ MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 08 de 29 de abril de 2010.

2.2 Análise de especiação de mercúrio

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC),³⁴ o termo “espécie química” é a forma específica de um elemento definida pela composição isotópica, eletrônica ou estado de oxidação e/ou estrutura molecular ou complexo; “análise de especiação” é a atividade analítica de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra; e “especiação de um elemento” é a distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema.

A análise de especiação ganhou importância a partir de 1960, quando os métodos analíticos desenvolvidos para a determinação da concentração total de elementos traço começaram a perder importância em estudos relacionados com a quantificação das espécies químicas individuais de um elemento. Entretanto, em estudos de especiação deve-se tomar cuidado com respeito à preservação das espécies, pois a estabilidade dos analitos deve ser mantida durante todo o processo analítico, principalmente em análise de especiação de mercúrio. A estabilidade das espécies é dependente da natureza da matriz e de alguns parâmetros físicos, como temperatura, umidade, radiação UV, matéria orgânica, entre outros.⁵

2.2.1 Estabilidade das espécies de mercúrio

Em análise de especiação, a amostragem, o armazenamento e o preparo da amostra são as etapas mais críticas, pois são as mais suscetíveis à perda dos analitos, degradação e/ou interconversão entre as espécies.⁵

O material do recipiente de armazenagem é um parâmetro que pode influenciar de forma significativa a estabilidade das espécies. Os recipientes de Teflon[®], vidro Pyrex[®] ou quartzo são os mais recomendados para armazenar soluções com espécies de mercúrio.^{6,35} Soluções de CH_3Hg^+ quando armazenadas em frascos de vidro Pyrex[®] devem ser mantidas em refrigerador e os recipientes devem ser previamente descontaminados com soluções diluídas de HNO_3 . Em frascos de PTFE, estas mesmas soluções de CH_3Hg^+ podem permanecer estáveis por até 6 meses.³⁶

⁵ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation*. John Wiley & Sons Ltd, 2003.

⁶ Mester, Z.; Sturgeon, R.; *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier B. V., 2003.

³⁴ Templeton *et al.*; *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.

³⁵ Leermakers *et al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 336 (1990) 655-662.

³⁶ Lansens *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 229 (1990) 281-285.

A instabilidade das espécies também é dependente da concentração dos analitos, pois quanto menor a concentração das espécies, maiores são as perdas.^{35,36} Embora recipientes de polietileno (PE) sejam bastante utilizados, eles não são adequados para armazenar soluções contendo espécies de mercúrio.^{5,37}

Existe também a possibilidade de fotodecomposição da espécie CH_3Hg^+ .^{22,38} Por isso, recomenda-se armazenar as espécies de CH_3Hg^+ ao abrigo da luz. Além disso, a adição de agentes oxidantes ou complexantes em meio ácido (ácidos diluídos), na presença de compostos com elevada força iônica, tendem a manter as espécies de mercúrio em solução. O pH ácido e a força iônica limitam o processo adsorptivo das espécies de mercúrio nas paredes do recipiente, enquanto agentes oxidantes e complexantes mantêm o mercúrio no estado divalente.³⁹ Em amostras biológicas, também é importante evitar a presença de micro-organismos, pois pode ocorrer a redução das espécies em espécies mais voláteis.⁵ Amostras de peixe e outros tecidos devem ser congelados durante o armazenamento para prevenir a decomposição microbiana do CH_3Hg^+ . Para este tipo de amostra, nenhum material especial é necessário para o seu armazenamento.⁶

Além dos cuidados durante a amostragem e estocagem de amostras ou soluções de referência, o preparo da amostra também é uma etapa crítica na análise de especiação de mercúrio, principalmente em amostras biológicas, como em tecido de peixe. Os métodos de preparo envolvem uma etapa de extração seletiva dos analitos e a possibilidade de contaminação e interconversão entre as espécies pode contribuir para gerar incertezas associadas à etapa de preparo na quantificação. Estes métodos de extração podem ser acompanhados ou não por técnicas cromatográficas, as quais têm por objetivo separar as espécies antes do sistema de detecção.

2.2.2 Métodos de extração de espécies de mercúrio

Um procedimento de extração quando aplicado à análise de especiação tem a função de liberar o analito da matriz minimizando ao máximo a presença de

⁵ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation*. John Wiley & Sons Ltd, 2003.

⁶ Mester, Z.; Sturgeon, R.; *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier, 2003.

²² Miranda *et al.*; *Appl. Catal. B: Environ.* 90 (2009) 115-119.

³⁵ Leermakers *et al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 336 (1990) 655-662.

³⁶ Lansens *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 229 (1990) 281-285.

³⁷ Stoeppler, M.; Matthes, W.; *Anal. Chim. Acta* 98 (1978) 389-392.

³⁸ Tossell, J. A.; *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 3587-3591.

³⁹ Yu, L. P.; Yan, X. P.; *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 245-253.

coextrativos que possam interferir na quantificação, além de preservar a integridade das espécies durante todo o processo analítico. Espécies organometálicas tendem a estar muito fortemente ligadas à matriz e o processo de extração deve, do ponto de vista físico-químico, fornecer energia suficiente para diminuir a interação entre o analito e a matriz. No entanto, esta energia não deve ser alta o suficiente para ocorrer a degradação das espécies.³

O primeiro método de extração de CH_3Hg^+ em peixes foi desenvolvido em 1966 por Westö, ⁴⁰ empregando cromatografia em camada delgada combinada com cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD). Este método utiliza grandes volumes de HCl concentrado, solventes orgânicos altamente tóxicos (benzeno, hexano e heptano) e sais inorgânicos. O método é composto de diversas etapas, utilizando ainda, um sistema de destilação do tipo Soxhlet.

Desde então, métodos baseados no uso de soluções extratoras ácidas (lixiviação ácida),^{12,41-43} alcalinas (extração alcalina),^{41,44-46} e complexantes (L-cisteína)^{12,42,43,46-48} com auxílio de ultrassom,^{12,42,47} radiação micro-ondas^{17,41,43,45} ou aquecimento convencional,^{44,48} têm sido utilizados para extração de espécies de mercúrio em tecidos de peixes.

Reyes *et al.*,⁴ compararam diferentes métodos para extração de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de peixes para posterior determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). Para isso, foram avaliadas soluções compostas por: i) HCl 5 mol L⁻¹ (ultrassom, 5 min de extração);⁴⁹ ii) HNO₃ 4 mol L⁻¹ (radiação micro-ondas a 180 °C, 20 min de

³ Ebdon *et al.*; *Trace elements speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, 2001.

⁴ Reyes *et al.*; *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.

¹² Batista *et al.*; *Food Chem.* 126 (2011) 2000-2004.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

⁴⁰ Westö, G.; *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137.

⁴¹ Serafimovski *et al.*; *Microchem. J.* 89 (2008) 42-47.

⁴² Santoyo *et al.*; *Talanta* 79 (2009) 706-711.

⁴³ Carbonell *et al.*; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 210-213.

⁴⁴ Carrasco *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2-6.

⁴⁵ Castillo *et al.*; *Anal. Chem.* 82 (2010) 2773-2783.

⁴⁶ Liu, Q.; *Microchem. J.* 95 (2010) 255-258.

⁴⁷ Pilz *et al.*; *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.

⁴⁸ Hight, S. C.; Cheng, J.; *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.

⁴⁹ Ortiz *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.

extração);⁵⁰ *iii*) ácido acético glacial (radiação micro-ondas a 165 °C, 10 min),⁵¹ *iv*) KOH e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% (m/v) em metanol (aquecimento convencional a 60 °C e ultrassom, 180 min de extração);⁴⁹ *v*) TMAH 5% (m/v) em metanol (radiação micro-ondas a 180 °C, 20 min de extração)⁵² e *vi*) cloreto de L-cisteína 1% (m/v) (aquecimento convencional a 60 °C, 120 min de extração).⁴⁸ Dentre os métodos estudados, apenas os que utilizaram KOH e TMAH 25% (m/v) mostraram resultados estatisticamente similares à concentração de CH₃Hg⁺ certificados em um material de referência certificado (CRM) de tecido de atum (ERM-CE464), com concordância de 99%.

Embora sejam métodos bastante utilizados na literatura, estes métodos são relativamente demorados e pouco eficientes quando não assistidos por ultrassom ou radiação micro-ondas, sendo que o uso deste tipo de instrumentação torna o método relativamente custoso, principalmente com a utilização de fornos micro-ondas. Além disso, a utilização deste tipo de energia pode levar à conversão do CH₃Hg⁺ em Hg²⁺, principalmente quando se utiliza ultrassom, o que demanda um estudo cuidadoso de otimização no que diz respeito à estabilidade das espécies.⁴⁷ Alguns autores também têm reportado a metilação de Hg²⁺ utilizando soluções de TMAH para extração de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, o que pode superestimar o resultado na determinação de CH₃Hg⁺.^{53,54} Tu *et al.*,⁵⁵ observaram 5,3% de metilação de Hg²⁺ utilizando TMAH para extração de espécies de mercúrio em tecido de ostra.

A combinação de ácidos inorgânicos e sais halogenados também têm sido uma alternativa para extração de espécies de mercúrio em tecidos de peixes.⁵⁶ Reyes *et al.*,⁵⁷ estudaram o comportamento de diferentes concentrações de HCl e NaCl (utilizando radiação micro-ondas a 60 °C, 10 min de extração) para extração de espécies de mercúrio em tecidos de peixe para posterior determinação por LC-ICP-MS. Os autores obtiveram boas resuperações da espécie CH₃Hg⁺ utilizando concentrações

⁴⁷ Pilz *et al.*; *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.

⁴⁸ Hight, S. C.; Cheng, J.; *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.

⁴⁹ Ortiz *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.

⁵⁰ Rahman, G. M. M.; Kingston, H. M. S.; *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 183-191.

⁵¹ Davis *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1546-1551.

⁵² Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 21-28.

⁵³ Qvarnström, J.; Frech, W.; *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491.

⁵⁴ Hintelmann *et al.*; *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.

⁵⁵ Tu *et al.* *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1583-1588.

⁵⁶ Houserova *et al.*; *Vet. Med.* 51 (2006) 101-110.

⁵⁷ Reyes *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 631 (2009) 121-128.

entre 4 e 6 mol L⁻¹ de HCl. No entanto, recuperações de no máximo 90% foram atingidas nestas condições para a espécie Hg²⁺. Na tentativa de melhorar a recuperação de Hg²⁺ os autores avaliaram o uso de NaCl em concentrações entre 0,25 e 1,0 mol L⁻¹, onde foi observado um aumento na recuperação de Hg²⁺, ficando entre 98 e 100%. Da mesma forma, Duarte *et al.*,⁵⁸ desenvolveram um método não cromatográfico para especiação de mercúrio em tecidos de peixes, utilizando uma mistura de HCl 6 mol L⁻¹ e KBr 1 mol L⁻¹ como solução extratora, sem a utilização de ultrassom ou radiação micro-ondas. A espécie CH₃Hg⁺ foi extraída com CHCl₃ e re-extraída uma solução de L-cisteína 1% (m/v). As determinações foram feitas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e geração química de vapor (CVG-ET AAS). O método apresentou bons valores de concordância para diferentes CRMs. Entretanto, o acúmulo de etapas, o uso de solventes clorados e um tempo relativamente elevado de extração são algumas desvantagens que limitam o método.

Recentemente, a MSPD, um método muito utilizado para extração de compostos orgânicos em diversas matrizes sólidas e semi-sólidas,^{7,9,59-65} foi aplicado para extração de compostos inorgânicos e organometálicos.¹¹ Piñeiro *et al.*,¹⁰ desenvolveram um método para extração de espécies de arsênio em frutos do mar utilizando a MSPD. Além disso, estudos indicam que a MSPD também pode ser utilizada para extração de brometos, iodetos e espécies de antimônio.¹¹ No entanto, até o momento, nenhum trabalho tem sido reportado na literatura para extração de espécies de mercúrio em tecidos de peixes.

⁷ Rodrigues *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 82-89.

⁹ Criado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 187-194.

¹⁰ Piñeiro *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 9272-9278.

¹¹ Piñeiro *et al.*; *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 110-116.

⁵⁸ Duarte *et al.*; *Spectroc. Acta Part B* 64 (2009) 513-519.

⁵⁹ Hu *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 188-193.

⁶⁰ Teixeira *et al.* *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 22-28.

⁶¹ Rodrigues *et al.*; *Anal. Methods* 4 (2012) 1820.

⁶² Garcinuño *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 35-41.

⁶³ Albero *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 127-133.

⁶⁴ Soler *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 41-49.

⁶⁵ Teixeira, D. M.; da Costa, C. T.; *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 175-181.

2.2.2.1 Dispersão da matriz em fase sólida

A MSPD foi desenvolvida por Barker *et al.*⁶⁶ em 1989. O método é baseado na mistura de amostras viscosas, sólidas ou semi-sólidas com um suporte sólido de característica abrasiva, como a sílica ou o seu derivado funcionalizado com grupos ocatadecilsilano (C18) na sua superfície. Estes suportes sólidos são os mesmos utilizados para empacotar cartuchos utilizados no método de extração em fase sólida (SPE). No entanto, na SPE estes materiais tem a função de adsorver os analitos ou os seus coextrativos presentes em amostras líquidas. Já na MSPD, o suporte sólido é macerado juntamente com a amostra com auxílio de almofariz e pistilo, e a sua característica abrasiva juntamente com a força mecânica aplicada na maceração têm a função de promover o rompimento da estrutura física original da amostra, quebrando-a em partículas de menor granulometria. Neste processo, os componentes da amostra são dissolvidos e dispersos sobre a superfície do suporte sólido diminuindo, assim, a interação entre o analito e os demais constituintes da amostra.⁸ Na Figura 1, estão mostradas as etapas envolvidas no método da MSPD original.

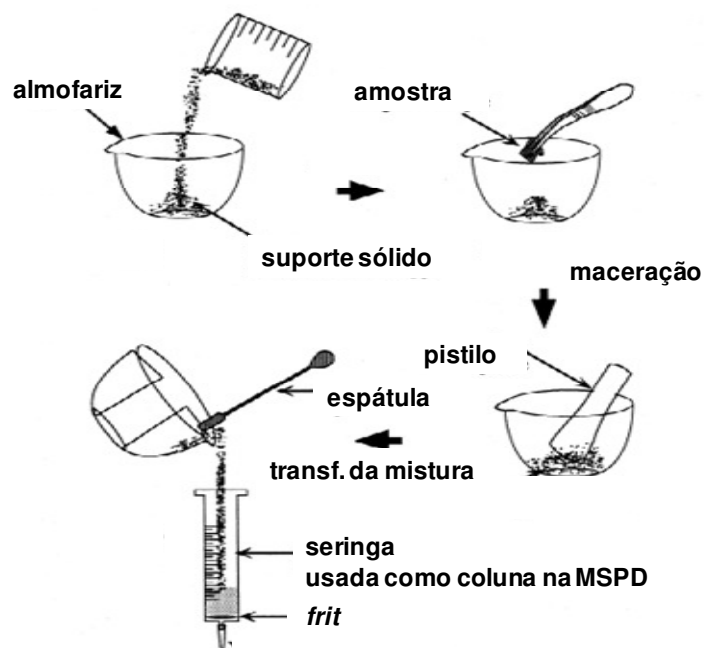


Figura 1. Esquema representativo do método de MSPD original (Adaptado de Barker⁸).

⁸ Barker, S. A.; *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.

⁶⁶ Barker *et al.*; *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353-361.

No procedimento da MSPD original, a mistura é transferida e empacotada em cartuchos de SPE após a maceração. Em seguida, a mistura é eluída com um solvente adequado em um sistema operado a vácuo, o qual pode ser utilizado para acelerar o processo de eluição. Durante a eluição, podem ocorrer duas situações: *i*) os analitos podem ficar retidos no cartucho enquanto os demais constituintes são eluídos em uma etapa de lavagem e, após, os analitos são eluídos com um solvente adequado; *ii*) os componentes da matriz podem ser seletivamente retidos no cartucho e os analitos eluídos diretamente. Após a eluição, o extrato pode ser analisado por uma técnica de quantificação adequada.⁶⁷

Sebastià *et al.*,⁶⁸ recentemente propuseram uma modificação na MSPD para extração de aflatoxinas, substituindo a etapa de transferência e empacotamento da mistura em cartuchos de SPE pela transferência direta para tubos de vidro de fundo cônico, seguido de agitação e centrifugação. Esta modificação traz vantagens significativas para o método, pois elimina a etapa de eluição, minimizando as diferenças entre as extrações, além de diminuir o tempo de extração.

2.2.3 Técnicas de determinação de espécies de mercúrio

Apesar da concentração total não fornecer informações consistentes a respeito das diferentes espécies em análise de especiação, alguns métodos utilizam a concentração total para determinação de espécies de mercúrio em peixes. Estes métodos são baseados na utilização de uma técnica que possibilite a determinação de mercúrio total juntamente com a concentração de alguma das espécies (CH_3Hg^+ ou Hg^{2+}), sendo a outra espécie determinada por diferença.⁴¹ Kaercher *et al.*,⁶⁹ desenvolveram um sistema para determinação de espécies de mercúrio em amostras de peixes por espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor e injeção em fluxo (FI-CVG AAS). Neste sistema, a variação da temperatura da cela de quartzo possibilita a determinação seletiva de mercúrio total e Hg^{2+} , onde a espécie CH_3Hg^+ pode ser determinada por diferença. À temperatura ambiente, o hidreto de

⁴¹ Serafimovski *et al.*; *Microchem. J.* 89 (2008) 42-47.

⁶⁷ Kristenson *et al.*; *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96-111.

⁶⁸ Sebastià *et al.*; *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2609-2612.

⁶⁹ Kaercher *et al.*; *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 705-710.

metilmercúrio (CH_3HgH), formado no sistema de geração de vapor, não é atomizado e apenas a espécie Hg^{2+} pode ser determinada ao ser reduzida à Hg^0 . No entanto, com a cela de quartzo aquecida a $650\text{ }^\circ\text{C}$, a espécie CH_3HgH é degradada e atomizada a Hg^0 e com isso, o mercúrio total pode ser determinado. Por fim, a espécie CH_3Hg^+ pode ser determinada por diferença.

A determinação da concentração total por um método diferente do método utilizado para determinação das espécies, também tem sido utilizada para comparação com a soma dos valores encontrados para as espécies individuais através de um balanço de massa. De certa forma, este artifício qualifica os resultados encontrados pelo método utilizado na análise de especiação.^{57,58,70,71} Dentre os métodos que fazem a determinação da concentração de mercúrio total, o estado da arte está baseado nos métodos que utilizam uma etapa de digestão assistida por micro-ondas (MAD) em sistema fechado, seguido da determinação por CV-ICP-MS.⁴⁷

O método de MAD baseia-se no aquecimento de reagentes oxidantes (por exemplo, HNO_3) em contato com a amostra. As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que se propagam em uma faixa de frequência entre 0,3 e 300 GHz, sendo que os fornos micro-ondas comerciais empregam frequências de aproximadamente 2,45 GHz. A potência gerada por um forno micro-ondas do tipo doméstico ou analítico pode variar entre 600 e 1400 W. A interação da matéria com a radiação micro-ondas, na presença de ácidos concentrados, gera um aumento de temperatura e pressão em sistemas fechados, o que permite uma eficiente quebra das ligações químicas dos componentes da amostra e, conseqüentemente, a mineralização completa dos analitos, gerando baixos teores de carbono residual.⁷²

Já a técnica de ICP-MS é uma importante ferramenta para determinação multielementar e destaca-se por atingir baixos limites de detecção e quantificação (da ordem de ng L^{-1}) para a maioria dos elementos da tabela periódica. Além disso, possui uma ampla faixa linear, a qual pode abranger até 9 ordens de magnitude. Basicamente, as amostras são introduzidas em um plasma de argônio na forma de um aerossol, podendo atingir temperaturas entre 7000 e 10000 K. Após serem introduzidas no

⁴⁷ Pilz et al.; *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.

⁵⁷ Reyes et al.; *Anal. Chim. Acta* 631 (2009) 121-128.

⁵⁸ Duarte et al.; *Spectroc. Acta Part B* 64 (2009) 513-519.

⁷⁰ Raab et al.; *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 684-692.

⁷¹ Wang et al.; *Talanta* 71 (2007) 2034-2039.

⁷² Krug, F. J. *Métodos de preparo de amostras*. F. J. Krug, 2008.

plasma ocorre, primeiramente, a secagem das pequenas gotas do aerossol. Em seguida, os componentes da amostra são dissociados e um elétron é removido da camada de valência, formando preferivelmente íons monovalentes, os quais são diretamente enviados para o espectrômetro de massas. A maioria dos equipamentos comerciais utilizam analisadores de massa do tipo quadrupolo, os quais tem a função de selecionar os íons de razão massa-carga (m/z) que estão sendo monitorados. Outro parâmetro importante da técnica é a forma de introdução das amostras, pois a eficiência de nebulização é um fator predominante da técnica. Durante a introdução no plasma, as amostras são transportadas por uma bomba peristáltica e um sistema de nebulização é responsável por gerar o aerossol fino. Geralmente são utilizados nebulizadores concêntricos, de fluxo cruzado ou do tipo *Babington*. Além disso, uma câmara de nebulização, que precede o nebulizador, tem a função de selecionar as gotas menores em detrimento das maiores. Câmaras de nebulização do tipo *Scott* ou ciclônicas são as mais utilizadas.⁷³ Para determinação de mercúrio, geralmente utiliza-se um sistema de geração de vapor, o qual utiliza um agente redutor (NaBH_4 ou SnCl_2) em meio ácido para reduzir a espécie Hg^{2+} na espécie elementar (Hg^0) e transformar a espécie CH_3Hg^+ no seu hidreto volátil (CH_3HgH).^{74,75} Com a geração de vapor de mercúrio a matriz não é introduzida no plasma, o que reduz o possível acúmulo de carbono na interface do sistema. Além disso, o fato da amostra ser introduzida na forma de vapor proporciona a introdução de uma maior quantidade de amostra, quando comparada a nebulização convencional, além de eliminar um possível efeito de memória causado pelo mercúrio.

Além dos métodos baseados na determinação da concentração total, a análise de especiação de mercúrio em amostras biológicas também pode ser feita utilizando métodos de extração seletivos juntamente com uma técnica capaz de determinar as duas espécies, no caso da CVG-ET AAS.⁵⁸ Outro método que tem sido desenvolvido para auxiliar na determinação de espécies de mercúrio em tecidos de peixes é a extração em ponto nuvem (CPE).^{76,77} Li e Hu,⁷⁸ desenvolveram um método baseado na

⁵⁸ Duarte *et al.*; *Spectroc. Acta Part B* 64 (2009) 513-519.

⁷³ Perkin Elmer. The 30-Minute Guide to ICP-MS. Technical Note, 2004.

⁷⁴ D'Ulivo *et al.*; *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 1283-1340.

⁷⁵ Dean, J. R. *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2005.

⁷⁶ Chen *et al.*; *Talanta* 77 (2009) 1381-1387.

⁷⁷ Chen *et al.*; *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1282-1287.

⁷⁸ Li, Y.; Hu, B.; *Spectroc. Acta Part B* 62 (2007) 1153-1160.

complexação de Hg^{2+} com I^- formando HgI_4^{2-} , o qual reage com o cátion verde de metila, formando um complexo apolar que é extraído para uma fase contendo um surfactante (Triton X-114). Após centrifugação, a espécie Hg^{2+} foi separada da espécie CH_3Hg^+ , retirando o sobrenadante. Por fim, as duas espécies foram determinadas pela técnica de ICP OES. Embora seja uma alternativa interessante para uma extração seletiva de espécies de mercúrio, o acúmulo de etapas e reações, podem contribuir para o aumento das incertezas referentes a estas etapas na quantificação.

Dentre as principais técnicas de determinação de espécies de mercúrio em peixes, as mais utilizadas são as técnicas hífenadas, que empregam LC ou GC para a separação das espécies, acopladas a detectores específicos.⁷⁹ As técnicas de LC^{4,12,13,32,42,47,48,53,57,71,76} e GC^{51,55,80-83} têm sido bastante utilizadas combinadas com a técnica de ICP-MS para especificação de mercúrio em amostras de peixe. Além disso, a técnica de AFS^{15,17,44,49,52,80} e a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES)^{16,55,84} também têm sido acopladas à GC, apresentando baixos limites de detecção e quantificação. A vantagem da LC em relação à GC é a possibilidade de separar analitos de baixa volatilidade e termicamente instáveis, não necessitando de uma etapa de derivatização para converter as espécies em compostos

⁴ Reyes *et al.*; *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.

¹² Batista *et al.*; *Food Chem.* 126 (2011) 2000-2004.

¹³ Chang *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 143-148.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

³² Lemes, M.; Wang, F.; *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.

⁴² Santoyo *et al.*; *Talanta* 79 (2009) 706-711.

⁴⁴ Carrasco *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2-6.

⁴⁷ Pilz *et al.*; *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.

⁴⁸ Hight, S. C.; Cheng, J.; *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.

⁴⁹ Ortiz *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.

⁵¹ Davis *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1546-1551.

⁵² Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 21-28.

⁵³ Qvarnström, J.; Frech, W.; *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491.

⁵⁵ Tu *et al.* *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1583-1588.

⁵⁷ Reyes *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 631 (2009) 121-128.

⁷¹ Wang *et al.*; *Talanta* 71 (2007) 2034-2039.

⁷⁶ Chen *et al.*; *Talanta* 77 (2009) 1381-1387.

⁷⁹ Gao *et al.*; *Microchem. J.* 103 (2012) 1-14.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

⁸¹ Krystek, P.; Ritsema, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2004) 354-359.

⁸² Monperrus *et al.*; *Anal. Chem.* 75 (2003) 4095-4102.

⁸³ Snell, J. P.; Quénel, C. R.; *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 447-454.

⁸⁴ Zabaljauregui *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 78-85.

voláteis.⁵ No entanto, as colunas capilares utilizadas na técnica de GC possuem um elevado poder de resolução com relação às colunas empacotadas utilizadas na LC.⁸⁵ Além disso, os limites de detecção e quantificação obtidos pelo acoplamento GC-ICP-MS são mais baixos em relação ao acoplamento LC-ICP-MS e uma maior eficiência de transporte dos analitos é observada, pois toda a amostra é vaporizada e introduzida no plasma.⁸⁶

A técnica de GC-MS é outra técnica altamente seletiva, de custo relativamente inferior, que também tem sido utilizada para determinação de espécies de mercúrio em peixes.^{14,15,19-21,45,87-89} Embora exista a necessidade de uma etapa prévia de derivatização, a técnica de GC-MS tem se mostrado adequada para determinação de espécies de mercúrio. Além disso, a microextração em fase sólida (SPME) também tem sido utilizada como alternativa para extração e pré-concentração de espécies de mercúrio combinada à técnica de GC, principalmente utilizando a espectrometria de massas para identificação e detecção.^{16,19,21,44,87} A SPME apresenta vantagens como a redução dos efeitos de matriz e o baixo consumo de solventes.⁹⁰ No entanto, um sistema de dessorção térmica acoplado ao cromatógrafo é requerido quando se utiliza a SPME, o que aumenta o custo e a possibilidade de degradação dos analitos.

2.2.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

A combinação da cromatografia em fase gasosa com a espectrometria de massas para separação, identificação e detecção dos componentes de uma mistura de compostos tem ganhado um importante espaço na pesquisa e na indústria. A

⁵ Cornelis *et al.*; *Handbook of Elemental Speciation*. John Wiley & Sons Ltd, 2003.

¹⁴ Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4545-4551.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁹ Cai, Y.; Bayona, J. M.; *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113-122.

²⁰ Chen, *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 209-215.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

⁴⁴ Carrasco *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2-6.

⁴⁵ Castillo *et al.*; *Anal. Chem.* 82 (2010) 2773-2783.

⁸⁵ Clémens *et al.*; *Talanta* 89 (2012) 12-20.

⁸⁶ Dressler *et al.*, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 149-162.

⁸⁷ Yang *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 135-142.

⁸⁸ Park *et al.*; *Water Air Soil Pollut.* 207 (2009) 391-401.

⁸⁹ Prieto *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 130-138.

⁹⁰ Díez, S.; Bayona, J. M.; *Talanta* 77 (2008) 21-27.

espectrometria de massas é uma técnica altamente seletiva capaz de identificar compostos a partir do monitoramento de seus fragmentos específicos. Do ponto de vista cromatográfico, a técnica de GC-MS é muito similar às técnicas de GC-ECD e cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID), pois os sistemas de injeção e separação são bastante similares. Na Figura 2, estão mostrados os principais componentes de um GC-MS.⁹¹

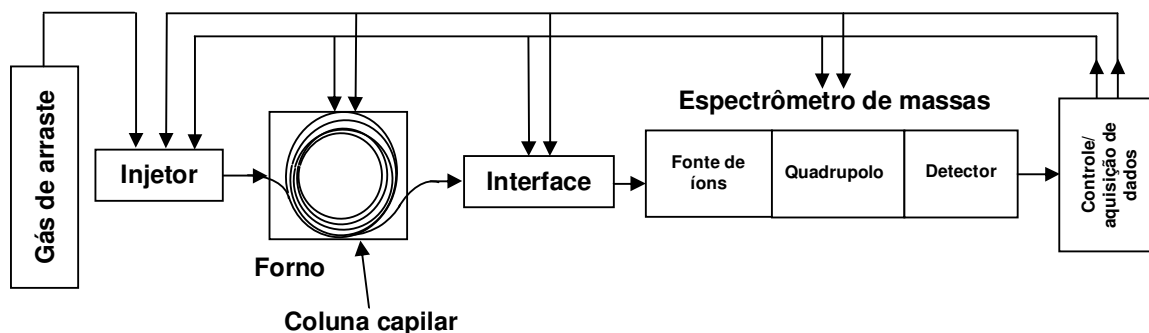


Figura 2. Diagrama dos principais componentes de um equipamento de GC-MS (Adaptado de McMaster⁹¹).

A injeção da amostra pode ser feita manualmente com auxílio de uma microsseringa ou através de um sistema de amostragem automática. A temperatura de injeção é um parâmetro importante que pode ser controlado, pois deve garantir que os analitos sejam volatilizados e, ao mesmo tempo, não sejam condensados na entrada da coluna cromatográfica ou degradados termicamente. Por isso, cabe salientar que existe a necessidade dos analitos serem voláteis e termicamente estáveis para serem separados por GC. Alguns sistemas de injeção permitem ainda, o uso de uma rampa de aquecimento. A injeção pode ser feita com divisão de fluxo (*split*) ou sem divisão de fluxo (*splitless*), alterando o tipo de insersor. Ao utilizar o insersor *split*, é possível estabelecer uma proporção definida de purga, sendo que apenas uma porção da amostra é introduzida na coluna. No entanto, ao utilizar o insersor *splitless*, todo volume de amostra vaporizado é enviado para a coluna. Além disso, alguns sistemas de purificação também têm sido utilizados juntamente com a injeção, como *purge and trap* e cartuchos de SPME. Estes sistemas permitem a extração, *cleanup* (limpeza) ou volatilização antes da introdução da amostra na coluna.^{91,92}

⁹¹ McMaster, M. C.; *GC-MS - A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons, 2008.

⁹² Collins et al.; *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp, 2006.

Após a injeção, os componentes da amostra são enviados para a coluna, onde ocorre a separação. Uma corrente de gás (fase móvel ou gás de arraste) passa continuamente pela coluna e têm a função de arrastar e separar os componentes da amostra até a interface entre o sistema cromatográfico e o espectrômetro de massas. Como gás de arraste geralmente são utilizados nitrogênio, hélio ou hidrogênio. Durante a separação cromatográfica, a temperatura do forno pode permanecer constante (isotérmica) ou sofrer uma variação (com temperatura programada). A programação de temperatura tem a vantagem de melhorar a resolução cromatográfica e diminuir o tempo de análise. Basicamente, a separação cromatográfica começa em uma temperatura mais baixa, para que os analitos de baixo ponto de ebulição possam ser eluídos em diferentes tempos de retenção. Em seguida, a temperatura é aumentada com o objetivo de diminuir a retenção dos analitos de maior ponto de ebulição. Por isso, a programação de temperatura é de grande utilidade quando existe muita diferença entre as temperaturas de ebulição dos analitos.⁹²

As colunas cromatográficas empregadas em GC podem ser capilares ou recheadas. As colunas recheadas possuem comprimento entre 1 e 3 m e diâmetro interno entre 1 e 4 mm, sendo constituídas por tubos de vidro, aço inoxidável ou cobre. Suas fases estacionárias podem ser sólidas ou líquidas. Já as colunas capilares possuem comprimento entre 10 e 100 m e diâmetro interno entre 0,10 e 0,75 mm, sendo constituídas por sílica fundida, vidro ou aço inoxidável e recobertas com poliimida. Suas fases estacionárias são imobilizadas na parte interna do capilar. A vantagem das colunas capilares está na maior resolução dos picos cromatográficos quando comparadas às colunas recheadas.⁹²

Após a separação, os analitos são enviados para a interface entre o sistema cromatográfico e o espectrômetro de massas. Após a interface, existe uma câmara de ionização, um analisador de massas e um sistema de detecção acoplado a um sistema de registro dos dados. Na câmara de ionização, ocorre a fragmentação das moléculas, a qual geralmente é feita por impacto de elétrons (EI) ou ionização química. A câmara de ionização é mantida sob aquecimento, para evitar a condensação dos analitos e sob vácuo para que os íons formados não colidam com moléculas neutras. O modo de ionização por EI utiliza uma energia de 70 eV durante a fragmentação. Depois de formados, os íons são enviados para um analisador de massas, onde são separados

⁹² Collins *et al.*; *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp, 2006.

conforme sua razão massa/carga (m/z), através da aplicação de um campo elétrico ou magnético. Analisadores de massas do tipo quadrupolo são os mais utilizados. Após a detecção, o sistema de aquisição e processamento dos dados gera um espectro de massas, o qual contém as abundâncias relativas de cada íon característico dos compostos separados. Desta forma, existe a possibilidade de fazer uma varredura (modo *scan*) dos possíveis fragmentos existentes em uma amostra ou monitorar fragmentos específicos no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM).⁹² No modo SIM, ocorre um ganho de sensibilidade em comparação com o modo *scan*, pois um monitoramento mais seletivo pode ser feito para identificação dos compostos.

Para determinação de espécies de mercúrio por GC-MS, reações de alquilação em meio aquoso têm sido utilizadas para transformação das espécies em compostos mais voláteis e termicamente estáveis. Reagentes derivatizantes como $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_2\text{H}_5)_4]$,^{14,15,19,51,52,55,81,84,88,89,93,94} $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_3\text{H}_7)_4]$ ^{20,44,87} e $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ ^{15-17,21,51,80,95} têm sido os mais utilizados para derivatização de espécies de mercúrio após diferentes métodos de extração em tecidos de peixes e frutos do mar. Apesar das reações de etilação serem as mais utilizadas, a espécie $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ não pode ser determinada ou utilizada como padrão interno quando $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_2\text{H}_5)_4]$ é usado como derivatizante. Nestas condições, ambas as espécies $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ e Hg^{2+} são convertidas a dietilmercúrio $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Hg}]$ durante a etapa de derivatização e, por isso, torna-se impossível distinguir entre as duas espécies.⁹⁶ No entanto, quando se utiliza o reagente $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$, a

¹⁴ Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4545-4551.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

¹⁹ Cai, Y.; Bayona, J. M.; *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113-122.

²⁰ Chen, *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 209-215.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

⁴⁴ Carrasco *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2-6.

⁵¹ Davis *et al.*; *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1546-1551.

⁵² Nevado *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 21-28.

⁵⁵ Tu *et al.* *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1583-1588.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

⁸¹ Krystek, P.; Ritsema, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2004) 354-359.

⁸⁴ Zabaljauregui *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 78-85.

⁸⁷ Yang *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 135-142.

⁸⁸ Park *et al.*; *Water Air Soil Pollut.* 207 (2009) 391-401.

⁸⁹ Prieto *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 130-138.

⁹² Collins *et al.*; *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp, 2006.

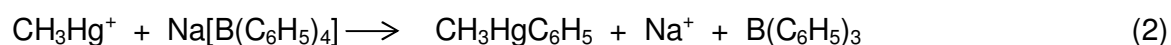
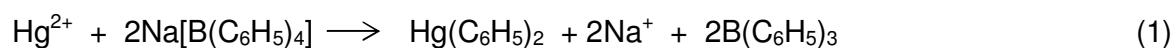
⁹³ Hippler *et al.*; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2465-2470.

⁹⁴ Zachariadis, G. A.; Kapsimali, D. C.; *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3884-3893.

⁹⁵ Abuín *et al.*; *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185-193.

⁹⁶ Cai *et al.*; *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 302-305.

possibilidade de interferência na determinação de $C_2H_5Hg^+$ é eliminada, pois a espécie $(C_2H_5)Hg(C_6H_5)$ é formada em reações de fenilação. Além disso, o reagente $Na[B(C_6H_5)_4]$ é mais estável em meio aquoso do que o $Na[B(C_2H_5)_4]$ e as espécies formadas após a derivatização são mais estáveis termicamente para serem separadas por GC, devido a ligação $RHg-C_6H_5$ ser mais forte do que a ligação $RHg-C_2H_5$.¹⁷ A estequiometria da reação de fenilação da espécie CH_3Hg^+ com $Na[B(C_6H_5)_4]$ foi proposta por Cay *et al.*¹⁷ Entretanto, para a espécie Hg^{2+} não existe informação na literatura a respeito de sua estequiometria. No entanto, Mishra *et al.*,²¹ mostraram que as duas espécies de mercúrio podem ser determinadas por GC-MS utilizando $Na[B(C_6H_5)_4]$. Os autores monitoraram o composto $Hg(C_6H_5)_2$, como sendo o produto na reação com a espécie Hg^{2+} . As equações (1) e (2) representam a estequiometria para as duas espécies.



Na Figura 3 estão mostradas as estruturas químicas do reagente derivatizante $Na[B(C_6H_5)_4]$ e das espécies feniladas geradas durante as reações de derivatização em meio aquoso.

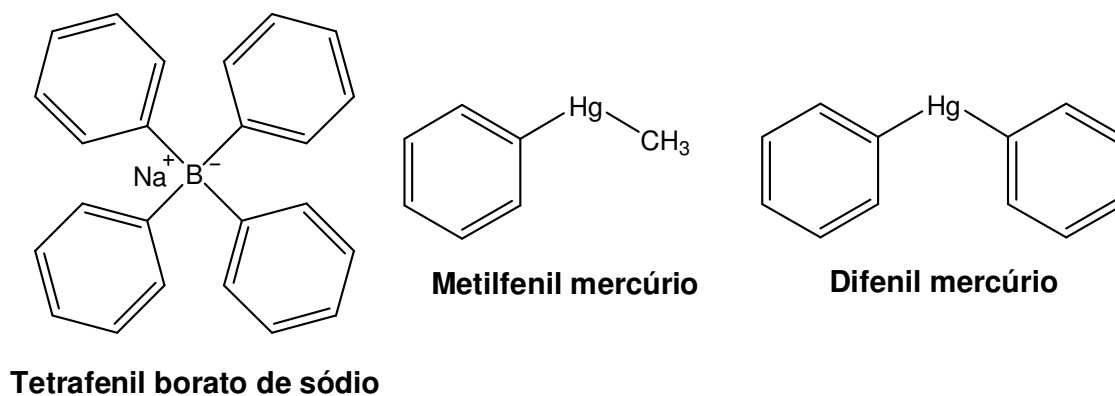


Figura 3. Estruturas químicas do reagente derivatizante tetrafenilborato de sódio $Na[B(C_6H_5)_4]$ e as espécies de mercúrio nas formas derivatizadas metilfenilmercúrio ($CH_3HgC_6H_5$) e difenilmercúrio [$Hg(C_6H_5)_2$].

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

2.3 Planejamento de experimentos

Como visto anteriormente, o desenvolvimento de um método analítico pode envolver um grande número de etapas em análise de especiação, como o tratamento preliminar das amostras e a extração e determinação dos analitos. Por isso, torna-se necessário avaliar, de forma rápida e segura, as informações a respeito das diferentes variáveis que influenciam significativamente o experimento.

A metodologia do planejamento fatorial combinada à análise de superfície de resposta é uma importante ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre os experimentos, minimizando assim o empirismo associado a técnicas de otimização por tentativa e erro.⁹⁷

O planejamento de experimentos reduz o número de ensaios ou repetições, melhora a qualidade dos resultados obtidos após o experimento e permite estudar combinações que não seriam possíveis variando um parâmetro por vez com os demais fixados. Com isso, observa-se uma considerável diminuição do tempo e do custo vinculado às etapas de otimização.⁹⁸

Experimentos ou tratamentos delineados a partir de planejamentos fatoriais envolvem a combinação entre os níveis (N) de dois ou mais fatores (k). Fatores são as variáveis independentes e os níveis são os limites inferior e superior que compreendem a faixa de estudo, fixada a partir do conhecimento prévio das variáveis com base na literatura. A variável dependente ou variável resposta é a variável a ser otimizada e esta depende exclusivamente do comportamento das variáveis independentes.⁹⁸

Quando todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator são feitas, o planejamento fatorial é dito completo. Entretanto, quando o número de experimentos pode ser limitado a partir de uma operação matemática (construção de uma matriz identidade), o delineamento passa a ter um menor número de experimentos, proporcionando informações tão seguras quanto às de um planejamento fatorial completo. Neste caso, o delineamento passa a ser um planejamento fatorial fracionado, o qual pode ser muito útil na seleção dos níveis ou fatores em estudo. Nos casos em que o número de fatores é superior a quatro e, principalmente, em situações onde não se tem o conhecimento do comportamento dos fatores em estudo, uma estratégia

⁹⁷ Box et al.; *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, 1978.

⁹⁸ Rodrigues, M. I.; lemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Cárita editora, 2005.

sequencial de planejamentos pode ser mais adequada. Neste caso, inicialmente aplica-se um planejamento fatorial fracionado para avaliar os efeitos das variáveis estudadas (triagem de variáveis) e, em seguida, são selecionadas as variáveis significativas e os melhores níveis de cada variável. Cabe destacar que um planejamento fatorial completo pode ser aplicado apenas com as variáveis significativas a fim de atingir o(s) valor(es) ótimo(s) da(s) variável(eis) dependente(s) avaliada(s). Quando se está próximo da região ótima, um delineamento composto central rotacional (DCCR) pode ser aplicado. Um DCCR é um planejamento fatorial completo com a adição de pontos axiais aos níveis avaliados. Com a adição dos pontos axiais ao delineamento, uma região de estudo mais abrangente pode ser avaliada e uma melhora na qualidade das informações pode ser obtida.⁹⁸

⁹⁸ Rodrigues, M. I.; lemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Cárita editora, 2005.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Para a separação e determinação das espécies de mercúrio por GC-MS foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010 Plus, www.shimadzu.com, EUA) equipado com um autoinjeter AOC-20i, conforme Figura 4. A separação foi feita com uma coluna capilar Crossbond® com fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm) com espessura de filme de 0,25 µm (Restek, modelo Rtx-5MS, www.restek.com, EUA). Como gás de arraste foi utilizado He com 99,999% de pureza (White Martins, www.whitemartins.com.br, Brasil). Para todos os experimentos, o volume de injeção foi de 2 µL. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por EI com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizado um analisador de massas do tipo quadrupolo.



Figura 4. Equipamento de GC-MS utilizado para separação e determinação das espécies de mercúrio.

A aquisição e tratamento dos dados obtidos no equipamento de GC-MS foram feitas com o auxílio do programa *GCMS solution*, versão 2.0 (Copyright© 1999-2007 Labsolutions GCMSsolution, Shimadzu Corporation).

A determinação de mercúrio total foi feita por CVG-ICP-MS, utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer SCIEX, modelo ELAN DRC II, www.perkinelmer.com, Canadá) equipado com uma tocha de quartzo (tubo injetor de 2 mm d.i.) e cones de platina. Um sistema de geração de vapor frio foi acoplado ao instrumento de ICP-MS.

As amostras foram digeridas em um forno micro-ondas (Anton Paar, modelo Multiwave 3000, www.anton-paar.com, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo (80 mL) e com sistema de controle de pressão e temperatura (pressão e temperatura máximas de trabalho de 80 bar e 280 °C, respectivamente).

A pesagem das amostras foi feita em uma balança analítica (Bioprecisa, modelo FA2104N, www.bioprecisa.com.br, Brasil), com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 210 g. Para o preparo de soluções tampão e ajustes de pH foi utilizado um pHmetro (Hanna, modelo pH21, www.hannabrasil.com, Brasil). Para agitação e homogeneização de soluções foi utilizado um agitador tipo vórtex (B. Braun Biotech International, modelo Certomat MV, www.bb Braunbiotech.com, Alemanha). A centrifugação dos extratos foi feita com o auxílio de uma centrífuga (Centribio, modelo 80-2B, Brasil) com capacidade para 12 tubos de 15 mL e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm. Para o preparo de soluções e lavagem das vidrarias foi utilizada água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3[®], www.millipore.com, Alemanha), com resistividade 18,2 MΩ cm.

O tratamento dos dados referentes à otimização da MSPD foi feito com o auxílio do programa *Statistica*, versão 8.0 (Copyright[®] 1984-2007, Statsoft Inc.). As demais avaliações estatísticas foram feitas com auxílio do programa *InStat*, versão 3.0 (Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc., Microsoft Corporation). Para comparação de médias foi usado o teste *t-student*. Para a comparação de três ou mais médias, foi usada a análise de variância (ANOVA), optando-se pelo teste de múltiplas comparações de *Tukey-Kramer*, com um nível de confiança de 95%.

3.2 Reagentes

As soluções aquosas utilizadas em todas as etapas do desenvolvimento do trabalho foram preparadas em água ultrapura. Foram preparadas soluções de referência de Hg²⁺ por diluições apropriadas a partir de uma solução estoque de cloreto de mercúrio (HgCl₂, Merck, www.merckgroup.com, Alemanha) 1000 mg L⁻¹, como Hg,

em HNO₃ 2% (v/v) (Merck). Da mesma forma, foram preparadas soluções de referência de CH₃Hg⁺ a partir de uma solução estoque de CH₃HgCl (Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com, Alemanha) 1000 mg L⁻¹, como Hg, em metanol grau HPLC (J. T. Baker, www.jtbaker.nl/index.htm, EUA).

Para as reações de derivatização, foi utilizado como reagente derivatizante o tetrafenilborato de sódio (Na[B(C₆H₅)₄], pureza > 99,5%, Sigma-Aldrich). As soluções de referência de mercúrio e Na[B(C₆H₅)₄] foram preparadas diariamente, mantidas sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz para garantir a integridade das espécies. Acetato de sódio (J. T. Baker) e ácido acético glacial (Merck) foram utilizados para o preparo das soluções tampão utilizadas nas reações de derivatização. Também foram avaliados heptano (J. T. Baker) e hexano (J. T. Baker) para a extração das espécies após a etapa de derivatização. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC.

Para a extração das espécies de mercúrio por MSPD foram utilizados cloreto de sódio (Merck) e ácido clorídrico (Merck). Como suportes sólidos foram avaliados: *i*) sílica gel (SiO₂, ACROS organics, www.acros.com, Bélgica) com tamanho de partícula entre 35 e 70 µm e 60 Å de tamanho de poro; *ii*) sílica gel funcionalizada com grupos octadecil (C18ec) (Macherey-Nagel, www.mn-net.com, Alemanha) com tamanho de partícula de 45 µm e 60 Å de tamanho de poro.

Para a quantificação de mercúrio total por CVG-ICP-MS foram preparadas soluções de tetraidroborato de sódio (NaBH₄, Vetec) em hidróxido de sódio concentrado (NaOH, Merck). Para digestão das amostras empregando MAD, foi utilizado HNO₃ concentrado (Merck).

3.3 Amostras

Para os ensaios de aplicabilidade foram utilizadas amostras de peixe do tipo atum (*Thunnus thynnus*) e cação anjo (*Squatina squatina*). Para os ensaios de otimização da MSPD, foi utilizada uma amostra de peixe do tipo cação viola (*Rhinobatos blochii*). Cabe destacar que duas amostras diferentes de atum (denominadas atum I e atum II) foram utilizadas na aplicabilidade. Todas as amostras foram obtidas no mercado público da cidade de Rio Grande/RS.

Para avaliar a exatidão do método foram utilizados CRMs de fígado de peixe (*Dogfish liver*, DOLT-3) e músculo de peixe (*Dogfish muscle*, DORM-2), obtidos através do National Research Council Canada (NRCC).

3.4 Tratamento preliminar das amostras

Primeiramente, cerca de 500 g de músculo de cada espécie de peixe foram adquiridas na forma de postas ou filés congelados. Do local da compra até o laboratório, as amostras foram transportadas em recipiente com gelo. Em seguida, as amostras foram congeladas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o tratamento preliminar, a fim de preservar a integridade das amostras e prevenir a interconversão entre as espécies de mercúrio. O posterior descongelamento foi feito ao abrigo da luz em refrigerador à temperatura de cerca de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um triturador de alimentos. As amostras foram quarteadas e as duas porções opostas foram submetidas à secagem, onde uma delas serviu como contraprova a fim de manter as mesmas condições de congelamento e descongelamento, caso houvesse a necessidade de repetir algum experimento. As duas porções restantes foram congeladas novamente. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa por 24 h, condição que garante a preservação das espécies.⁹⁹ Após, as amostras foram moídas com auxílio de almofariz e pistilo e armazenadas em dessecador, sendo monitoradas as massas até apresentarem massa constante.

3.5 Digestão das amostras para determinação de mercúrio total

Para determinação da concentração de mercúrio total $0,20 \pm 0,01$ g de amostra foram digeridos em triplicata com adição de 6 mL de HNO_3 concentrado. O programa de aquecimento do forno de micro-ondas foi adaptado das condições recomendadas pelo fabricante e consistiu de: *i*) 0 até 1000 W (rampa de 15 min); *ii*) 1000 W (10 min); *iii*) 0 W (20 min - resfriamento).

3.6 Determinação de mercúrio total por CVG-ICP-MS

Após serem digeridas, as amostras foram determinadas por CVG-ICP-MS. Os parâmetros instrumentais foram ajustados antes da determinação. As condições operacionais estão mostradas na Tabela 1 e foram adaptadas do trabalho de Pilz *et al.*⁴⁷

⁴⁷ Pilz *et al.*; *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.

⁹⁹ Schmidt, L.; *Avaliação do comportamento de espécies de mercúrio em peixes após diferentes métodos de cocção*. PPGQ, UFSM, 2011.

Tabela 1. Condições operacionais para a determinação da concentração de mercúrio total por CVG-ICP-MS.

Parâmetro	Valor
<i>ICP-MS</i>	
Potência de radiofrequência	1400 W
Vazão do gás de plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	1,05 L min ⁻¹
<i>CVG</i>	
Concentração de HCl	1 mol L ⁻¹
Carregador da amostra	água ultrapura
Concentração de NaBH ₄	0,1% (m/v) em NaOH 0,01% (m/v)

3.7 Otimização da separação cromatográfica por GC-MS

Inicialmente, foram feitos experimentos com soluções de referência aquosas seguidos de derivatização para otimizar a separação das espécies de mercúrio por GC-MS. Foram adicionados 1 µg de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺, como Hg; 2 mL de solução tampão acetato pH 5,0;¹⁶ 1 mL de hexano¹⁷ e 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v)⁸⁰, como agente derivatizante. Foram avaliadas a temperatura inicial (30 a 130 °C) e a taxa de aumento da temperatura do forno (20 a 50 °C min⁻¹) durante o programa de aquecimento. Além disso, a proporção de introdução de amostra no insersor (modo *split*) foi avaliada entre 1:1 e 1:7.

3.8 Determinação das espécies de mercúrio por GC-MS

As espécies de mercúrio foram separadas e determinadas por GC-MS. Com exceção do programa de aquecimento, as condições operacionais foram fixadas e estão mostradas na Tabela 2. Os fragmentos das espécies derivatizadas CH₃Hg(C₆H₅) e Hg(C₆H₅)₂ foram monitorados no modo SIM, conforme o trabalho de Mishra *et al.*²¹

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

Tabela 2. Condições operacionais para a separação e determinação das espécies de mercúrio por GC-MS.

Parâmetro	Valor
<i>Injetor</i>	<i>Split</i>
Temperatura	200 °C
Vazão total do gás de arraste	14,5 mL min ⁻¹
Pressão	121,8 kPa
Velocidade Linear	45,2 cm s ⁻¹
<i>Detector</i>	<i>MS</i>
<i>m/z</i> para mercúrio orgânico ^a	51, 77, 91, 217, 279, 294
<i>m/z</i> para mercúrio inorgânico ^b	51, 77, 154, 279, 356
Temperatura da fonte de ionização	230 °C
Temperatura da interface	250 °C

^a Fragmentos monitorados (*m/z*) para a espécie CH₃Hg⁺ na forma derivatizada, CH₃Hg(C₆H₅).

^b Fragmentos monitorados (*m/z*) para a espécie Hg²⁺ na forma derivatizada, Hg(C₆H₅)₂.

3.9 Otimização da etapa de derivatização das espécies de mercúrio

Os compostos de mercúrio geralmente estão presentes na matriz como espécies iônicas. Para serem separadas por GC, estas espécies precisam ser extraídas da matriz e convertidas (derivatizadas) em espécies voláteis.¹⁵ Dentre as reações de derivatização de espécies de Hg, a fenilação em meio aquoso (pH 5,0) tem sido reportada.⁹³ Neste trabalho, foi utilizado o Na[B(C₆H₅)₄] como reagente derivatizante. Dessa forma, foram avaliados diversos parâmetros da derivatização como o efeito do pH da solução tampão composta por acetato de sódio e ácido acético (3,0 a 8,0); o volume da solução de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) (0,5 a 2,0 mL); tipo de solvente orgânico para injeção no GC-MS (hexano e heptano) e o tempo de agitação/reação (0,5 a 15 min). Todos os ensaios foram feitos em solução aquosa, variando um parâmetro por vez com os demais parâmetros fixados. Os resultados foram avaliados pela comparação das áreas dos picos cromatográficos.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

⁹³ Hippler *et al.*; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2465-2470.

3.10 Extração das espécies de mercúrio empregando MSPD

Para a extração das espécies de mercúrio por MSPD foram pesadas quantidades adequadas de amostra e suporte sólido (SiO_2 ou C18), sendo estas quantidades transferidas para almofariz de porcelana e maceradas por 5 min. Após, a mistura foi transferida, com auxílio de espátula, para tubos de polipropileno (PP) com capacidade de 15 mL, onde foram adicionados 3 mL de solução extratora de NaCl em HCl. Com o objetivo de remover toda a mistura (amostra + suporte sólido) da superfície do almofariz, foram adicionados 2 mL da solução extratora, seguido da transferência para o mesmo tubo de PP, totalizando 5 mL de solução extratora. A mistura (amostra, suporte sólido e solução extratora) foi agitada/homogeneizada em vórtex e centrifugada por 10 min a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, e colocado em um novo tubo de PP de 15 mL para posterior etapa de derivatização.

Para a derivatização das espécies de mercúrio, foram adicionados no extrato proveniente da MSPD, 2 mL de uma solução tampão acetato, 1 mL de solvente orgânico (heptano ou hexano) seguido da adição do reagente derivatizante $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$. Em seguida, a mistura foi agitada/homogeneizada em vórtex e centrifugada por 10 min a 3000 rpm. Por fim, a fase contendo o solvente orgânico foi transferida para frascos de vidro e introduzida no equipamento de GC-MS. Na Figura 5, estão mostradas as etapas envolvidas na extração por MSPD.

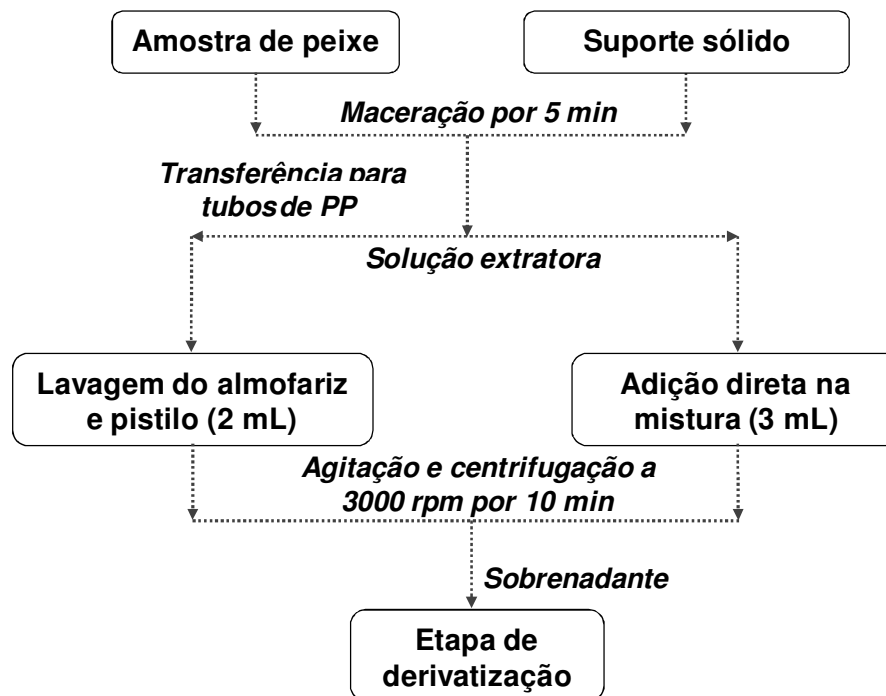


Figura 5. Fluxograma da extração das espécies de mercúrio empregando a MSPD.

3.11 Otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD

Inicialmente, foram avaliados diferentes solventes como acetonitrila e metanol 20, 50, 60 e 80% (v/v), assim como uma solução de L-cisteína 1% (m/v) para extração das espécies de mercúrio por MSPD. Além disso, a extração das espécies de mercúrio por MSPD foi otimizada com auxílio da metodologia de superfície de resposta (SRM), onde foi aplicada uma estratégia de planejamentos fatoriais sequenciais. Inicialmente, foi feita uma triagem de variáveis através de um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , onde foram selecionadas as variáveis de importância significativa na recuperação dos analitos. Após, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2^3 , a fim de estabelecer as melhores condições para a extração de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ por MSPD.

3.11.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Devido a MSPD estar sendo proposta pela primeira vez para extração de espécies de mercúrio, inicialmente foi aplicado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para avaliar a influência de 5 variáveis independentes na recuperação das espécies,

variável dependente. As variáveis independentes foram escolhidas a partir de uma pesquisa na literatura. A recuperação foi calculada conforme equação (3).

$$R = \frac{A_M - A_B}{A_S} \times 100 \quad (3)$$

onde R representa a recuperação (%); A_M é a área da solução de referência adicionada na matriz antes da extração por MSPD, juntamente com a concentração de mercúrio já existente na amostra; A_B é a área do analito presente na amostra sem adição de mercúrio e A_S é a área da solução de referência adicionada no solvente (sem passar pela MSPD).

Foram avaliados os efeitos das seguintes variáveis: massa de amostra (m_A); massa de suporte sólido (m_{SS}); concentração de HCl (C_{HCl}); concentração de NaCl (C_{NaCl}) e tipo de suporte sólido (SS). A análise de efeitos foi feita considerando um nível de confiança de 90%. Na Tabela 3, estão mostradas as variáveis e os valores reais e codificados que foram avaliados.

O planejamento fatorial foi composto por 22 tratamentos, sendo 16 combinações entre os níveis avaliados e 6 tratamentos no ponto central para avaliar o desvio padrão entre os experimentos. Na Tabela 3, está mostrada a matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Tabela 3. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD.

Fatores/variáveis		Níveis		
		(-1)	0	(+1)
m_A	Massa de amostra (g)	0,25	0,5	0,75
m_{SS}	Massa de suporte sólido (g)	0,5	1,0	1,5
C_{HCl}	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	1,0	3,0	5,0
C_{NaCl}	Concentração de NaCl (mol L ⁻¹)	0,5	1,0	1,5
SS	Tipo de suporte sólido	C18	C18 ou SiO ₂	SiO ₂

3.11.2 Planejamento fatorial completo 2³

Após determinar as variáveis de importância significativa na recuperação das espécies, foi aplicado um planejamento fatorial completo, caracterizado por um DCCR, a fim de modelar o experimento e estabelecer as condições ótimas das variáveis estudadas na extração por MSPD. Na Tabela 4, estão mostradas as variáveis e os valores reais e codificados que foram estudados no DCCR.

Tabela 4. Fatores/variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2³ para otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD.

Variáveis/Fatores	Níveis				
	(-1,68)	(-1)	0	(+1)	(+1,68)
m _A Massa de amostra (g)	0,1	0,2	0,35	0,5	0,6
C _{HCl} Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	1,0	1,8	3,0	4,2	5,0
t _A Tempo de agitação (min)	1,0	3,8	8,0	12,2	15,0

O planejamento experimental aplicado foi composto por 17 tratamentos, sendo 8 combinações entre os níveis estudados, 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. Os pontos axiais foram calculados de acordo com a equação (4).¹⁰⁰

$$\alpha = (2^n)^{1/4} \quad (4)$$

onde α representa a distância dos pontos axiais e n o número de variáveis independentes.

Foi feito o ajuste de um modelo quadrático de superfície de resposta que pode ser representado pelo polinômio genérico da equação (5).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_{ij} + \varepsilon \quad (5)$$

onde Y representa a variável dependente ou variável resposta, x_i e x_j as variáveis independentes ou fatores, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} os coeficientes de regressão e ε o erro ou

¹⁰⁰ Khuri, A. I.; Cornell, J. A.; *Response Surface Design and Analyses*. Marcel Dekker Inc., 1987.

termo residual do modelo.¹⁰¹

Para avaliar a validade dos modelos de superfície de resposta, foi utilizada a ANOVA, através de um teste F de *Fisher*, com nível de confiança de 95%. O modelo foi simplificado em situações onde os termos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Adicionalmente, foi feito o cálculo dos desvios relativos do modelo, representado pela razão entre a diferença entre os valores preditos e observados e os valores observados pelo experimento, conforme equação (6).⁹⁸

$$DR = \frac{Y - \hat{Y}}{Y} \times 100 \quad (6)$$

onde *DR* representa o desvio relativo (%), *Y* o valor de recuperação observado pelo experimento e \hat{Y} o valor de recuperação predito pelo modelo.

3.12 Validação do método

Para a validação do método proposto foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: limite de detecção (LD) e quantificação (LQ); linearidade; efeito de matriz; exatidão, precisão e robustez.

3.12.1 Limite de detecção e quantificação

O LD é definido como a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o LQ é a concentração mínima que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. O LD foi determinado pelo cálculo da razão sinal ruído, o qual considera como LD a concentração equivalente a 3 vezes a razão entre a altura do pico cromatográfico e a altura do ruído instrumental. Da mesma forma, o LQ foi estabelecido como a concentração equivalente a 10 vezes a razão sinal ruído.¹⁰² As adições dos analitos foram feitas em solução aquosa.

⁹⁸ Rodrigues, M. I.; lemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Cárita editora, 2005.

¹⁰¹ Anschau *et al.*; *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 2148-2156.

¹⁰² Ribani *et al.*; *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.

3.12.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.¹⁰³ Para avaliar a linearidade, foi feita uma curva de calibração no solvente em uma faixa de 0,05 a 1,25 mg L⁻¹ e 0,08 a 0,4 mg L⁻¹ para as espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, respectivamente. Cabe salientar, que cada ponto foi avaliado em triplicata e as faixas de concentração estudadas foram escolhidas com base em uma revisão na literatura e de acordo com as concentrações de mercúrio encontradas em amostras de peixe. Da mesma forma, foram feitas curvas de adição de analito nas mesmas faixas de concentração, onde os analitos foram adicionados na matriz antes da extração por MSPD.

A validade das curvas analíticas estudadas foi avaliada através do método da regressão linear, onde foi possível estimar os coeficientes de determinação (r^2). Estes parâmetros representam o grau de ajuste dos dados experimentais à curva analítica, pois quanto mais próximo da unidade, menor é a dispersão dos dados e menor é a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.¹⁰⁴

3.12.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz pode ser definido como a influência de um ou mais componentes da matriz na medida da concentração ou massa do analito. A existência de efeito de matriz pode ser verificada através da comparação da resposta analítica dos padrões preparados no solvente e na matriz.¹⁰⁵ Desta forma, foram preparadas curvas analíticas no solvente e na matriz com concentrações de 0,05 a 1,0 mg L⁻¹ e 0,08 a 0,4 mg L⁻¹, expresso como Hg, para as espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, respectivamente. A curva analítica preparada no solvente foi feita através de adições dos analitos em solução aquosa, seguida de derivatização. A curva analítica preparada na matriz foi feita da mesma forma, porém as adições dos analitos foram feitas nos extratos provenientes do procedimento de MSPD. Além disso, para fins de

¹⁰³ INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

¹⁰⁴ Chui *et al.*; *Quim. Nova* 24 (2001) 374-380.

¹⁰⁵ SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Documento Nº 10684, 2010.

comparação, as curvas foram feitas no mesmo dia para minimizar a variação que é observada quando as medições são feitas em dias diferentes.

O efeito de matriz pode ser calculado através da relação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas na matriz e no solvente, conforme equação (7).¹⁰⁶

$$C = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad (7)$$

onde C representa o efeito de matriz (%); S_s é a inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração preparada no solvente e S_m é a inclinação da curva de calibração preparada na matriz. Economou *et al.*,¹⁰⁶ classificaram o efeito de matriz nas seguintes faixas: baixo ($-20\% < C < 20\%$); médio ($-50\% < C < -20\%$ ou $20\% > C > 50\%$) e alto ($C < -50\%$ ou $C > 50\%$).

3.12.4 Exatidão e precisão

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.¹⁰³

A exatidão e precisão do método foram avaliadas através da aplicação do método proposto em materiais de referência de fígado de peixe (DOLT-3) e músculo de peixe (DORM-2), onde foram feitos ensaios em triplicata, com 3 injeções no GC-MS para cada replicata. A exatidão foi avaliada de acordo com a concordância entre os valores observados pelo método proposto e os valores certificados pelo CRM. A precisão foi avaliada utilizando como critério o RSD entre as medidas. Em métodos empregados para análise de traços ou impurezas por técnicas cromatográficas, podem ser aceitos valores de RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.¹⁰²

¹⁰² Ribani *et al.*; *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.

¹⁰³ INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

¹⁰⁶ Economou *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5856-5867.

3.12.5 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta a pequenas variações, ou seja, quando um método não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, pode-se dizer que este método é robusto.¹⁰³

A robustez do método foi avaliada variando o tempo de agitação em vórtex durante a extração das espécies de mercúrio com a solução de NaCl em HCl. Esta avaliação fez parte do planejamento fatorial completo 2^3 , o qual teve a variável tempo de agitação (t_A) em vórtex adicionada à estratégia de planejamentos fatoriais sequenciais, sendo possível avaliar o t_A de 1 a 15 min e observar o efeito desta variável na recuperação das espécies de mercúrio.

¹⁰³ INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Estudo da separação cromatográfica das espécies de mercúrio por GC-MS

O estudo da separação e determinação das espécies de mercúrio por GC-MS foi feito considerando como base o trabalho de Mishra *et al.*²¹ A identificação das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} na forma derivatizada foi feita através do monitoramento, no modo SIM, dos fragmentos de m/z 51, 77, 91, 217, 279, 294 e 51, 77, 154, 279, 356 para as espécies $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$, respectivamente. As condições da derivatização usadas para este estudo estão apresentadas no item 3.4. Na Figura 6, estão mostrados os íons monitorados no modo SIM referentes aos picos cromatográficos das espécies derivatizadas.

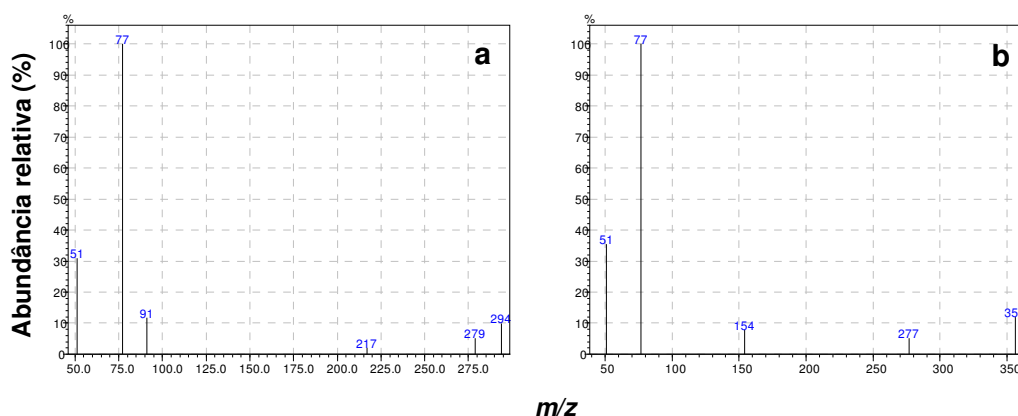


Figura 6. Íons (m/z) monitorados no modo SIM referentes à fragmentação das espécies de mercúrio, derivatizadas: (a) $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e (b) $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$. Condições: 1 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL $\text{NaB}[(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v); 1 mL de hexano.

Inicialmente, foram feitos testes em solução aquosa com adição de 1 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg, utilizando um programa de aquecimento com 30 $^\circ\text{C}$ de temperatura inicial (permanecendo por 5 min), aumentando a 30 $^\circ\text{C min}^{-1}$ até 270 $^\circ\text{C}$ (permanecendo por 2,5 min). Com o objetivo de reduzir o tempo de análise, foram avaliados os parâmetros temperatura inicial e taxa de aumento da

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

temperatura, variando um parâmetro por vez com o outro fixado, conforme a Figura 7. Cabe destacar que os pares de janelas a-b e c-d representam um cromatograma de íon total (TIC), ou seja, apenas uma corrida cromatográfica, pois o *software* do equipamento não permite exportar os cromatogramas inteiros quando é feito o monitoramento de diferentes fragmentos para diferentes analitos.

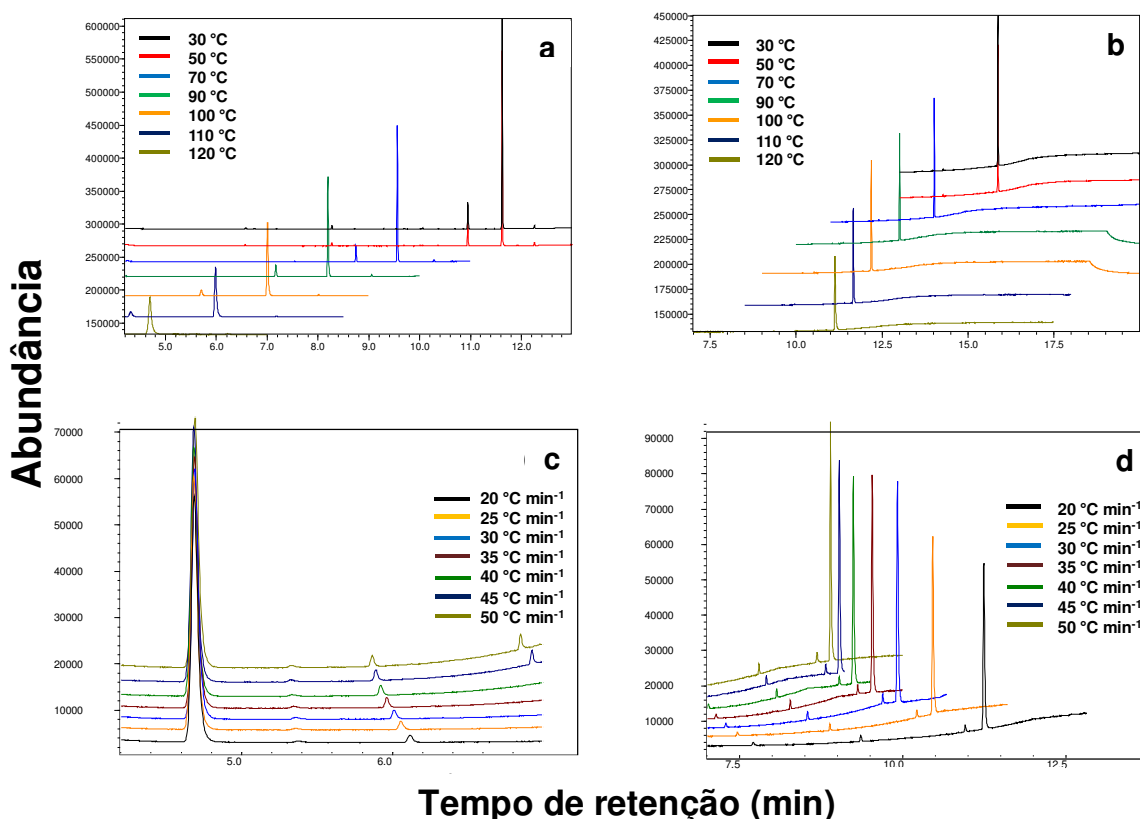


Figura 7. Cromatogramas de íon total referentes à avaliação da temperatura inicial (a) $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e (b) $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ e da taxa de aumento da temperatura (c) $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e (d) $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$. Condições: 1 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg ; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL $\text{NaB}[(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 1 mL de hexano.

Como pode ser visto nas Figuras 7a e 7b, o aumento da temperatura inicial de 30 °C para 120 °C resultou na diminuição dos tempos de retenção dos dois compostos em até 7 min para a espécie mais volátil ($\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$), diminuindo em 5 min o tempo total de análise. Já nas Figuras 7c e 7d, pode-se perceber que a variação na taxa de aumento da temperatura de 20 °C min⁻¹ para 50 °C min⁻¹, com a temperatura inicial fixada em 120 °C, resultou na diminuição de 2,3 min no tempo de retenção da espécie menos volátil [$\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$], conforme esperado. Além disso, cabe destacar que não

houve perda de sensibilidade, pois as áreas dos picos estudados permaneceram constantes com as variações feitas no programa de aquecimento, descartando a possibilidade de degradação térmica dos analitos.

Na Figura 8, está mostrado um cromatograma no modo TIC obtido após adição de 1 μg das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg, em solução aquosa sob as condições otimizadas (temperatura inicial de 120 $^\circ\text{C}$ e 50 $^\circ\text{C min}^{-1}$ de taxa de aumento da temperatura). Os picos cromatográficos representam as espécies derivatizadas, as quais possuem os tempos de retenção de 4,61 e 8,82 min, para as espécies $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$, respectivamente. Além disso, a proporção de introdução de amostra no insersor *split* também foi avaliada entre 1:1 e 1:7 e a proporção de 1:7 foi a que apresentou a maior área de pico para as duas espécies.

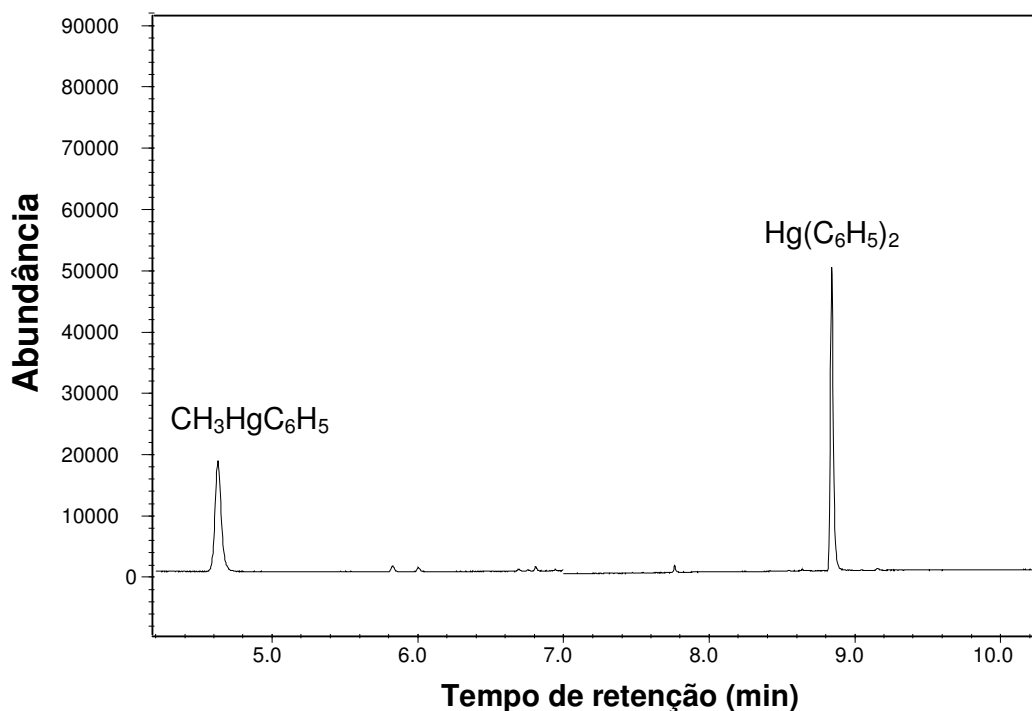


Figura 8. Cromatograma no modo TIC de uma solução de referência de 1 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg. Condições: 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL $\text{NaB}[(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 1 mL de hexano, sob as condições otimizadas do GC-MS.

4.2 Otimização da etapa de derivatização das espécies de mercúrio

A avaliação das melhores condições da reação de derivatização foi feita utilizando como resposta a área dos picos cromatográficos. Cabe destacar que este estudo foi feito em meio aquoso, ou seja, sem a influência dos coextrativos gerados na MSPD, pois inicialmente os parâmetros de influência significativa na extração não eram conhecidos e nenhum trabalho similar foi encontrado na literatura. Dessa forma, este estudo inicial foi feito com o objetivo de determinar os parâmetros ótimos da derivatização para, posteriormente, serem fixados durante a otimização da extração por MSPD. As avaliações foram feitas de forma univariada.

Além do trabalho de Mishra *et al.*,²¹ outros autores têm feito a determinação de espécies de mercúrio após separação por GC, utilizando Na[B(C₆H₅)₄] como derivatizante.^{15-17,80,95} Com base nestes trabalhos, foram avaliados parâmetros como volume de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v), tipo de solvente orgânico para injeção no GC-MS, pH do meio e o tempo de agitação.

4.2.1 Efeito do volume de derivatizante

Os experimentos iniciais foram feitos utilizando 2 mL de uma solução tampão acetato pH 5; 1 mL de hexano e 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v). O efeito do volume de derivatizante foi avaliado de 0,5 a 2 mL de uma solução 1% (m/v). Cabe salientar que a faixa de volume e a concentração da solução de Na[B(C₆H₅)₄] foi escolhida com o objetivo de utilizar o derivatizante em excesso com relação às espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, a fim de garantir, mesmo do ponto de vista qualitativo, bons índices de conversão da reação. De acordo com a estequiometria da reação, 1 mL de uma solução de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) reage com uma solução de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ 1 mg L⁻¹ em uma proporção molar de 6301:1 e 5861:1, respectivamente. Na Figura 9, estão mostrados os resultados obtidos no estudo do volume de derivatizante.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

²¹ Mishra *et al.*; *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

⁹⁵ Abuín *et al.*; *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185-193.

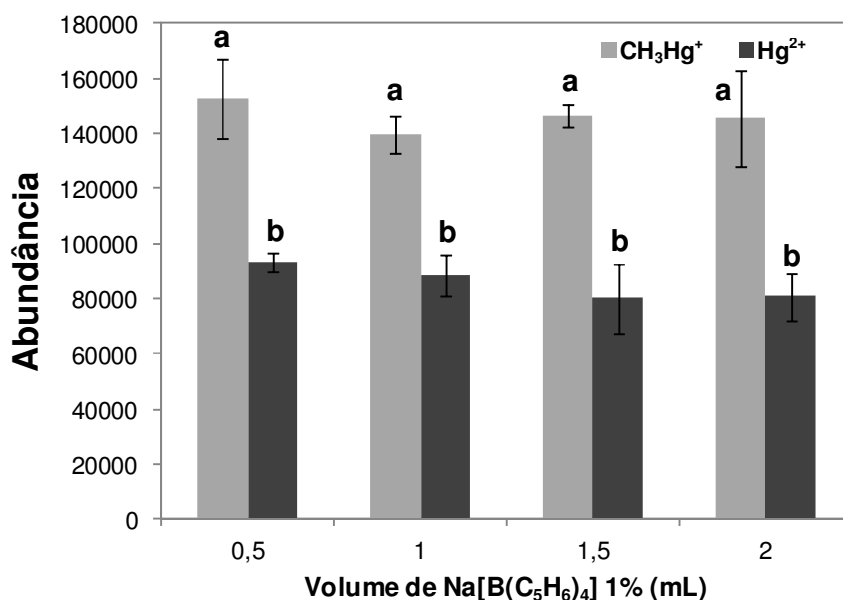


Figura 9. Estudo do volume de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 0,5 a 2 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 1 min de agitação. As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.

Entre os volumes estudados não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$), mostrando que 0,5 mL de uma solução de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) (0,015 mmol) equivale à mesma resposta obtida com o uso de volumes maiores. Assim, o volume de 0,5 mL de derivatizante foi escolhido para os estudos posteriores para assegurar um excesso de derivatizante. Similarmente, Mao *et al.*⁸⁰ utilizaram 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) ao determinar as espécies CH₃Hg⁺ e C₂H₅Hg⁺ empregando as técnicas de GC-AFS e GC-ICP-MS. Outros autores, têm utilizado volumes de até 2 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) para a determinação da espécie CH₃Hg⁺ em reações de fenilação.^{16,95}

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

⁹⁵ Abuín *et al.*; *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185-193.

4.2.2 Efeito do tipo de solvente orgânico

Para os estudos feitos até o momento, foi utilizado hexano como solvente extrator. Para estudar o efeito do tipo de solvente orgânico também foi avaliado o heptano, como mostrado na Figura 10.

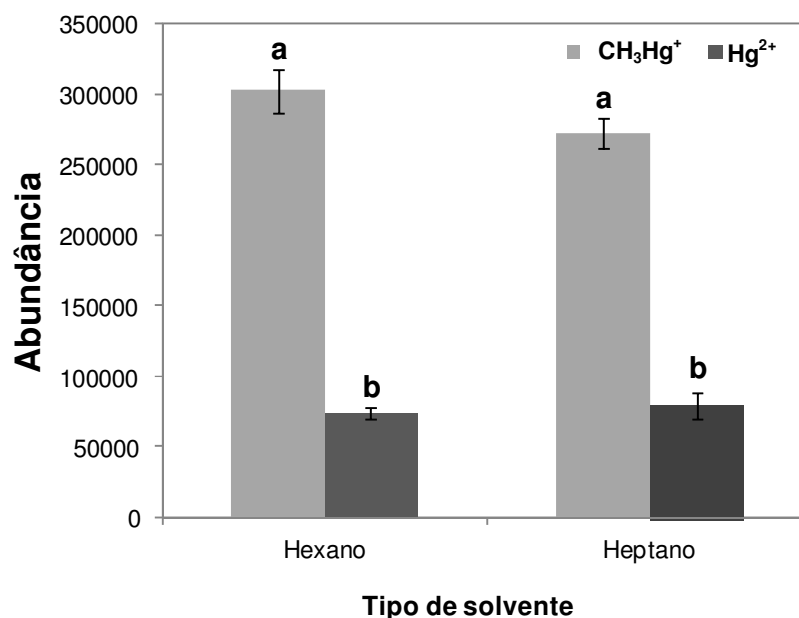


Figura 10. Estudo do tipo de solvente orgânico para a extração das espécies derivatizadas de mercúrio ($n = 3$). Condições: $1 \mu\text{g}$ de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 1 min de agitação. As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.

A ANOVA não mostrou diferença significativa entre as médias. Por isso, ao fazer a escolha do tipo de solvente orgânico, foi considerado o solvente que apresentou o menor desvio padrão relativo (RSD) para a espécie Hg^{2+} (5,4%), pois é a espécie geralmente encontrada em concentrações mais baixas em amostras de peixes.

4.2.3 Efeito do tempo de agitação/reação

O tempo de agitação ou tempo de reação foi avaliado inicialmente de 0,5 a 2 min, onde não houve diferença significativa entre as médias, mostrando que a reação é independente do tempo no intervalo de 0,5 a 2 min (Figura 11). Além disso, para

confirmação, foi avaliado um intervalo entre 5 e 15 min, onde também não foi verificada diferença significativa entre as médias. Pode-se perceber que menores RSDs foram obtidos com 0,5 min e, a fim de diminuir o tempo de derivatização, este valor foi escolhido para os estudos posteriores.

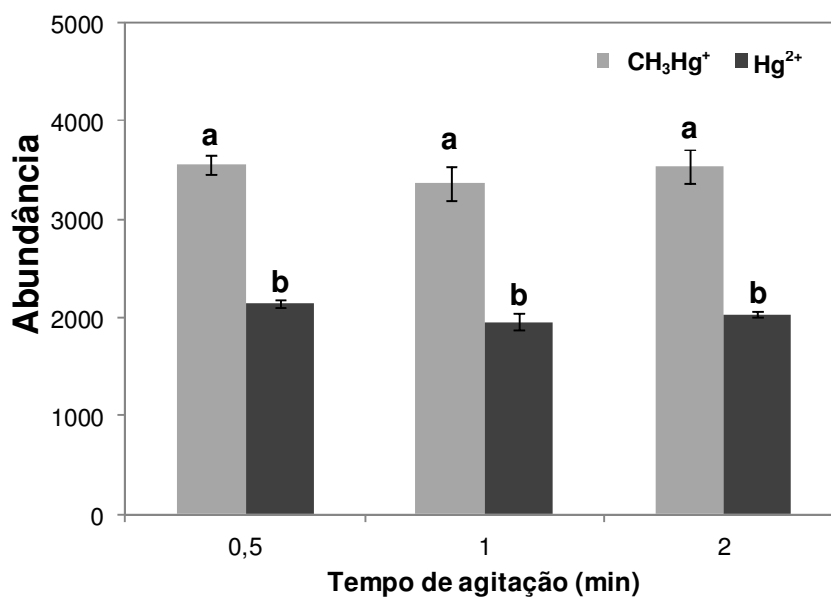


Figura 11. Estudo do tempo de agitação/reação na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano e 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v). As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.

De maneira similar, Cai *et al.*,¹⁷ estudaram o tempo de reação de fenilação para CH₃Hg⁺ em um intervalo entre 5 e 40 min, onde não foi verificada influência do tempo na eficiência de reação.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

4.2.4 Efeito do pH

O efeito do pH foi avaliado através do preparo de 5 soluções tampão acetato com pH entre 3 e 7, com adição de 2 mL desta solução. Os resultados estão mostrados na Figura 12

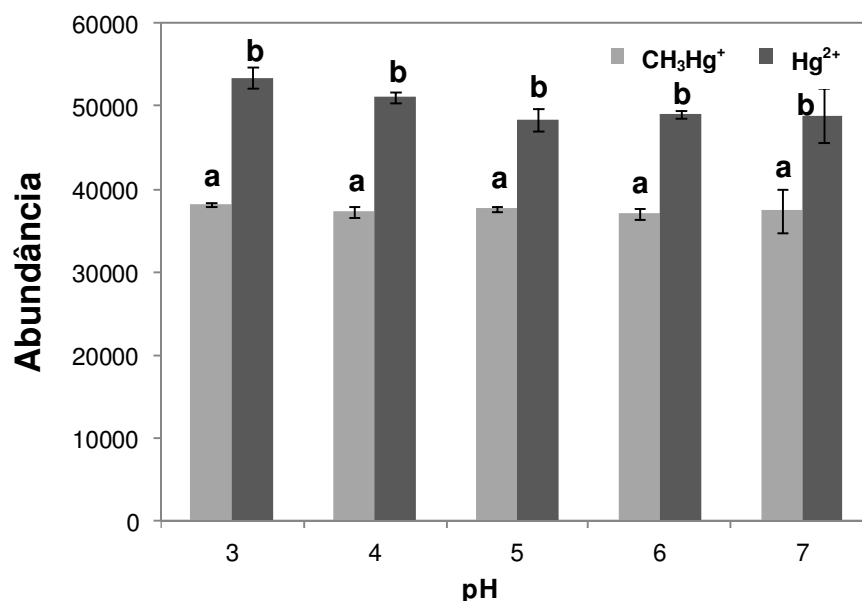


Figura 12. Estudo do efeito do pH na reação de fenilação em meio aquoso (n = 3). Condições: 1 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg; 2 mL de tampão acetato pH de 3,0 a 7,0; 1 mL de hexano; 1 mL de Na[B(C₆H₅)₄] 1% (m/v) e 30 s de agitação. As letras a e b classificam as médias que apresentaram diferença significativa entre si. As barras de erro correspondem ao desvio padrão absoluto entre as áreas.

Conforme mostrado na Figura 12, nenhuma condição apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), mostrando que as espécies formadas nas reações de derivatização não foram influenciadas pelas variações de pH. Cai *et al.*,¹⁷ observaram o mesmo efeito para CH₃Hg⁺ ao desenvolver um método para determinação das espécies CH₃Hg⁺ e C₂H₅Hg⁺ por GC-AFS utilizando reações de fenilação em meio aquoso, mostrando que a fenilação da espécie CH₃Hg⁺ pode ser feita em pH entre 4 e 10. Da mesma forma, Rodil *et al.*¹⁶ ao fazer um estudo para determinação de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ através de reações de fenilação após extração assistida

¹⁶ Rodil *et al.*; *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

por micro-ondas (MAE) e determinação por GC-MIP-OES, não observaram efeito significativo na variação de pH entre 4 e 8 para as duas espécies. Entretanto, a maioria dos autores utilizam pH entre 4,5 e 5,0 nas reações de derivatização.^{15,17,80,95} Dessa forma, 2 mL de uma solução tampão (ácido acético e acetato de sódio) com pH 5 foi utilizada nos estudos posteriores.

4.3 Otimização da extração das espécies de mercúrio por MSPD

É importante salientar que este trabalho propõe pela primeira vez a extração das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em tecidos de peixe utilizando a MSPD. Os primeiros experimentos foram feitos considerando como base o trabalho de Piñeiro *et al.*,¹⁰ o qual utilizou a MSPD para extração de espécies de arsênio (arsenito, arsenato, monometilarsênio, dimetilarsênio, arsenobetaína e arsenocolina) em frutos do mar.

Inicialmente, foram avaliadas as condições de 0,5 g de amostra (cação viola), adição de 1 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} (ambos como Hg), 1 g de suporte sólido (C18), 5 min de tempo de dispersão e 15 mL de volume de solvente de eluição. Os primeiros experimentos foram feitos pelo método tradicional da MSPD, onde a mistura (após ser macerada) foi empacotada em cartuchos de SPE e eluída com um solvente extrator, utilizando um sistema operado a vácuo (*manifold*). Como solventes de eluição, foram avaliados metanol 20, 50, 60 e 80% (v/v) e acetonitrila. Entretanto, nestas condições nenhum tipo de solvente foi eficiente para eluição das espécies.

A ineficiência dos solventes estudados (metanol e acetonitrila) pode ser atribuída à natureza iônica das espécies (CH_3Hg^+ e Hg^{2+}), pois estes solventes possuem afinidade por compostos moleculares. Sabe-se que o mercúrio possui forte interação com grupamentos sulfidril (-SH) e de acordo com Lemes e Wang,³² o CH_3Hg^+ encontra-se quase que integralmente na forma do complexo $\text{CH}_3\text{Hg}(\text{Cis})$ em músculo de peixes. Devido a este fato, também foi utilizada uma solução de L-cisteína 1% (m/v) para extração. Entretanto, desta vez não foi feito o empacotamento da mistura em cartuchos. Na tentativa de propor uma modificação na MSPD, visando reduzir o tempo

¹⁰ Piñeiro *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 9272-9278.

¹⁵ Cai *et al.*; *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

¹⁷ Cai *et al.*; *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.

³² Lemes, M.; Wang, F.; *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.

⁸⁰ Mao *et al.*; *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.

⁹⁵ Abuín *et al.*; *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185-193.

de extração, as etapas de empacotamento da mistura e de eluição foram excluídas do procedimento. Dessa forma, após ser macerada por 5 min, a mistura foi transferida para tubos de PP de 15 mL, nos quais foram adicionados 5 mL da solução de L-cisteína 1% (m/v). Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada por 10 min a 3000 rpm. Entretanto, utilizando esta solução, não foram obtidas recuperações satisfatórias das espécies de mercúrio. Embora a maceração da amostra com um suporte sólido seja a etapa responsável pelo rompimento da estrutura física da amostra, deixando o analito disponível para ser extraído,⁸ parece que o tempo de maceração e o tempo de interação entre a solução de L-cisteína 1% (m/v) e a amostra não foram suficientes para promover a extração dos analitos. Hight e Cheng,⁴⁸ desenvolveram um método para a extração de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em amostras de peixe utilizando uma solução de L-cisteína 1% (m/v) e um tempo de extração superior a 2 h e com etapa adicional de aquecimento.

Assim, baseado em trabalhos como os de Westöö⁴⁰ e Duarte *et. al.*,⁵⁸ que utilizaram ácidos e sais inorgânicos para extração de espécies de mercúrio em tecidos de peixes, foi avaliada uma mistura de NaCl 1 mol L^{-1} e HCl 3 mol L^{-1} como solução extratora, na tentativa de propor um método rápido, simples e que fizesse uso de pequenas quantidades de reagentes, utilizando a MSPD. Inicialmente, foram feitas adições de $10 \mu\text{g}$ de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg, em $0,5 \text{ g}$ de amostra. Nestes experimentos foi utilizado 1 g de dois suportes sólidos, SiO_2 ou C18. Na Figura 13, está mostrado um cromatograma que representa o experimento exploratório que foi feito utilizando a mistura de NaCl e HCl como solução extratora. Os picos cromatográficos foram sobrepostos e estão ampliados na Figura para auxiliar na visualização.

⁸ Barker, S. A.; *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.

⁴⁰ Westöö, G.; *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137.

⁴⁸ Hight, S. C.; Cheng, J.; *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.

⁵⁸ Duarte *et al.*; *Spectroc. Acta Part B* 64 (2009) 513-519.

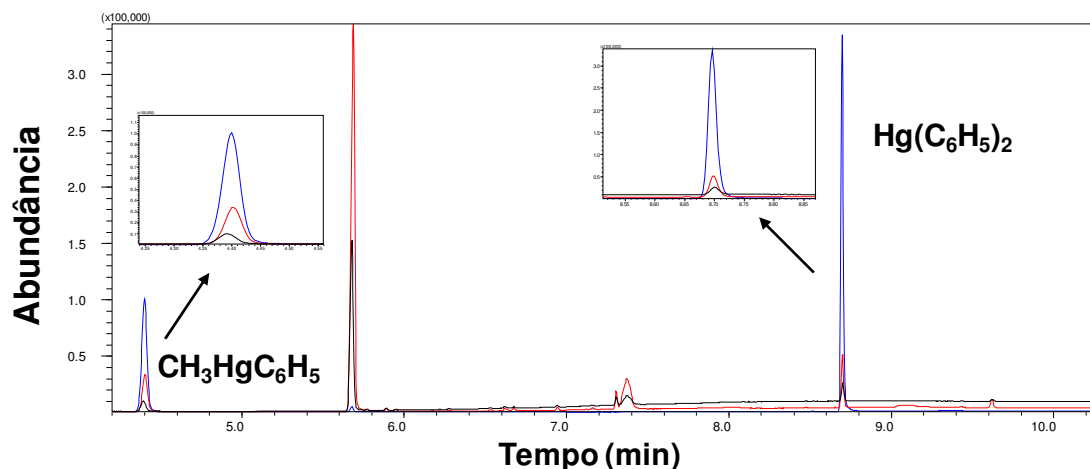


Figura 13. Cromatogramas das espécies de Hg derivatizadas: $\text{CH}_3\text{HgC}_6\text{H}_5$ e $\text{Hg}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$. Os cromatogramas representam experimentos onde foram utilizados C18 (■); sílica (■) e adição de $10 \mu\text{g}$ de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg, sem passar pela MSPD (■). Condições: $0,5 \text{ g}$ de amostra; 1 g de suporte sólido; extração com 5 mL de uma solução de $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$; 2 mL de tampão acetato $\text{pH } 5,0$; 1 mL de hexano; 1 mL de $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização.

Pode-se perceber, de forma qualitativa, que a mistura de $\text{NaCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ extraiu as espécies de mercúrio mesmo que de forma ineficiente, utilizando os dois suportes sólidos testados, o que não havia sido observado para os demais solventes e soluções estudadas anteriormente. Por isso, foi aplicada uma metodologia de superfície de resposta, através de uma estratégia de planejamentos fatoriais sequenciais, para otimizar os parâmetros da MSPD, a fim de melhorar as recuperações obtidas com o experimento da Figura 13.

4.3.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Tendo em vista a falta de conhecimento a respeito das variáveis que poderiam influenciar significativamente na extração de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em tecidos de peixes por MSPD, foi feita uma triagem de variáveis através de um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , onde foram avaliados os efeitos das variáveis: massa de amostra (m_A); massa de suporte sólido (m_{SS}); concentração de HCl (C_{HCl}); concentração de NaCl (C_{NaCl}) e tipo de suporte sólido (SS). As faixas de estudo foram escolhidas de acordo

com as condições avaliadas inicialmente e estão mostradas na Tabela 2 (item 3.7.1). A análise de efeitos foi feita considerando um nível de confiança de 90%.

Na Tabela 5, estão mostrados os efeitos de cada variável independente avaliada e a Tabela 6 contém os valores de recuperação das duas espécies de mercúrio após a aplicação do planejamento fatorial fracionado. As recuperações foram calculadas de acordo com a equação (3). Para estes experimentos, foi feita a adição de 10 µg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg, nas amostras antes da extração, para cada tratamento. Após as adições, as amostras foram deixadas em repouso por 1 h, na ausência de luz, com o objetivo de evaporar o solvente das soluções de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} (metanol e H_2O ultrapura, respectivamente). A mesma adição foi feita no solvente, ou seja, em solução aquosa sem passar pela MSPD, passando apenas pelo procedimento de derivatização para usar como referência no cálculo da recuperação.

Tabela 5. Efeitos estimados das variáveis independentes na recuperação das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} .

Fatores	CH_3Hg^+			Hg^{2+}		
	Efeito	Erro padrão	p-valor	Efeito	Erro padrão	p-valor
Média	25,92	2,35	0,0000	19,03	2,29	0,0000
Massa de amostra (g)	-3,11	5,51	0,5802	-10,34	5,37	0,0721
Massa de suporte sólido (g)	-7,94	5,51	0,1693	-3,83	5,37	0,4862
Concentração de HCl (mol L^{-1})	-16,13	5,51	0,0098	23,62	5,37	0,0004
Concentração de NaCl (mol L^{-1})	-4,20	5,51	0,4568	2,48	5,37	0,6500
Tipo de suporte sólido	9,98	5,51	0,0891	7,22	5,37	0,1972

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com as recuperações (R) obtidas para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} .

Tratamento	Massa de amostra (g)	Massa de suporte sólido (g)	Concentração de HCl (mol L^{-1})	Concentração de NaCl (mol L^{-1})	Suporte sólido (5=1234) ^a	R CH_3Hg^+ (%)	R Hg^{2+} (%)
1	-1 (0,25)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,5)	+1 (SiO_2)	56,2	5,8
2	+1 (0,75)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (C_{18})	31,6	2,8
3	-1 (0,25)	+1 (1,5)	-1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (C_{18})	21,2	4,6
4	+1 (0,75)	+1 (1,5)	-1 (1,0)	-1 (0,5)	+1 (SiO_2)	20,8	1,8
5	-1 (0,25)	-1 (0,5)	+1 (5,0)	-1 (0,5)	-1 (C_{18})	10,1	29,7
6	+1 (0,75)	-1 (0,5)	+1 (5,0)	-1 (0,5)	+1 (SiO_2)	23,9	31,2
7	-1 (0,25)	+1 (1,5)	+1 (5,0)	-1 (0,5)	+1 (SiO_2)	27,8	34,0
8	+1 (0,75)	+1 (1,5)	+1 (5,0)	-1 (0,5)	-1 (C_{18})	13,4	12,2
9	-1 (0,25)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	+1 (1,5)	-1 (C_{18})	42,5	10,4
10	+1 (0,75)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	+1 (1,5)	+1 (SiO_2)	35,9	2,1
11	-1 (0,25)	+1 (1,5)	-1 (1,0)	+1 (1,5)	+1 (SiO_2)	27,6	8,3
12	+1 (0,75)	+1 (1,5)	-1 (1,0)	+1 (1,5)	-1 (C_{18})	16,8	1,7
13	-1 (0,25)	-1 (0,5)	+1 (5,0)	+1 (1,5)	+1 (SiO_2)	11,1	52,1
14	+1 (0,75)	-1 (0,5)	+1 (5,0)	+1 (1,5)	-1 (C_{18})	8,6	13,2
15	-1 (0,25)	+1 (1,5)	+1 (5,0)	+1 (1,5)	-1 (C_{18})	4,1	28,5
16	+1 (0,75)	+1 (1,5)	+1 (5,0)	+1 (1,5)	+1 (SiO_2)	24,8	25,6
17	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	+1 (SiO_2)	45,8	48,3
18	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	+1 (SiO_2)	44,0	32,4
19	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	+1 (SiO_2)	36,4	32,1
20	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	-1 (C_{18})	22,6	14,2
21	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	-1 (C_{18})	24,1	14,3
22	0 (0,50)	0 (1,0)	0 (3,0)	0 (1,0)	-1 (C_{18})	21,0	13,2

^a Matriz identidade: representa a multiplicação das quatro primeiras colunas.

Com a aplicação do planejamento fatorial fracionado foi possível avaliar a recuperação das 5 variáveis combinadas em dois níveis e entre os pontos centrais de cada variável. Dentre as condições estudadas, não foi observada recuperação superior a 56,2%. O desvio padrão relativo (RSD) do experimento foi estimado pelos valores de recuperação obtidos nos pontos centrais, onde os tratamentos com C18 apresentaram desvios de 6,9% e 4,4% para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Já para os ensaios com sílica, os desvios foram consideravelmente superiores, de 11,9% e 24,6% para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente.

Como pode ser visto na Tabela 6, a análise de efeitos mostrou que a variação de 0,25 para 0,75 g de massa de amostra representou um efeito negativo de até 10,3% na recuperação de Hg^{2+} , sendo um parâmetro de importância significativa ($p = 0,072$) para esta espécie. Isto mostra que existe uma tendência em aumentar a recuperação em valores mais baixos de massa de amostra, principalmente para Hg^{2+} . Por isso, a massa de amostra foi estudada em uma nova faixa (0,1 a 0,6 g) no planejamento fatorial seguinte (item 4.3.2). Já o aumento de 0,5 para 1,5 g de massa de suporte sólido não mostrou significância estatística ($p > 0,10$), evidenciando que a recuperação das duas espécies não é dependente da massa de suporte sólido. Desta forma, 0,5 g foi selecionada como massa de suporte sólido para os estudos posteriores, visando minimizar os gastos com reagente.

A concentração de HCl foi a variável mais significativa na análise de efeitos para CH_3Hg^+ ($p = 0,0098$) e Hg^{2+} ($p = 0,0004$). Entretanto, o aumento de 1 para 5 mol L^{-1} de HCl resultou na diminuição de 16,1% na recuperação de CH_3Hg^+ e um aumento de 23,6% na recuperação de Hg^{2+} . Este comportamento discrepante não permite concluir se existe uma tendência em extrair as duas espécies simultaneamente com valores mais baixos ou mais altos de concentração de HCl. Por isso, a mesma faixa de estudo foi mantida para o segundo planejamento fatorial (item 4.3.2).

O efeito da concentração de NaCl também mostrou diferentes comportamentos entre as espécies, pois o aumento da concentração de NaCl de 0,5 para 1,5 mol L^{-1} mostrou um efeito negativo de 4,2% e um efeito positivo de 2,5% na recuperação das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Entretanto, estes efeitos não foram significativos ($p > 0,10$) mostrando que a recuperação das duas espécies não é dependente da concentração de NaCl. Assim, a concentração de 0,5 mol L^{-1} de NaCl

foi utilizada para o próximo planejamento fatorial (item 4.3.2), minimizando o consumo de reagentes.

Os tipos de suportes sólidos estudados (SiO_2 e C18) mostraram efeitos positivos para as duas espécies. A mudança de C18 para sílica apresentou efeito positivo de até 10%, para CH_3Hg^+ , com variação significativa ($p = 0,089$). Dessa forma, qualitativamente é possível afirmar qualitativamente que a sílica é o melhor suporte sólido para extração de CH_3Hg^+ , ou seja, a recuperação da espécie orgânica é maior ao utilizar a SiO_2 como suporte sólido.

A escolha de dois suportes sólidos de diferentes polaridades foi feita com o objetivo de estudar a influência destes dois suportes na extração simultânea das duas espécies de mercúrio. Sendo a sílica o suporte que apresentou melhores resultados na extração de CH_3Hg^+ , pode-se dizer que existe uma possível influência na liberação da espécie CH_3Hg^+ das proteínas presentes nos tecidos de peixe. Espécies metálicas, especialmente organometálicas, tendem a estar fortemente ligadas à matriz (forças de adsorção, iônicas ou por interações de Van der Waals), o que exige uma energia suficientemente maior que a interação da espécie com a matriz e suficientemente menor que a energia de degradação da espécie nos processos de extração.³ A característica polar da sílica, juntamente com o auxílio da maceração, pode ser a causa desta influência. No entanto, o mesmo efeito não ocorre para Hg^{2+} , o qual parece não ser influenciado pela mudança nos suportes sólidos estudados. Por isso, a sílica foi utilizada como suporte sólido nos estudos posteriores.

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionado, foi aplicado um planejamento fatorial completo, apenas com as variáveis que mostraram influência na extração, a massa de amostra e concentração de HCl. As variáveis que não apresentaram influência tiveram seus valores fixados nos valores mais baixos estudados. Além disso, foi acrescentada a variável tempo de extração (ou tempo de agitação) pois, até o momento, todos os estudos estavam sendo feitos com 1 min de tempo de extração/agitação. Assim, para o planejamento fatorial completo foi avaliado um intervalo de 1 a 15 min.

³ Ebdon *et al.*; *Trace elements speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, 2001.

4.3.2 Planejamento fatorial completo 2³

O planejamento fatorial completo foi aplicado, a partir dos resultados do planejamento fatorial fracionado (item 4.3.1), com o objetivo de definir as condições ótimas do método de extração através das superfícies de resposta. Foram efetuados testes de ANOVA, com nível de confiança de 95%, juntamente com o cálculo dos desvios relativos dos modelos de regressão para verificar a validade das superfícies de resposta e seus modelos de regressão. Para estes experimentos foi feita a adição de 10 µg de CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, como Hg, nas amostras antes da extração em cada experimento. Além disso, também foi feita a extração na amostra sem adição de mercúrio para descontar o sinal analítico referente ao analito presente na amostra nos cálculos de recuperação. Na Tabela 6, estão mostradas a matriz do planejamento fatorial e as recuperações obtidas após os experimentos para as duas espécies. As variáveis fixadas foram massa de suporte sólido (0,5 g), concentração de NaCl (0,5 mol L⁻¹) e tipo de suporte sólido (SiO₂).

Pode-se perceber com a aplicação do segundo planejamento fatorial (Tabela 6) que a recuperação aumentou para as duas espécies, ficando entre 51,2 e 129%, sendo que nas condições experimentais do primeiro planejamento fatorial a maior recuperação foi de 56,2%. Os RSDs do experimento, calculados através dos pontos centrais, foram de 11,8 e 5,4% para as espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, respectivamente.

Para verificar a validade das superfícies de resposta, foi utilizada a ANOVA, através de um teste F de *Fisher*, no modo MS residual. Além disso, foi feito um ajuste dos dados experimentais através de um modelo quadrático e as interações dos termos lineares. Os termos sem significância estatística foram omitidos dos modelos de regressão. Os modelos de regressão das espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺ são representados pelas equações (9) e (10), onde R_{org} e R_{ino} representam as recuperações das espécies, respectivamente; m_A é a massa de amostra (g) e C_{HCl} é a concentração de HCl (mol L⁻¹).

$$R_{org} = 97,66 - 8,54m_A - 11,65C_{HCl} \quad (9)$$

$$R_{ino} = 66,85 - 15,08m_A + 24,07C_{HCl} - 9,14C_{HCl}^2 \quad (10)$$

Pode-se notar que o termo referente ao tempo de agitação não consta no modelo, pois a variável tempo de agitação não teve significância estatística ($p > 0,05$), com 95% de nível de confiança. Além disso, conforme mostrado na Tabela 6, é possível notar que a recuperação não sofre variação significativa nas situações em que as variáveis massa de amostra e concentração de HCl não sofrem alteração nos seus valores quando o tempo de agitação varia (tratamentos 1 e 5; 2 e 6; 13, 14, 16 e 17) mostrando que a recuperação das duas espécies não é dependente do tempo de agitação (no intervalo entre 1 e 15 min). Na Tabela 7, estão mostrados os parâmetros calculados para a ANOVA.

Tabela 7. Parâmetros da ANOVA no modo MS residual.

Fonte de variação	CH ₃ Hg ⁺					Hg ²⁺				
	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	2851,56	2	1425,78	7,93	3,74	11954,21	3	3984,74	54,93	3,41
Erro = Resíduo	2514,16	14	179,58			942,98	13	72,53		
Total	5365,72	16				12897,19	16			

SQ: Soma quadrática; GL: Graus de liberdade; MQ: Média quadrática; F_{cal}: Valor de F calculado; F_{tab}: Valor de F tabelado.

A partir da ANOVA (teste F de Fisher) foi possível perceber que os modelos de regressão podem ser significativos e preditivos com coeficientes de regressão de 0,85 para CH₃Hg⁺ e 0,91 para Hg²⁺. Os valores de F calculados foram maiores que os valores de F tabelados, onde a razão entre F_{cal}/F_{tab} foi de 2,1 e 16,1 para as espécies CH₃Hg⁺ e Hg²⁺, respectivamente. Estes resultados mostraram que os modelos de regressão podem ser considerados significativos e preditivos, ou seja, podendo representar os dados experimentais. Além disso, também foram calculados, através da equação (6), os desvios relativos dos modelos de regressão. Estes resultados estão mostrados na Tabela 8. Pode-se perceber que os desvios estiveram abaixo de 20% para a maioria dos tratamentos. Na Figura 14, também é possível observar uma correlação entre os valores preditos pelos modelos de regressão e os valores observados pelo experimento.

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial completo 2³ com as recuperações observadas no experimento, recuperações previstas pelos modelos e os desvios relativos para cada espécie de mercúrio.

Tratamento	Massa de amostra (g)	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	Tempo de agitação (min)	R CH ₃ Hg ⁺ observada (%)	R Hg ²⁺ observada (%)	R CH ₃ Hg ⁺ prevista (%)	R Hg ²⁺ prevista (%)	Desvio Relativo CH ₃ Hg ⁺ (%)	Desvio Relativo Hg ²⁺ (%)
1	-1 (0,2)	-1 (1,8)	-1 (3,8)	129,1	34,8	117,8	46,6	8,7	33,7
2	1 (0,5)	-1 (1,8)	-1 (3,8)	88,6	10,3	100,7	16,4	13,7	59,4
3	-1 (0,2)	1 (4,2)	-1 (3,8)	79,4	98,4	94,5	94,7	19,1	3,7
4	1 (0,5)	1 (4,2)	-1 (3,8)	80,8	66,3	77,4	64,6	4,2	2,5
5	-1 (0,2)	-1 (1,8)	1 (12,2)	118,2	33,3	117,8	46,6	0,3	39,9
6	1 (0,5)	-1 (1,8)	1 (12,2)	104,7	11,0	100,7	16,4	3,8	49,2
7	-1 (0,2)	1 (4,2)	1 (12,2)	102,1	89,4	94,5	94,7	7,4	6,0
8	1 (0,5)	1 (4,2)	1 (12,2)	51,2	57,3	77,4	64,6	51,2	12,7
9	-1,68 (0,1)	0 (3,0)	0 (8,0)	111,8	99,1	112,0	89,5	0,2	9,7
10	1,68 (0,6)	0 (3,0)	0 (8,0)	103,9	42,7	83,3	38,8	19,8	9,1
11	0 (0,35)	-1,68 (1,0)	0 (8,0)	97,2	16,2	117,2	0,3	20,6	102,1
12	0 (0,35)	1,68 (5,0)	0 (8,0)	78,1	79,5	78,0	80,5	0,03	1,2
13	0 (0,35)	0 (3,0)	-1,68 (1,0)	103,2	68,3	97,6	64,1	5,4	6,2
14	0 (0,35)	0 (3,0)	1,68 (15,0)	108,8	69,2	97,6	64,1	10,2	7,3
15	0 (0,35)	0 (3,0)	0 (8,0)	84,6	66,5	97,6	64,1	15,4	3,5
16	0 (0,35)	0 (3,0)	0 (8,0)	106,9	69,3	97,6	64,1	8,6	7,4
17	0 (0,35)	0 (3,0)	0 (8,0)	100,1	62,2	97,6	64,1	2,5	3,1

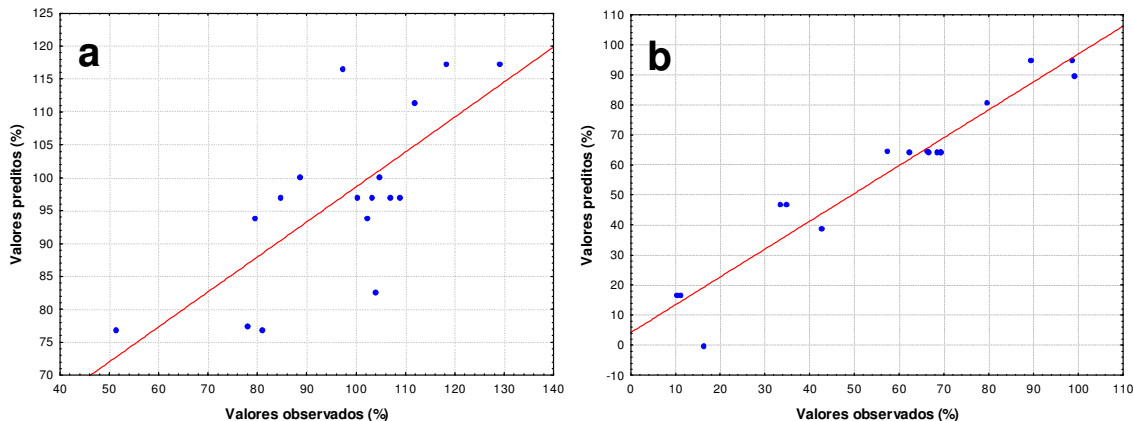


Figura 14. Correlação entre os valores preditos pelos modelos de regressão e os valores observados pelo experimento para as espécies (a) CH_3Hg^+ e (b) Hg^{2+} . Condições: 10 μg de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 1 mL de $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização.

Pode-se notar que os valores possuem uma menor dispersão dos dados para Hg^{2+} , o que está de acordo com a ANOVA, já que a razão entre o valor de F calculado e F tabelado também foi maior para Hg^{2+} . A boa concordância entre os valores preditos e os observados, juntamente com os resultados positivos da ANOVA, permitem plotar as superfícies de contorno, possibilitando a análise dos dados de uma forma global. Na Figura 15, estão mostradas as superfícies de contorno que representam as recuperações das espécies de mercúrio como uma função das variáveis significativas (massa de amostra e concentração de HCl).

Pode-se notar, através das superfícies de contorno (Figura 15), que existem regiões que correspondem à recuperação em torno de 100% para as duas espécies. A região destacada na Figura 15a mostra uma recuperação entre 90 e 100% para CH_3Hg^+ e a região destacada na Figura 15b mostra recuperações entre 80 e 100% para Hg^{2+} . Entretanto, existe uma região que possui recuperações entre 80 e 100% para as duas espécies, mostrando que existe uma condição de compromisso onde as duas espécies de Hg podem ser extraídas simultaneamente utilizando a MSPD. Estas regiões compreendem os níveis (-1; 0,2 g) de massa de amostra e (+1; 4,2 mol L^{-1}) de concentração de HCl. Analisando os desvios relativos do modelo para estas condições (tratamentos 3 e 7 da Tabela 8), as recuperações foram de 79,4 a 102% com desvios relativos entre 3,7 e 19,1%. Segundo Ribani *et al.*,¹⁰² os intervalos aceitáveis de

recuperação para determinação de resíduos por técnicas cromatográficas e eletroforéticas podem estar entre 70 e 120%, com precisão de até 20%.

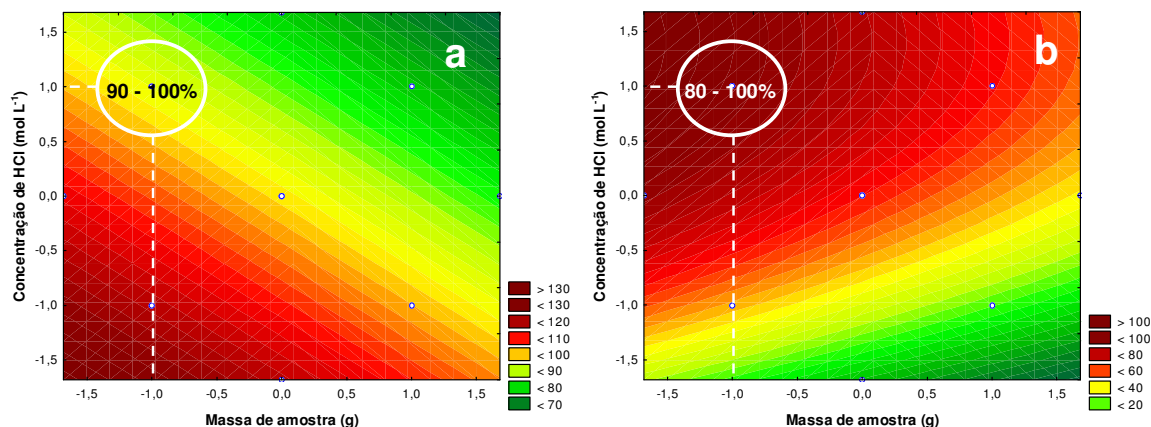


Figura 15. Superfícies de contorno que representam as recuperações para (a) CH_3Hg^+ e (b) Hg^{2+} como uma função da massa de amostra e da concentração de HCl. Condições: $10 \mu\text{g}$ de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , como Hg; 2 mL de tampão acetato pH 5,0; 1 mL de hexano; 1 mL de $\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$ 1% (m/v) e 30 s de agitação na derivatização.

Cabe destacar que existe outra condição na qual a recuperação das duas espécies foi satisfatória, a condição que corresponde ao tratamento 9 com os níveis (-1,68; 0,1 g de amostra) e (0; HCl 3,0 mol L^{-1}). Nesta condição, as recuperações estiveram entre 99,1 e 112% com desvios relativos entre 0,2 e 9,7%. Apesar desta condição ter apresentado valores de recuperação adequados e com baixos desvios relativos, esta condição não foi escolhida, pois a pequena massa de amostra resulta no aumento do limite de detecção e quantificação do método. Este comportamento mostrou que a recuperação das duas espécies pode ser maximizada em baixos valores de massa de amostra e altos valores de concentração de HCl.

Com os resultados dos experimentos para a escolha das melhores condições da MSPD, foram selecionados os seguintes parâmetros: 0,2 g de massa de amostra; 0,5 g de sílica; 5 mL de uma solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} e HCl 4,2 mol L^{-1} , com tempo de extração/agitação de 1 min. A Figura 16, traz um fluxograma simplificado contendo as condições otimizadas da MSPD e da derivatização.

¹⁰² Ribani *et al.*; *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.

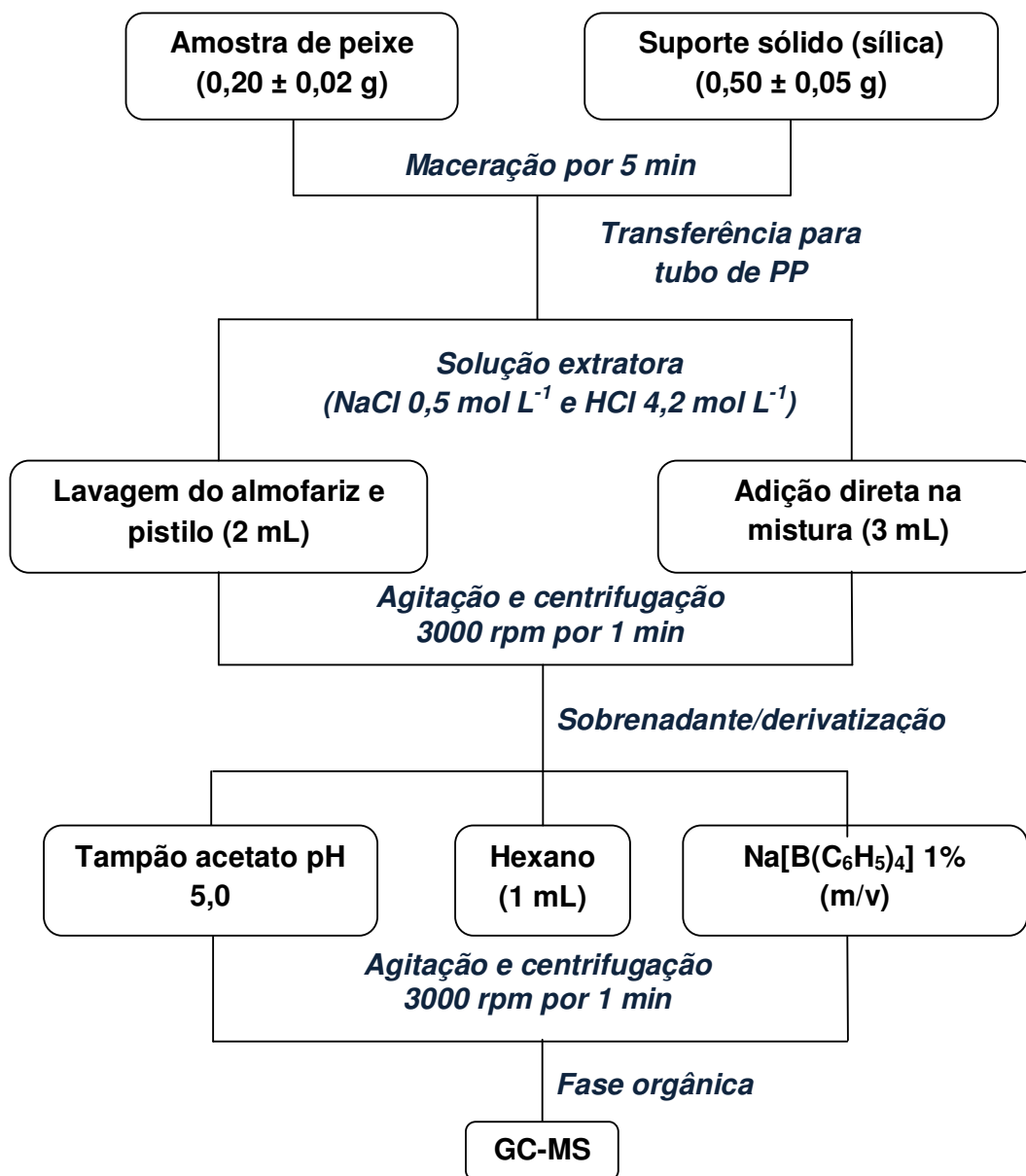


Figura 16. Fluxograma simplificado da extração/derivatização das espécies de mercúrio por MSPD e determinação por GC-MS.

4.4 Validação do método

4.4.1 Limite de detecção e quantificação

O LD e LQ foram estabelecidos a partir da adição de analito e derivatização das espécies de mercúrio em solução aquosa, de forma a obter um sinal reprodutível (com 5 injeções) que fosse visualmente detectável e que pudesse ser quantificado com segurança após o processo de extração, obedecendo o critério de 3 e 10 vezes a razão sinal ruído, respectivamente.¹⁰² Os íons (m/z) utilizados para a quantificação foram o 294 e 356 para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Os limites de detecção do método foram de 0,06 e 0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Da mesma forma, os limites de quantificação foram de 0,2 e 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente.

4.4.2 Estudo da linearidade

A linearidade foi estudada de 0,05 a 1,25 mg L^{-1} para CH_3Hg^+ e 0,08 a 0,40 mg L^{-1} para Hg^{2+} , com derivatização em solução aquosa. O estudo também foi feito com a adição dos analitos na matriz, antes da extração com as condições da MSPD previamente otimizadas, na mesma faixa de aplicação. Na Figura 18 estão mostradas as curvas de calibração preparadas no solvente e de adição de analito.

As curvas preparadas no solvente apresentaram coeficientes de correlação (r^2) de 0,9971 e 0,9978 para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente. Da mesma forma, as curvas de adição de analito apresentaram r^2 de 0,9926 e 0,9909 para CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente.

Os resultados mostraram que o instrumento responde linearmente independente da forma de calibração, pois tanto a curva analítica preparada no solvente como de adição de analito (adicionado na matriz antes da extração), mostraram linearidade nos intervalos de concentração estudados com pequena dispersão entre os dados. Um coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,99 é considerado adequado para linearidade da curva de calibração.¹⁰⁷

¹⁰² Ribani *et al.*; *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.

¹⁰⁷ Green, J. M. A.; *Anal. Chem.* 68 (1996) 305-309.

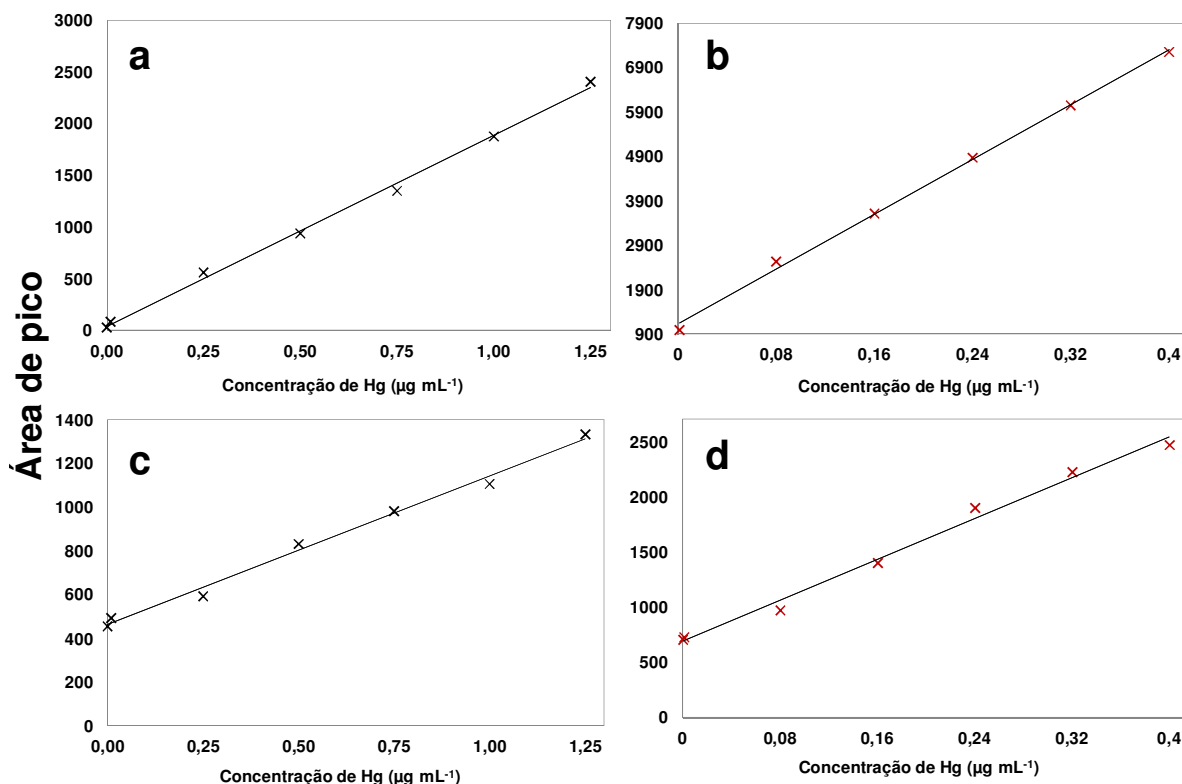


Figura 17. Curvas de calibração preparadas no solvente (a) CH₃Hg⁺ e (b) Hg²⁺; e de adição de analito (c) CH₃Hg⁺ e (d) Hg²⁺.

4.4.3 Estudo do efeito de matriz

Para estudar o efeito de matriz foram feitas curvas de calibração preparadas no solvente e no extrato da MSPD (extrato de cação viola), com o objetivo de comparar o coeficiente angular das duas curvas e verificar a influência dos componentes da matriz no sistema de detecção. Cabe destacar que as duas curvas foram preparadas no mesmo dia a fim de minimizar o efeito da variação da resposta instrumental diária. Na Figura 18, estão mostradas as curvas de calibração preparadas no solvente e no extrato. As curvas no extrato estão plotadas subtraindo a concentração de Hg já existente na amostra para uma melhor comparação visual da inclinação das duas curvas.

As curvas apresentaram boa linearidade para CH₃Hg⁺, com r^2 de 0,9982 e 0,9934 para as curvas preparadas no solvente e no extrato, respectivamente. Para Hg²⁺, os valores de r^2 foram de 0,9946 e 0,9970 para as curvas preparadas no solvente e no extrato, respectivamente.

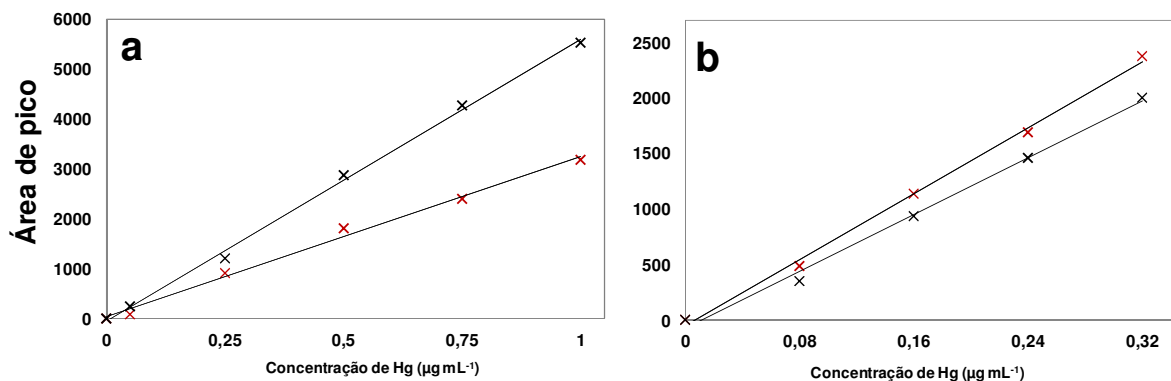


Figura 18. Curvas analíticas (x) preparada no solvente e (x) no extrato para as espécies (a) CH_3Hg^+ e (b) Hg^{2+} .

Pode-se perceber que a inclinação da curva no extrato é menor para CH_3Hg^+ , quando comparada com a curva no solvente. Já a inclinação da curva no extrato é maior para Hg^{2+} . Para quantificar o efeito de matriz, foi utilizada a equação (7), onde Hg^{2+} apresentou um enriquecimento de sinal (-16,6%). Segundo Economou *et al.*,¹⁰⁶ um enriquecimento dessa ordem de grandeza é considerado um baixo efeito de matriz. No entanto, CH_3Hg^+ apresentou uma supressão de sinal de 43%, o que é considerado um efeito de matriz médio.

É importante salientar que não existe discussão na literatura a respeito do efeito de matriz para a determinação de espécies de Hg em amostras de peixe por GC-MS. Entretanto, Zachariadis *et al.*,⁹⁴ desenvolveram um método para determinação de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em urina, saliva e soro sanguíneo utilizando SPME em *head space* e determinação por GC-MS. Os autores observaram uma melhor sensibilidade na curva analítica preparada na urina com relação à curva preparada na matriz de soro sanguíneo. Este efeito foi atribuído à presença das proteínas do sangue, as quais formam complexos com mercúrio. Além disso, os autores relatam que os picos cromatográficos de CH_3Hg^+ foram menores do que os de Hg^{2+} . Similarmente, a mesma perda de sensibilidade para CH_3Hg^+ com a curva preparada no extrato da matriz foi observada neste trabalho. Por isso, a fim de minimizar os efeitos de matriz e considerando a existência de um efeito de matriz médio para CH_3Hg^+ , as quantificações foram feitas através de curvas preparadas no extrato da matriz nos

⁹⁴ Zachariadis, G. A.; Kapsimali, D. C.; *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3884-3893.

¹⁰⁶ Economou *et al.*; *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5856-5867.

estudos posteriores.

4.4.4 Estudo da exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foram avaliadas através da aplicação do método otimizado em materiais de referência certificados de fígado de peixe (DOLT-3) e músculo de peixe (DORM-2). Além disso, o método também foi aplicado para amostras de peixe do tipo cação anjo e dois tipos de atum (atum I e atum II). Para a quantificação, foi feita uma curva preparada no extrato da amostra de cação viola, após a aplicação da MSPD. A curva analítica, os CRMs e as amostras foram feitas em triplicata, com 3 injeções no equipamento de GC-MS para cada replicata. Na Tabela 9 estão mostrados os resultados observados para os CRMs e as amostras.

Tabela 9. Valores observados e certificados pelos CRMs e os valores referentes à aplicabilidade do método (resultados em $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ desvio padrão, $n = 3$).

Amostra	Valor observado ^a CH_3Hg^+	Valor observado ^a Hg^{2+}	Soma ^b	Valor certificado ^c CH_3Hg^+	Valor certificado ^c Hg^{2+}	Total
DOLT-3	$1,57 \pm 0,15$	$1,76 \pm 0,15$	$3,33 \pm 0,21$	$1,59 \pm 0,12$	$1,78 \pm 0,18$	$3,37 \pm 0,14^d$
DORM-2	$3,93 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,03$	$4,32 \pm 0,09$	$4,47 \pm 0,32$	$0,17 \pm 0,41$	$4,64 \pm 0,26^d$
Cação anjo	$0,37 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,04$	-	-	$0,47 \pm 0,05^e$
Cação viola	$0,52 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,02$	-	-	$0,63 \pm 0,03^e$
Atum I	$0,83 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,04$	$1,17 \pm 0,06$	-	-	$1,09 \pm 0,08^e$
Atum II	$0,25 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,09$	-	-	$0,47 \pm 0,05^e$

^aQuantificação por GC-MS após a extração por MSPD.

^bConcentração correspondente à soma das espécies quantificadas por GC-MS após extração por MSPD.

^cConcentração informada pelo CRM.

^dConcentração total de mercúrio informada pelos CRMs DOLT-3 e DORM-2.

^eConcentração total de mercúrio por CVG-ICP-MS para as amostras.

A aplicação do método de extração por MSPD e quantificação por GC-MS nos CRMs apresentaram boa concordância com os valores certificados, com RSDs inferiores a 9,5%, mostrando que o método apresentou exatidão e precisão satisfatórias. Além disso, com a quantificação utilizando uma curva preparada no

extrato de cação viola, foi possível comprovar que a quantificação em amostras de peixe pode ser feita utilizando qualquer tipo de peixe, independente da composição da matriz, desde que seja feita através de uma curva preparada no extrato da matriz.

A soma da concentração das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} determinadas por GC-MS após extração por MSPD apresentou boa concordância com os valores de concentração total de mercúrio determinados por CVG-ICP-MS após digestão por MAD. Além disso, considerando a variabilidade das medidas, os teores de mercúrio total estiveram dentro do intervalo permitido pela legislação (entre 0,5 e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$).³³

4.4.5 Estudo da robustez

A robustez foi avaliada durante a etapa de otimização da extração por MSPD, onde o tempo de extração/agitação foi avaliado de 1 a 15 min. Os resultados mostraram que a recuperação das duas espécies não foi influenciada pelo tempo de extração/agitação, ou seja, a extração das espécies de mercúrio não é dependente do tempo de extração no intervalo de tempo estudado.

³³ MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 08 de 29 de abril de 2010.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados ao longo deste trabalho, pode-se concluir que o método mostrou-se adequado para determinação de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em tecido de peixe. O procedimento de extração mostrou-se bastante rápido e simples quando comparado aos demais métodos de extração descritos na literatura, uma vez que estes utilizam longos tempos de extração ou auxílio de ultrassom ou radiação micro-ondas. Além disso, a modificação feita na MSPD tradicional contribuiu para reduzir as etapas do método, pois a substituição da etapa de empacotamento e eluição pela transferência da mistura para tubos de centrífuga, proporcionou maior rapidez e simplicidade para o método, eliminando problemas da variabilidade nas extrações observada no método tradicional.

Através da aplicação do método, foi possível identificar e quantificar CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em um material de referência certificado de fígado de peixe (DOLT-3) e músculo de peixe (DORM-2) apresentando boa concordância e precisão satisfatórias (RSDs menores que 9,5%). Foi verificado um efeito de matriz para a espécie CH_3Hg^+ ao comparar curvas analíticas preparadas no solvente com curvas preparadas no extrato da MSPD, o qual foi corrigido através da quantificação com uma curva preparada no extrato de amostras de cação viola. Além disso, também foi possível quantificar CH_3Hg^+ e Hg^{2+} nos peixes do tipo atum, cação anjo e cação viola, obtendo uma boa concordância na comparação entre a soma das concentrações das espécies obtidas pelo método proposto com a concentração total de mercúrio obtida pela determinação por CV-ICP-MS. Os limites de detecção do método foram de 0,06 e 0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente, e os limites de quantificação foram de 0,198 e 0,396 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} , respectivamente.

Dessa forma, este trabalho serviu para contribuir com os métodos de extração das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em tecido de peixe de forma satisfatória e com caráter inovador, apresentando vantagens com relação à rapidez, simplicidade e custo relativo do método, mostrando ser adequado para ser utilizado na pesquisa e na rotina para o monitoramento das espécies CH_3Hg^+ e Hg^{2+} em peixes.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cornelis, R.; Crews, H.; Caruso, J.; Heumann, K. G. *Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine & occupational health*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, 2005, 768 p.
2. Craig, P. J. *Organometallic compounds in the environment*. John Wiley & Sons. Chichester, 2003, 398 p.
3. Ebdon, L.; Pitts, L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F. X.; Quevauviller, P. *Trace elements speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2001, 391 p.
4. Reyes, L. H.; Mizanur Rahman, G. M.; Fahrenholz, T.; Skip Kingston, H. M. Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.
5. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K. *Handbook of elemental speciation: techniques and methodology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 2003, 657 p.
6. Mester, Z.; Sturgeon, R. *Sample preparation for trace element analysis*. Elsevier B. V. Amsterdam, 2003, 1286 p.
7. Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Primel, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 82-89.
8. Barker, S. A. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.

9. Criado, M. R.; Fernández, D. H.; Pereiro, I. R.; Torrijos, R. C. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of polychlorinated biphenyls in fat by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 187-194.
10. Piñeiro, A. M.; Vázquez, E. P.; Herbello, P. H.; Barrera, P. B.; Piñeiro, J. M.; Rodríguez, E. A.; Lorenzo, S. M.; Mahía, P. L.; Rodríguez, D. P. Matrix solid-phase dispersion as a sample pretreatment for the speciation of arsenic in seafood products. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9272-9278.
11. Piñeiro, J. M.; Rodríguez, E. A.; Mahia, P. L.; Guilorenzo, S. M.; Rodríguez, D. P.; Hortas, V. R.; Framil, M. M.; Piñeiro, A. M. Matrix solid-phase dispersion of organic compounds and its feasibility for extracting inorganic and organometallic compounds. *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 110-116.
12. Batista, B. L.; Rodrigues, J. L.; de Souza, S. S.; Souza, V. C. O.; Barbosa, F. Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. *Food Chem.* 126 (2011) 2000-2004.
13. Chang, L. F.; Jiang, S. J.; Sahayam, A. C. Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 143-148.
14. Nevado, J. J. B.; Doimeadios, R. C. R. M.; Krupp, E. M.; Bernardo, F. J. G.; Fariñas, N. R.; Moreno, M. J.; Wallace, D.; Roper, M. J. P. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4545-4551.
15. Cai, Y.; Monsalud, S.; Jaffé, R.; Jones, R. D. Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate. Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147-155.

16. Rodil, R.; Carro, A. M.; Lorenzo, R. A.; Abuín, M.; Cela, R. Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313-323.
17. Cai, Y.; Monsalud, S.; Furton, K. G. Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia* 52 (2000) 82-86.
18. Iwasaki, Y.; Saito, Y.; Nakano, Y.; Mochizuki, K.; Sakata, O.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3309-3317.
19. Cai, Y.; Bayona, J. M. Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113-122.
20. Chen, S. S.; Chou, S. S.; Hwang, D. F. Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu^{2+} addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 209-215.
21. Mishra, S.; Tripathi, R. M.; Bhalke, S.; Shukla, V. K.; Puranik, V. D. Determination of methylmercury and mercury(II) in a marine ecosystem using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 192-198.
22. Miranda, C.; Yáñez, J.; Contreras, D.; Garcia, R.; Jardim, W. F.; Mansilla, H. D. Photocatalytic removal of methylmercury assisted by UV-A irradiation. *Appl. Catal. B: Environ* 90 (2009) 115-119.

23. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury, 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf> acessado em: 03 de julho de 2012.
24. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority List of Hazardous Substance. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html> acessado em: 02 de julho de 2012.
25. Lubick, N. Funding struggle for mercury monitoring. *Nature* 459 (2009) 620-621.
26. Takizawa, Y.; Osame, M. *Understanding of Minamata disease – methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan*. Japan Public Health Association. Tóquio, 2001, 154 p.
27. Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.
28. Harris, H. H.; Pickering, I. J.; George, G. N. The chemical form of mercury in fish. *Science* 301 (2003) 1203.
29. Lee, R.; Middleton, D.; Caldwell, K.; Dearwent, S.; Jones, S.; Lewis, B.; Monteilh, C.; Mortensen, M. E.; Nickle, R.; Orloff, K.; Reger, M.; Risher, J.; Rogers, H. S.; Watters, M. A review of events that expose children to elemental mercury in the United States. *Ciênc. Saúde Coletiva* 15 (2010) 585-598.
30. Compeau, G. C.; Bartha, R. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 498-502.
31. Gllmour, C. C.; Henry, E. A.; Mitchell, R. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2281-2287.
32. Lemes, M.; Wang, F. Methylmercury speciation in fish muscle by HPLC-ICP-MS following enzymatic hydrolysis. *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 663-668.

33. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 08 de 29 de abril de 2010. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=imprimirAtoTematica> acessado em: 05 de julho de 2012.
34. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.-G.; Muntau, H.; Leeuweng, H. P. V.; Łobinski, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453–1470.
35. Leermakers, M.; Lansens, P.; Baeyens, W. Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions. *Fresenius J. Anal. Chem.* 336 (1990) 655-662.
36. Lansens, P.; Meuleman, C.; Baeyens, W. Long-term stability of methylmercury standard solutions in distilled, deionized water. *Anal. Chim. Acta* 229 (1990) 281-285.
37. Stoepler, M.; Matthes, W. Storage behaviour of inorganic mercury and methylmercury chloride in sea water. *Anal. Chim. Acta* 98 (1978) 389-392.
38. Tossell, J. A. Theoretical study of the photodecomposition of methyl Hg complexes. *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 3587-3591.
39. Yu, L. P.; Yan, X. P. Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 245-253.
40. Westöö, G. Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. Methylmercury Compounds in Fish, Identification and Determination *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2131-2137.
41. Serafimovski, I.; Karadjova, I.; Stafilov, T.; Cvetković, J. Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Microchem. J.* 89 (2008) 42-47.

42. Santoyo, M. M.; Figueroa, J. A. L.; Wrobel, K.; Wrobel, K. Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi³⁺ as internal standard. *Talanta* 79 (2009) 706-711.
43. Carbonell, G.; Bravo, J. C.; Fernández, C.; Tarazona, J. V. A New method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 210-213.
44. Carrasco, L.; Díez, S.; Bayona, J. M. Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction matrix effect evaluation. *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 2-6.
45. Castillo, Á.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; Roig-Navarro, A. F.; Alonso, J. I. G. Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues. *Anal. Chem.* 82 (2010) 2773–2783.
46. Liu, Q. Determination of mercury and methylmercury in seafood by ion chromatography using photo-induced chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometric detection. *Microchem. J.* 95 (2010) 255-258.
47. Pilz, C.; Antes, F. G.; Moreira, C. M.; Mello, P. A.; Duarte, F. A.; Pozebon, D.; Flores, E. M. M.; Dressler, V. L. Determination of Hg species in edible mushrooms using reversed phase-liquid chromatography-chemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Br. J. Anal. Chem.* 05 (2011) 228-233.
48. Hight, S. C.; Cheng, J. Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation. *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 160-172.

49. Ortiz, A. I. C.; Albarrán, Y. M.; Rica, C. C. Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1595-1601.
50. Rahman, G. M. M.; Kingston, H. M. S. Development of a microwave-assisted extraction method and isotopic validation of mercury species in soils and sediments. *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 183-191.
51. Davis, W. C.; Pol, S. S. V.; Schantz, M. M.; Long, S. E.; Day, R. D.; Christopher, S. J. An accurate and sensitive method for the determination of methylmercury in biological specimens using GC-ICP-MS with solid phase microextraction. *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1546-1551.
52. Nevado, J. J. B.; Doimeadios, R. C. R. M.; Bernardo, F. J. G.; Moreno, M. J. Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 21-28.
53. Qvarnström, J.; Frech, W. Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1486-1491.
54. Hintelmann, H.; Falter, R.; Ilgen, G.; Evans, R. D. Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH_3Hg^+) in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.
55. Tu, Q.; Qian, J.; Frech, W. Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1583-1588.
56. Houserova, P.; Kuban, V.; Spurny, P.; Habarta, P. Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of Moravian rivers. *Vet. Med.* 51 (2006) 101-110.

57. 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. *Anal. Chim. Acta* 631 (2009) 121-128.
58. Duarte, F. A.; Bizzi, C. A.; Antes, F. G.; Dressler, V. L.; Flores, É. M. M. Organic, inorganic and total mercury determination in fish by chemical vapor generation with collection on a gold gauze and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectroc. Acta Part B* 64 (2009) 513-519.
59. Hu, Y.-Y.; Zheng, P.; He, Y.-Z.; Sheng, G.-P. Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 188-193.
60. Teixeira, D. M.; Patão, R. F.; Coelho, A. V.; da Costa, C. T. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 22-28.
61. Rodrigues, S. A.; Caldas, S. S.; Kurz, M. H. S.; Cabrera, L. C.; Duarte, F. A.; Zanella, R.; Primel, E. G. Comparison of matrix solid-phase dispersion and modified QuEChERS methods for extraction of pesticide residues from onion. *Anal. Methods* 4 (2012) 1820.
62. Garcinuño, R. M.; Ramos, L.; Hernando, P. F.; Cámara, C. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 35-41.
63. Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Donoso, A.; Tadeo, J. L. Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 127-133.
64. Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. Liquid chromatography-electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 41-49.

65. Teixeira, D. M.; da Costa, C. T. Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of *Maclura pomifera*. *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 175-181.
66. Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353-361.
67. Kristenson, E.; Brinkman, U.; Ramos, L. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96-111.
68. Sebastià, N.; Soler, C.; Soriano, J. M.; Mañes, J. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2609-2612.
69. 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. *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 705-710.
70. Raab, A.; Genney, D. R.; Meharg, A. A.; Feldmann, J. Identification of arsenic species in sheep-wool extracts by different chromatographic methods. *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 684-692.
71. Wang, M.; Feng, W.; Shi, J.; Zhang, F.; Wang, B.; Zhu, M.; Li, B.; Zhao, Y.; Chai, Z. Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC–ICP-MS. *Talanta* 71 (2007) 2034-2039.
72. Krug, F. J. *Métodos de preparo de amostras*. F. J. Krug. Piracicaba, 2008, 340 p.
73. Perkin Elmer. The 30-Minute Guide to ICP-MS. Technical Note, 2004.
74. D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q.; Welz, B. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 1283-1340.

75. Dean, J. R. *Practical inductively coupled plasma spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, 2005, 184 p.
76. Chen, J.; Chen, H.; Jin, X. Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration. *Talanta* 77 (2009) 1381-1387.
77. Chen, H.; Chen, J.; Jin, X.; Wei, D. Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1282-1287.
78. Li, Y.; Hu, B. Sequential cloud point extraction for the speciation of mercury in seafood by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectroc. Acta Part B* 62 (2007) 1153-1160.
79. 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. *Microchem. J.* 103 (2012) 1-14.
80. Mao, Y.; Liu, G.; Meichel, G.; Cai, Y.; Jiang, G. Simultaneous speciation of monomethylmercury and monoethylmercury by aqueous phenylation and purge-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection. *Anal. Chem.* 80 (2008) 7163-7168.
81. Krystek, P.; Ritsema, R. Mercury speciation in thawed out and refrozen fish samples by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2004) 354-359.
82. Monperrus, M.; Doimeadios, R. C. R. M.; Scancar, J.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Simultaneous sample preparation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis of monomethylmercury and tributyltin in a certified oyster tissue. *Anal. Chem.* 75 (2003) 4095-4102.

83. Snell, J. P.; Quétel, C. R. SI-traceable certification of methylmercury amount content in a tuna material. *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 447-454.
84. Zabaljauregui, M.; Delgado, A.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O.; Diego, A.; Madariaga, J. M. Fast method for routine simultaneous analysis of methylmercury and butyltins in seafood. *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 78-85.
85. Clémens, S.; Monperrus, M.; Donard, O. F. X.; Amouroux, D.; Guérin, T. Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review. *Talanta* 89 (2012) 12-20.
86. Dressler, V. L.; Antes, F. G.; Moreira, C. M.; Pozebon, D.; Duarte, F. A. As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review. *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 149-162.
87. Yang, L.; Colombini, V.; Maxwell, P.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E. Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 135-142.
88. Park, J. S.; Lee, J. S.; Kim, G. B.; Cha, J. S.; Shin, S. K.; Kang, H. G.; Hong, E. J.; Chung, G. T.; Kim, Y. H. Mercury and methylmercury in freshwater fish and sediments in South Korea using newly adopted purge and trap GC-MS detection method. *Water Air Soil Pollut.* 207 (2009) 391-401.
89. Prieto, A.; Zuloaga, O.; Usobiaga, A.; Etxebarria, N.; Fernández, L. A.; Marcic, C.; de Diego, A. Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 130-138.
90. Díez, S.; Bayona, J. M. Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta* 77 (2008) 21-27.
91. McMaster, M. C. *GC-MS - A practical user's guide*. Jonh Wiley & Sons. Hoboken, 2008, 180 p.

92. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp. Campinas, 2006, 272 p.
93. Hippler, J.; Hoppe, H. W.; Mosel, F.; Rettenmeier, A. W.; Hirner, A. V. Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC–ICP-MS and GC–MS techniques. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2465-2470.
94. Zachariadis, G. A.; Kapsimali, D. C. Effect of sample matrix on sensitivity of mercury and methylmercury quantitation in human urine, saliva, and serum using GC-MS. *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3884-3893.
95. Abuín, M.; Carro, A. M.; Lorenzo, R. A. Experimental design of a microwave-assisted extraction–derivatization method for the analysis of methylmercury. *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 185-193.
96. Cai, Y.; Jaffé, R.; Jones, R. Ethylmercury in the soils and sediments of the Florida everglades. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 302-305.
97. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, Ltd. New York, 1978, 645 p.
98. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Cárita editora. Campinas, 2005, 325 p.
99. Schmidt, L., Avaliação do comportamento de espécies de mercúrio em peixes após diferentes métodos de cocção. PPGQ, UFSM, Santa Maria, 2011.
100. Khuri, A. I.; Cornell, J. A. *Response surface design and analyses*. Marcel Dekker Inc. New York, 1987, 405 p.
101. Anschau, A.; Aragão, V. C.; Porciuncula, B. D. A.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 2148-2156.

102. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.
103. INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf acessado em: 22 de julho de 2012.
104. Chui, Q. S. H.; Zucchini, R. R.; Lichtig, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso determinação de cádmio. *Quim. Nova* 24 (2001) 374-380.
105. SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Documento N^o 10684, 2010. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf acessado em: 17 de junho de 2012.
106. Economou, A.; Botitsi, H.; Antoniou, S.; Tsiipi, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5856-5867.
107. Green, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* 68 (1996) 305-309.