

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Adequação e verificação de procedimentos para  
determinação de mercúrio em amostras de fígado e rim de  
rato utilizando a técnica CV-GF AAS**

**André Eliziário dos Santos**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2014**

André Eliziário dos Santos

**Adequação e verificação de procedimentos para determinação de mercúrio em amostras de fígado e rim de rato utilizando a técnica CV-GF AAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Analítica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde

Co-orientador: Prof. Dr. Honório Coutinho de Jesus

**VITÓRIA**

**2014**

**Adequação e verificação de procedimentos para determinação  
de mercúrio em amostras de fígado e rim de rato utilizando a  
técnica CV-GF AAS**

**André Eliziário dos Santos**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre em Química.**

**Aprovado em 24/08/2014 por:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Cristina Barthus  
Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Araceli Veronica Flores Nardy Ribeiro  
Instituto Federal do Espírito Santo**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, Agosto de 2014**

À minha família, principalmente aos meus pais, que me proporcionaram apoio essencial para a realização do mestrado e sem os quais jamais consideraria possível chegar tão longe

## AGRADECIMENTOS

À Professora Geisamanda, pela oportunidade de orientação, que possibilitou a continuação do mestrado e pela sua compreensão, paciência e suporte, que possibilitaram a conclusão do mesmo.

Ao Professor Honério, pela oportunidade de orientação e suporte que possibilitaram o início do mestrado.

Ao Professor Dalton, por dar suporte a esse estudo com informações importantes e possibilitar a obtenção de novas amostras para a realização do estudo.

Às Professoras Araceli e Rosangela, por aceitarem participar da banca de avaliação.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudo, que possibilitou suporte financeiro para a realização do mestrado.

Ao biotério do Centro de Ciências Fisiológicas da UFES, por fornecer os animais necessários para a realização do estudo.

Ao Laboratório de Química Analítica da UFES (LQA), pelo empréstimo de instalações e reagentes para a realização das análises.

Ao LabPetro, pelo fornecimento de parte do argônio necessário para a execução das análises.

Ao Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA) do NCQP/UFES, pelo fornecimento de materiais e purificação do ácido nítrico usado nas análises.

Ao Laboratório de Química Orgânica da UFES, pelo empréstimo de vidrarias e reagentes como isopropanol e borohidreto de sódio, essenciais para a conclusão dos testes.

À CETAM, principalmente ao Carlos Henrique, por ceder uma alíquota do padrão de ouro, essencial para continuação da execução de testes.

À Amanda, Thalles e Fernando, companheiros de laboratório e agora amigos, que auxiliaram na realização das análises e da dissertação.

E a todos os outros colaboradores não nominados que auxiliaram no processo de execução do mestrado.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Ciclo ambiental do mercúrio .....	19
<b>FIGURA 2</b> – Captação e distribuição relativa das formas orgânicas de mercúrio.....	21
<b>FIGURA 3</b> – Micro-ondas modelo MD-4531, da CEM Corporation .....	33
<b>FIGURA 4</b> – Bloco digestor Marconi MA4005/ME com acessório para banho-maria	33
<b>FIGURA 5</b> – Gerador de vapor frio Analytik Jena HS55 .....	34
<b>FIGURA 6</b> – Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Zeiss AAS5 EA .....	34
<b>FIGURA 7</b> – Sistema de deionização Quimis Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis Q342 .....	36
<b>FIGURA 8</b> – Subdestilador de quartzo.....	37
<b>FIGURA 9</b> – Subdestilador Subboiling BSB-939-IR da Berghof.....	37
<b>FIGURA 10</b> – Rato de laboratório Wistar .....	38
<b>FIGURA 11</b> – Esquema de inserção da rede de ouro no forno de grafite.....	41
<b>FIGURA 12</b> – Comparação dos teores de recuperação com diferentes tempos de espera de abertura após digestão com micro-ondas .....	44
<b>FIGURA 13</b> – Comparação dos teores de recuperação com utilização de 0,250 e 0,500 g de amostra na digestão com micro-ondas.....	45
<b>FIGURA 14</b> – Comparação entre os teores de recuperação por digestão em micro- ondas e bloco digestor .....	46
<b>FIGURA 15</b> – Comparação entre as curvas de adição de analito pré e pós digestão e curva de calibração .....	47
<b>FIGURA 16</b> – Comparação do teor de recuperação entre o recobrimento do forno com irídio e recobrimento do forno com ouro .....	48

<b>FIGURA 17</b> – Comparativo dos teores de recuperação dos testes sem e com a adição de simeticona.....	49
<b>FIGURA 18</b> – Comparativo dos teores de recuperação dos testes sem e com a adição de isopropanol .....	49
<b>FIGURA 19</b> – Comparativo dos teores de recuperação médios dos testes sem e com a adição de isopropanol + simeticona .....	50
<b>FIGURA 20</b> – Valores de absorbância obtidos para os diferentes métodos de amalgamação com ouro.....	51
<b>FIGURA 21</b> – Otimização das temperaturas de amalgamação e atomização .....	52
<b>FIGURA 22</b> – Otimização da concentração de borohidreto .....	53
<b>FIGURA 23</b> – Otimização do volume de ácido nítrico usado em digestão.....	54
<b>FIGURA 24</b> – Resultados do teste de adição de dicromato e isopropanol .....	55
<b>FIGURA 25</b> – Comparação entre as curvas de adição de analito e curva de calibração .....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Características físico-químicas gerais do mercúrio.....	18
<b>TABELA 2</b> – Métodos frequentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção .....	22
<b>TABELA 3</b> – Critérios de aceitação para a exatidão.....	31
<b>TABELA 4</b> – Parâmetros do espectrômetro de absorção atômica .....	35
<b>TABELA 5</b> – Programa de temperatura para recobrimento do forno de grafite com ouro <sup>a</sup> ou irídio <sup>b</sup> .....	40
<b>TABELA 6</b> – Parâmetros utilizados no gerador de hidretos .....	42
<b>TABELA 7</b> – Programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de Hg.....	42
<b>TABELA 8</b> – Resultados dos testes de recuperação e valores de recuperação médio .....	56
<b>TABELA 9</b> – Concentrações de mercúrio nas amostras de fígado de rato .....	58
<b>TABELA 10</b> – Concentrações de mercúrio nas amostras de rim de rato .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG - Cromatografia gasosa (*gas chromatography*)

CV-AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (*cold vapor generation atomic absorption spectrometry*)

CV-AFS – Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (*cold vapor generation fluorescence absorption spectrometry*)

CV-GF AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite com geração de vapor frio (*cold vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

ET AAS - Espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico (*electrothermic atomic absorption spectrometry*)

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*graphite furnace atomic absorption spectrometry*)

F AAS – Espectrometria de absorção atômica em chama (*flame atomic absorption spectrometry*)

HCL – Lâmpada de cátodo oco (*hollow cathode lamp*)

ICP OES – Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (*inductive coupled plasma optical emission spectrometry*)

ICP-MS - Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (*inductive coupled plasma mass spectrometry*)

INAA - Análise por ativação com nêutrons instrumental (*Instrumental neutron activation analysis*)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

PPB – Partes por bilhão

PPM – Partes por milhão

RNAA - Análise por ativação com nêutrons radioquímica (*radiochemical neutron activation analysis*)

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

SPME – Microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

Abs - Absorbância

°C – Graus Celsius

g - Grama

h – Hora

L - Litro

µg – Micrograma

µL - microlitro

mL - Mililitro

min – Minuto

ng - Nanograma

nM – Nanomolar (concentração)

kg - quilograma

s - Segundo

## RESUMO

O mercúrio é um elemento que ainda necessita constante monitoramento devido sua capacidade tóxica em concentrações em níveis de traço com possibilidade de contaminação e exposição por uma variedade de formas e compostos presentes no ambiente.

Esse estudo possuiu como objetivo a obtenção de um procedimento simplificado e eficiente para a determinação de teores de mercúrio em tecidos de rato Wistar a partir da otimização de um método de determinação, utilizando um sistema de geração de vapor frio acoplado a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (CV-GF AAS). Houve a comparação entre métodos de digestão, comparação de métodos de amalgamação, otimização, verificação do método a partir da obtenção de figuras de mérito e análise de amostras de fígado e rins de ratos tratados com exposição crônica ao mercúrio. Os resultados comprovaram que o método de digestão em bloco digestor, a utilização de amalgamação por recobrimento de tubo em ouro em conjunto com rede de ouro e adição pré-análise à solução de simeticona e isopropanol apresentou os melhores resultados, com teores de recuperação médios entre 92 e 114 %, viabilizando a utilização do procedimento proposto.

Palavras-chave: mercúrio, pré-concentração, ouro, rato, CV, GF AAS.

## **ABSTRACT**

Mercury is an element that still needs constant monitoring because it is highly toxic at trace-level concentrations, with possibility exposure and contamination by a variety of forms present in the environment. Thus, the aim of this work was adapt and verify a simple and efficient procedure for mercury determination in Wistar rat tissues using cold vapor generation, pre-concentration in graphite furnace and analysis by atomic absorption spectrometry (CV-GF AAS). They were made comparison of amalgamation methods, procedure optimization, verification of merit figures and analysis of liver and kidneys of chronically treated rat. The best results were obtained using the hot block digestion method as sample pre-treatment and gold coated tube combined with and net of gold for amalgamation. It was necessary to use dichromate, isopropanol and simeticone pre-analysis. Procedure accuracy was verified through recovery tests at five concentration (between 92 and 114 %), enabling the use of the proposed procedure.

Keywords: mercury, gold, preconcentration, rat, CV, GF AAS.

## SUMÁRIO

1.	MOTIVAÇÃO DO ESTUDO .....	15
2.	INTRODUÇÃO .....	16
2.1.	MERCÚRIO .....	16
2.1.1.	Aspectos históricos .....	16
2.1.2.	Características químicas .....	17
2.1.3.	Aspectos ambientais do mercúrio .....	18
2.1.4.	Características toxicológicas .....	19
2.2.	TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE Hg .....	22
2.2.1.	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite .....	23
2.2.2.	Técnica de geração de vapor frio de mercúrio (CV-AAS) .....	24
2.2.3.	Recobrimento do forno de grafite .....	24
2.3.	PREPARO DE AMOSTRAS .....	25
2.4.	OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO .....	27
2.5.	VERIFICAÇÃO DO PROCEDIMENTO .....	28
3.	OBJETIVOS .....	32
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
4.	METODOLOGIA .....	33
4.1.	EQUIPAMENTOS .....	33
4.2.	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	35
4.3.	LIMPEZA DOS MATERIAIS UTILIZADOS .....	37
4.4.	TRATAMENTO DOS ANIMAIS UTILIZADOS .....	38
4.5.	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	39
4.5.1.	Digestão das amostras em micro-ondas .....	39
4.5.2.	Digestão das amostras em bloco digestor .....	40
4.6.	ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA .....	40
4.6.1.	Sistemas de pré-concentração .....	40
4.6.2.	Análise por CV-GF AAS .....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1.	CHECAGEM DOS PARÂMETROS PREVIAMENTE OTIMIZADOS .....	43
5.2.	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	44

5.3. PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO E USO DE REAGENTES	
AUXILIARES .....	47
5.4. OTIMIZAÇÃO UTILIZANDO AMALGAMAÇÃO EM FORNO COM	
RECOBRIMENTO DE OURO E REDE DE OURO.....	51
5.4.1. Temperaturas de amalgamação e atomização .....	51
5.4.2. Concentração da solução redutora – borohidreto de sódio.....	52
5.4.3. Volume de ácido nítrico utilizado no processo de digestão.....	53
5.4.4. Adição de reagentes auxiliares .....	54
5.5. VERIFICAÇÃO DO MÉTODO .....	55
5.5.1. Limites de detecção e quantificação .....	55
5.5.2. Ensaios de recuperação e teste de precisão intermediária.....	56
5.6. DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE FÍGADO E RIM DE RATO.....	57
6. CONCLUSÃO .....	60
7. BIBLIOGRAFIA.....	61

|

## 1. MOTIVAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi motivado pelo fato do mercúrio ser um elemento que ainda necessita constante monitoramento devido a sua elevada capacidade tóxica em concentrações em níveis de traço<sup>1</sup>. O principal método de contaminação é através do processo de bioacumulação<sup>2</sup>, além de exposição ocupacional<sup>3</sup> e aplicações médicas<sup>4</sup>, sendo o principal meio de contaminação ambiental proveniente do descarte inadequado de resíduos industriais e domésticos em ambientes aquáticos<sup>3</sup>.

Vários métodos e técnicas analíticas são reportadas em literatura para a determinação de mercúrio em amostras diversas, sendo destacadas as técnicas de geração de vapor frio de mercúrio (CV)<sup>5</sup>, que podem ser combinadas a diversos métodos espectrométricos (F AAS<sup>6</sup>, GF AAS<sup>7</sup>, ICP OES<sup>8</sup> e ICP-MS<sup>9</sup>).

Estudos estão sendo realizados no Laboratório de Química Analítica da UFES, que já analisou tecidos de ratos para Cd e Pb<sup>10</sup>, em parceria com o Laboratório de Eletromecânica Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da UFES, que forneceu os tecidos e desenvolveu estudos sobre manifestações fisiológicas e sintomáticas nos ratos gerando uma correlação dose-efeito. Estudos semelhantes estão sendo realizados para Hg<sup>11</sup>, ocorrendo a necessidade de um procedimento verificado para a determinação desse elemento de maneira precisa e confiável em tecidos de rato, o qual carece de materiais de referência completamente compatíveis para a determinação de mercúrio.

## 2. INTRODUÇÃO

A definição de metais pesados apresenta imprecisão devido ao referencial que pode ser tomado<sup>12</sup>, o que pode incluir apenas metais de alta densidade, ou até mesmo alguns metaloides e ametais<sup>12, 13</sup>. Para o foco deste estudo será utilizada a definição toxicológica, ou seja, metais pesados são elementos utilizados em processos industriais e apresentam toxicidade em organismos vivos, tanto em seus processos aeróbios e anaeróbios, não apresentando a necessidade de serem densos ou terem alto caráter metálico. Os principais elementos representantes seguindo esta diretriz são o arsênio, cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel, selênio, zinco, e o elemento que é o principal objeto de estudo desse projeto, o mercúrio<sup>13</sup>.

### 2.1. MERCÚRIO

#### 2.1.1. Aspectos Históricos

O mercúrio é usado de formas práticas variadas desde tempos remotos, sendo existentes registros de sua utilização desde a China Antiga, a cerca de 3000 anos, como componente de preparação de pigmentos de cor avermelhada. Existem registros onde o mercúrio foi encontrado em tumbas do Egito Antigo como preservante, e talvez como protetor de espíritos malignos. Teve inicialmente utilização médica na época das Grandes Navegações como auxiliar no tratamento da sífilis. A partir do início do século 20, o mercúrio teve uma série de usos, hoje considerados pouco ortodoxos, como em pós para escovação dentária, beneficiamento de tecidos e inalação direta do vapor de mercúrio para melhorar o bem-estar<sup>14</sup>.

O aumento significativo da produção de mercúrio ocorreu após a descoberta do fulminato mercúrico como um bom agente detonador para uma série de explosivos, e a exposição humana ao mercúrio aumentou substancialmente com a utilização de compostos orgânicos de mercúrio como agentes antifúngicos na agricultura a partir da década de 1910<sup>15</sup>, algo que foi abolido décadas depois após registros de envenenamento em massa tanto de seres humanos e espécies selvagens, destacando-se os casos de Minamata<sup>16</sup> e do Iraque<sup>17</sup>.

O mercúrio também possui utilização com finalidade farmacêutica, como o mercurocromo (dibromohidroxiomercurifluoresceína), que teve uma utilização considerável como antisséptico, tendo sido outra importante causa de intoxicação por mercúrio. O Timerosal (tiosalicilato de etilmercúrio), que foi utilizado no Brasil e conhecido por muitos como o antigo princípio ativo do Methiolate<sup>18</sup>, ainda é utilizado como conservante em alguns medicamentos e vacinas, mesmo com risco toxicológico potencial para infantes. Compostos de metilmercúrio e fenilmercúrio ainda possuem utilização limitada como agentes de preservação antibacteriana<sup>14</sup>.

Industrialmente, o mercúrio possui utilização variada, como componentes de barômetros, esfigmomanômetros, termômetros, na produção eletrolítica de cloro e soda cáustica (hidróxido de sódio) e interruptores elétricos de automóveis. O vapor de mercúrio é largamente utilizado em lâmpadas de arco de mercúrio e incandescentes<sup>14</sup>.

Uma característica importante do mercúrio, conhecida desde os tempos dos alquimistas e com ampla utilização é a capacidade do mercúrio formar amálgamas estáveis com outros metais, destacando principalmente a prata e o ouro, com posterior isolamento desses metais por simples aquecimento, características que são utilizadas mesmo em tempos atuais para mineração de ouro em sedimentos ribeirinhos da Amazônia<sup>19</sup> e para produção de amálgamas com prata utilizados em obturações dentárias<sup>20</sup>, mesmo com o risco de toxicidade<sup>14</sup>.

### **2.1.2. Características químicas**

O mercúrio é o único metal líquido em temperatura ambiente (25°C). Raramente é encontrado em forma isolada na natureza, sendo o minério cinabre (HgS) sua principal fonte de extração, do qual é isolado a partir de aquecimento e posterior condensação. É um metal pesado de coloração prateada, possui baixa condutividade térmica comparado a outros metais e razoável condutividade elétrica. Forma facilmente ligas com vários metais, como ouro, prata e estanho, sendo as ligas de mercúrio denominadas amálgamas<sup>21</sup>. A tabela 1 apresenta características físico-químicas gerais desse elemento.

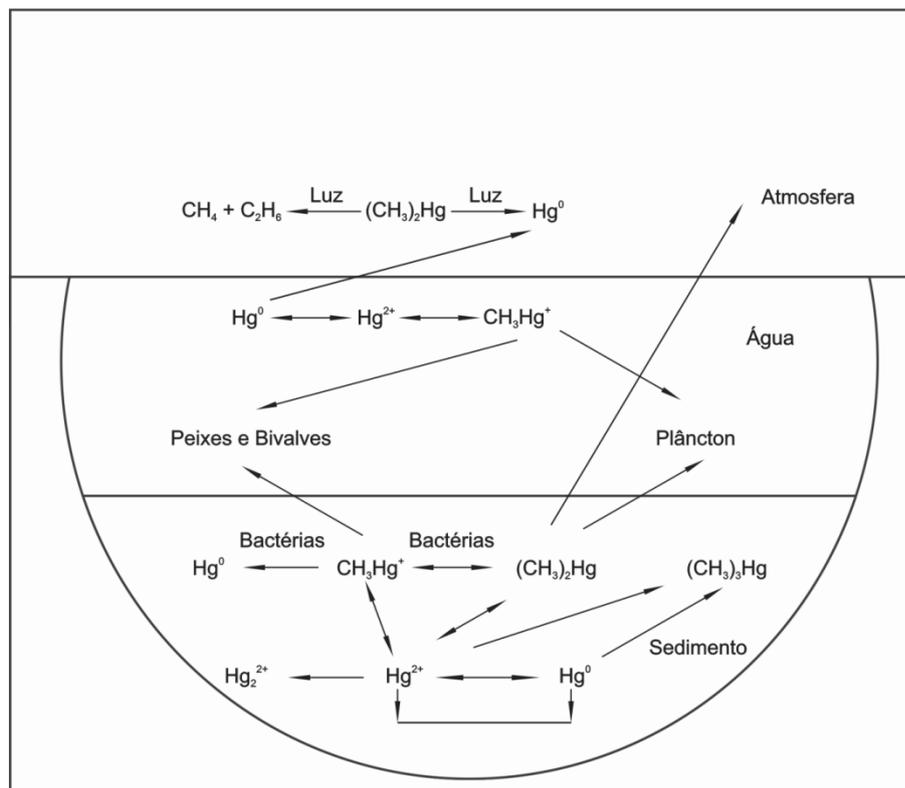
**Tabela 1.** Características físico-químicas gerais do mercúrio<sup>21</sup>.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Número atômico	80
Massa atômica	200,59
Ponto de fusão (°C)	-38,83
Ponto de ebulição (°C)	356,73
Ponto triplo (°C)	-38,8344
Densidade a 20 °C (g.l <sup>-1</sup> )	13,456

Os principais sais de mercúrio são o cloreto de mercúrico  $\text{HgCl}_2$  (conhecido como sublimato corrosivo – veneno de alta potência), cloreto mercurioso  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (conhecido como calomelano, ainda possui certo uso na área médica), fulminato mercúrico  $\text{Hg}(\text{ONC})_2$  (detonador utilizado amplamente em explosivos) e sulfeto mercúrico  $\text{HgS}$  (conhecido como vermelhão, pigmento de pintura de alta qualidade). Também são destacados os compostos orgânicos de mercúrio, sendo os principais o metilmercúrio  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (produzido através de diversos processos) e o etilmercúrio  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$  (metabólito ativo do Timerosal). O mercúrio possui sete isótopos naturais, em conjunto com outros 35 isótopos e isômeros artificiais conhecidos<sup>21</sup>.

### 2.1.3. Aspectos ambientais do mercúrio

Metais pesados, como o mercúrio, não possuem importância metabólica em organismos vivos, nos quais esse elemento causa alterações fisiológicas tóxicas, com destaque para o processo de metilação do mercúrio a compostos orgânicos, resultando na formação do metilmercúrio, composto de elevada estabilidade química e elevada solubilidade a compostos lipídicos, o qual se incorpora a cadeia alimentar nos níveis tróficos a partir dos organismos produtores, em algas, sendo transferidos de forma acumulada a níveis tróficos posteriores, a peixes carnívoros e conseqüentemente a seres humanos, através o processo de biomagnificação<sup>22, 23</sup>. A figura 1 representa uma síntese do ciclo ambiental do mercúrio e seu processo de biotransformação através de alguns níveis tróficos.



**Figura 1.** Ciclo do ambiental do mercúrio. Fonte: BISINOTI *et al. Química Nova*, 27(4), 2004, pp. 593-600. (adaptado)

#### 2.1.4. Características toxicológicas

O mercúrio em sua forma líquida (*quicksilver*) não apresenta toxicidade quando ingerido, visto a sua baixa absorção pelo trato gastrointestinal devido a formação de gotículas e não reagir com moléculas biologicamente importantes no trato gastrointestinal quando íntegro. Porém o Hg é extremamente perigoso em forma de vapor, pois é absorvido totalmente pelo trato respiratório e através da oxidação mediada pela catalase celular, predominantemente dos eritrócitos, o mercúrio Hg é oxidado para sua forma mercúrica ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Depois de algumas horas, a deposição do mercúrio inalado pela forma de vapor nos tecidos é semelhante a deposição proveniente dos sais mercúricos, com exceção uma importante diferença: o vapor de mercúrio, que apresenta carga elemental nula, atravessa membranas celulares com muito maior facilidade que o mercúrio bivalente, chegando em uma grande quantidade ao sistema nervoso central, principalmente ao cérebro, por isso

sendo mais marcantes os efeitos tóxicos no sistema nervoso central quando o mercúrio é absorvido por essa forma<sup>24,25</sup>.

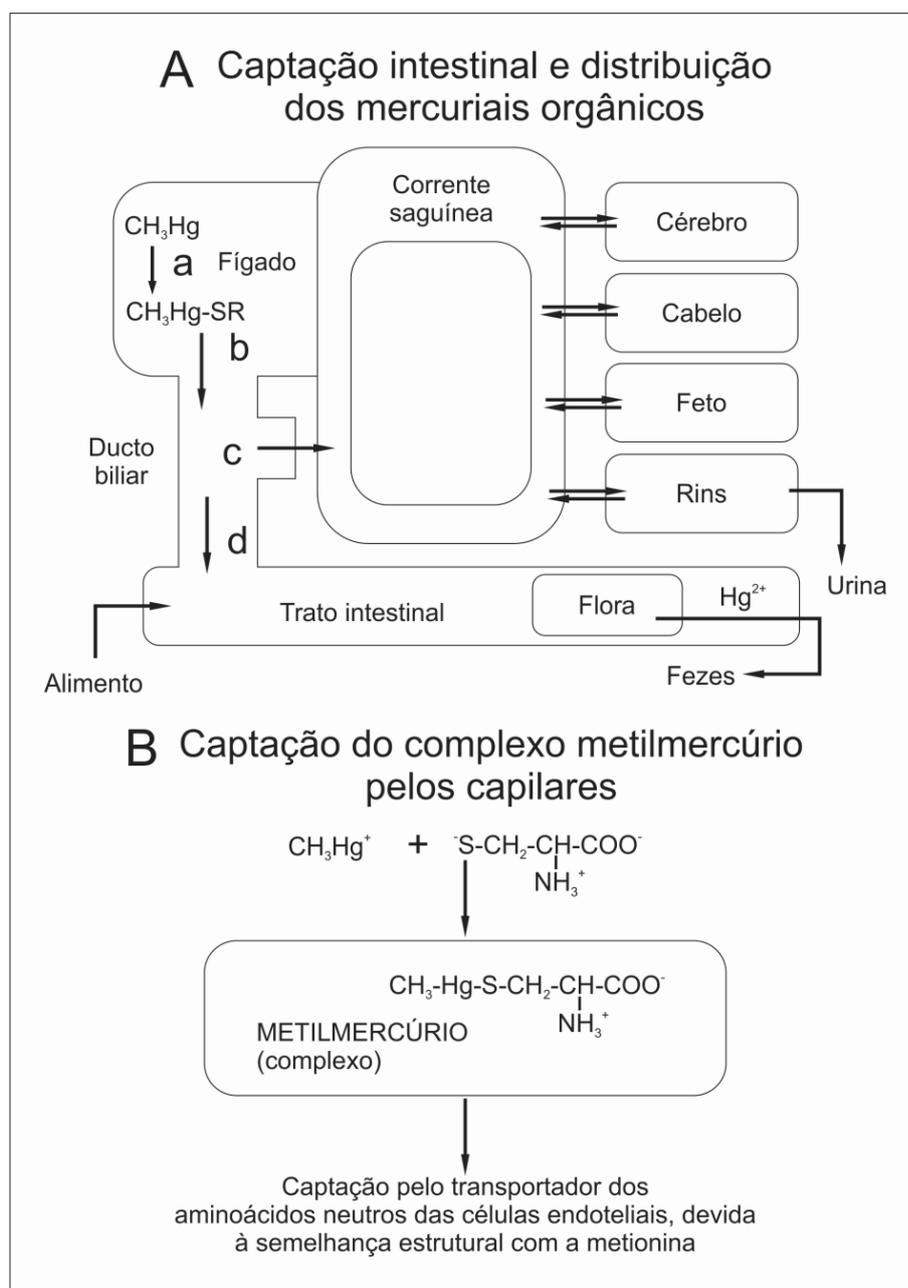
Na forma mercuriosa ( $\text{Hg-Hg}^{2+}$ ) apresenta baixa absorção devido a sua baixa solubilidade na forma de calomelano. No organismo o íon mercurioso pode se desproporcionar em Hg e  $\text{Hg}^{2+}$ , formando compostos com maior solubilidade<sup>24,25</sup>.

A forma mercúrica, quando ingerida na forma de sais solúveis como cloreto mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ) são altamente perigosos quando ingeridos, pois o íon  $\text{Hg}^{2+}$  não somente se liga ao trato gastrointestinal, mas também possui taxa de absorção consideravelmente alta (em torno de 10 a 15 %) e uma quantidade considerável do íon  $\text{Hg}^{2+}$  pode permanecer ligado à mucosa do trato alimentar e ao conteúdo intestinal. O  $\text{Hg}^{2+}$  possui distribuição acentuadamente heterogênea quando é absorvido através dessa forma, sendo a maior concentração encontrada nos rins, onde o metal é retido por mais tempo que nos outros tecidos. As concentrações do mercúrio inorgânico são semelhantes no sangue total e no plasma. O mercúrio inorgânico não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Devido a heterogeneidade de distribuição quantidades seus efeitos tóxicos são predominantemente renais e gastrointestinais<sup>24,26</sup>.

As formas orgânicas são consideradas as mais perigosas, pois os grupos alquila garantem alta absorção pelo trato gastrointestinal; mais de 90% do metilmercúrio ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, com baixas capacidades corrosivas. Os mercuriais orgânicos atravessam por difusão para o interior dos tecidos, destacando-se a difusão pela barreira hematoencefálica e placenta, causando mais efeitos neurológicos e teratogênicos que as formas inorgânicas. O metilmercúrio combina-se com a cisteína e forma uma estrutura semelhante à metionina; esse complexo é captado pelo transporte de aminoácidos neutros grandes deposita-se no endotélio capilar. Os sais mercuriais orgânicos possuem distribuição mais homogênea pelo organismo, quando comparado com os sais inorgânicos<sup>24,27</sup>.

O principal mecanismo de toxicidade do mercúrio é devido ao íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), a principal forma tóxica, por formar facilmente ligações com o enxofre. Quando o enxofre se encontra em grupos sulfidídrica, o íon mercúrico bivalente substitui os íons hidrogênios ligados ao enxofre formando mercaptidas  $\text{X-Hg-SR}$  e

$\text{Hg}(\text{SR})_2$  (figura 2), onde o X é um radical carbônico e R é uma proteína, interferindo na conformação de proteínas e principalmente causando a inativação de enzimas com grupos sulfidrílicos, causando alterações nas funções do organismo. O íon mercúrico também é capaz de realizar ligações com outros agrupamentos orgânicos importantes, como o fosforil, carboxila, amida e amina<sup>24,27</sup>.



**Figura 2.** Captação e distribuição relativa das formas orgânicas de mercúrio. Fonte: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, 2005, p. 1395.

## 2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DE Hg

Os métodos analíticos para determinação de mercúrio são selecionados de acordo com o tipo de amostra e o teor de mercúrio esperado. As características de cada matriz, baixos teores de Hg em algumas amostras e a própria natureza volátil desse elemento definem a melhor técnica a ser utilizada em cada ocasião<sup>28,29</sup>.

A Tabela 2 apresenta os métodos usados com maior frequência para determinação de mercúrio e seus limites de detecção (LD). Entretanto esses limites são dependentes do processo global, não se limitando a aparelhagem para obtenção de tais limites<sup>30</sup>.

**Tabela 2.** Métodos frequentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção.

<b>Método</b>		<b>LD</b>
Titulação	Método colorimétrico	0,01-0,1 µg/g
Espectrometria de Absorção Atômica	Forno de grafite (GF AAS)	1 ng/g
	Vapor frio (CV-AAS)	0,01-1 ng/g
Análise por Ativação com Nêutrons	Instrumental (INAA)	0,001-0,01 ng/g
	Radioquímica (RNAA)	1-10 ng/g
Cromatografia Gasosa	Detector de Captura Eletrônica	0,01-0,05 ng/g
	Detector de Emissão Atômica	~0,05 ng/g
	Espectrometria de Massas	0,1 ng/g
	CV-AAS / CV-AFS	0,01-0,05 ng/g
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	Detector de Ultravioleta	1 ng/mL
	CV-AAS	0,5 ng/mL
	CV-AFS	0,08 ng/mL
	Eletroquímico	0,1-1 ng/mL
Plasma Acoplado	Espectrometria de Massa (ICP-MS)	0,01 ng/mL
Indutivamente	Espectrometria de Emissão Atômica (ICP AES)	2 ng/mL
Outros métodos	Espectrometria Fotoacústica	0,05 ng
	Fluorescência de Raios X	5ng/g–1 µg/g
	Métodos Eletroquímicos	0,1-1 µg/g
	Analizador de Filme de Ouro	0,05 µg/g

Dentre os métodos atualmente utilizados para a determinação de Hg, o CV-AAS apresenta-se como uma das mais difundidas devido à facilidade de operação, baixo custo, boa sensibilidade e exatidão quando comparada a outras técnicas de

limites de detecção semelhantes. Estes limites podem ser reduzidos com a utilização de um sistema de amalgamação para pré-concentração do metal<sup>28,29</sup>.

### **2.2.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**

A técnica espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) utiliza-se de um aquecedor eletrotérmico para a atomização do analito (ET AAS), sendo nesse caso o forno de grafite. O forno de grafite apresenta um orifício superior para injeção da amostra, usualmente de 20 a 50  $\mu\text{L}$ , que apresenta fluxo constante de gás inerte, usualmente argônio, tanto internamente ao tubo, que possui a função de arrastar componentes após a purga (limpeza) do tubo e externamente, com a função de evitar desgaste do sistema e resfriamento rápido do tubo após o processo de aquecimento. Inicialmente ocorre o corte do fluxo de gás, para evitar o arraste da amostra e durante o período do corte do fluxo, ocorre rapidamente a injeção da amostra, e logo após inicia-se o procedimento de aquecimento, atomização, quantificação do elemento, purga para liberação do fluxo para limpeza do forno<sup>31</sup>.

Um destaque do forno de grafite é o seu processo de aquecimento, que pode ser controlado minuciosamente em etapas de modo a eliminar componentes da matriz e promover uma atomização eficiente da amostra através de programas de aquecimento, determinante para a sensibilidade da técnica. Um programa típico de aquecimento envolve uma etapa de evaporação do solvente (secagem), uma segunda etapa para a incineração de quaisquer materiais orgânicos voláteis presentes (pirólise), uma etapa rápida de atomização, uma etapa afinal de purga (limpeza)<sup>31</sup>.

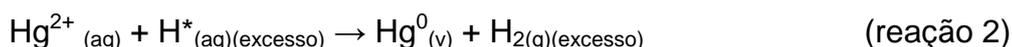
### 2.2.2. Técnica de geração de vapor frio de mercúrio (CV-AAS)

A sigla CV-GF AAS é utilizada para definir sistemas de geração de vapor frio de mercúrio (CV), acoplados com a técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), combinados com o recobrimento prévio do forno de grafite com um modificador permanente<sup>31</sup>.

Alguns elementos, como o mercúrio, são capazes de serem transformados em vapores voláteis quando sofrem reação com um forte agente redutor como o NaBH<sub>4</sub>, (reação 1)<sup>28, 29, 32, 33</sup>.



No caso do mercúrio ocorre redução desse elemento para a sua forma elementar (Hg<sup>0</sup>) (reação 2)<sup>28-30,33</sup>.



O vapor frio formado (Hg<sup>0</sup><sub>(v)</sub>) é carregado para o compartimento de análise através do fluxo de gás inerte (argônio). No caso do mercúrio isso se torna particularmente vantajoso, pois a geração prévia de vapor frio elimina interferentes provenientes das amostras, algo crítico no caso do mercúrio devido ao seu baixo ponto de ebulição, 356,73 °C, o que dificultaria a separação do mercúrio da matriz por pirólise em uma solução<sup>21,31</sup>.

### 2.2.3. Recobrimento do forno de grafite

O recobrimento do forno de grafite consiste na impregnação da superfície do forno de grafite com um modificador químico permanente, geralmente um metal de alta estabilidade química, podendo ser utilizados irídio<sup>34,35</sup>, platina<sup>36</sup>, ródio<sup>37</sup> e ouro<sup>38, 39</sup>. Esse recobrimento pode apresentar duas funções.

O metal impregnado na superfície do tubo pode ser utilizado para diminuir o desgaste acelerado do forno de grafite, ao evitar a formação de carbetos ou o ataque por ácidos da superfície do forno, devido à elevada estabilidade da ligação do metal de recobrimento com o carbono do grafite, aumentando a longevidade do forno.

A segunda função do recobrimento, a qual se destaca por ser particularmente importante no caso da utilização da técnica de geração de vapor frio de mercúrio (CV-AAS) é o fato do recobrimento promover pré-concentração do mercúrio na superfície do forno através de amalgamação, resultando em liberação de quantidades maiores de mercúrio durante a etapa de atomização, aumentando a sensibilidade geral do processo. A elevada estabilidade do metal de recobrimento também diminui a necessidade de repetição do processo, podendo resistir até 300 ciclos de aquecimento/resfriamento sem necessidade de um novo processo de recobrimento, desde que a temperatura máxima do programa de atomização não ultrapasse 2400 °C no caso do irídio<sup>34,35</sup> ou 1100 °C, no caso do recobrimento com ouro<sup>38,39</sup>.

### 2.3. PREPARO DE AMOSTRAS

Qualquer que seja a técnica analítica utilizada, um preparo eficiente da amostra é essencial para a obtenção dos limites de quantificação e detecção oferecidos pela técnica e da determinação dos teores de analito com valores mais próximos possíveis da concentração real. O processo de preparo de amostras consiste nos procedimentos utilizados em amostras para conservação, liberação de analito de componentes de matriz e análise de modo a obter a maior quantidade de analito em forma disponível para determinação, em conjunto com a minimização de perdas provenientes do processo de conservação e manipulação das amostras<sup>40</sup>.

Problemas relacionados à perda de analito em processos de preparação são frequentes e críticos no caso em determinações de mercúrio, pois dada a elevada volatilidade desse elemento, processos de preparo de amostras, destacando-se a etapa de extração de analito, quando não executados adequadamente resultam em perdas elevadas<sup>40</sup>.

Existem processos de preparo de amostras que geram resultados eficientes para mercúrio, sendo destacados os processos de digestão em micro-ondas, bloco digestor e microextração em fase sólida<sup>40</sup>.

O processo de digestão em bloco digestor consiste na reação de uma alíquota da amostra com soluções ácidas concentradas, destacando-se ácidos

clorídrico<sup>41</sup> e nítrico<sup>42</sup>, misturas de ácidos com a inclusão do ácido perclórico<sup>43</sup> e sulfúrico<sup>44</sup> ou digestão em meio alcalino<sup>45</sup>, com posterior aquecimento em recipientes semiabertos a temperaturas moderadas, em torno de 70 - 95 °C<sup>45-48</sup> em bloco digestor. Esse processo pode ser utilizado em ampla variedade de amostras, de solos e biossólidos, exemplificado pelos trabalhos de Robins *et al.*<sup>42</sup>, Park *et al.*<sup>46</sup>, e Hylander *et al.*<sup>44</sup> e tecidos orgânicos animais, como observado nos trabalhos de Voegborlo *et al.*<sup>41</sup>, Ortiz *et al.*<sup>43</sup>, Mailman *et al.*<sup>45</sup>, Odžak *et al.*<sup>47</sup>, e Currey *et al.*<sup>48</sup>.

No processo de digestão em micro-ondas ocorre a adição de solução ácida concentrada a uma pequena alíquota da amostra, com posterior aquecimento por micro-ondas, utilizando-se sistemas fechados em alta pressão ou em caso de sistemas mais avançados, refluxo de oxigênio<sup>49</sup>. Preferencialmente utilizado em amostras com composição de difícil digestão, destacando-se amostras de solo, como nos trabalhos de Picoloto *et al.*<sup>49</sup>, Hellings *et al.*<sup>50</sup> e Murphy *et al.*<sup>51</sup>; amostras orgânicas vegetais, como observado em Hellings *et al.*<sup>50</sup> e Silva *et al.*<sup>52</sup> e animais, como destacado nos trabalhos de Augelli *et al.*<sup>53</sup>, Shah *et al.*<sup>54</sup> e Eperesi *et al.*<sup>55</sup>. Destaca-se também a presença de métodos padronizados para a análise de amostras de mercúrio em micro-ondas, com destaque para as variações do método USEPA 3050<sup>56</sup>, que são os métodos 3051<sup>57</sup> e 3052<sup>58</sup> que são particularmente otimizadas para amostras orgânicas.

O processo de microextração em fase sólida consiste na utilização de colunas extremamente finas recobertas com um filme de polímero, nas quais é realizada a passagem da solução contendo analito. O analito é retido na camada polimérica e é posteriormente transferido para o sistema de análise através de fluxo de líquido ou gás. Esse processo de extração comumente é utilizado em conjunto com técnicas de cromatografia gasosa com baixo teor de amostra disponível<sup>59</sup>.

A escolha por métodos de digestão das amostras utilizadas no estudo, com o uso de ácido nítrico puro em sistemas de bloco digestor e micro-ondas foi realizada devido a simplicidade desses métodos em conjunto com ampla utilização, presente em literatura, de processos de análise de amostras orgânicas contendo mercúrio utilizando esses métodos, com excelentes teores de recuperação, acima de 90%<sup>41-</sup>

## 2.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Para uma técnica possuir um bom desempenho é necessário que esta apresente os melhores valores de resposta possíveis, que são obtidos através de um processo experimental definido por otimização<sup>34,60</sup>.

A otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito das variáveis presentes em relação aos valores de resposta apresentados. Essa avaliação é feita a partir do planejamento de experimentos que realizem a observação do efeito dessas variáveis sobre o valor de resposta, que pode ser feita ao se observar o efeito de uma variável por vez, definido nesse caso como otimização univariada, ou os efeitos podem ser avaliados utilizando por vez um conjunto de variáveis simultaneamente, sendo denominada otimização multivariada<sup>60</sup>.

O planejamento por otimização univariada ocorre a partir da atribuição de uma faixa de valores para cada variável presente e observação dos valores de resposta apresentados resultando na observação do efeito de cada variável isoladamente em relação à resposta. O planejamento univariado destaca-se pela sua simplicidade de execução, entretanto esse modelo de planejamento não avalia qualquer efeito de interação entre as variáveis presentes e a possibilidade de realização de uma quantidade elevada de experimentos para um modelo de planejamento univariado com quantidade elevada de variáveis<sup>60</sup>.

A opção de planejamento multivariado utiliza a alteração simultânea de valores de um conjunto de variáveis com observação dos efeitos na resposta apresentada. Devido à alteração simultânea, esse modelo de planejamento possibilita a observação de possíveis efeitos de interação entre variáveis e a partir do conhecimento prévio da faixa de variação das variáveis apresentadas e montagem de modelos de planejamento fatorial, pode resultar em redução considerável da quantidade de experimentos. Entretanto alguns métodos de planejamento fatorial, como o planejamento  $2^k$ , não permitem estudar o efeito de valores quantitativos intermediários e o planejamento composto central, não é adequado em estudos com variáveis qualitativas, devido a impossibilidade de atribuição de valores intermediários a essas variáveis<sup>60</sup>.

Assim, no estudo apresentado houve a escolha de otimização univariada devido a utilização de muitas variáveis qualitativas, como presença ou não de dicromato, isopropanol e simeticona e, principalmente a variação de valores em uma faixa extensa de alguns fatores quantitativos a serem analisados, como o teor da concentração de borohidreto, temperaturas de amalgamação e atomização inviabilizam a utilização técnicas multivariadas de planejamento fatorial.

## 2.5. VERIFICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Uma vez definidos os parâmetros otimizados, deverá ser garantida a qualidade dos resultados apresentados, ou seja, se o método escolhido e otimizado apresenta confiabilidade nos resultados apresentados e a checagem desses valores é feita a partir da verificação de um conjunto de parâmetros através do processo definido por validação. Os parâmetros avaliados no processo de validação são seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez<sup>34,61,62</sup>.

A seletividade define a capacidade de determinação do analito mediante a ação de interferentes presentes na matriz, que podem aumentar ou diminuir o sinal referente ao analito. A seletividade pode ser determinada a partir da utilização de materiais de referência certificados, e quando na falta destes, a comparação de amostras com e sem a adição de analito, através de curvas de adição de analito<sup>34,61,62</sup>.

Para uma quantificação adequada do analito, além de uma boa seletividade, é necessário que a relação entre o sinal do equipamento e a concentração do analito apresente uma faixa linear dinâmica adequada. A linearidade, ou a medida da correlação entre a resposta média e a concentração do analito e feita a partir de padronização interna ou externa, formulada a partir de uma função linear definida pela equação 1<sup>34,61,62</sup>.

$$y = a + bx \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.)

x = concentração

a = interseção com o eixo y, quando x = 0

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade

Um método é mais sensível quando pequenas variações de concentração (x) resultam em grandes variações de resposta (y), determinado através da inclinação da reta ou *slope* (b)<sup>34,61,62</sup>.

A determinação da linearidade é feita a partir da realização de curvas de calibração, onde se realiza a regressão linear por método de mínimos quadrados da leitura de diferentes concentrações de padrão, onde recomenda-se ao menos 5 níveis de padrões diferentes, com o número de repetições mais próximo possível do efetuado nas rotinas experimentais. Uma vez construída a reta, é realizada a adequação da reta com a análise de resíduos e o teste de correlação linear (r), que indicam quão adequada é a reta obtida para utilização como modelo matemático<sup>34,61,62</sup>.

Também deverá ser definida a faixa de trabalho do método, ou seja, o intervalo de concentrações as quais o método pode ser aplicado. Sempre que possível, a faixa de trabalho escolhida a concentração esperada deverá se situar no meio da faixa de trabalho aplicada. Para garantia da adequação da faixa de trabalho, deverá ser determinado os teores de concentração mínimos nos quais o analito pode ser detectado, determinado pelo limite de detecção (LD) e a menor concentração na qual o analito pode ser quantificado adequadamente, determinado pelo limite de quantificação, sendo esses valores definidos pela equação 2<sup>34,61-63</sup>:

$$L = k \cdot s_{bl} / S \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

L = limite a ser mensurado

k = constante determinada a partir do nível de confiança a ser usado (por padrão usa-se k = 3 para o LD e k = 10 para o LQ para um intervalo de confiança de 90%)

$s_{bl}$  = desvio-padrão das leituras do branco

S = sensibilidade (definida pelo *slope*)

Para a aferição da eficiência do método é necessária a aferição da eficiência do método através de testes de tendência ou recuperação analítica, que pode ser definida pela equação 3<sup>34,61,62</sup>:

$$\text{tendência} = V_{\text{observado}} / V_{\text{esperado}} \cdot 100\% \quad (\text{equação 3})$$

Quando utilizados materiais de referência certificados (MRC), método que deverá ser utilizado preferencialmente, a tendência pode ser feita através do cálculo do erro relativo, z-score e erro normatizado<sup>34,61</sup>.

Na falta de um MRC completamente compatível, o que ocorre no estudo realizado, o cálculo da tendência poderá ser feito a partir de ensaios de recuperação, onde são utilizadas amostras fortificadas com uma concentração conhecida (*spike*) em baixo, médio e alto teor de mercúrio da faixa de utilização do método. Entretanto esse ensaio possui um problema: a forma do analito utilizada no *spike* pode não ser a mesma presente na amostra, o que pode ocasionar resultados otimistas, mas não reais. O teor de recuperação é calculado conforme a equação 6<sup>34, 61, 62</sup>:

$$\text{Recuperação}_{(\%)} = [ (C_1 - C_2) / C_3 ] \cdot 100 \quad (\text{equação 4})$$

Sendo:

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada

$C_3$  = concentração do analito adicionada à amostra fortificada

Para a finalização dos testes de validação são executados ensaios de precisão, que são representados pelos testes de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O resultado desses testes são expressos através do coeficiente de variação (CV), calculado conforme a equação 7<sup>34,61,62</sup>:

$$CV = \text{DPR} \cdot \text{DP} / \text{CMD} \cdot 100 \quad (\text{equação 5})$$

Sendo:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

Os critérios de aceitação para aprovação dos valores de precisão variam mediante o teor de analito presente na amostra, e estão apresentados na tabela 3<sup>34,64</sup>.

Tabela 3. **CrITÉRIOS de aceitação para a exatidão**<sup>34,64</sup>.

<b>Concentração</b>	<b>Recuperação média (%)</b>
100 %	98 – 102
10 %	98 – 102
1 %	97 – 103
0,1 %	95 – 105
100 ppm	90 – 107
10 ppm	80 – 110
100 ppb – 1ppm	80 – 110
10 ppb	75 – 120
1 ppb	70 – 125

O teste de repetitividade consiste na avaliação da variação da resposta do método quando utilizadas as mesmas condições experimentais, procedimento de medição, observador, instrumento sob mesmas condições, local e com repetições no menor espaço de tempo possível. Para a execução do teste de precisão intermediária, deverá ocorrer a mudança de alguns dos fatores de análise, como diferentes analistas, equipamentos ou diferentes tempos de análise. O teste de reprodutibilidade é executado a partir da variação de resultados de ensaios interlaboratoriais<sup>34,61,62</sup>.

### 3. OBJETIVOS

Este estudo possuiu como objetivo otimizar e verificar um procedimento para determinar teores de mercúrio em tecidos de ratos expostos de forma crônica a este elemento a partir da técnica de geração química de vapor frio de mercúrio acoplado a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (CV-GF AAS) utilizando digestão ácida em bloco digestor como preparo de amostra.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o preparo de amostras de fígado e rins de rato utilizando digestão ácida por aquecimento em bloco digestor ou em micro-ondas.

- Otimizar um procedimento para determinar teores de mercúrio em fígado e rins de rato utilizando a técnica de geração química de vapor frio de mercúrio acoplado a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (CV-GF AAS).

- Realizar a verificação do procedimento otimizado para determinar teores de mercúrio em fígado e rins de rato por CV-GF AAS utilizando a avaliação de figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação e ensaios de recuperação.

- Determinar o teor de mercúrio em amostras de fígado e rins de ratos controles e de ratos dopados com mercúrio.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. EQUIPAMENTOS

Para digestão em micro-ondas foi utilizado um aparelho modelo MD-4531, da CEM Corporation (Figura 3) e para a digestão em bloco digestor foi utilizado um aparelho Marconi MA4005/ME com acessório para aquecimento por banho-maria (Figura 4).



**Figura 3.** Micro-ondas modelo MD-4531, da CEM Corporation.



**Figura 4.** Bloco digestor Marconi MA4005/ME com acessório para banho-maria.

As análises dos teores de mercúrio foram realizadas utilizando um gerador de vapor frio Analytik Jena HS55 (Figura 5) acoplado, através de um capilar de politetrafluoretileno (PTFE) e uma ponteira de titânio, a um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Zeiss AAS5 EA (Figura 6) com correção de fundo por lâmpada de deutério.



**Figura 5.** Gerador de vapor frio Analytik Jena HS55. 1 - tubulação de saída de gases do reator do gerador.



**Figura 6.** Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Zeiss AAS5 EA. 1 – ponteira do auto-amostrador. 2- auto-amostrador.

O acoplamento consiste na retirada da ponteira do sistema do auto-amostrador (figura 6 – indicador 1) com a substituição pela ponteira de titânio que está conectada diretamente a saída de gases do reator do gerador de vapor frio (figura 5 – indicador 1). O controle da movimentação da ponteira realizado através do braço do sistema de auto-amostragem do forno de grafite (figura 6 – indicador 2) que possui o carrossel de auto-amostragem desativado durante a utilização do gerador de vapor frio.

Os parâmetros gerais usados no espectrômetro estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros do espectrômetro de absorção atômica.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Linha espectral (nm)	253,7
Fenda espectral (nm)	0,8
Tipo de lâmpada	HCL de Hg
Corrente da lâmpada (mA)	3,0
Tempo de integração (s)	4
Corrente da lâmpada D2-HCL (mA)	13,2
Ganho da lâmpada D2-HCL	Mínimo

#### 4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

A água utilizada nas diluições e preparo de soluções foi purificada por um sistema de deionização Quimis Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis Q342 (Figura 7).



**Figura 7.** Sistema de deionização Quimis Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis Q342.

O gás inerte utilizado para análise foi o Argônio ICP 5.0 da Tecnocryo. Para o preparo dos padrões de mercúrio foi usada a solução estoque padrão de mercúrio 1000 mg/L PAHG1000-0125 Qhemis High Purity (Brasil). O padrão de ouro usado no recobrimento do forno de grafite foi proveniente do padrão Gold Standard for ICP TraceCERT®, 1000 mg L<sup>-1</sup> Au em ácido clorídrico da Sigma-Aldrich (Estados Unidos). O irídio usado para o recobrimento dos tubos de grafite foi proveniente do padrão ICP-Standard Iridium 1000 mg L<sup>-1</sup> da Bernd Kraft GmbH (Alemanha). Foi utilizado uma rede de ouro de aproximadamente 4x1 cm (~0,2g) para realizar amalgamação. Para o preparo das soluções redutoras foram usados o borohidreto de sódio P.A.- ACS da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Brasil). O hidróxido de sódio P.A., dicromato de potássio P.A., solução de peróxido de hidrogênio P.A. e o isopropanol P.A. usados no processo de análise foram provenientes da Vetec (Brasil). O antiespumante utilizado foi proveniente de uma solução comercial de simeticona 75 mg mL<sup>-1</sup> do Laboratório Medley (Brasil). O ácido nítrico P.A. utilizado para a descontaminação, preparo de soluções e análise foi proveniente da Vetec (Brasil), sendo que nas alíquotas de ácido utilizadas para preparo das soluções padrões e para digestão de amostras o ácido foi inicialmente destilado em um destilador de quartzo (Figura 8). Posteriormente a purificação do ácido passou a ser realizada em um Subboiling Destillacid BSB-939-IR da Berghof (Figura 9).



**Figura 8.** Subdestilador de quartzo.



**Figura 9.** Subdestilador Subboiling BSB-939-IR da Berghof.

#### 4.3. LIMPEZA DOS MATERIAIS UTILIZADOS

Para limpeza e descontaminação, principalmente para eliminação de metais e material orgânico contaminante, das vidrarias e outros materiais (como béqueres, balões volumétricos, ponteiras, frascos de Teflon do forno de micro-ondas, frascos de polietileno, etc.), tais itens foram lavados previamente em água corrente,

detergente neutro e deixados por imersão em solução de  $\text{HNO}_3$  5 % (v / v) durante o período de 24 h. Posteriormente, foram enxaguados exaustivamente com água ultrapura<sup>10, 65</sup>.

#### 4.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com idade aproximada de três meses (250 e 300 g) (Figura 10). Esses animais foram fornecidos pelos biotérios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração, sob controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas<sup>66</sup>.



**Figura 10.** Rato de laboratório Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory\\_rat#mediaviewer/File:Wistar\\_rat.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Laboratory_rat#mediaviewer/File:Wistar_rat.jpg)

Os animais foram divididos em três grupos que foram tratados por 30 dias com injeções intramusculares: grupo controle, que foi tratado com solução salina-NaCl 0,9 %; grupo tratado com concentração reduzida de cloreto de mercúrio - 10 nM; e grupo tratado com concentração elevada de cloreto de mercúrio – 50 nM<sup>11</sup>.

Os ratos pertencentes ao grupo tratado com mercúrio receberam, no primeiro dia do tratamento, uma injeção intramuscular contendo quantidade suficiente de

solução de cloreto mercúrico  $4,86 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $\text{HgCl}_2$ ), dissolvido em solução salina, para atingir a concentração plasmática de 10 nM e 50 nM. Nos dias subsequentes, levando em consideração que a meia-vida do  $\text{HgCl}_2$  é 37 dias, os ratos receberam doses diárias de reforço ( $0,17 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) contendo somente a quantidade que eles excretariam em um dia, segundo protocolo experimental desenvolvido por Wiggers et al<sup>67</sup>.

Após o abate dos animais, preferencialmente foram escolhidas amostras condizentes com a distribuição de mercúrio observada em organismos vivos derivadas de mercúrio ingerido, como fígado e rins<sup>66</sup>.

#### 4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

O método preferencial para o tratamento das amostras para análise consiste na utilização de métodos semelhantes aos já utilizados em outros trabalhos com digestão ácida<sup>42, 46-48, 50-54</sup>. As amostras, compostas por fígado (peso típico do órgão 6 g) e rins (peso típico do órgão 0,6 g) íntegros, foram macerados em gral de vidro para homogeneização, para posterior retirada das alíquotas. O processo de digestão das amostras foi realizado conforme os métodos de preparo por micro-ondas ou por bloco digestor.

Devido ao número limitado de amostras de rins, e a pequena massa de cada uma, juntamente a similaridade de composição entre rim e fígado (tecidos com cápsula fibrosa, estroma e parênquima densos)<sup>68</sup>, a otimização e verificação foi realizada utilizando apenas amostras de fígado.

##### 4.5.1. Digestão das amostras em micro-ondas

Usou-se alíquotas de  $0,250 \pm 0,025$  g e  $0,500 \pm 0,050$  g de fígado previamente macerado. As amostras foram pesadas em tubos de teflon e foram adicionados 5 mL de ácido nítrico subdestilado (modificação do método USEPA 3052<sup>56</sup> que preconiza a utilização de 10 mL para determinação de Hg em matrizes com conteúdo orgânico) e 1 mL de peróxido de hidrogênio. Os tubos foram lacrados e colocados em aquecimento utilizando-se a programação EPA3051<sup>55</sup> XPRESS presente no aparelho de micro-ondas. Após a rotina de aquecimento, foi esperado o

tempo de pelo menos 12 h em resfriamento à temperatura ambiente para a abertura dos tubos de teflon. Após o resfriamento, as soluções resultantes foram acondicionadas em tubos de prolipropileno e diluídas para 14,0 mL com água de osmose reversa.

#### 4.5.2. Digestão das amostras em bloco digestor

Usou-se alíquotas de  $0,250 \pm 0,025$  g de fígado ou  $0,200 \pm 0,020$  g de rim previamente macerado. As amostras foram pesadas em tubos de polipropileno de 15 mL e foram adicionados 2 mL de ácido nítrico subdestilado. Após essa adição as amostras foram deixadas em repouso por pelo menos 12 h em tubos semiabertos. Após o período de repouso, as amostras foram aquecidas em banho-maria durante 60 min a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ). A solução obtida foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados 1 mL de solução de peróxido de hidrogênio 30% e realizado um novo aquecimento durante 60 min a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . As soluções resultantes foram diluídas para 14,0 mL com água de osmose reversa.

### 4.6. ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA

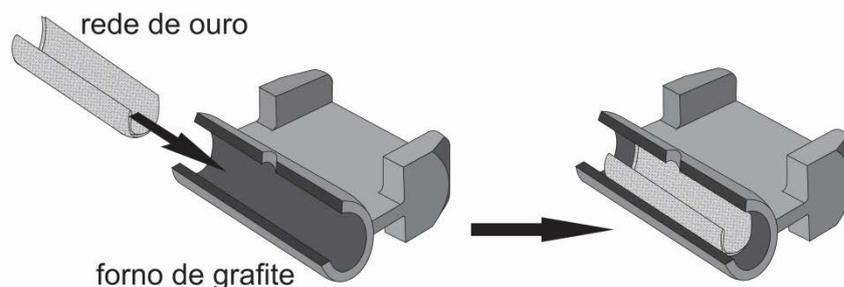
#### 4.6.1. Sistemas de pré-concentração

Foram utilizados dois tipos de sistema de recobrimento do forno de grafite, um com irídio<sup>10</sup> e outro com ouro<sup>38</sup>. O recobrimento do forno de grafite foi realizado utilizando-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da solução padrão de Ir  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  ou da solução padrão de Au  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , usando o programa de aquecimento apresentado na Tabela 5. O processo foi repetido até a utilização de 250  $\mu\text{L}$  de solução padrão.

**Tabela 5.** Programa de temperatura para recobrimento do forno de grafite com ouro<sup>a</sup> ou irídio<sup>b</sup>.

Etapa	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Taxa de aquecimento ( $^\circ\text{C/s}$ )	Tempo (s)	Fluxo de gás
Aquecimento	$60^a/90^b$	$50^a/5^b$	$5^a/40^b$	min
Secagem	$120^a/110^b$	$0^a/1^b$	$60^a/40^b$	0
Autozero	$120^a/130^b$	$0^a/1^b$	$5^a/40^b$	0
Atomização	$900^a/1200^b$	$950^a/300^b$	$5^a/26^b$	0
Limpeza	$1050^a/2100^b$	$200^a/500^b$	$3^a/8^b$	máx

Para a realização dos testes de otimização do método de amalgamação com ouro, houve também a utilização de uma rede de ouro no interior do forno de grafite. A rede de ouro de aproximadamente 4x1 cm (~0,2 g) foi dobrada e inserida no interior do forno de grafite (Figura 11) sem e com o recobrimento prévio com ouro para verificar a melhor eficiência de amalgamação.



**Figura 11.** Esquema de inserção da rede de ouro no forno de grafite. Fonte: Cervený *et al. Spectrochim. Acta B*, 2007, Vol.62(3), pp.317-323 (adaptado).

#### 4.6.2. Análise CV-GF AAS

Para a construção das curvas de calibração, foram utilizadas soluções padrão de mercúrio em meio de solução de ácido nítrico 3 % v v<sup>-1</sup>, com concentrações de 1,0 a 5,0 ng mL<sup>-1</sup> de mercúrio. Uma alíquota de 3 mL da solução é colocada no reator, juntamente com 200 µL de solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,03 % m v<sup>-1</sup>, que é encaixado no gerador de vapor frio. Automaticamente é iniciado o bombeamento da solução redutora, composta por NaBH<sub>4</sub> 1,0 % m v<sup>-1</sup> e NaOH 0,5 % m v<sup>-1</sup>, e purga do vapor frio para o forno de grafite através do gás H<sub>2</sub> gerado e do fluxo de argônio durante o tempo programado. O vapor carregado é pré-concentrado no forno de grafite, e após aquecimento, a análise é realizada. As amostras foram analisadas utilizando-se dos mesmos parâmetros que os utilizados para os padrões de calibração, porém com a adição conjunta de 3 gotas de solução de simeticona 75 mg mL<sup>-1</sup> e de 1 mL de isopropanol.

Salienta-se que foram analisados brancos para todos os testes realizados e que, no mínimo, as análises foram realizadas em triplicata.

As análises foram realizadas utilizando-se os parâmetros apresentados na Tabela 6 para a programação do gerador de hidretos e na Tabela 7 para a programação de aquecimento do forno de grafite.

**Tabela 6.** Parâmetros utilizados no gerador de hidretos.

Parâmetro	Valor
Tempo de bombeamento (s)	40
Tempo de purga 1 (s)	20
Tempo de purga 2 (s)	10
Taxa de bombeamento (mL/min)	18

**Tabela 7.** Programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de Hg.

Etapa	Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C/s)	Tempo (s)	Fluxo de gás
Aquecimento	80 <sup>a</sup> /150 <sup>b</sup>	25 <sup>a</sup> /300 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	min
secagem	80 <sup>a</sup> /150 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /0 <sup>b</sup>	60 <sup>a</sup> /20 <sup>b</sup>	0
Autozero	80 <sup>a</sup> /150 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /0 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	0
Atomização	750 <sup>a</sup> /800 <sup>b</sup>	1400 <sup>a</sup> /1500 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	0
Limpeza	900 <sup>a</sup> /2100 <sup>b</sup>	200 <sup>a</sup> /1000 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup> /5 <sup>b</sup>	máx

<sup>a</sup> Revestimento com ouro

<sup>b</sup> Revestimento com irídio

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CHECAGEM DOS PARÂMETROS PREVIAMENTE OTIMIZADOS

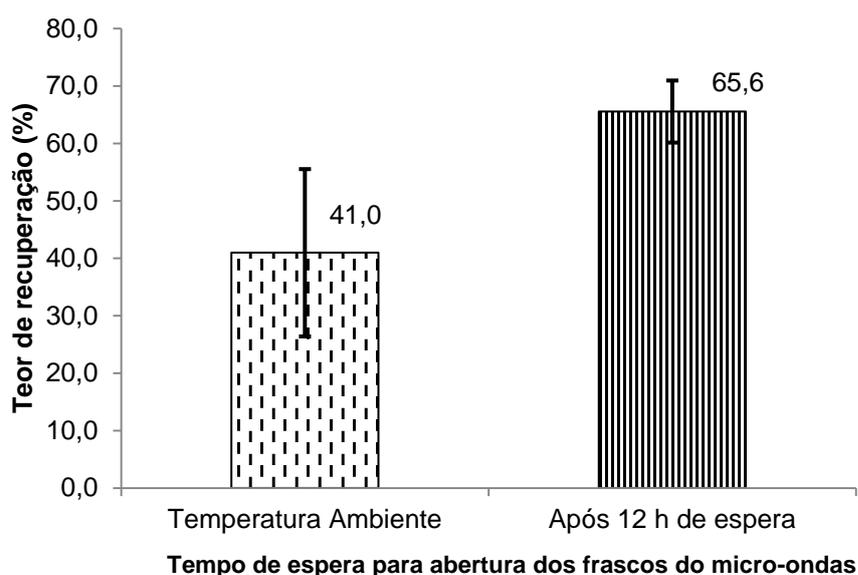
Inicialmente foram utilizados parâmetros previamente otimizados por estudos anteriores<sup>65,69</sup> através de planejamento fatorial: a otimização do programa de aquecimento (temperaturas de amalgamação e atomização), concentração da solução de NaBH<sub>4</sub> e do processo de calibração para o forno de grafite recoberto com irídio. Os valores apresentados por esse estudo foram checados com o objetivo de confirmar as melhores respostas de absorbância observadas e certificar que esses valores obtidos fossem adequados para utilização no estudo atual. Durante os testes de sensibilidade das curvas de calibração com comparação de curvas sem e com uso conjunto dos padrões de mercúrio com dicromato de potássio (0,03 % m v<sup>-1</sup>), foi decidido por não acrescentar o dicromato aos padrões, pois não havia mudanças significativas no sinal quando comparado aos padrões sem a adição de dicromato, o que é justificado pelo fato dos padrões de calibração de mercúrio apresentar somente íons Hg<sup>2+</sup> forma máxima de oxidação, não apresentando função nesse caso<sup>34</sup>. Posteriormente, os testes com dicromato foram retomados.

Com a continuação da checagem foi constatado um problema: os brancos de calibração e preparação dos testes de calibração e recuperação iniciais apresentavam concentrações consideravelmente elevadas, comprometendo os limites de detecção, obtendo-se com isso valores pouco aceitáveis para o estudo, acima de 0,5 ng mL<sup>-1</sup>. Ao procurar a solução desse problema foi constatado que o sistema de subdestilação de quartzo utilizado não era capaz de remover resíduos de Hg do ácido nítrico com muita eficiência (brancos de preparação de amostra com teores de até 2,48 ng mL<sup>-1</sup>) algo que poderia ser justificado por problemas no processo de limpeza do destilador, sendo necessária a utilização de um sistema de subdestilação que não estivesse apresentando esses problemas, no caso um subdestilador por infravermelho (brancos de preparação de amostra com teores abaixo de 0,50 ng mL<sup>-1</sup>).

## 5.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

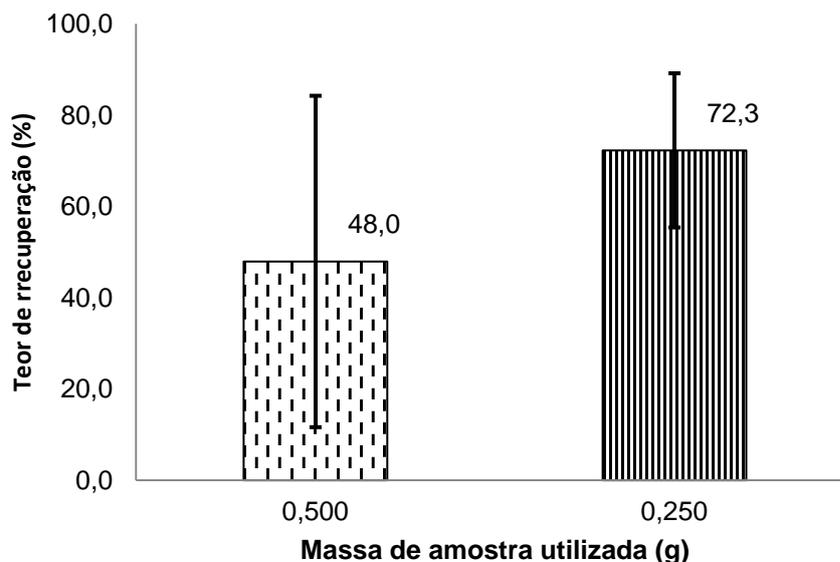
Foram testados dois métodos de digestão de amostras, um utilizando radiação por micro-ondas e outro com aquecimento em bloco digestor.

Inicialmente, foram realizados ensaios de recuperação para as amostras digeridas por micro-ondas, utilizando  $0,500 \pm 0,05$  g de amostra de fígado e adição de  $200 \mu\text{L}$  de padrão  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de Hg em diferentes replicatas antes e após o do processo de digestão com abertura dos frascos de teflon assim que alcançassem a temperatura ambiente, com posterior transferência da solução e diluição em frascos de polipropileno para  $14,0 \text{ mL}$ . A pré-concentração do Hg foi realizada por amalgamação em tubo de grafite recoberto com irídio. Os testes apresentaram resultados insatisfatórios com teor de recuperação inferior a 50%, fora dos critérios de aceitação, e coeficiente de variação maior que 30%, o que poderia ser justificado pela formação, durante o aquecimento, de pressão excessiva no sistema de micro-ondas, resultando em perdas elevadas do analito. É importante salientar que, mesmo após alcançar a temperatura ambiente, aguardando o tempo de resfriamento indicado pelo programa, ao se abrir os frascos ainda se percebia pressão. Para tentar minimizar este problema, foi o aumentado o tempo de espera de abertura dos frascos de digestão de micro-ondas após 12 h do resfriamento ao invés da abertura logo que os frascos alcançassem temperatura ambiente, o que diminuiu consideravelmente a perda de mercúrio (Figura 12).



**Figura 12.** Comparação dos teores de recuperação com diferentes tempos de espera de abertura dos frascos após digestão com micro-ondas.

Foram realizados novos testes de recuperação com adição de padrão, com replicatas de  $0,500 \pm 0,05$  g e  $0,250 \pm 0,025$  g de amostra, com o objetivo diminuir os efeitos de uma possível fonte de formação excessiva de pressão no sistema de micro-ondas e com isso, resultar em melhora dos valores de recuperação. A redução de massa resultou em aumento significativo nos teores de recuperação ( $72,3 \pm 16,9$  % versus  $48,0 \pm 36,3$  %) (Figura 13), porém ainda não satisfatório.



**Figura 13.** Comparação dos teores de recuperação com utilização de 0,250 e 0,500 g de amostra na digestão com micro-ondas.

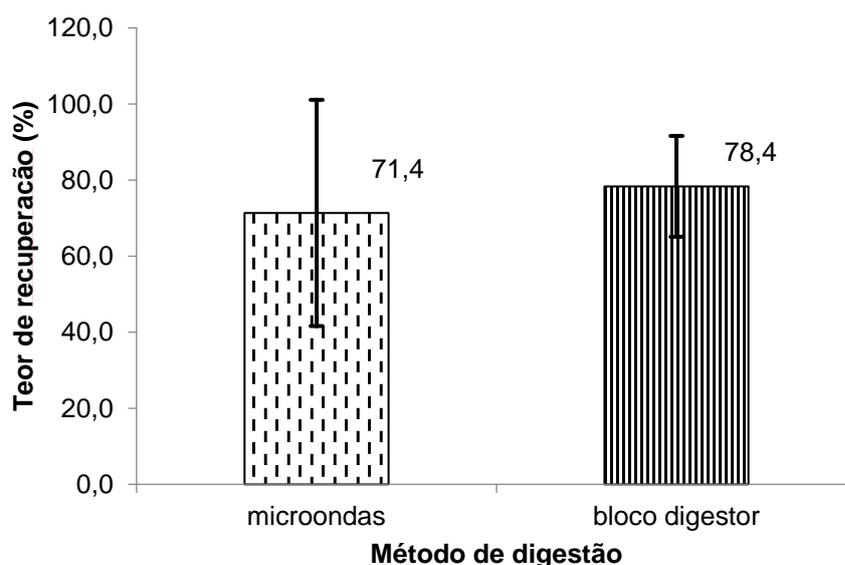
Aumentando ainda mais o rigor analítico, o teste de recuperação com digestão por micro-ondas foi repetido, mas não foi obtido melhoras no teor de recuperação e o desvio padrão das triplicatas se apresentou muito alto ( $71,4 \pm 29,7$  %).

Foi testado também o método de digestão de preparo de amostra utilizando digestão ácida em bloco digestor. Realizando a comparação dos resultados obtidos por esse método com os valores apresentados pelo método de digestão por micro-ondas verificou-se que a utilização do bloco digestor se demonstrou mais vantajoso por apresentar teores de recuperação um pouco superior ao obtido com a digestão por micro-ondas ( $78,4 \pm 13,3$  % versus  $71,4 \pm 29,7$  %) (Figura 14).

Verificou-se que o preparo da amostra em bloco digestor apresentou algumas vantagens em relação ao processo de digestão por micro-ondas, tais como: menor variância dos resultados; maior frequência analítica (40 amostras simultâneas versus 16); e redução potencial do risco de perda ou contaminação do analito, devido

principalmente ao uso de temperaturas e pressões menores e a possibilidade do processo de digestão ocorrer diretamente nos tubos de polipropileno graduado.

A principal desvantagem do uso do bloco digestor seria o tempo maior do processo de digestão, porém como percebeu-se que para se trabalhar com o micro-ondas seria conveniente aguardar um longo período para abertura dos tubos após o resfriamento, a frequência analítica obtida com o bloco digestor justificou o seu uso.

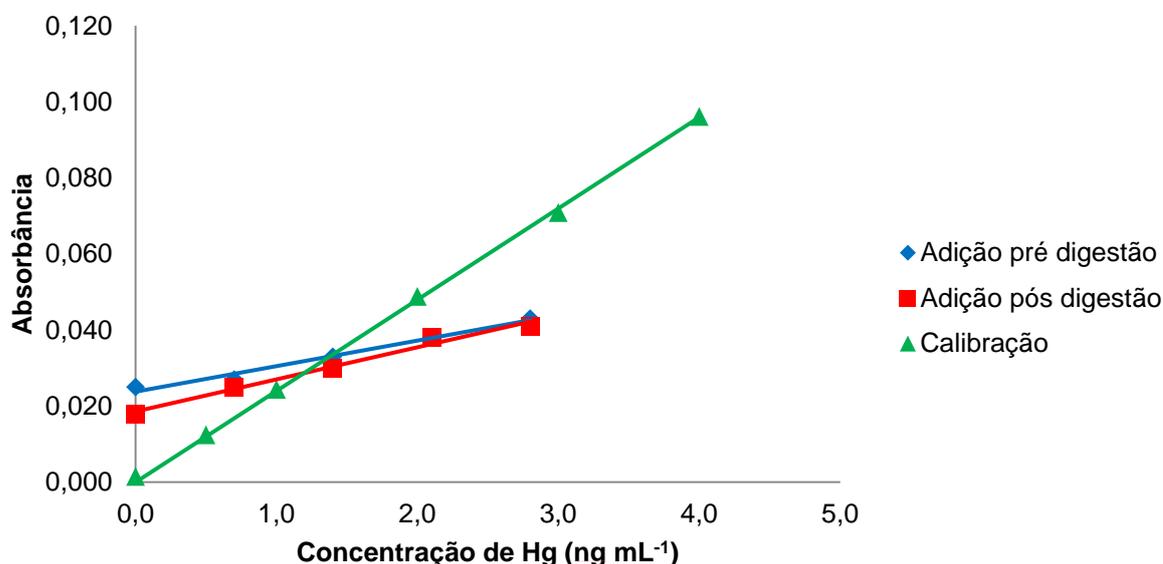


**Figura 14.** Comparação entre os teores de recuperação por digestão em micro-ondas e bloco digestor.

Apesar das mudanças no processo de digestão terem melhorado os resultados gerais, o método utilizado ainda apresentavam problemas que comprometiam a aceitação do método, pela presença de teores de recuperação considerados baixos, com valores abaixo de 80 %, combinado com flutuação de valores elevado, com coeficiente de variação de 7,5 a 32,7 %.

Para a verificação da possível causa desse problema, que poderia ser derivado do processo de preparo de amostras ou do processo de análise das amostras, foram construídas curvas de adição de analito (1,42; 2,13 e 2,84 ng mL<sup>-1</sup>), com adição de mercúrio realizada antes e após do processo de digestão das amostras. As curvas de adição de analito (pré-digestão:  $y=0,007x+0,024$  e  $R^2=0,9827$ ; pós digestão  $y=0,008x+0,019$  e  $R^2=0,9856$ ) apresentaram sensibilidade e coeficiente de correlação inferiores às curvas de calibração ( $y=0,026x$  e  $R^2=0,9993$ ), sugerindo possível interferência por efeitos de matriz. Com esses resultados foi também verificado que o processo de digestão utilizando bloco

digestor não estava apresentando perdas de analito, pois as sensibilidades das curvas de adição não apresentaram diferença estatística ao adicionar analito pré e pós o processo de digestão (Figura 15).



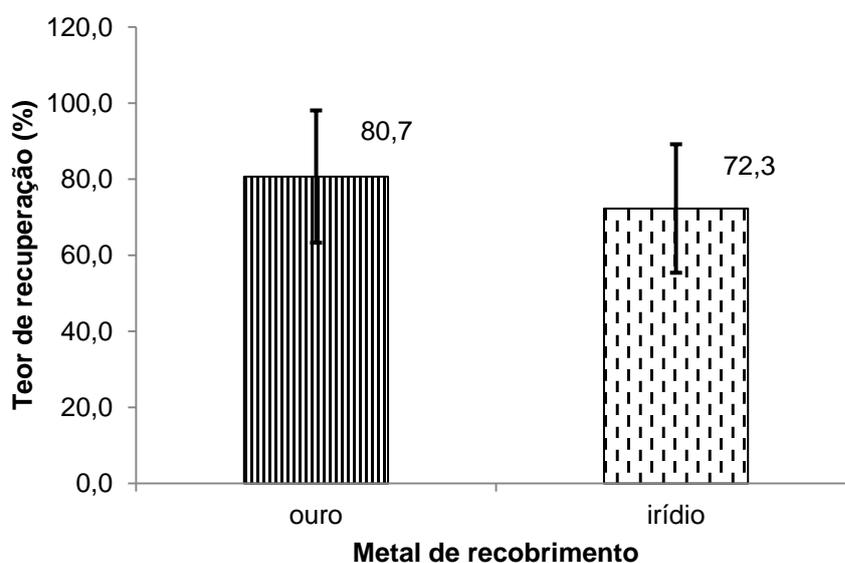
**Figura 15.** Comparação entre as curvas de adição de analito pré e pós digestão e curva de calibração.

Outro problema constatado foi o aumento de pressão nas soluções de amostras armazenadas, já digeridas, o que poderia ser causado por reação incompleta de  $H_2O_2$  na digestão. Inicialmente, a digestão era realizada pelo aquecimento da amostra com  $HNO_3$  a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min e posterior adição de  $H_2O_2$  a temperatura ambiente. Como possível solução para o problema apresentado aumentou-se a etapa de aquecimento no bloco digestor de 30 min para 1 h e adição de uma etapa adicional de aquecimento de 30 min a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  após a adição de peróxido para a eliminação do excesso desse composto. Desta forma, as soluções digeridas apresentaram-se totalmente translúcidas (digestão total) e adequadas para armazenamento.

### 5.3. PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO E USO DE REAGENTES AUXILIARES

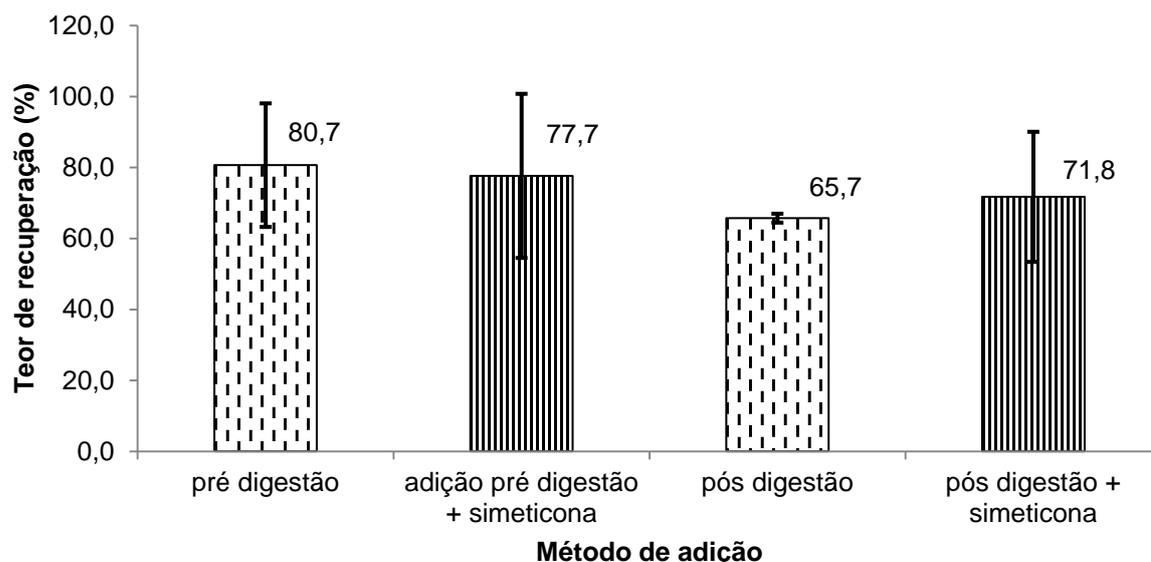
Visto que as modificações realizadas no método ainda não apresentaram resultados que possibilitassem a aceitação do método, foi estudado outro método de

amalgamação realizando testes utilizando recobrimento do forno com ouro, substituindo o irídio. Foi observado que o recobrimento de ouro para amalgamar o vapor de Hg resultou em uma pequena melhora dos teores de recuperação ( $80,7 \pm 19,4$  % versus  $72,3 \pm 21,4$  %), porém pouco significativa, principalmente considerando a variação dos valores (Figura 16). Entretanto foi escolhido continuar os estudos usando recobrimento com ouro devido às temperaturas menores de atomização e de limpeza do forno e a menor necessidade de rotinas de recobrimento do tubo, diminuindo consideravelmente o desgaste do forno de grafite.



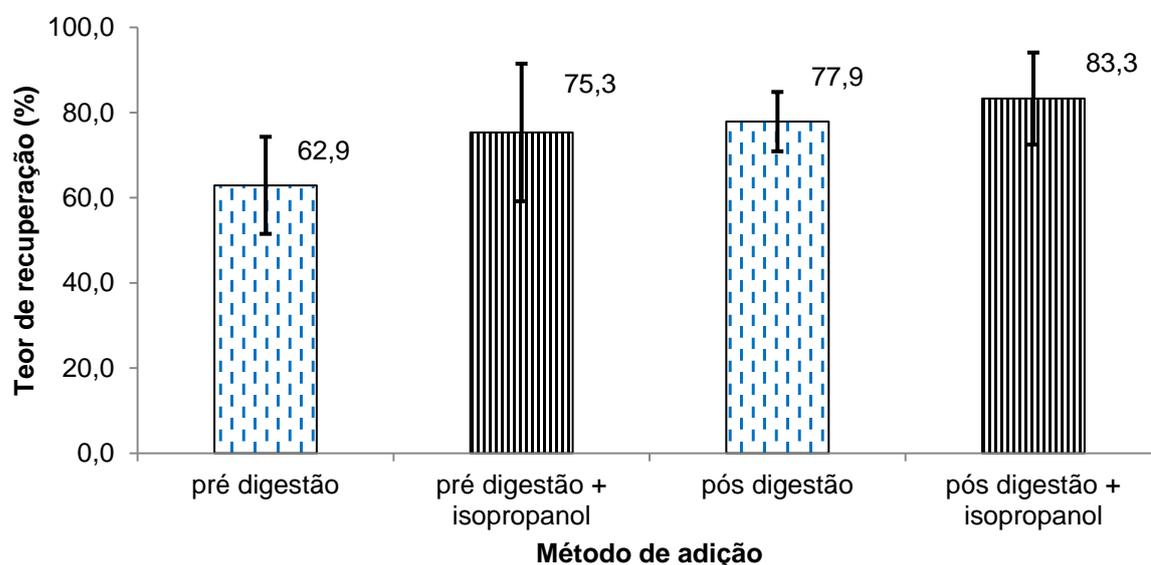
**Figura 16.** Comparação do teor de recuperação entre o recobrimento do forno com irídio e recobrimento do forno com ouro.

Foram realizados novos testes em busca de melhores resultados. O primeiro foi a realização de teste de recuperação com adição de 200  $\mu\text{L}$  de padrão de 100  $\text{ng mL}^{-1}$  de Hg antes e após o processo de digestão e adição de 3 gotas de solução de simeticona 75  $\text{mg mL}^{-1}$  no reator. Este teste foi proposto devido a propriedade da simeticona (dimetilpolissiloxano) em reduzir a formação de espuma (*antifoam*)<sup>70</sup>, podendo facilitar a liberação de mercúrio da solução e melhorar os teores de recuperação. Porém não houve diferença significativa quando comparado com os ensaios realizados sem adição de simeticona (Figura 17).



**Figura 17.** Comparativo de teores de recuperação dos testes sem e com a adição de simeticona.

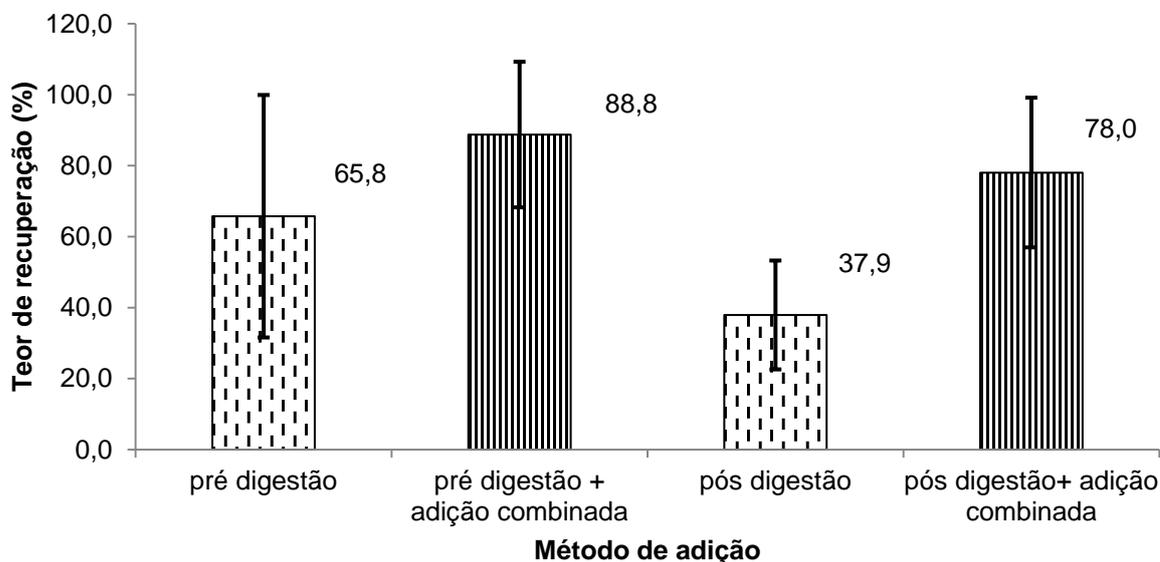
A seguir foi feito o teste de recuperação com adição de isopropanol (1mL) no reator, devido a possibilidade do isopropanol reduzir a tensão superficial da solução<sup>71</sup> facilitando a liberação do mercúrio da solução, fato constatado pelo aumento dos teores de recuperação (Figura 18).



**Figura 18.** Comparativo dos teores de recuperação dos testes sem e com a adição de isopropanol.

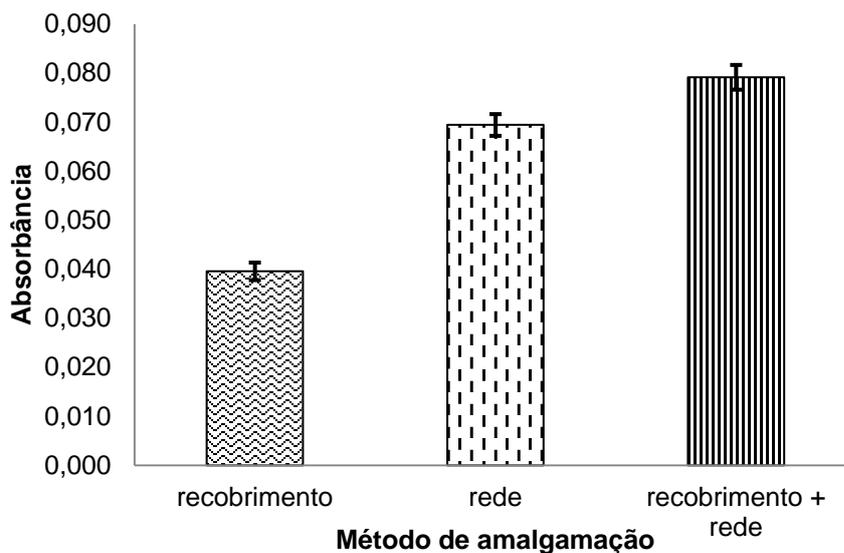
O terceiro foi um teste de recuperação com adição combinada de simeticona (3 gotas de solução  $75 \text{ mg mL}^{-1}$ ), isopropanol (1 mL) no reator devido a possibilidade de ocorrer uma ação sinérgica com a adição simultânea de isopropanol e

simeticona, resultando em teores de recuperação melhores que os testes que possuíam adição isolada dos dois reagentes. Houve aumento dos valores de recuperação ( $88,8 \pm 20,5 \%$ ), entretanto ainda não são satisfatórios devido à flutuação elevada dos valores obtidos (Figura 19).



**Figura 19.** Comparativo de teor de recuperação médio dos testes sem e com a adição de isopropanol + simeticona.

Deste modo, buscou-se melhorar o processo de amalgamação com ouro, realizando testes utilizando três modos de amalgamação. O primeiro consistiu na utilização de um forno de grafite recoberto com ouro como método de amalgamação (já trabalhado anteriormente). O segundo consistiu em utilização de uma rede de ouro dentro do forno de grafite, sem recobrimento, como método de amalgamação. O terceiro método foi a combinação com o uso simultâneo do recobrimento do forno de grafite com Au e introdução da rede de ouro. Comparando os valores de absorvância apresentados, o método de uso combinado de recobrimento e rede de ouro apresentou os maiores valores de resposta quando comparados com os valores obtidos com a rede de ouro e recobrimento do forno (Figura 20). Essa melhora pode ser justificada pela maior área de superfície de contato disponível para amalgamação do Hg nesse método, quando comparado aos outros dois executados. Sendo assim, foi definido como método de amalgamação a combinação do recobrimento do forno com ouro e a inserção da rede de ouro.



**Figura 20.** Valores de absorbâncias obtidos para os diferentes métodos de amalgamação com ouro.

#### 5.4. OTIMIZAÇÃO UTILIZANDO AMALGAMAÇÃO EM FORNO COM RECOBRIMENTO DE OURO E REDE DE OURO

Devido a possibilidade dos parâmetros utilizados para técnica de amalgamação com irídio não serem compatíveis com a técnica com amalgamação em forno com recobrimento de ouro e rede de ouro, foi realizado um novo processo de otimização, baseado no estudo de Duarte *et al.*<sup>72</sup>. Foram estudados o programa de temperatura do forno, o teor de borohidreto da solução redutora, o volume de ácido nítrico usado na digestão e a adição de reagentes auxiliares. Estes testes foram realizados com cinco replicatas para cada ponto. Devido ao número limitado de amostras de rins, e a pequena massa de cada uma, juntamente a similaridade de composição entre rim e fígado (tecidos com cápsula fibrosa, estroma e parênquima densos)<sup>68</sup>, a otimização e verificação foi realizada utilizando apenas amostras de fígado.

##### 5.4.1. Temperaturas de amalgamação e atomização

Primeiramente foram realizados os testes com a variação da temperatura de amalgamação de 60 a 300 °C em passos de 20 graus. Como demonstrado na Figura 21 a temperatura de 80 °C demonstrou maior valor de resposta em absorbância,

com observação de decréscimo rápido dos valores de resposta a partir de 160 °C, pela dificuldade em formar amalgama em temperaturas mais elevadas.

Definida a temperatura de amalgamação (80 °C), o próximo passo foi a otimização da temperatura de atomização. Foram realizados os testes com a variação da temperatura de atomização de 450 a 800 °C em passos de 50 graus. Com os resultados apresentados na Figura 21, verificou-se que a partir de 700 °C não houve diferença estatística entre os valores, sendo escolhido o valor de 750 °C.

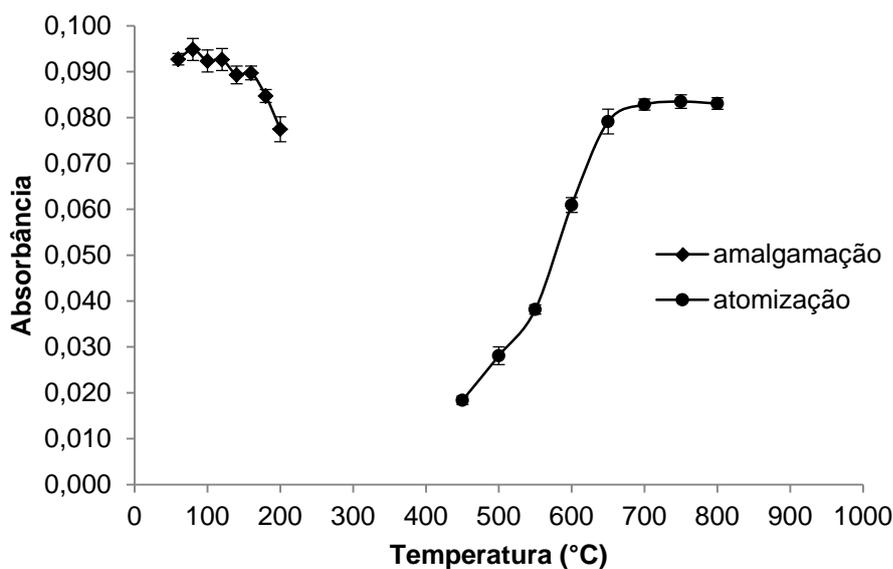


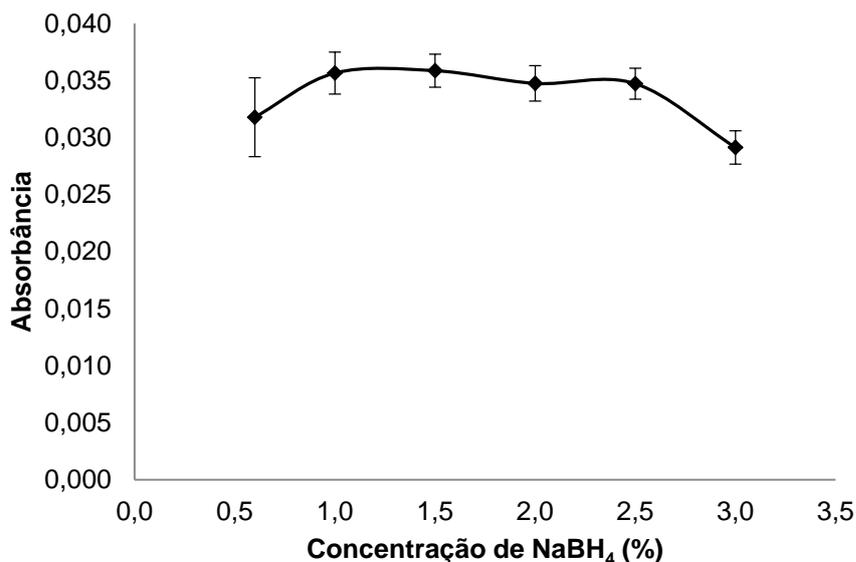
Figura 21. Otimização das temperaturas de amalgamação e atomização.

#### 5.4.2. Concentração da solução redutora – borohidreto de sódio

Primeiramente foi verificado o fluxo de bombeamento de borohidreto. Após ajustes manuais de compressão do capilar na bomba peristáltica foi verificado o fluxo de 17 mL min<sup>-1</sup>, confirmados com aferição em proveta do teor bombeado cronometrado em 60 s. Como o tempo de bombeamento definido em 40 s, através de um cálculo de proporção resulta em bombeamento efetivo de 11,33 mL de solução de borohidreto para o reator.

Verificado o fluxo da solução, foi realizada a otimização da concentração da solução de borohidreto a ser utilizada. Foram executados testes usando como amostra uma alíquota de 3 mL de uma solução padrão 2 ng mL<sup>-1</sup> de Hg e variando as concentrações de solução de borohidreto de 0,6 % a 3,0 % m v<sup>-1</sup>. Conforme demonstrado na Figura 22, os valores de absorbância apresentaram os melhores resultados entre concentrações de 1,0 e 1,5 %, m v<sup>-1</sup>, não havendo mudanças

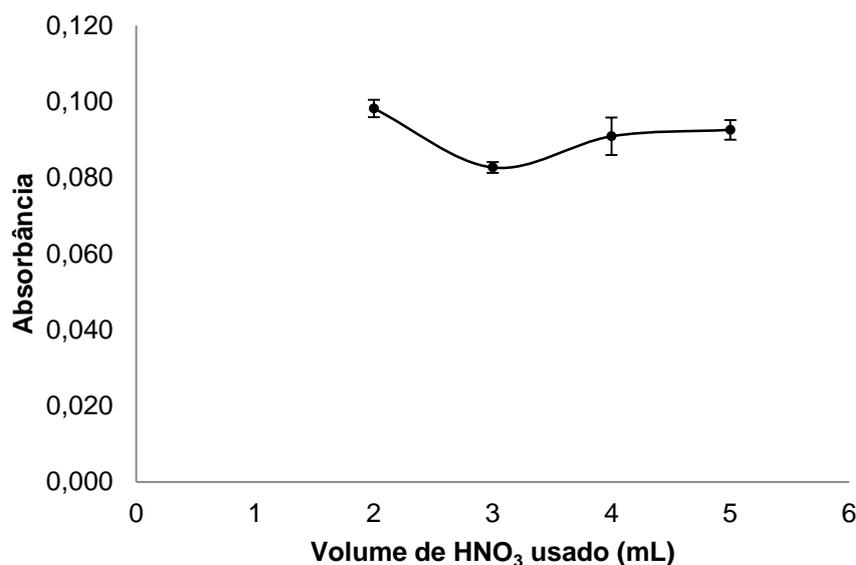
significativas de resposta entre teores de 1,0 a 2,5 %  $m v^{-1}$ . Houve uma redução considerável do valor da absorbância em concentração de 3 %  $m v^{-1}$ , podendo ser justificado pelo aumento excessivo da vazão de gás formado, que pode dificultar a pré-concentração do Hg. Assim, foi escolhido 1,0 %  $m v^{-1}$  para utilização em testes posteriores.



**Figura 22.** Variação do sinal da absorbância com a concentração de borohidreto.

#### 5.4.3. Volume de ácido nítrico utilizado no processo de digestão

Utilizando o procedimento de preparo de amostra em bloco digestor foi testado a variação do volume de ácido nítrico usado na digestão de 2 a 5 mL utilizando amostras de fígado de rato, em alíquotas de  $0,250 \pm 0,025$  g. Até o momento utilizava-se 5 mL de HNO<sub>3</sub>. O resultado do teste (Figura 23) demonstrou que a eficiência de digestão foi semelhante em todos os volumes (desvio padrão relativo de 8,0 %), sendo que as amostras digeridas com 2 mL de ácido nítrico apresentaram o melhor valor de resposta, sendo este fixado para o procedimento.



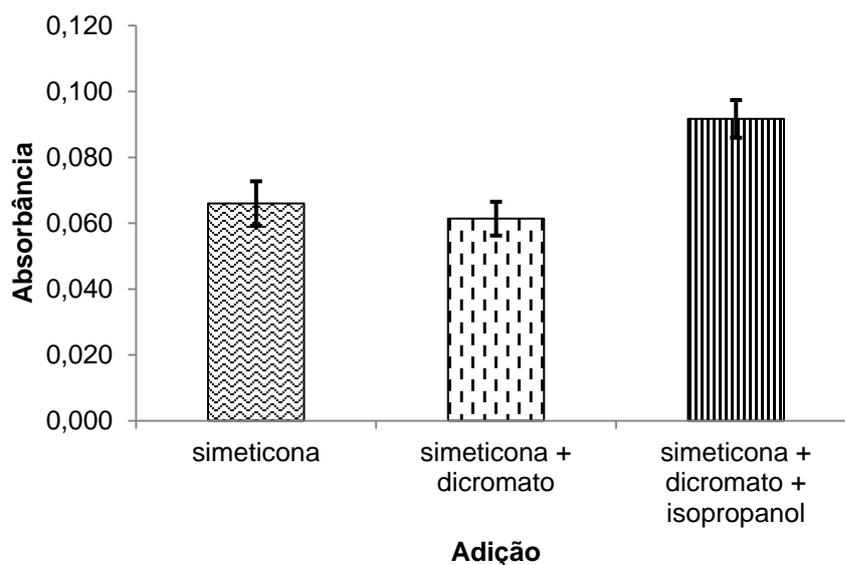
**Figura 23.** Variação do sinal da absorbância com volume de ácido nítrico usado na digestão.

#### 5.4.4. Adição de reagentes auxiliares

Foi verificada a influência da adição de dicromato de potássio (200  $\mu\text{L}$  de solução 0,03 %  $\text{m v}^{-1}$ ), simeticona (3 gotas de solução 75  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e do isopropanol (1 mL) no sinal de resposta. O dicromato foi usado com intuito de garantir que todo o mercúrio presente no meio antes do processo de redução esteja na forma de  $\text{Hg}^{2+}$ ; a simeticona (antiespumante)<sup>70</sup> e o isopropanol (diminuir tensão superficial da solução)<sup>71</sup> foram utilizados visando facilitar o arraste do  $\text{Hg}^0$  formado após a redução.

Foram realizados testes utilizando-se amostras digeridas de  $0,250 \pm 0,025$  g de fígado de rato. Após o processo de digestão foram realizadas leituras com a adição dos reagentes complementares no reator: simeticona; dicromato e simeticona; e dicromato, simeticona e isopropanol.

Observando os resultados (Figura 24), verificou-se que a adição conjunta de dicromato, simeticona e isopropanol resultou em aumento significativo do sinal em conjunto com a redução dos coeficientes de variação relativo, quando comparados com a adição de dicromato e simeticona e somente simeticona.



**Figura 24.** Resultados do teste de adição de dicromato e isopropanol.

## 5.5. VERIFICAÇÃO DO MÉTODO

Para confirmação da validade do método para a análise de tecidos contendo mercúrio foi realizada a verificação do método utilizando a avaliação de figuras de mérito: limite de detecção, limite de quantificação e ensaios de recuperação.

### 5.5.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados mediante a utilização da fórmula citada no processo de validação (equação 2), utilizando a média e desvio padrão de 10 leituras de branco. A partir da utilização da fórmula descrita nos ensaios, foram encontrados os valores de Limite de detecção (LD) médio do método de  $0,035 \text{ ng mL}^{-1}$  e limite de quantificação (LQ) médio de  $0,118 \text{ ng mL}^{-1}$ , valores inferiores aos reportados na literatura<sup>73-76</sup> e considerados adequados para o estudo realizado.

### 5.5.2. Ensaio de recuperação e teste de precisão intermediária

Devido a falta de um material certificado de referência completamente compatível com as amostras em estudo, neste trabalho com o intuito de realizar a verificação do procedimento foram realizados ensaios de recuperação e teste de precisão intermediária.

Para processos de validação são considerados o valor recomendado de 7 repetições<sup>61</sup>.

Os ensaios de recuperação foram realizados utilizando-se brancos de preparação e digestões de  $0,250 \pm 0,025$  g de fígado de rato com adição de solução de mercúrio de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  antes do início do processo de digestão, de modo que resultassem em valores de fortificação de 0 a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  na solução da amostra final.

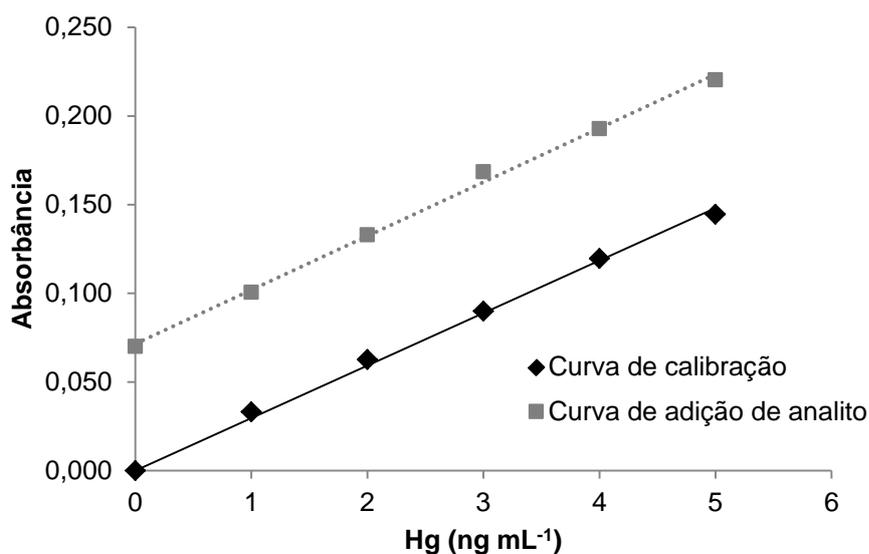
Foram realizadas 3 digestões em dias diferentes com adição de Hg nas amostras de fígado em cinco níveis (0, 1, 2, 3, 4 e  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ), construindo-se curvas de adição de analito. Para cada digestão e cada nível, as amostras foram digeridas em triplicata. De cada triplicata, foram realizadas três leituras. Assim, em um mesmo dia, para cada nível de adição foram realizadas 9 análises.

Foram obtidos valores de recuperação médios entre 92 e 114% (Tabela 8), considerados aceitáveis para a aprovação do procedimento.

**Tabela 8.** Resultados dos testes de recuperação e valores de recuperação médio

Adição ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)				Coeficiente de variação (%)
	digestão 1	digestão 2	Digestão 3	média (%)	
1,0	$70,2 \pm 11,5$	$86,1 \pm 7,0$	$121,0 \pm 19,5$	$92,4 \pm 16,7$	16,2
2,0	$89,2 \pm 14,4$	$124,5 \pm 3,1$	$100,4 \pm 17,0$	$108,1 \pm 23,6$	17,2
3,0	$108,8 \pm 9,4$	$118,1 \pm 4,5$	$114,4 \pm 7,3$	$113,7 \pm 4,7$	4,1
4,0	$99,1 \pm 3,7$	$111,1 \pm 1,9$	$98,1 \pm 6,8$	$102,7 \pm 7,3$	7,1
5,0	$99,8 \pm 2,4$	$114,7 \pm 7,1$	$96,0 \pm 2,9$	$103,5 \pm 9,9$	9,5

Ao construir as curvas de adição de analito foi verificado que a interferência de matriz antes observada foi contornada pelas otimizações realizadas, visto que as sensibilidades das curvas de adição ( $y=0,030x+0,072$ ;  $R^2=0,9970$ ) não apresentaram diferença estatística em relação as curvas de calibração ( $y=0,030x$ ;  $R^2=0,9974$ ) (Figura 15).



**Figura 25.** Comparação entre as curvas de adição de analito e curva de calibração.

## 5.6. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE FÍGADO E RIM DE RATO

Após a verificação do procedimento, foram realizadas as determinações de mercúrio nas amostras de ratos dopados com mercúrio, onde foram utilizadas amostras de fígado, em alíquotas de  $0,250 \pm 0,025$  g e rins, em alíquotas de  $0,200 \pm 0,020$  g. As amostras foram separadas em três categorias diferentes: amostras de quatro ratos de controle com tratamento sem adição de mercúrio; amostras de quatro ratos com tratamento de dopagem diária de solução de cloreto mercúrico para manutenção do nível plasmático em 10nM; e amostras de quatro ratos com dopagem diária de solução de cloreto mercúrico para manutenção do nível plasmático em 50 nM. Para cada amostra foram realizadas a digestão em triplicata e leitura em duplicata. Os valores encontrados para as amostras de fígado estão apresentados na Tabela 9 e de rins, na Tabela 10.

**Tabela 9.** Concentrações de mercúrio em amostras de fígado de rato.

Amostra	Hg (ng g <sup>-1</sup> )				C.V. (%)
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	
Controle 1	156,0 ± 1,8	174,9 ± 0,5	190,7 ± 4,1	173,8 ± 15,7	9,0
Controle 2	105,5 ± 4,2	71,7 ± 2,1	102,6 ± 4,6	93,3 ± 18,7	18,3
Controle 3	93,5 ± 0,8	69,7 ± 0,3	82,1 ± 3,8	81,8 ± 10,8	13,2
Controle 4	52,5 ± 4,0	59,5 ± 6,3	78,7 ± 1,8	63,6 ± 12,6	19,8
10 nM 1	92,7 ± 1,8	80,1 ± 1,2	64,6 ± 2,7	79,1 ± 12,7	16,0
10 nM 2	86,2 ± 2,9	73,5 ± 4,2	64,5 ± 2,9	74,7 ± 10,1	13,5
10 nM 3	61,7 ± 1,5	64,6 ± 0,6	65,2 ± 0,6	63,8 ± 1,9	2,9
10 nM 4	62,2 ± 2,1	84,0 ± 2,9	73,8 ± 1,2	75,7 ± 7,0	9,2
50 nM 1	82,3 ± 0,5	112,6 ± 1,0	83,1 ± 0,6	92,7 ± 15,5	16,7
50 nM 2	69,2 ± 3,8	52,4 ± 0,4	57,0 ± 1,3	59,7 ± 8,0	13,4
50 nM 3	57,9 ± 5,1	41,9 ± 3,9	60,0 ± 1,1	53,3 ± 9,3	17,5
50 nM 4	66,0 ± 0,1	81,8 ± 0,2	88,8 ± 0,6	78,9 ± 10,5	13,3

**Tabela 10.** Concentrações de mercúrio em amostras de rim de rato.

Amostra	Hg (ng g <sup>-1</sup> )				C.V. (%)
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	
Controle 1	380,6 ± 49,7	355,0 ± 15,9	351,9 ± 1,2	362,5 ± 27,3	7,5
Controle 2	457,5 ± 3,1	436,8 ± 6,9	367,4 ± 13,6	420,6 ± 42,8	10,2
Controle 3	391,6 ± 7,1	362,5 ± 14,7	386,2 ± 16,9	380,1 ± 17,4	4,6
Controle 4	143,2 ± 4,9	149,9 ± 12,7	146,0 ± 10,0	143,4 ± 8,2	5,6
10 nM 1	344,8 ± 25,4	367,3 ± 5,2	336,3 ± 0,3	349,5 ± 18,5	5,3
10 nM 2	282,2 ± 1,5	264,4 ± 8,0	237,5 ± 0,8	231,4 ± 20,5	7,8
10 nM 3	354,0 ± 5,9	329,8 ± 4,0	334,0 ± 5,4	339,3 ± 12,2	3,6
10 nM 4	403,6 ± 7,5	394,2 ± 8,1	366,8 ± 1,6	388,2 ± 17,9	4,6
50 nM 1	130,4 ± 1,9	118,9 ± 5,6	129,0 ± 6,9	126,0 ± 7,0	5,5
50 nM 2	120,6 ± 7,6	141,7 ± 8,4	133,7 ± 9,5	132,0 ± 11,6	8,8
50 nM 3	211,2 ± 1,1	244,6 ± 4,2	225,6 ± 2,1	227,1 ± 15,1	6,7
50 nM 4	134,8 ± 14,1	124,7 ± 10,7	110,8 ± 0,9	123,4 ± 13,4	10,9

Observando os valores de concentração encontrados, verificou-se uma pequena variação entre os resultados de uma mesma replicata para amostras de fígado e rim, e para as triplicatas de rim. Ao se comparar as triplicatas de fígado verificou-se um desvio maior, mas aceitável<sup>64</sup>. Isso pode ter ocorrido devido à

amostra ser muito fibrosa, o que pode ter levado a uma homogeneização não tão eficiente.

Foi verificado que a concentração de mercúrio em amostras de fígado de rato é em média inferior a concentração encontrada nas amostras de rim de rato, fato esse já verificado em outros estudos<sup>77,78</sup>.

Foi constatado que não houve aumento na concentração detectada quando realizada a comparação entre as amostras controle e as amostras cujos espécimes receberam dopagem de mercúrio, o que poderia ser justificado pelo composto utilizado para a dopagem, o  $\text{HgCl}_2$ , apresentar mercúrio na forma mercúrica ( $\text{Hg}^{2+}$ ), que possui menor capacidade de difusão para os tecidos e menor tendência a ligação em proteínas. Além disso, o mercúrio na forma mercúrica possui a maior capacidade de excreção do organismo<sup>78</sup>, dificultando a acumulação do metal nos tecidos, e a retenção de mercúrio inorgânico em rim é mais acentuada e importante em humanos do que em rato<sup>77</sup>. Além disso, teores reduzidos de mercúrio nas amostras de tecido dos ratos dopados com teor elevado de mercúrio (50 nM), principalmente para os rins, pode ser justificada pela possibilidade desse teor elevado apresentar efeito de toxicidade aguda resultando em ocorrência de lesões nesses órgãos<sup>79</sup>. Essas lesões podem ser causadas por morte celular<sup>80</sup> que resulta em necrose de tecidos, causando redução da atividade renal<sup>81</sup>, e possibilitando a redução da capacidade de acumulação de mercúrio nesses órgãos afetados. Porém, outros estudos deverão ser realizados para poder dar suporte a essas especulações.

## 6. CONCLUSÃO

Após a realização do processo de investigação e comparação de métodos de amalgamação e digestão, em conjunto com a realização dos processos de otimização e verificação, obteve-se bons resultados para os testes de recuperação, com teores médios entre 92 e 114 %. Assim, o procedimento adotado mostrou-se adequado para a determinação de mercúrio em amostras de fígado e rim de ratos a partir da técnica de geração química de vapor frio de mercúrio acoplado a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (CV-GF AAS), após digestão ácida das amostras por aquecimento em bloco digestor e amalgamação em forno contendo recobrimento com ouro e rede de ouro.

Considerando os teores de mercúrio obtidos nos tecidos dos ratos, não houve aumento na concentração detectada quando realizada a comparação entre as amostras controle e as amostras cujos espécimes receberam dopagem de mercúrio. Ao contrário, foi observado teores reduzidos de mercúrio nas amostras de tecido dos ratos dopados com teor elevado de mercúrio (50 nM), principalmente para os rins. Isto pode ter ocorrido pela possibilidade desse teor elevado apresentar efeito de toxicidade aguda resultando lesões nesses órgãos, causadas por morte celular que resulta em necrose de tecidos, redução da atividade renal e redução da capacidade de acumulação de mercúrio nesses órgãos afetados. Porém, outros estudos deverão ser realizados para poder dar suporte a essas suposições.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. VIEIRA, M. A.; GRINBERG, P.; BOBEDA, C. R. R.; REYES, M. N. M.; CAMPOS, REINALDO C. **Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review.** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2009, 64(6), 459-476.
2. WANG, J.; FENG, X.; ANDERSON, C. W. N.; XING, Y.; SHANG, L. **Remediation of mercury contaminated sites – A review.** *Journal of Hazardous Materials*. 2012, 221-222, 1-18.
3. BROOKS, W. E. **Mercury.** U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries. 2007. 1, 104-105.
4. BALL, L. K.; BALL, R.; PRATT, R. D. **An Assessment of Thimerosal Use in Childhood Vaccines.** *Pediatrics*. May, 2001, 107(5), 114.
5. TAKASE I.; PEREIRA, H. B.; LUNA A. S.; GRINBERG P.; CAMPOS R. C. D. **A geração química de vapor em espectrometria atômica.** *Química Nova*. 2002, (6b), 1132.
6. GARCÍA, M. Y.; DI BERNARDO, M. L.; VIT, P.; RONDÓN, C.; GONZÁLEZ, I.; SAAVEDRA, A. R; ZAGO, K.; UZCATEGUI, N. A. **Standardization and determination of Mercury (Hg) in bee pollen of Brassica napus L.** *RETEL : Revista de Toxicología en Línea*. 2007, 13, 11.
7. ÁLVAREZ, F. F.; RODRÍGUEZ, M. T.; ESPINOSA, A. J. F.; DABÁN, A. G. **Physical speciation of arsenic, mercury, lead, cadmium and nickel in inhalable atmospheric particles.** *Analytica Chimica Acta*, 2004524(1), 33-40.
8. PAN, J.; WANG, S.; ZHANG, R. **Preparation and modification of macroporous epoxy-triethylenetetramine resin for preconcentration and removal of Hg(II) in aqueous solution.** *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, 102, 2372-2378.
9. BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; DE SOUZA, S. S. ; OLIVEIRA SOUZA, V. C.; 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 Chemistry*, 2011, 126(4), 2000-2004.

10. VESCOVI, M. V. A. **Avaliação da deposição tecidual de metais tóxicos (Cd e Pb) em ratos submetidos a diferentes formas de exposição.** Monografia para conclusão de curso. Universidade Federal do Espírito Santo, 2010. 80p.
11. AZEVEDO, B. F **Efeitos cardiorrespiratórios da injeção intracisternal de cloreto de mercúrio.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011. 92p.
12. DUFFUS, J.H. **“heavy metals” - a meaningless term? (IUPAC Technical Report).** Pure and Applied. Chemistry. 2002, 74(5), 793–807.
13. JARUP, L. **Hazards of heavy metal contamination..** British Medical Bulletin. 2003, 68, 167-182.
14. CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. **The toxicology of mercury and its chemical compounds.** Critical reviews in toxicology. 2006, 36(8), 609-662.
15. SMART, N. A. **Use and residues of mercury compounds in agriculture.** Residue Reviews. 1968, 23, 1-36.
16. EKINO S, SUSU M, NINOMIYA T, IMAMURA K, KITAMURA T. **Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning.** Journal of the Neurological Sciences. 2007, 262(1-2). 131-144.
17. BAKIR, F.; DAMLUJI, S. F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N. Y.; TIKRITI, S.; DHAHIR, H. I.; CLARKSON, T. W. ; SMITH, J. C.; DOHERTY, R. A. **Methylmercury Poisoning in Iraq.** Science. 1973: Vol. 181(4096), 230-241.
18. GEIER, D. A. SYKES, L. K., GEIER, M. R. **A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2007, 10, 575–596.
19. DOREA, J. G.; BARBOSA, A. C.; SILVA, G. S. **Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 2006, 142(3), 275-283.
20. LIANG, L.; BROOKS, R. J. **Mercury reactions in the human mouth with dental amalgams.** Water, Air, and Soil Pollution. 1995, 80(1-4), 103-107.
21. LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 89th Edition. 89<sup>a</sup> ed. Colorado, USA. CRC Press, 2009. 2736 p.

22. CABANA, G.; TREMBLAY, A.; KALFF, J.; RASMUSSEN, J. B.. **Pelagic food chain structure in Ontario lakes: a determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*)**. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1994, 51(2), 381-389.
23. BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F.. **O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente**. Química Nova, 2004, 27(4), 593-600.
24. GILMAN A. G. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro. McGral Hill Interamericana do Brasil. 2005. 1647p.
25. SØRENSEN, F. W.; LARSEN, J. O. ; EIDE, R. ; SCHIØNNING, J. D. **Neuron loss in cerebellar cortex of rats exposed to mercury vapor: a stereological study**. Acta Neuropathologica. 2000, 100(1), 95-100.
26. ZALUPS, R. K.; DIAMOND, G. L. **Intrarenal distribution of mercury in the rat: Effect of administered dose of mercuric chloride**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1987, 38(1), 67-72.
27. RODRIGUES, J. L.; SERPELONI, J. M.; BATISTA, B. L.; SOUZA, S. S.; BARBOSA JR., F. **Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury**. Archives of Toxicology. 2010, 84(11), 891-896.
28. CANELA, M. C. **Determinação de mercúrio a nível de traço: Aplicação em amostras de interesse ambiental. Dissertação de mestrado**. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, 1995.
29. BARBOUR; R. **Avaliação crítica de métodos analíticos para determinação de arsênio e mercúrio em amostras de ácido sulfúrico de uma metalurgia de cobre**. Dissertação de mestrado. Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007, 36p.
30. MICARONI, R. C. da C. M. *et al.* **Compostos de mercúrio: Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte**. Química Nova. 2000, 23, 487-495.
31. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3rd Completely Revised Edition. 3ª. ed. New York. Wiley-VCH, 1999. 965 p.
32. CAMPOS, M. S. de. **Estudo da correlação mercúrio-selênio em amostras de cabelos de índio Wari**. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas

Energéticas e Nucleares associado à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 17, 31, 32p.

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

34. GUILHEN, S. N. et al. **Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS).** *Estudo de caso.* *Quimica. Nova.* 2010, 33, 1285-1290.

35. MATOUSEK, J. P.; IAVETZ, R.; POWELL, K. J.; LOUIE, H. **Mechanistic studies on the trapping and desorption of volatile hydrides and mercury for their determination by electrothermal vaporization-inductively-coupled plasma mass spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy.* 2002; 57(1):147-155.

36. BAXTER, D. C.; FRECH, W. **Determination of mercury by atomic absorption spectrometry using a platinum-lined graphite furnace for in situ preconcentration.** *Analytica chimica acta.* 1989, 225, 175-183.

37. FLORES, E. M.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. **Determination of mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite tube, and electrothermal atomization.** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 2001, 56(9), 1605-1614.

38. CERVENY, V.; RYCHLOVSKY, P.; NETOLICKA, J.; SIMA, J. **Electrochemical generation of mercury cold vapor and its in-situ trapping in gold-covered graphite tube atomizers.** *Spectrochimica Acta Part B-atomic Spectroscopy.* 2007, 62(3), 317-323.

39. FLORES, É. L.; PANIZ, J. N.; FLORES, É. M.; POZEBON, D.; & DRESSLER, V. L. **Mercury speciation in urban landfill leachate by cold vapor generation atomic absorption spectrometry using ion exchange and amalgamation.** *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 2009, 20(9), 1659-1666.

40. MITRA, Somenath (Ed.). **Sample preparation techniques in analytical chemistry.** John Wiley & Sons, New Jersey 2004, 448p.

41. VOEGBORLO, R. B.; ADIMADO, A. A. **A simple classical wet digestion technique for the determination of total mercury in fish tissue by cold-vapour**

**atomic absorption spectrometry in a low technology environment.** Food Chemistry. 2010, 123 (3), 936-940.

42. ROBINS, N. A.; HAGAN, N.; HALABI, S.; HSU-KIM, H.; GONZALES, R. D. E.; MORRIS, M.; WOODALL, G.; RICHTER, D. D.; HEINE, P.; ZHANG, T.; BACON, A.; VANDENBERG, J. **Estimations of historical atmospheric mercury concentrations from mercury refining and present-day soil concentrations of total mercury in Huancavelica, Peru.** Science of the Total Environment. 2012, 426, 146-154.

43. ORTIZ, A. I. C.; ALBARRAN, Y. M.; RICA, C. C. **Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples.** Journal Of Analytical Atomic Spectrometry. 2002, 17(12), 1595-1601.

44. HYLANDER, L. D.; SILVA, G. D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J.; DE CASTRO E SILVA, E.; GUIMARÃES, J. R. D.; ARAUJO, D. M.; NEVES, R. P.; STACHIW, R.; BARROS, A. J. P. **Relationship of mercury with aluminum, iron and manganese oxy-hydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil.** Science of the Total Environment. 2000, 260(1-3), 97-107.

45. MAILMAN, M.; BODALY, R. A. **The burning question: Does burning before flooding lower methyl mercury production and bioaccumulation?** Science Of The Total Environment. 2006, 368(1), 407-417.

46. PARK, C. H.; EOM, Y.; LEE, L. J. E.; LEE, T. G. **Simple and accessible analytical methods for the determination of mercury in soil and coal samples.** Chemosphere. 2013, 93(1), 9-13.

47. ODŽAK, N.; ZVONARIC, T.; KLJAKOVIC GAŠPIC, Z.; HORVAT, M.; BARIC, A. **Biomonitoring of mercury in the Kastela Bay using transplanted mussels.** Science of the Total Environment. 2000, 261(1-3), 61-68.

48. CURREY, N. A.; BENKO, W.I.; YARU, B. T. ; KABI, R. **Determination of heavy metals, arsenic and selenium in Barramundi (Lates calcarifer) from Lake Murray, Papua New Guinea.** Science of the Total Environment. 1992, 125, 305-320.

49. PICOLOTO, R. S.; WILTSCHE, H.; KNAPP, G.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. **Mercury determination in soil by CVG-ICP-MS after volatilization using microwave-induced combustion.** Analytical Methods. 2012, 4(3), 630-636.

50. HELLINGS, J.; ADELOJU, S. B.; VERHEYEN, T. V. **Rapid determination of ultra-trace concentrations of mercury in plants and soils by cold vapour**

**inductively coupled plasma-optical emission spectrometry.** Microchemical Journal, 2013, 111, 62-66.

51. MURPHY, J.; JONES, P.; HILL, S. J. **Determination of total mercury in environmental and biological samples by flow injection cold vapour atomic absorption spectrometry.** Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 1996, 51(14), 1867-1873.

52. SILVA, M. J.; PAIM, A. P. S.; PIMENTEL, M. F.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. **Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion.** Analytica Chimica Acta. 2010, 667(1-2), 43-48.

53. AUGELLI, M. A.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; CANTAGALLO, M. I.; ANGNES, L. **Analytical procedure for total mercury determination in fishes and shrimps by chronopotentiometric stripping analysis at gold film electrodes after microwave digestion.** Food Chemistry. 2007, 101(2), 579-584.

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

55. EPERESI, C.; NELSON, D.; STAUFFER, M. **Preliminary Investigations of Correlations Between Total Mercury in Tuna and Quality Control, and Mercury Recoveries Using Microwave Digestion.** Spectroscopy Letters. 2010, 43(7), 597-601.

56. USEPA METHOD 3050B. ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, AND SOILS **Disponível em:**

**<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>.** Acessado em 25 de maio de 2014.

57. USEPA METHOD 3051A. MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS. **Disponível em:**

**<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>.** Acessado em 25 de maio de 2014.

58. USEPA METHOD 3052. MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. **Disponível em:**

**<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf>.** Acessado em 25 de maio de 2014.

59. Valente, A. L. P.; Augusto, F. **Microextração por fase sólida**. Química Nova. 2000, 23(4), 523-530.
60. A CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. **Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão Acadêmica. 2008, 9(1), 23-27.
61. INMETRO **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Junho/2010. 24p.
62. ALBANO, F.; RODRIGUEZ, M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais**. 1ª. ed. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2007, 136 pp.
63. SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre. 5ª ed. Ed. Bookman, 2002. 1056 pp.
64. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. In: HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 2002.
65. SCARPATTI, K. S. **Otimização de um gerador de hidretos para determinação de Hg em tecido de rato**. Trabalho de conclusão de curso. Programa de Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo. 2011. 67p.
66. FURIERI, L. B. **Exposição à baixa concentração de HgCl<sub>2</sub> durante 30 dias deprime a contratilidade miocárdica e promove disfunção coronariana em ratos**. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011. 215p.
67. WIGGERS, G. A., STEFANON, I., PADILHA, A. S., PEÇANHA, F. M., VASSALLO, D. V., & OLIVEIRA, E. M. **Low nanomolar concentration of mercury chloride increases vascular reactivity to phenylephrine and local angiotensin production in rats**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2008, 147(2), 252-260.
68. SOBOTTA, J. **Sobotta: Atlas de Histologia: Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica**. Rio de Janeiro. 7ª ed. Guanabara Koogan. 2007. 272pp.
69. SIMÕES; R. R. V. **Avaliação do desempenho de um gerador de hidretos acoplado a um espectrômetro de absorção atômica para a determinação de**

**mercúrio em ostras e sedimentos.** Trabalho de conclusão de curso. Programa de Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo. 2010. 34p.

70. BERGERON, V.; COOPER, P.; FISCHER, C.; GIEMANSKAKAHN, J.; LANGEVIN, D.; POUCHELON, A. **Polydimethylsiloxane (PDMS)-based antifoams.** *Colloids and Surfaces A*, 1997, 122(1-3), 103-120.

71. TARIQ, M.; FREIRE, M. G.; SARAMAGO, B.; COUTINHO, J. A. P.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N. **Surface tension of ionic liquids and ionic liquid solutions.** *Chemical Society Reviews*. 2012, 41(2), 829-868

72. DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; ANTES, F. G.; DRESSLER, V. B L.; FLORES, E. 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.** *Spectrochimica Acta Part B*. 2009, 64(6), 513-519.

73. IZGI, B.; DEMIR, C.; GÜÇER, Ş. **Application of factorial design for mercury determination by trapping and graphite furnace atomic absorption spectrometry.** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2000, 55(7), 971-977.

74. RIVARO, P.; IANNI, C.; SOGGIA, F.; FRACHE, R. **Mercury speciation in environmental samples by cold vapour atomic absorption spectrometry with in situ preconcentration on a gold trap.** *Microchimica Acta*. 2007, 158(3-4), 345-352.

75. TORRES, D. P.; DITTERT, I. M.; HÖHN, H.; FRESCURA, V. L.; CURTIUS, A. J. **Determination of mercury in gasoline diluted in ethanol by GF AAS after cold vapor generation, pre-concentration in gold column and trapping on graphite tube.** *Microchemical Journal*. 2010, 96(1), 32-36.

76. BRANDÃO, G. P.; CAMPOS, R. C.; LUNA, A. S. **Determination of mercury in gasoline by cold vapor atomic absorption spectrometry with direct reduction in microemulsion media.** *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2005, 60(5), 625-631.

77. CARRIER, G.; BOUCHARD, M.; BRUNET, R. C.; CAZAB M. **Toxicokinetic Model for Predicting the Tissue Distribution and Elimination of Organic and Inorganic Mercury Following Exposure to Methyl Mercury in Animals and Humans. II. Application and Validation of the Model in Humans.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001, 171(1), 50–60.

78. FRIBERG, L. **Studies on the Accumulation, Metabolism and Excretion of Inorganic Mercury ( $\text{Hg}^{203}$ ) after prolonged Subcutaneous Administration to Rats.** *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. 1956, 12(4), 411–427.
79. GUILHERMINA, G.; ADRIANA, T. M.; MONICA, E. M. **The implication of renal glutathione levels in mercuric-chloride nephrotoxicity.** *Toxicology*, 1989, 58(2), 187-195.
80. ERCAL, N., GURER-ORHAN, H., & AYKIN-BURNS, N. **Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage.** *Current topics in medicinal chemistry*, 2001, 1(6), 529-539.
81. ZALUPS, R. K. **Reductions in renal mass and the nephropathy induced by mercury.** *Toxicology And Applied Pharmacology*, 1997, 143(2), 366-379.