

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARLA FERNANDA GRASEL FROIS

Otimização multivariada de métodos para a determinação de mercúrio em peixe utilizando técnicas de geração de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica

Porto Alegre 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARLA FERNANDA GASEL FROIS

Otimização multivariada de métodos para a determinação de mercúrio em peixe utilizando técnicas de geração de vapor acopladas à espectrometria de absorção atômica

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Profa. Dra. Márcia Messias da Silva

Orientadora

Dr. Wiliam Boschetti

Coorientador

Porto Alegre 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Max e Claudete, aos meus irmãos, Caroline “Nini”, Dudu e Gabriel e aos meus cunhados Jéssica e Marcos por todo suporte, incentivo e compreensão.

À professora Dra. Márcia Messias da Silva, pela orientação e apoio, e por ter acreditado em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Wiliam Boschetti, por toda ajuda e incentivo, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Dra. Mariana Potes “Mari”, por todos os ensinamentos; pela paciência e apoio desde o início da iniciação científica.

À Deninha, por toda ajuda fornecida durante o trabalho.

Às professoras Maria Goreti Rodrigues Vale e Morgana Dessuy, pela ajuda e por terem fornecido todas as condições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas e amigos do Grupo de Análise de Traços: Álvaro, Carol, Eliseu, Ingrid, Leandro, Léo, Nati, Paola, Rafa, Susane, Thais e Xicó.

À todas pessoas que estiveram comigo, me apoiando e incentivando, durante esses anos. E também àquelas que conheci e convivi durante os anos de graduação.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1 MERCÚRIO .....	2
2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO.....	3
2.2.1 Espectrometria de absorção atômica .....	4
2.2.2 Geração química de vapor acoplada à técnicas espectrométricas .....	5
2.2.3 Geração fotoquímica de vapor acoplada à técnicas espectrométricas.....	7
2.3 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESTRATÉGIA MULTIVARIADA .....	8
2.3.1 Planejamento fatorial completo .....	9
2.3.2 Metodologia de superfície de Resposta.....	9
2.3.3 Aplicações da estratégia multivariada na otimização de técnicas de geração de vapor ..	10
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	12
3.1 GERAL.....	12
3.2 ESPECÍFICOS .....	12
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	13
4.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	13
4.2 REAGENTES E AMOSTRAS.....	13

4.3 PREPARO DE AMOSTRA .....	14
4.3.1 Determinação de mercúrio em peixe por CV-AAS.....	15
4.3.2 Determinação de mercúrio em peixe por PVG-AAS .....	15
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	15
4.4.1 Geração de vapor frio .....	15
4.4.2 Geração fotoquímica de vapor.....	16
4.5 PROCEDIMENTOS DE OTIMIZAÇÃO .....	17
4.5.1 Otimização univariada.....	17
4.5.2 Otimização multivariada.....	17
4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO.....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA .....	19
5.1.1 Otimização univariada das condições de geração de vapor frio.....	19
5.1.2 Otimização univariadas das condições de geração fotoquímica de vapor.....	22
5.1.3 Parâmetros de mérito .....	25
5.2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	27
5.2.1 Otimização multivariada das condições de geração de vapor frio .....	27
5.2.2 Otimização multivariada das condições de geração fotoquímica de vapor.....	32
5.2.3 Parâmetros de mérito .....	36
5.3 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PEIXE .....	37
5.3.1 Preparo de amostra .....	37
5.3.2 Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão dos métodos.....	39
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>

## RESUMO

O emprego das técnicas de geração de vapor frio (CV) e geração fotoquímica de vapor (PVG), para conversão de Hg em vapor atômico a temperatura ambiente e posterior detecção por espectrometria de absorção atômica (AAS), é uma das estratégias mais empregadas para a determinação desse elemento em nível de traços. Neste trabalho foi realizada a otimização de métodos analíticos para determinação de Hg em peixe pelas técnicas de CV-AAS e PVG-AAS. As variáveis vazão de solução carreadora, vazão de gás de arraste, concentração de ácido fórmico (para a PVG) e concentração de HCl e NaBH<sub>4</sub> (para a CV), foram otimizadas empregando estratégias univariadas e multivariadas. Pela comparação das sensibilidades obtidas através da otimização univariada para as duas técnicas, se estimou uma eficiência de 133% para PVG, em comparação a CV. Este fato não é condizente com outros trabalhos reportados na literatura. Deste modo, foi realizada uma otimização multivariada para ambas as técnicas. Os resultados obtidos pela aplicação dos planejamentos experimentais, fatorial completo de dois níveis e de Doehlert, mostraram que as variáveis estudadas apresentaram efeitos de interação, indicando que essa estratégia é mais adequada para a otimização das variáveis. O planejamento experimental resultou na melhora dos parâmetros de mérito para a CV, e em um aumento de 40% na sensibilidade. Porém o LD e o LQ foram superiores aos da PVG. A eficiência da PVG estimada nessas condições foi de 96%. Os métodos otimizados permitiram a determinação simples, exata e precisa de Hg em peixe através das técnicas CV-AAS e PVG-AAS.

## ABSTRACT

The use of cold vapor (CV) and photochemical vapor generation (PVG) techniques, for Hg conversion to atomic vapor at room temperature and subsequent detection by atomic absorption spectrometry (AAS), is one of the most used strategies for the determination of this element at trace levels. In this work analytical methods for Hg determination in fish by CV-AAS and PVG-AAS were optimized. Parameters as carrier solution flow rate, carrier gas flow rate, formic acid concentration (PVG), HCl and NaBH<sub>4</sub> concentrations (CV) were optimized by univariate and multivariate strategies. By comparing the sensitivities obtained through the univariate optimization for the two techniques, an efficiency of 133% was estimated for PVG, compared to CV. This fact is not consistent with other studies reported in the literature. Thus, a multivariate optimization was performed for both techniques. The results obtained by experimental designs (two-level full factorial design and Doehlert matrix design) showed that the studied variables presented interaction effects, indicating that this strategy is more adequate for the optimization of the variables. The experimental design led to enhanced figures of merit for CV, and a 40% increase in sensitivity. However, LD and LQ were higher than those of PVG. The efficiency of the PVG estimated under these conditions was 96%. The optimized methods allowed simple and accurate determination of Hg in fish by CV-AAS and PVG-AAS techniques.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lâmpada de UV (a) e espiral de quartzo (b) usados para a construção do reator fotoquímico na PVG do Hg. ....	14
<b>Figura 2.</b> Esquema do sistema de injeção em fluxo usado para a CV do Hg. ....	16
<b>Figura 3.</b> Esquema do sistema de injeção em fluxo usado para a PVG do Hg. ....	17
<b>Figura 4.</b> Efeito da vazão de Ar na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl: 0,4 mol L <sup>-1</sup> , concentração de NaBH <sub>4</sub> : 0,2% (m/v), vazão de HCl: 6 mL min <sup>-1</sup> . ....	20
<b>Figura 5.</b> Efeito da concentração de HCl na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: NaBH <sub>4</sub> 0,2% (m/v), vazão Ar: 50 mL min <sup>-1</sup> , vazão de HCl: 6 mL min <sup>-1</sup> . ....	21
<b>Figura 6.</b> Efeito da concentração de NaBH <sub>4</sub> na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl: 1 mol L <sup>-1</sup> , vazão Ar: 50 mL min <sup>-1</sup> , vazão de HCl: 6 mL min <sup>-1</sup> . ....	21
<b>Figura 7.</b> Efeito da vazão de HCl na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl: 1 mol L <sup>-1</sup> , concentração de NaBH <sub>4</sub> : 0,1% (m/v), vazão de Ar: 50 mL min <sup>-1</sup> . ....	22
<b>Figura 8.</b> Estudo do efeito da concentração do ácido acético (■), ácido fórmico (▲) e n-propanol (○) a) na absorvância integrada do Hg e b) na absorvância do Hg. Condições experimentais: vazão de Ar: 50 mL min <sup>-1</sup> , vazão do precursor orgânico: 7 mL min <sup>-1</sup> . ....	23
<b>Figura 9.</b> Efeito da vazão de Ar na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de AF: 5% (v/v), vazão de AF: 7 mL min <sup>-1</sup> . ....	24
<b>Figura 10.</b> Efeito da vazão de AF na área (■) e altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de AF: 5% (v/v), vazão de Ar: 40 mL min <sup>-1</sup> . ....	25
<b>Figura 11.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas na CV-AAS, a um nível de confiança de 95%. ....	28
<b>Figura 12.</b> Gráficos de superfícies de resposta para a CV-AAS. ....	31

<b>Figura 13.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas na PVG-AAS, a um nível de confiança de 95%.....	33
<b>Figura 14.</b> Gráficos de superfícies de resposta para a PVG-AAS.....	35
<b>Figura 15.</b> Aspecto das amostras a) antes e b) após diluição de 1:10. Da esquerda para a direita: DOLT-4, músculo de peixe e tecido de atum.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aplicações da estratégia multivariada na otimização da geração de vapor frio. ....	11
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros de mérito instrumentais obtidos para CV e PVG a partir da otimização univariada. ....	27
<b>Tabela 3.</b> Matriz e resultados do planejamento $2^4$ para a CV-AAS. ....	28
<b>Tabela 4.</b> Matriz e resultados do planejamento Doehlert realizado para a CV-AAS. ....	<b>Error!</b>
<b>Bookmark not defined.</b>	
<b>Tabela 5.</b> Condições ótimas encontrada para a CV-AAS empregando as estratégias univariada e multivariada de otimização. ....	31
<b>Tabela 6.</b> Matriz e resultados do planejamento $2^3$ para a PVG-AAS. ....	33
<b>Tabela 7.</b> Matriz e resultados do planejamento Doehlert realizado para a PVG-AAS. ....	34
<b>Tabela 8.</b> Condições ótimas encontrada para a PVG-AAS empregando as estratégias univariada e multivariada de otimização. ....	36
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros de mérito instrumentais obtidos para CV e PVG a partir da otimização multivariada. ....	37
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros de mérito do método para a determinação de Hg por CV-AAS e PVG-AAS. ....	40
<b>Tabela 11.</b> Determinação de Hg em CRM e materiais de referência por CV-AAS e PVG-AAS. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês “ <i>atomic absorption spectrometry</i> ”)
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês “ <i>atomic fluorescence spectrometry</i> ”)
$A_{int}$	Absorvância integrada
CCD	Planejamento composto central (do inglês “ <i>central composite design</i> ”)
CRM	Material de referência certificado (do inglês “ <i>certified reference material</i> ”)
CV	Vapor frio (do inglês “ <i>cold vapor</i> ”)
CVG	Geração química de vapor (do inglês “ <i>Chemical vapor generation</i> ”)
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês “ <i>flame atomic absorption spectrometry</i> ”)
FI	Injeção em fluxo (do inglês “ <i>flow injection</i> ”)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês “ <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> ”)
GLS	Separador gás-líquido (do inglês “ <i>gas-liquid separator</i> ”)
HCL	Lâmpada de catodo oco (do inglês “ <i>hallow cathod lamp</i> ”)
HG	Geração de hidretos (do inglês “ <i>hydride generation</i> ”)
HR-CS-GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (do inglês “ <i>high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> ”)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês “ <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> ”)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês “ <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> ”)
LD	Limite de detecção
LMWC	Composto orgânico de baixo peso molecular (do inglês “ <i>low molecular weight organic compound</i> ”)
LQ	Limite de quantificação

LS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês “ <i>line source atomic absorption spectrometry</i> ”)
PBD	Planejamento Plackett-Burman (do inglês “ <i>Plackett-Burman Design</i> ”)
PVG	Geração fotoquímica de vapor (do inglês “ <i>photochemical vapor generation</i> ”)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês “ <i>relative standard deviation</i> ”)
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês “ <i>responce surface methodology</i> ”)
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (do inglês “ <i>tetramethylammonium hydroxide</i> ”)

## 1. INTRODUÇÃO

O mercúrio é considerado um metal potencialmente tóxico e um poluente ambiental que pode causar diversos prejuízos à saúde mesmo em baixas concentrações. No ambiente aquático, o Hg inorgânico sofre metilação por ação de microrganismos e é acumulado ao longo da cadeia alimentar como metilmercúrio ( $\text{MeHg}^+$ ). Isso faz com que o consumo de frutos do mar seja a principal forma de exposição do ser humano ao Hg. Em contrapartida, esses alimentos são fontes de proteínas, minerais e ácidos graxos essenciais, dessa forma, é importante que façam parte da nossa alimentação. Assim, a legislação brasileira estabelece que a concentração máxima de Hg permitida em peixe seja de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (para presas) e de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (para predadores).

A determinação de Hg é comumente feita através de geração de vapor frio, usando a espectrometria de absorção atômica (CV-AAS) ou espectrometria de fluorescência atômica (CV-AFS) como sistema de detecção. Uma alternativa ao uso da CV consiste na utilização da geração fotoquímica de vapor (PVG) como técnica de introdução de amostra.

As técnicas de geração de vapor como a CV e a PVG se baseiam na conversão do analito em uma espécie volátil previamente a sua introdução no atomizador. Em comparação com outras técnicas de introdução de amostra a CV e a PVG apresentam algumas vantagens, pois permitem a introdução de maiores volumes de amostra (conferindo maior sensibilidade e menores limites de detecção), tem eficiência de transporte de analito de cerca de 100% e apresentam menor risco de interferências, uma vez que o analito é separado da matriz.

A otimização das condições de geração de vapor dessas técnicas geralmente é feita de forma univariada, na qual as variáveis são estudadas individualmente, sem considerar que haja interação entre elas. Como resultado as condições otimizadas podem não corresponder às condições ótimas para a técnica. Nesse sentido, empregar estratégias de otimização multivariadas, nas quais as variáveis são estudadas simultaneamente, observando-se possíveis interações entre as mesmas, pode ser uma alternativa vantajosa.

Neste trabalho, as técnicas de geração química de vapor e geração fotoquímica de vapor, acopladas à espectrometria de absorção atômica (CV-AAS e PVG-AAS) foram empregadas na determinação de Hg em peixe. A otimização das condições experimentais para geração de vapor foi realizada através do uso das estratégias univariada e multivariada.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MERCÚRIO

O mercúrio é considerado um metal potencialmente tóxico que pode ocorrer na natureza nas formas elementar ( $\text{Hg}^0$ ), iônica ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Hg}_2^{2+}$ ), e nas formas orgânicas, onde o Hg está ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo as mais comuns o metilmercúrio ( $\text{MeHg}^+$ ) e o dimetilmercúrio ( $(\text{Me})_2\text{Hg}$ ). É conhecido que as formas orgânicas de Hg apresentam maior toxicidade que as inorgânicas devido à maior lipofilicidade desses compostos, facilitando a sua absorção pela pele.<sup>1, 2</sup> Além disso, o cátion metilmercúrio tem grande afinidade por grupos aniônicos contendo enxofre, em especial ao grupo tiol (-SH) que está presente em aminoácidos como a cisteína (Cys). O complexo  $\text{MeHg-Cys}$  formado é reconhecido por proteínas de transporte, como a metionina, e é transportado livremente pelo corpo, inclusive através da barreira hematoencefálica e da placenta. Devido ao fato de se ligar fortemente a essas proteínas o  $\text{MeHg}^+$  não é liberado rapidamente do organismo, tendo um tempo de meia vida no sangue humano de cerca de 50 dias.<sup>3</sup>

Uma vez no organismo a ação tóxica dos compostos de Hg pode ocorrer por diversos mecanismos, dependendo da forma química absorvida, da dose e da frequência de exposição<sup>4</sup>. Entre os prejuízos à saúde decorrentes da exposição ao Hg estão danos ao sistema nervoso central, doenças cardiovasculares, renais, pulmonares, autismo, má formação de feto e infertilidade.<sup>5</sup>

As espécies de  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$  e  $(\text{Me})_2\text{Hg}$  podem ser facilmente interconvertidas pelo ciclo biogeoquímico do Hg, que envolve o transporte do Hg pela atmosfera, sua deposição em sedimentos de oceanos, e sua revolatilização.<sup>6</sup> O  $\text{Hg}^0$  na forma de vapor é liberado naturalmente na atmosfera por atividades vulcânicas e geológicas. Porém, atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis, mineração, processos industriais, entre outros, são a principal fonte de emissão de Hg na atmosfera.<sup>7</sup> O  $\text{Hg}^0$  presente na atmosfera é oxidado a  $\text{Hg}^{2+}$  (forma mais solúvel) que é depositada em sedimentos de oceanos, essa espécie de Hg pode seguir três caminhos: i) Permanecer depositada no fundo dos oceanos na forma pouco solúvel de  $\text{HgS}$ ; ii) ser reduzida, formando novamente  $\text{Hg}^0$  que será reemitido para a atmosfera reiniciando o ciclo; e iii) ser convertida em  $\text{MeHg}^+$  e  $(\text{Me})_2\text{Hg}$  por ação de bactérias e microorganismos.<sup>6, 8</sup>

A conversão de espécies inorgânicas em espécies metiladas é a primeira etapa nos processos de bioacumulação e biomagnificação do Hg no ambiente aquático. O  $\text{MeHg}^+$

formado pode ser consumido por peixes que ocupam posições baixas na cadeia alimentar, resultando na acumulação de  $\text{MeHg}^+$  em seus músculos e tecidos, através de um processo chamado bioacumulação. Esse primeiro processo, pode levar a biomagnificação do  $\text{MeHg}^+$  ao longo da cadeia alimentar, isso ocorre quando peixes predadores se alimentam de presas que já tenham  $\text{MeHg}^+$  bioacumulado em seus músculos ou tecidos.<sup>2, 6</sup> Esses processos conferem aos peixes do topo da cadeia alimentar uma concentração de  $\text{MeHg}^+$  cerca de 100.000 vezes maior que o meio aquático ao seu redor.<sup>9</sup>

## 2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

A determinação de Hg em amostras biológicas geralmente é feita empregando técnicas espectrométricas. As técnicas com plasma indutivamente acoplado (ICP OES e ICP-MS) possuem a vantagem de permitir a análise multielementar, porém, nem sempre os parâmetros instrumentais utilizados estão nas condições otimizadas para todos os analitos; sendo ainda, muito suscetíveis a interferências espectrais e de matriz, apresentando alto custo nas análises. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) é uma alternativa de menor custo, e por ser uma técnica monoelementar permite a utilização de condições instrumentais ótimas para cada analito. No entanto, a análise de matrizes complexas pode ser problemática, devido ao efeito de matriz e a volatilidade do Hg.<sup>10</sup>

A introdução de amostra nesses equipamentos pode ser realizada de diferentes modos, dependendo, principalmente, do seu estado físico. Nas técnicas como a ICP OES e ICP-MS a amostra a ser analisada é convertida em um aerossol, sendo que apenas 3-5% da amostra introduzida chega ao atomizador, o que resulta em perda de sensibilidade. Além disso, existe a necessidade das amostras estarem em solução, sendo que na maioria dos casos é imprescindível uma etapa prévia de preparo de amostra. Na GF AAS o mesmo pode ser necessário para eliminar o efeito de matriz na análise de amostras complexas.

Alternativamente, essas técnicas espectrométricas podem ser acopladas à técnicas de geração de vapor. Estas técnicas consistem na conversão do analito em uma espécie volátil, previamente a sua introdução no sistema de detecção. As técnicas mais utilizadas para isso são a geração química de vapor (CVG) e a geração fotoquímica de vapor (PVG).

As técnicas de geração de vapor têm como vantagens: i) a separação prévia do analito da matriz, minimizando possíveis interferências; ii) a alta eficiência de transporte do analito (aproximadamente 100% do analito presente na amostra pode ser convertido em espécies voláteis), conferindo a essas técnicas alta sensibilidade; iii) os melhores limites de detecção e

quantificação, já que as técnicas possibilitam a introdução de maiores volumes de amostra no sistema; iv) a possibilidade de pré-concentração do analito, dependendo do sistema utilizado; e v) a possibilidade de estudos de especiação devido aos diferentes comportamentos do analito em função do seu estado de oxidação, e também com acoplamento de diferentes técnicas de detecção, como ICP-MS, ICP OES, GF AAS e espectrometria de fluorescência atômica (AFS).<sup>11, 12</sup>

A determinação de Hg utilizando técnicas de geração de vapor acopladas a AAS ou AFS possui a vantagem de permitir sua detecção em temperatura ambiente, sem a necessidade de uma etapa de atomização para a formação de átomos gasosos de Hg no estado fundamental. Isso é possível devido à alta pressão de vapor do Hg, permitindo sua redução a vapor atômico em temperatura ambiente.<sup>13</sup> Assim, existem sistemas comerciais específicos para determinação de Hg (Analisadores de Hg), que utilizam a geração química de vapor para conversão do Hg em vapor atômico, e posterior detecção baseada nos princípios da AAS ou da AFS. Os Analisadores de Hg são uma alternativa aos equipamentos comerciais de AAS e AFS, por possuírem uma instrumentação mais simples e de baixo custo. Os mesmos Analisadores de Hg comerciais podem ser usados com PVG, porém, nesse caso é necessário o acoplamento de um reator fotoquímico.

### **2.2.1 Espectrometria de absorção atômica**

A AAS se baseia na propriedade de que átomos livres (gasosos) absorvem a energia emitida por uma fonte de radiação eletromagnética, passando de um estado eletrônico de menor energia (fundamental) para um estado eletrônico de maior energia (excitado). A relação entre a atenuação da radiação eletromagnética resultante da absorção atômica, e a concentração de átomos no estado fundamental é fornecida pela lei de Lambert-Beer (Equação 1). Nessa equação  $A$  é a absorvância;  $I_0$  e  $I_t$  as intensidades de radiação emitida e transmitida (ou não absorvida), respectivamente;  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar do meio;  $b$  é o comprimento do caminho óptico; e  $c$  é a concentração de átomos no estado fundamental.<sup>13, 14</sup>

$$A = \log I_0/I_t = \epsilon bc \qquad \text{Equação 1}$$

Os componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica são: a fonte de radiação, o atomizador, o monocromador e o detector.

Nos espectrômetros de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS) a fonte de radiação consiste de uma lâmpada que emite um comprimento de onda específico do analito de interesse, sendo a lâmpada de cátodo oco (HCL) a mais utilizada, tornando a técnica monoelementar.<sup>13, 14</sup> Em alguns modelos de Analisadores de Hg a fonte de radiação empregada pode consistir em uma lâmpada de baixa pressão de Hg.

A radiação emitida passa pelo atomizador, onde os átomos gasosos no estado fundamental irão absorver parte da radiação, passando para o estado excitado. Em AAS a atomização do analito pode ser promovida na chama, no forno de grafite ou na cela de quartzo. Nos dois primeiros casos a atomização ocorre por dissociação térmica, devido às altas temperaturas empregadas (até 3000 °C). Na cela de quartzo, como temperaturas menores são empregadas (~ 900 °C) a atomização não ocorre devido à dissociação térmica e sim através de colisões do analito com radicais H•. O tubo de quartzo é utilizado como atomizador especificamente quando as técnicas de geração de vapor são usadas para introdução da amostra. E no caso do Hg, como é gerado vapor atômico a temperatura ambiente, a cela de quartzo é empregada como uma cela de absorção, sendo aquecida a baixas temperaturas (~ 50 °C), apenas para evitar a condensação do vapor.<sup>13, 14</sup>

O monocromador tem como função isolar a linha analítica de interesse das demais linhas de emissão (p ex. emitidas pelo atomizador). Em LS AAS isso é realizado principalmente, com o uso de redes de difração, nas quais a radiação é decomposta em discretos comprimentos de onda.<sup>13, 14</sup> No entanto, alguns modelos de Analisadores de Hg não possuem o monocromador como componente, tornando o instrumento ainda mais simples. Isso é possível, pois na determinação de Hg por CV-AAS não é necessária a etapa de atomização e, assim, a emissão de linhas espectrais diferentes da linha analítica é minimizada.

Por fim o detector irá converter a radiação recebida em sinal elétrico. Os detectores mais comumente empregados são as fotomultiplicadoras.<sup>13, 14</sup>

### **2.2.2 Geração química de vapor acoplada à técnicas espectrométricas**

A CVG pode ser dividida em duas técnicas, a geração de hidretos (HG) e a geração de vapor frio (CV). Ambas as técnicas se baseiam na conversão do analito em átomos ou moléculas voláteis, previamente a sua introdução no atomizador, utilizando para isso agentes redutores, como NaBH<sub>4</sub>, em meio ácido. As espécies voláteis formadas são separadas da matriz, que fica na fase líquida, em um separador gás-líquido (GLS) e carregadas até o atomizador por um gás de arraste. A técnica é seletiva ao analito em um estado de oxidação específico. Assim, é necessária a digestão das amostras, para liberar o analito de suas formas

orgânicas, e em alguns casos uma etapa de pré-redução antes das análises. A HG é empregada na determinação de elementos formadores de hidretos, caso do As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn, Te e Tl. A CV é empregada para elementos que são reduzidos a espécies atômicas, como o Hg e o Cd. Nesse caso, os analitos podem ser quantificados a temperatura ambiente, sem a necessidade de utilizar instrumentos de maior complexidade.<sup>11, 12</sup>

A geração de vapor do analito pode ser feita a partir de três sistemas diferentes: sistema em batelada, em fluxo contínuo (CF) ou de injeção em fluxo (FI). Na injeção em fluxo, a amostra e os reagentes são introduzidos no sistema através de uma bomba peristáltica. A solução carreadora e os reagentes são bombeados continuamente, e um volume discreto de amostra é introduzido com o auxílio de uma válvula de injeção no fluxo de solução carreadora. Sinais transientes, cuja forma é dependente da dispersão do analito na solução carreador, são gerados nesse sistema.<sup>11, 14</sup>

Devido à simplicidade e as demais vantagens citadas anteriormente, CV tem sido muito utilizada para a determinação de Hg, sendo acoplada a diferentes sistemas de detecção. Segue abaixo a descrição de alguns trabalhos utilizando Analisadores de Hg, baseados na conversão de Hg a vapor atômico e posterior detecção por AAS ou AFS.

Silva *et al.*<sup>15</sup> desenvolveram um método para determinação de Hg em arroz por CV-AFS. A redução do Hg a vapor atômico foi realizada com SnCl<sub>2</sub>, e o preparo das amostras consistiu em digestão em microondas, utilizando HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O LD do método foi de 0,9 ng g<sup>-1</sup>.

Voegborlo *et al.*<sup>16</sup> investigaram diferentes preparos de amostra para a determinação de Hg em tecido de peixe por CV-AAS. As abordagens consistiram na digestão por via úmida em sistema aberto, e fatores como temperatura e tempo de decomposição foram otimizados. O procedimento empregando uma mistura de HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HClO<sub>4</sub> resultou em melhor precisão e exatidão. O LD obtido para o método foi de 0,6 ng g<sup>-1</sup>.

Kan *et al.*<sup>17</sup> desenvolveram um método para a determinação de Hg total em amostras biológicas por CV-AAS, utilizando um sistema de pré-concentração do analito em uma coluna de ouro. Antes das análises as amostras foram solubilizadas com ácido fórmico, e as espécies orgânicas de Hg foram convertidas em Hg<sup>2+</sup> pela adição de uma mistura de KBrO<sub>3</sub> e KBr. O LD obtido para o método foi de 1,0 ng g<sup>-1</sup>

Nesses trabalhos os autores investigaram principalmente os preparos de amostras, procurando estratégias mais simples e de baixo custo. Nesse sentido, poucos estudos foram

realizados com relação à otimização das condições experimentais de geração de vapor (p.ex. concentração e vazão dos reagentes).

### 2.2.3 Geração fotoquímica de vapor acoplada à técnicas espectrométricas

A radiação ultravioleta tem sido empregada desde a década de 60 no preparo de amostras, servindo para eliminar a matriz através da foto-oxidação da matéria orgânica, atuando na conversão dos analitos em espécies iônicas, ou na sua foto-redução. Isso é possível, uma vez que a radiação UV fornece energia suficiente para a clivagem homolítica de ligações químicas.<sup>18</sup>

Guo *et al.*<sup>19</sup> foram os primeiros autores a relatar o uso da radiação ultravioleta para a conversão do analito em espécies voláteis e posterior introdução no sistema de detecção, em 2003. Neste caso, a geração de vapor do analito ocorre a partir de uma reação fotoquímica, pela interação de um precursor orgânico com a radiação ultravioleta, formando radicais que reduzem o analito a uma espécie volátil. O precursor orgânico empregado é geralmente um composto orgânico de baixo peso molecular, sendo os ácidos carboxílicos os mais empregados. Aldeídos e álcoois também já foram empregados com sucesso na PVG, porém, na literatura é sugerido que esses compostos são foto-oxidados aos seus respectivos intermediários ácidos carboxílicos, que então seguem um caminho reacional de formação de radicais comum a todos ácidos carboxílicos.<sup>20, 21</sup>

A PVG é uma técnica alternativa a CVG, podendo ser acoplada aos mesmos sistemas de detecção (AAS, AFS, ICP-MS, ICP OES). Além disso, apresenta algumas vantagens: i) utiliza apenas reagentes simples, geralmente compostos orgânicos de baixo peso molecular (LMWC), favorecendo a química verde e dispensando o uso de agentes redutores caros e instáveis como o NaBH<sub>4</sub>, cuja solução precisa ser preparada diariamente e pode ser fonte de contaminações; ii) é menos suscetível a interferência por metais de transição, como Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup> que atuam como catalisadores decompondo os hidretos formados; ou reagem com o NaBH<sub>4</sub> consumindo esse reagente e formando colóides que dificultam o processo de liberação do analito para a fase vapor.<sup>20, 21</sup>

Desde o primeiro trabalho relatando o uso da PVG para a conversão do analito em espécies voláteis, as potencialidades da técnica como uma alternativa à geração química de vapor tem sido extensamente investigadas. No entanto, mesmo com as vantagens de custo e simplicidade, não foram encontrados trabalhos reportando o acoplamento da PVG aos Analisadores de Hg.

Chen *et al.*<sup>22</sup> propuseram o uso da PVG para a especiação de Hg ( $\text{MeHg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em amostras de óleo de peixe, se baseando nos diferentes comportamentos das espécies do analito frente a radiação UV. A partir da exposição das amostras à radiação UV menos energética (311 nm) foi determinada a concentração de  $\text{Hg}^{2+}$ , enquanto empregando radiação UV mais energética (254 nm) foi possível formar espécies voláteis a partir de  $\text{MeHg}^+$  e determinar a concentração de Hg total nas amostras. A possibilidade de reduzir espécies orgânicas de Hg a vapor atômico pela PVG já foi reportada por outros autores.<sup>23-25</sup>

Lisboa *et al.*<sup>25</sup> compararam o emprego da PVG e da CV (utilizando  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{SnCl}_2$  como agente redutor) na geração de vapor do Hg a partir de amostras de glicerina. A sensibilidade da PVG foi inferior as obtidas pela CV, correspondendo a 60% e 78% das sensibilidades encontradas com  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{SnCl}_2$ , respectivamente. Apesar disso, foram obtidos bons limites de detecção para a técnica. Os valores instrumentais calculados foram, 0,12; 0,11 e 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$  para PVG e CV, com  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{SnCl}_2$ , respectivamente.

Liu *et al.*<sup>26</sup> desenvolveram um método para determinação direta de Hg em vinagre branco, utilizando a própria matriz (ácido acético) como precursor orgânico, sem a necessidade de preparo de amostra. Variáveis como, concentração de ácido acético, vazão de gás de arraste e tempo de exposição da amostra a radiação UV foram otimizadas de forma univariada.

### 2.3 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR ESTRATÉGIA MULTIVARIADA

Na otimização de métodos analíticos se busca encontrar as condições experimentais das variáveis que resultam na maior resposta possível, garantindo ao método maior sensibilidade e melhores parâmetros analíticos.<sup>27</sup> Nesse sentido, estratégias univariadas de otimização são as mais empregadas. Essa estratégia consiste em avaliar individualmente a influência de cada variável sobre a resposta experimental. Para isso, enquanto uma variável é estudada as demais são mantidas em uma condição fixa. No entanto, quando otimizações univariadas são empregadas, não são considerados os efeitos de interação entre as variáveis, tornando, em muitos casos, difícil encontrar as condições ótimas para o sistema, o que constitui a principal desvantagem dessa estratégia de otimização.<sup>28, 29</sup> Atualmente as estratégias de otimização multivariada têm sido muito empregadas para contornar esses problemas, uma vez que permite otimizar simultaneamente as variáveis. Essas estratégias consistem na obtenção de modelos matemáticos que permitem avaliar se as variáveis estudadas são estatisticamente significativas, e se há efeitos de interação entre elas.<sup>30</sup> O

procedimento para a otimização multivariada de um método pode ser dividida em duas partes: i) Realização de um experimento de triagem, para avaliar de forma prévia quais das variáveis estudadas tem influência significativa na resposta. O planejamento fatorial completo de dois níveis é o mais empregado para esse objetivo;<sup>31</sup> ii) emprego da metodologia de superfície de resposta para a determinação das condições experimentais ótimas.<sup>31, 32</sup>

### **2.3.1 Planejamento fatorial completo**

Planejamentos fatoriais completos são geralmente empregados como análise exploratória do sistema a ser otimizado, servindo para avaliar a influência das variáveis investigadas sobre a resposta. Nesse tipo de planejamento as variáveis são estudadas em pelo menos dois níveis, representados por (+1) para o nível superior, e (-1) para o nível inferior. Um ponto central (0), no qual todas as variáveis estão em um valor médio entre o nível superior e inferior, também pode ser incluído no planejamento. A inclusão desse ponto no planejamento permite estimar o erro experimental sem a necessidade de realizar repetições de todo planejamento, e fornece informações sobre a curvatura dos dados experimentais.<sup>32, 33</sup>

Os planejamentos fatoriais podem ser representados por  $b^n$ , na qual  $b$  representa a quantidade de níveis em que a variável é estudada e  $n$  representa o número de variáveis. O caso mais simples consiste em avaliar as  $n$  variáveis em dois níveis, o que resulta em  $2^n$  experimentos. Dessa forma, o número de experimentos necessários para realizar um planejamento  $2^n$  completo aumenta rapidamente com  $n$ .<sup>33</sup> Quando se trabalha com muitas variáveis (geralmente mais de quatro variáveis) os planejamentos fatoriais completos resultam em um grande número de experimentos, e possivelmente nem todas variáveis irão afetar significativamente a resposta. Nesse caso, uma alternativa para a triagem inicial de muitas variáveis consiste nos planejamentos fatoriais incompletos ( $2^{n-1}$  ou fracionários) ou planejamentos Plackett-Burman (PBD).<sup>32, 33</sup>

### **2.3.2 Metodologia de superfície de Resposta**

A metodologia de superfície de resposta (RSM) consiste em um conjunto de técnicas multivariadas que permite o estabelecimento das condições ótimas para as variáveis estudadas a partir do ajuste de modelos matemático aos dados experimentais obtidos. Qualquer tipo de modelo matemático pode ser utilizado para ajustar os dados, entretanto os planejamentos mais empregados consistem na obtenção de polinômios de segundo grau para descrever a resposta em função das variáveis. Esse tipo de ajuste é mais adequado quando os dados experimentais

apresentam curvatura, e apresentam como vantagem a possibilidade de determinar matematicamente as condições ótimas das variáveis, a partir da localização dos pontos críticos de máximo e de mínimo. Os planejamentos experimentais mais utilizados para isso são: o planejamento fatorial de três níveis ( $3^n$ ), o Box-Behnken, o composto central (CCD) e a matriz de Doehlert.<sup>29 - 31, 34</sup>

O planejamento Doehlert apresenta algumas vantagens com relação aos demais planejamentos de segunda ordem, sendo as principais:

(1) Apresenta uma eficiência maior, possibilitando otimizar o mesmo número de variáveis com uma quantidade reduzida de experimentos. O número de experimentos (N) necessário para otimizar as variáveis é dado pela equação  $N = k^2 + k + PC$ , na qual  $k$  é o número de variáveis e  $PC$  é o número de repetições no ponto central.<sup>29, 35</sup>

(2) Permite o estudo das variáveis em níveis diferentes, assim uma variável que apresenta maior efeito sobre a resposta ou tem um amplo domínio experimental, pode ser estudada em mais níveis, de modo a se obter mais informações sobre seu comportamento. Na otimização de três variáveis elas são estudadas em 3, 5 e 7 níveis.<sup>29, 35</sup>

(3) Devido à distribuição uniforme dos pontos experimentais no espaço, o deslocamento do planejamento pode ser feito aproveitando-se pontos do planejamento inicial, o que confere a esse planejamento grande mobilidade.<sup>29, 35</sup>

### **2.3.3 Aplicações da estratégia multivariada na otimização de técnicas de geração de vapor**

A Tabela 1 apresenta algumas aplicações dos planejamentos de triagem das variáveis e da metodologia de superfície de resposta na otimização de métodos analíticos para determinação de Hg por CV, acoplada a diferentes sistemas de detecção. Porém, em nenhum dos trabalhos reportados foi utilizado Analisadores de Hg.

O emprego da abordagem multivariada para a CV geralmente é feito buscando as condições ótimas de geração de vapor, e por isso as variáveis otimizadas normalmente são a vazão de gás de arraste, a vazão de solução carreadora e a concentração de agentes redutores.

Para a PVG, até o momento apenas um trabalho foi encontrado na literatura empregando a abordagem multivariada para a determinação das condições ótimas de geração de vapor. Gao *et al.*<sup>36</sup> empregaram os planejamentos experimentais PBD e CCD na otimização de método para a determinação de As por PVG-ICP-MS. As variáveis avaliadas

foram a concentração de ácido fórmico e ácido acético (precursores orgânicos), a vazão de Ar e a vazão de amostra.

**Tabela 1.** Aplicações da estratégia multivariada na otimização da geração de vapor frio.

<b>Analitos</b>	<b>Técnica</b>	<b>Planejamento</b>	<b>Parâmetros<sup>a</sup></b>	<b>Ref.</b>
Hg	FI-CVG-ICP OES	$2^{5-1}$ , $2^4$	[HCl], [NaBH <sub>4</sub> ], V <sub>HCl</sub> , V <sub>NaBH<sub>4</sub></sub> , V <sub>Ar</sub>	37
Hg	CVG-GF AAS	PBD, CCD	[HCl], [NaBH <sub>4</sub> ], V <sub>Ar</sub> , Tc, Ta, tc, tamanho partícula, volume de ácido.	38
Hg, As, Sb, Se, Sn	FI-CVG-ICP OES	$2^3$	Potência, V <sub>reagentes</sub> , V <sub>Ar</sub>	39
Hg	CVG-AFS	$2^3$	[SnCl <sub>2</sub> ], [HNO <sub>3</sub> ], V <sub>Amostra</sub>	40
Hg, Se	CVG-AFS	$2^3$ , Doehlert	[NaBH <sub>4</sub> ], [HNO <sub>3</sub> ], V <sub>Ar</sub>	41
Hg, As, Sb, Bi, Ge, Sn, Se, Te	CVG-ICP OES	CCD	[NaBH <sub>4</sub> ], [HCl], V <sub>Ar</sub>	42
Hg	CVG-ICP OES	$2^4$	Potência, V <sub>Ar</sub> , [NaBH <sub>4</sub> ], [HCl]	43
Sb, Bi, Sn, Hg	FIA-SPE-CVG-HR-CS-GFAAS	CCD	V <sub>eluente</sub> , V <sub>amostra</sub> [eluente] e [NaBH <sub>4</sub> ]	44
As, Se, Hg	CVG-ICP OES	PBD, CCD	[NaBH <sub>4</sub> ], [HCl], V <sub>reagentes</sub>	45

<sup>a</sup>V<sub>a</sub>: Vazão do reagente *a*, Tc: temperatura de coleta, Ta: temperatura de atomização, tc: tempo de coleta.

Fonte: O autor

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral a otimização de métodos analíticos para a determinação de mercúrio em peixe utilizando as técnicas de geração de vapor frio (CV) e geração fotoquímica de vapor (PVG), acopladas à espectrometria de absorção atômica.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o emprego da área e altura do pico como resposta analítica;
- Realizar estudos de otimização univariada das condições experimentais dos sistemas de geração de vapor (vazão de gás de arraste, vazão de solução carreadora, concentração de precursor orgânico (para a PVG) e concentração de HCl e NaBH<sub>4</sub> (para a CV));
- Realizar estudos de otimização multivariada das mesmas condições experimentais de geração de vapor;
- A partir das condições otimizadas para as duas técnicas construir curvas de calibração com padrões de Hg em meio aquoso e obter os parâmetros de mérito (limites de detecção e quantificação e massa característica);
- Comparar os parâmetros de mérito obtidos a partir das duas estratégias de otimização e compará-los quanto aos limites estabelecidos pela legislação brasileira;
- Estimar a eficiência da geração fotoquímica de vapor através da sua comparação com a geração de vapor frio;
- Avaliar a exatidão e precisão dos resultados obtidos após as otimizações.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todas as medidas foram feitas utilizando um analisador de mercúrio (FIMS 400, Perkin Elmer, EUA), equipado com uma cela de absorção de quartzo de 24 cm e uma lâmpada de baixa pressão de Hg, emitindo em 253,7 nm, como fonte de radiação. Para controlar a vazão do gás de arraste (argônio) foram empregados dois controladores de fluxo mássico de gases, o primeiro de 0 - 1000 mL min<sup>-1</sup> modelo FMA5400A/5500A Series (Omega Engineering, Stanford, EUA), e o segundo de 0 - 50 mL min<sup>-1</sup> modelo 32907-57 (Cole Palmer, Vernon Hills, EUA).

Para o preparo das amostras pela CV foi empregado um bloco digestor (Marconi, Piracicaba, Brasil), além de tubos de vidro e um sistema de refluxo utilizando dedo frio.

A geração fotoquímica de vapor do Hg foi realizada empregando-se uma lâmpada de Hg de 18 W - 4 pinos, com comprimento de onda de 254 nm, modelo TUV PL-L (Philips, Pila, Polônia). Ao redor da lâmpada de Hg, foi inserido um percurso analítico confeccionado de quartzo em forma de espiral com as seguintes dimensões: 115 cm de comprimento x 1,3 mm de diâmetro interno x 3,0 mm de diâmetro externo e volume interno de 2,3 mL. A lâmpada de Hg e a espiral de quartzo utilizada estão apresentadas nas Figuras 1a e 1b, respectivamente.

Para o preparo das amostras para a PVG foi utilizado um banho ultrassônico Q 5.9/37A (Ultronique, Campinas, Brasil).

Para a pesagem das amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica Europe modelo EU60 (Gibertini Elettronica, Milão, Itália).

As medidas foram avaliadas tanto no modo área (resultando em um sinal analítico de absorvância integrada) como no modo altura (resultando em um sinal analítico de absorvância).

### 4.2 REAGENTES E AMOSTRAS

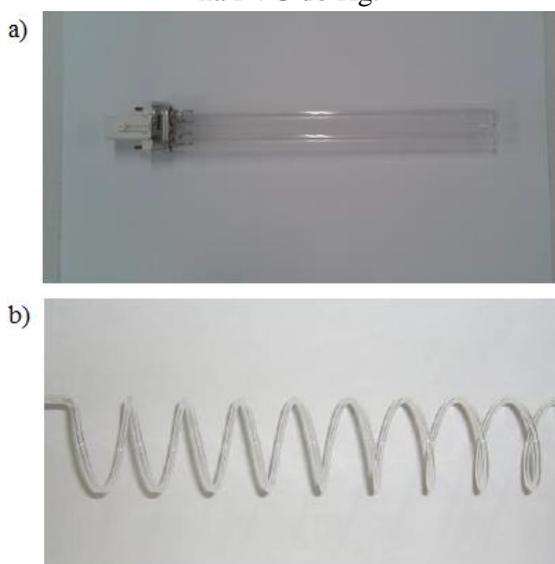
Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Soluções de mercúrio inorgânico foram preparadas diariamente a partir da diluição de uma solução intermediária de 1 mg L<sup>-1</sup> em HNO<sub>3</sub> 0,014 mol L<sup>-1</sup>, esta preparada pela diluição da solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> de mercúrio (Sigma Aldrich, Munique, Alemanha). As soluções padrão e amostras foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade 18.2 MΩ cm) obtida de um sistema

de purificação de água Milli-Q® (Millipore, Massachusetts, EUA). Ácido clorídrico e ácido nítrico (Synth, São Paulo, Brasil) foram destilados em um sistema de destilação sub-boiling de quartzo (Marconi, Piracicaba, Brasil). Para a limpeza das vidrarias e frascos utilizados as mesmas foram mantidas imersas por pelo menos 24h em uma solução de HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup>, e em seguida foram enxaguadas pelo menos três vezes com água ultrapura.

Para a geração de vapor frio, tetrahidroboreto de sódio (Acros Organic, Geel, Bélgica) estabilizado com hidróxido de potássio (Merck, Alemanha) foi empregado como agente redutor. Permanganato de potássio (Merck, Alemanha) e cloridrato de hidroxilamônio (Synth, São Paulo, Brasil) foram empregados no preparo das amostras. Para a geração fotoquímica de vapor ácido fórmico, n-propanol (Synth, São Paulo, Brasil) e ácido acético (Ecibra, São Paulo, Brasil) foram investigados como precursores orgânicos. Hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (Merck, Alemanha) foi usado para a solubilização das amostras. Argônio de pureza 99,9% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi empregado como gás carreador para as duas técnicas (CV e PVG).

Para as duas técnicas a exatidão dos métodos otimizados foi avaliada pela análise do material de referência certificado (CRM) DOLT-4 (*dog fish liver*), proveniente do *National Research Council Canada* (NRCC, Ottawa, Canadá). Também foram feitas análises de dois candidatos a materiais de referência: *i*) uma amostra de músculo de peixe, fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento, e *ii*) uma amostra de atum fornecida pela Universidade Federal do ABC.

**Figura 1.** Lâmpada de UV (a) e espiral de quartzo (b) usados para a construção do reator fotoquímico na PVG do Hg.



## 4.3 PREPARO DE AMOSTRA

### 4.3.1 Determinação de mercúrio em peixe por CV-AAS

O método de preparo de amostra empregado para a determinação de Hg em peixe por CV foi adaptado de Oreste *et al.*<sup>46</sup>, que empregaram digestão em bloco com sistema de dedos frio. O uso do dedo frio evita perdas do analito por volatilização e também minimiza a perda dos reagentes durante a digestão, gerando um sistema de refluxo, e possibilitando que esses sejam usados em quantidades menores.

No procedimento, uma massa de amostra (50 - 150 mg) foi pesada e transferida para tubos de vidro, seguida da adição de 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> bidestilado. Os tubos fechados com dedo frio foram mantidos no bloco digestor até atingir a temperatura de 120 °C e, então, foram resfriados a temperatura ambiente para a adição de permanganato de potássio 5% (m/v) (2,0 - 5,0 mL), retornando ao bloco digestor, aquecido a mesma temperatura, até a completa decomposição da amostra (aproximadamente 90 minutos). Em seguida, resfriado a temperatura ambiente, o permanganato de potássio em excesso foi reduzido com cloridrato de hidroxilamônio 10% (m/v) e as amostras avolumadas para 15 mL.

### 4.3.2 Determinação de mercúrio em peixe por PVG-AAS

O preparo de amostras empregado para a determinação de Hg por PVG foi adaptado de Potes *et al.*<sup>47</sup> Nesse procedimento uma massa de amostra (50 - 150 mg) foi pesada e transferida para tubos de polipropileno de 15 mL, em seguida foi adicionado 1,0 mL de TMAH 25% (m/v). Os tubos foram mantidos em um banho a 60 °C por 3h e, após atingir a temperatura ambiente, foram avolumados para 10 mL. Em seguida essa solução foi diluída 10 vezes pela adição de ácido fórmico, resultando em uma concentração final de 25% (v/v) desse reagente e 0,125% (m/v) de TMAH. O volume final da solução foi 10 mL.

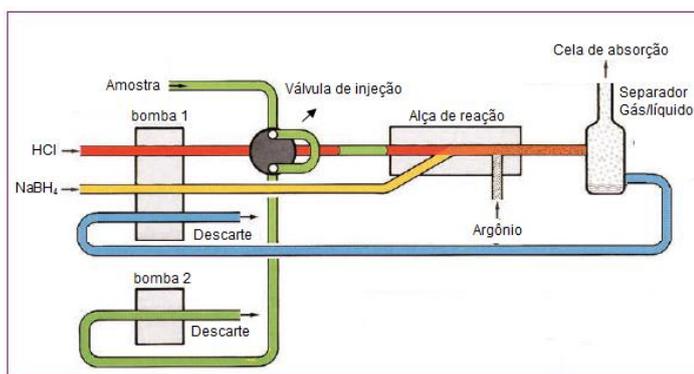
## 4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.4.1 Geração de vapor frio

Na Figura 2 é apresentado o sistema utilizado para a geração de vapor frio do Hg. Esse sistema é equipado com duas bombas peristálticas para controlar o fluxo de entrada dos reagentes. A primeira bomba controla o fluxo de HCl e NaBH<sub>4</sub> e a segunda controla o fluxo da amostra. Um volume fixo de amostra ou solução padrão, controlado por uma válvula de

injeção de 500  $\mu\text{L}$ , era introduzido no sistema através de uma bomba peristáltica. Através de outra bomba era introduzido um fluxo contínuo de  $\text{HCl}$ , com vazões de 7 ou 3  $\text{mL min}^{-1}$ , sendo esse interrompido apenas para a introdução da amostra/solução padrão, através da válvula de injeção. Um segundo canal foi empregado para a injeção da solução de  $\text{NaBH}_4$ , com uma vazão de 4 ou 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ . A mistura dos reagentes e a redução do  $\text{Hg}$  ocorriam na alça de reação. O Ar foi introduzido no sistema entre a alça de reação e o GLS. O vapor do analito foi carreado pelo Ar, com vazões de 50 ou 40  $\text{mL min}^{-1}$  até o GLS. Após atravessar o filtro de politetrafluoretileno (PTFE) o vapor foi levado até a cela de absorção, que era mantida na temperatura de 50  $^\circ\text{C}$  para evitar a condensação do vapor do analito.

**Figura 2.** Esquema do sistema de injeção em fluxo usado para a CV do  $\text{Hg}$ .

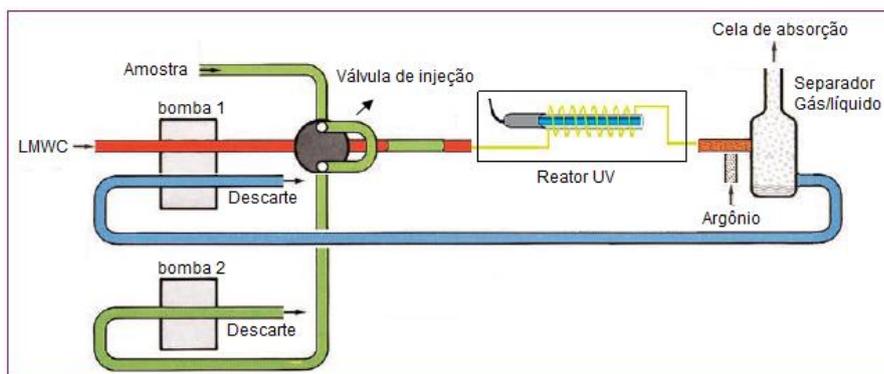


Fonte: Adaptado de Perkin Elmer.<sup>48</sup>

#### 4.4.2 Geração fotoquímica de vapor

Na PVG do  $\text{Hg}$ , foi empregado o mesmo sistema de injeção em fluxo da CV, com exceção da alça de reação, que foi substituída por um reator fotoquímico, constituído de uma lâmpada de UV envolta por uma espiral de quartzo, empregada como percurso analítico (Figura 3). Além disso, na PVG a primeira bomba peristáltica foi necessária apenas para a introdução do precursor orgânico. As soluções padrão e as amostras foram preparadas em meio de ácido fórmico 25%, enquanto que para a solução carreadora foi empregada uma concentração de 5% desse reagente. A vazão usada para o precursor orgânico foi de 8  $\text{mL min}^{-1}$ , que resultou em um tempo de exposição da solução a radiação UV de 25 s.

**Figura 3.** Esquema do sistema de injeção em fluxo usado para a PVG do Hg.



Fonte: Adaptado de Perkin Elmer.<sup>48</sup>

## 4.5 PROCEDIMENTOS DE OTIMIZAÇÃO

Os procedimentos de otimização das duas técnicas consistiram na utilização de estratégias univariadas e multivariadas. Em cada caso os experimentos foram realizados utilizando os sistemas descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2 (Figuras 2 e 3 respectivamente), e empregando soluções padrão de Hg inorgânico de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . O volume injetado no sistema foi de  $500 \mu\text{L}$ , resultando em uma massa de  $5 \text{ ng}$  de Hg.

### 4.5.1 Otimização univariada

A otimização univariada das condições experimentais para ambas as técnicas foi feita empregando área e altura como resposta analítica. Cada variável foi otimizada mantendo as demais em uma condição fixa. As variáveis otimizadas para a CV foram: vazão de HCl ( $V_{\text{HCl}}$ ), vazão de argônio ( $V_{\text{Ar}}$ ), concentração de HCl ( $[\text{HCl}]$ ) e de  $\text{NaBH}_4$  ( $[\text{NaBH}_4]$ ); e para a PVG: vazão de ácido fórmico ( $V_{\text{AF}}$ ), vazão de argônio ( $V_{\text{Ar}}$ ) e concentração de ácido fórmico ( $[\text{AF}]$ ).

### 4.5.2 Otimização multivariada

A otimização multivariada das condições experimentais para ambas as técnicas foi feita empregando planejamento fatorial completo de dois níveis e planejamento Doehlert. As variáveis investigadas no planejamento  $2^n$  foram as mesmas estudadas na otimização univariada (seção 4.5.1). No caso da CV foi utilizado um planejamento  $2^4$ , enquanto para a PVG foi utilizado um planejamento  $2^3$ . O domínio experimental empregado, bem como a resposta analítica otimizada (área ou altura), foram determinados a partir dos resultados

obtidos na otimização univariada. O planejamento Doehlert foi realizado apenas para as variáveis que apresentaram efeitos, ou efeitos de interação, significativos no planejamento 2<sup>n</sup>, e o número de níveis que cada variável foi estudada foi determinado a partir da influência que essa variável teve sobre a resposta. Todos dos dados experimentais obtidos foram analisados no software STATISTICA 8.0.

#### 4.6 PARÂMETROS DE MÉRITO

Os parâmetros de mérito estimados foram, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), massa característica ( $m_0$ ) e desvio padrão relativo (RSD).

O LD, definido como a massa ou concentração mínima de analito que pode ser detectada com uma dada certeza estatística, foi calculado através da Equação 2. Sendo  $\sigma$  o desvio padrão de dez medidas de branco e  $S$  o coeficiente angular da curva de calibração.

$$LD = 3\sigma_{10}/S \quad \text{Equação 2}$$

O LQ, definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser quantificada com uma certeza estatística de 95%, foi calculado pela Equação 3.

$$LQ = 10\sigma_{10}/S \quad \text{Equação 3}$$

A massa característica, definida como a massa de analito necessária para resultar em um sinal de 1% de absorção (que corresponde a um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s), foi calculada pela Equação 4. Na qual,  $A_{int}$  corresponde ao sinal de absorvância integrada produzido por uma massa  $m$  de analito, que representa um ponto intermediário da curva de calibração.

$$m_0 = 0,0044m/A_{int} \quad \text{Equação 4}$$

E por último, o RSD foi calculado pela Equação 5, sendo  $s$  o desvio padrão das medidas e  $x$  a média dos valores de absorvância ou absorvância integrada obtidas. Esse parâmetro foi utilizado para avaliar a precisão do método.

$$RSD\% = (s/x)100 \quad \text{Equação 5}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho serão apresentados em três subitens. No subitem 5.1, serão apresentados os resultados referentes à otimização univariada da CV e da PVG, e os respectivos parâmetros de mérito calculados nas condições otimizadas. No subitem 5.2, serão apresentados os resultados da otimização multivariada realizada para as duas técnicas, e os parâmetros de mérito calculados empregando as condições ótimas encontradas pelo planejamento experimental. Por último, no subitem 5.3, serão apresentados os resultados da aplicação dos métodos otimizados pela CV e PVG na determinação de Hg em materiais de referência e CRMs.

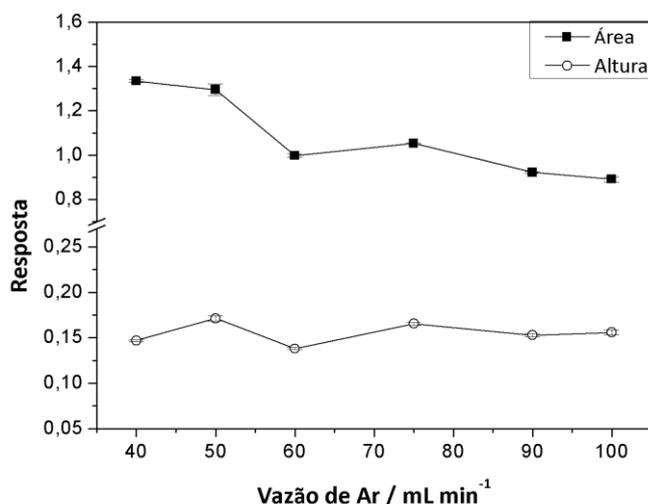
### 5.1 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA

#### 5.1.1 Otimização univariada das condições de geração de vapor frio

##### 5.1.1.1 *Efeito da vazão de gás de arraste*

Como gás de arraste foi empregado o argônio, que tem como função auxiliar na separação do vapor do analito da solução no GLS, e também auxiliar no transporte do mesmo até a cela de absorção. As vazões avaliadas variaram de 40 a 100 mL min<sup>-1</sup>. Como pode ser observado na Figura 4, o sinal em área apresentou um decréscimo (30%) para vazões maiores que 50 mL min<sup>-1</sup>. Para o sinal em altura, maior sensibilidade foi obtida para a vazão de 50 mL min<sup>-1</sup> e por isso essa condição foi escolhida os seguintes estudos. O aumento na vazão de argônio implica da diluição da nuvem atômica e perda de sensibilidade, por isso foi observado um decréscimo no sinal analítico como aumento dessa variável.

**Figura 4.** Efeito da vazão de Ar na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl: 0,4 mol L<sup>-1</sup>, concentração de NaBH<sub>4</sub>: 0,2% (m/v), vazão de HCl: 6 mL min<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

#### 5.1.1.2 Efeito da concentração de solução carreadora e agente redutor

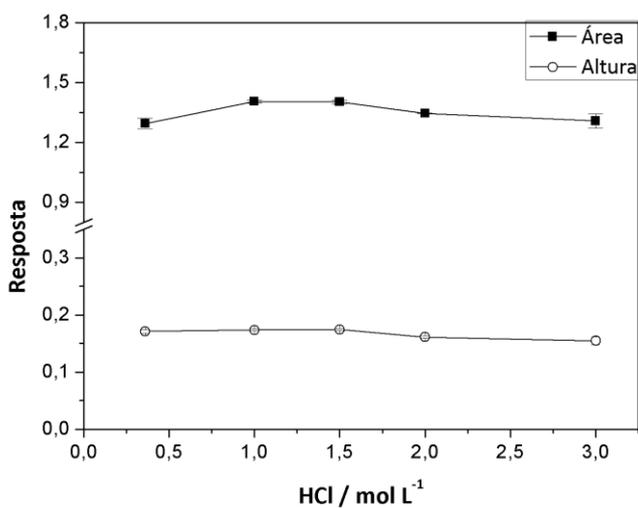
Como solução carreadora e agente redutor foram empregados HCl e NaBH<sub>4</sub>, respectivamente. Esses reagentes são responsáveis por promover a redução do analito a uma espécie volátil. Assim as concentrações utilizadas de cada um podem influenciar diretamente na eficiência de geração de vapor do Hg. Por isso foi avaliada o efeito dessas variáveis no sinal analítico, tanto em área como altura.

Para o HCl foram estudadas concentrações de 0,4 a 3 mol L<sup>-1</sup>, e como pode ser observado na Figura 5 esse parâmetro teve pouca influência, tanto para área como para altura, havendo uma queda de cerca de 10% para as concentrações de 2 e 3 mol L<sup>-1</sup>. Dessa forma, a concentração de 1 mol L<sup>-1</sup> foi escolhida para os estudos a seguir.

Com relação ao NaBH<sub>4</sub>, foram avaliadas concentrações entre 0,05 e 1,0% (m/v), mantendo-se constante a concentração de KOH 0,3% (m/v), adicionado para estabilizar a solução. Para a altura do pico não foi observada variação significativa para concentrações acima de 0,1%, porém para a área houve uma queda com o aumento da concentração, sendo o maior sinal obtido para a concentração de 0,1% (Figura 6). O comportamento observado para esta variável pode ser explicado pelo aumento da produção de gás H<sub>2</sub> (proveniente da hidrólise do NaBH<sub>4</sub>) que, assim como o Ar, pode levar a diluição da nuvem atômica e perda

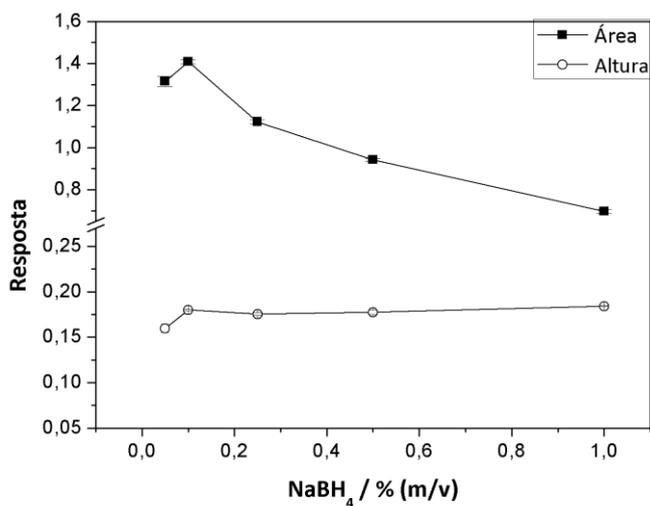
de sensibilidade. Além disso, quando se empregava concentrações altas de  $\text{NaBH}_4$  a reação de redução do Hg era muito violenta, e parte da solução entrava no sistema de detecção.

**Figura 5.** Efeito da concentração de HCl na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais:  $\text{NaBH}_4$  0,2% (m/v), vazão Ar:  $50 \text{ mL min}^{-1}$ , vazão de HCl:  $6 \text{ mL min}^{-1}$ .



Fonte: O autor

**Figura 6.** Efeito da concentração de  $\text{NaBH}_4$  na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl:  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , vazão Ar:  $50 \text{ mL min}^{-1}$ , vazão de HCl:  $6 \text{ mL min}^{-1}$ .

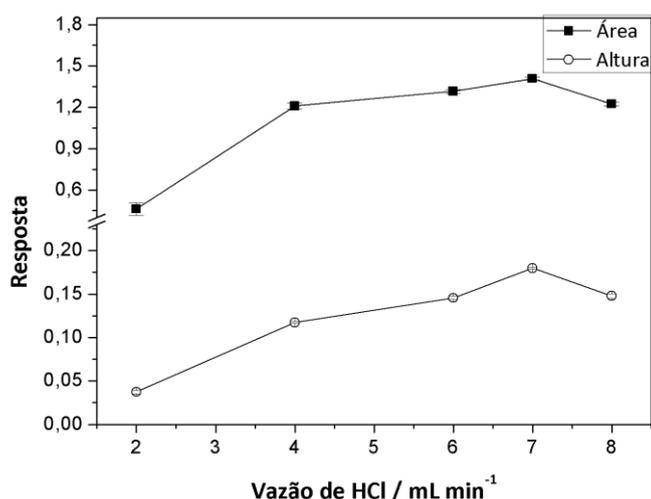


Fonte: O autor

### 5.1.1.3 Efeito da vazão da solução carreadora

A otimização da vazão da solução carreadora (HCl) foi feita através da variação da velocidade de rotação da bomba peristáltica, mantendo fixo o volume de solução padrão introduzido no sistema. As vazões avaliadas variaram de 2 mL min<sup>-1</sup> a 8 mL min<sup>-1</sup>. A Figura 7 mostra um aumento nos sinais obtidos, em área e altura, com o aumento da vazão empregada. A vazão de 7 mL min<sup>-1</sup> resultou em maior sensibilidade, tanto para área como para altura, e foi escolhida.

**Figura 7.** Efeito da vazão de HCl na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de HCl: 1 mol L<sup>-1</sup>, concentração de NaBH<sub>4</sub>: 0,1% (m/v), vazão de Ar: 50 mL min<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

## 5.1.2 Otimização univariadas das condições de geração fotoquímica de vapor

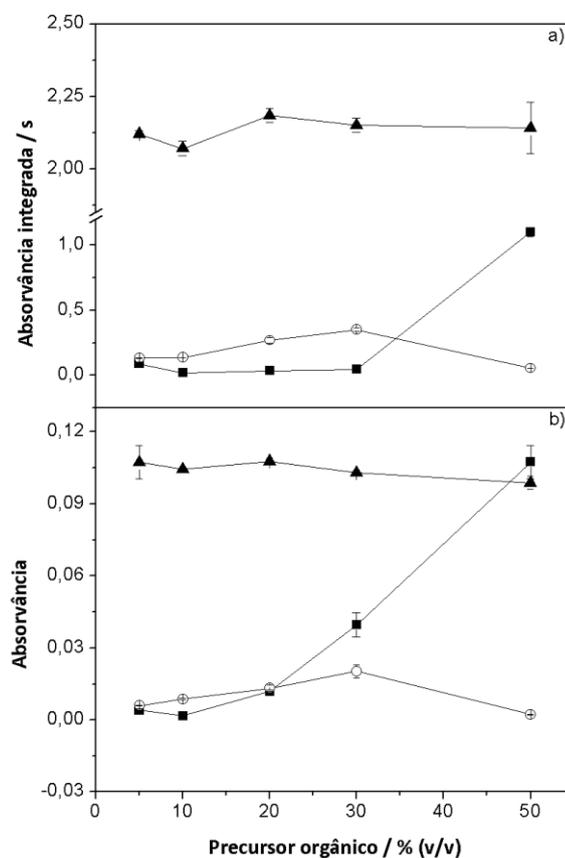
### 5.1.2.1 Estudo dos precursores orgânicos

Compostos orgânicos de baixo peso molecular como o ácido fórmico, o ácido acético e o n-propanol são comumente utilizados como fonte de radicais na PVG do Hg.<sup>20, 47, 49</sup> Por isso foi realizado um estudo preliminar para avaliar o efeito da concentração desses compostos na redução fotoquímica do Hg. Para os três compostos foram avaliadas concentrações entre 5 e 50% (v/v). As concentrações estudadas foram empregadas na solução padrão e na solução carreadora. Na Figura 8, observa-se que a redução do Hg às espécies voláteis foi mais eficiente na presença de ácido fórmico, tanto para o sinal em área, como em altura. O n-propanol, independente da concentração empregada, apresentou redução pouco

significativa do Hg, com relação ao obtido com o ácido fórmico, apresentando um sinal cerca de seis vezes menor. Para o ácido acético, se observou a redução do analito apenas para a concentração de 50% (v/v), apresentando um sinal, em área, duas vezes menor que para o ácido fórmico. Devido à maior eficiência, o ácido fórmico foi escolhido como o precursor orgânico.

Com relação às concentrações de ácido fórmico investigadas, observa-se na Figura 8 um patamar, com variação pouco significativa para o sinal obtido. Por isso duas concentrações menores (1 e 2,5% v/v) foram investigadas. Para a concentração de 2,5% (v/v) o sinal se manteve constante, porém para a concentração de 1% (v/v) houve uma queda de 8 vezes no sinal de área e altura. Dessa forma, a concentração de 5% (v/v) é suficiente para garantir a redução do Hg na solução padrão e foi adotada para seguir os estudos. Porém como será discutido posteriormente, foi necessário utilizar uma concentração de 25% (v/v) nas amostras, mantendo a concentração da solução carreadora em 5% (v/v).

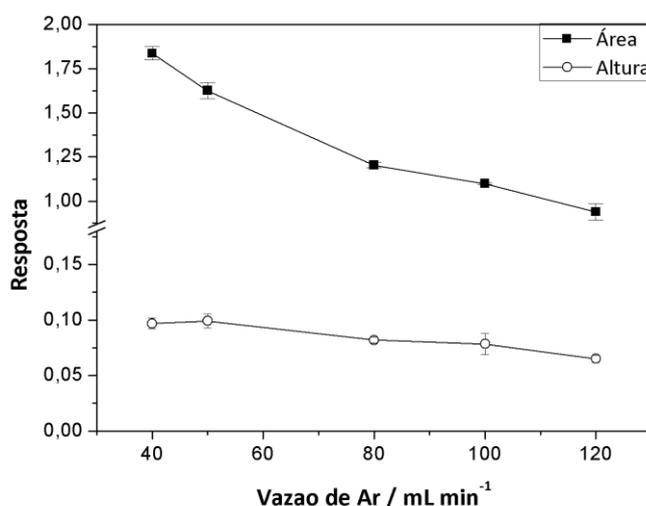
**Figura 8.** Estudo do efeito da concentração do ácido acético (■), ácido fórmico (▲) e n-propanol (○) a) na absorvância integrada do Hg e b) na absorvância do Hg. Condições experimentais: vazão de Ar: 50 mL min<sup>-1</sup>, vazão do precursor orgânico: 7 mL min<sup>-1</sup>.



### 5.1.2.2 Efeito da vazão de gás carreador

Assim como na geração de vapor frio, também foi utilizado argônio como gás carreador na PVG. O Ar era introduzido após a saída do reator fotoquímico e auxiliava na separação dos vapores do analito da solução no GLS e também no seu transporte até a cela de absorção. As vazões de Ar investigadas foram de 40 a 120 mL min<sup>-1</sup>. Como pode ser visto na Figura 9, o sinal em altura praticamente não foi influenciado por esse parâmetro, porém para área se observou um decréscimo no sinal com o aumento da vazão de Ar, sendo a maior sensibilidade atingida para a vazão de 40 mL min<sup>-1</sup>, que foi escolhida para prosseguir os estudos. Assim como o observado para a CV, o decréscimo no sinal com o aumento da vazão de Ar pode ser explicado pela diluição da nuvem atômica.

**Figura 9.** Efeito da vazão de Ar na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de AF: 5% (v/v), vazão de AF: 7 mL min<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

### 5.1.2.3 Efeito da vazão do precursor orgânico

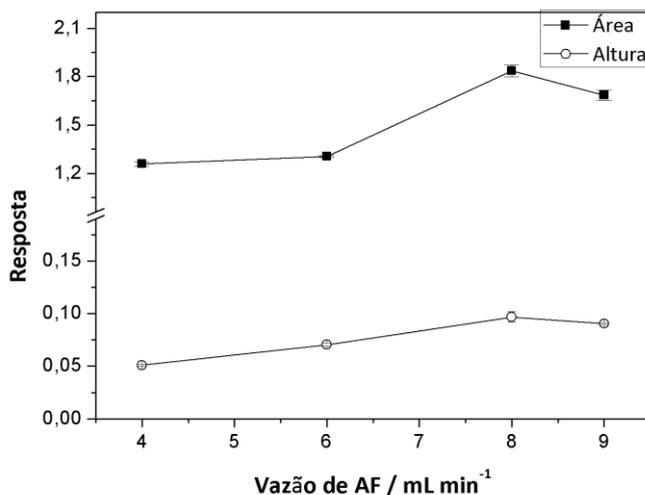
A vazão com que o precursor orgânico é introduzido no sistema determina o tempo que a solução permanecerá exposta à radiação ultravioleta. Assim, esse parâmetro também irá afetar a extensão com que os radicais, necessários para a redução do Hg, são formados.

O estudo da vazão do precursor orgânico foi feito variando a velocidade de rotação da bomba peristáltica e mantendo fixo o volume de solução padrão (e a massa de Hg) introduzido no sistema. Foram investigadas vazões entre 4 e 9 mL min<sup>-1</sup> que correspondem a tempos de exposição de 45 e 15 s, respectivamente.

Na Figura 10 se observa que o sinal em área e altura possuem comportamentos semelhantes, apresentando maior sensibilidade para a vazão de 8 mL min<sup>-1</sup>, que corresponde a um tempo de irradiação da solução de 25 s. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Zhang *et al.*<sup>50</sup>, no qual foi observado que 20 s de irradiação eram suficientes para promover a formação dos radicais do ácido fórmico e a redução do Hg.

Para vazões inferiores a 8 mL min<sup>-1</sup>, ou seja, maior tempo de exposição à radiação UV, houve um decréscimo no sinal de 30%. Comportamentos similares foram observados por outros autores.<sup>23</sup> Oreste *et al.*<sup>24</sup> atribuíram esse fato a diminuição na formação de radicais a partir do ácido fórmico quando a vazão da solução é menor, já que menos solução é exposta à radiação ultravioleta, o que resulta em uma redução mais eficiente do Hg. Além disso, um tempo de exposição elevado pode levar a reoxidação do Hg.<sup>24</sup> Dessa forma a vazão de 8 mL min<sup>-1</sup> foi escolhida para seguir os estudos.

**Figura 10.** Efeito da vazão de AF na área (■) e na altura (○) do pico. Condições experimentais: concentração de AF: 5% (v/v), vazão de Ar: 40 mL min<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

### 5.1.3 Parâmetros de mérito

Depois de otimizadas as condições de geração de vapor do Hg, foram construídas curvas de calibração, com padrões em meio aquoso, para o cálculo dos parâmetros de mérito para as duas técnicas (Tabela 2). Para a construção das curvas em área e altura foram empregados nove padrões com concentração entre 0,25 e 20 µg L<sup>-1</sup> Hg (0,125 a 10 ng Hg).

Para as duas técnicas foi observada maior sensibilidade utilizando área do pico como resposta, isso pode ser observado nos valores de coeficiente angular encontrados para as retas, e também pelas massas características obtidas. Em decorrência disso os LDs e LQs instrumentais foram melhores em área do que em altura para as duas técnicas.

Outro parâmetro estimado foi a eficiência da geração fotoquímica de vapor. Esse parâmetro serve para avaliar a eficiência conjunta da formação das espécies voláteis de Hg, da sua separação da solução no GLS e do seu transporte até o sistema de detecção.<sup>19</sup> Essa estimativa é feita pela comparação da sensibilidade obtida pela PVG com a obtida pela CV, técnica convencional de geração de vapor. Como foram utilizados os mesmos sistemas de injeção em fluxo para as duas técnicas, pode-se considerar que a eficiência é referente somente à formação das espécies voláteis de Hg. Considerando a geração de vapor frio como 100%, se estimou a eficiência da PVG como sendo 133%, avaliando a área do pico como resposta e 60% avaliando a altura do pico. Essa diferença nos valores de eficiência estimados usando área e altura é resultado dos diferentes perfis de picos observados para as duas técnicas. Para a PVG era necessário um tempo de integração de 50 segundos, pois o pico era mais largo, enquanto para a CV o tempo de integração necessário era menor (35 segundos), já que o pico era mais estreito e alto.

É reportado na literatura que em sistemas de injeção em fluxo o perfil do pico obtido é dependente de dois processos cinéticos que ocorrem simultaneamente: i) o processo físico de geração de zonas de dispersão; e ii) o processo químico resultante da reação entre o analito e os reagentes, o que comanda a velocidade de geração do produto que será medido pelo detector.<sup>51, 52</sup> O primeiro processo leva à formação de gradientes de concentração do analito como resultado da sua diluição na solução carreadora. Fatores como a vazão da solução carreadora, e o caminho percorrido pelo analito até o detector, influenciam diretamente a formação das zonas de dispersão, e a altura do pico.<sup>51</sup> Porém, ao integrar o pico esses efeitos podem ser eliminados e, se a mesma massa de analito for introduzida no sistema, a comparação em área de dois picos com perfis diferentes é mais adequada.<sup>53, 54</sup> O mesmo foi observado Siemer *et al.*<sup>55</sup> na determinação de As por FI-HG-AAS. Os autores mostraram que a altura do pico era influenciada pela vazão empregada de gás carreador, pelo volume de amostra introduzido no sistema (mantendo a massa de analito fixa) e pelos diferentes estados de oxidação do analito (devido à diferenças na cinética de reação), mas a área do pico não era afetada.

Dessa forma, optou-se por estimar a eficiência da PVG utilizando a área do pico como resposta, uma vez que a cinética envolvida nos processos de geração de vapor e as condições experimentais empregadas foram diferentes para as duas técnicas. Assim, é mais adequado afirmar que a PVG apresentou uma eficiência de 133% em comparação a CV. Isso mostra que a CV teve uma eficiência de formação das espécies voláteis de Hg menor que a PVG, porém esse resultado não é condizente com o reportado na literatura, nos quais a CV é considerada como 100% por apresentar uma alta eficiência de formação de espécies voláteis.<sup>23, 25, 47</sup> Isso indica que a otimização univariada da CV provavelmente não levou as suas condições ótimas, e por isso também foi realizada a otimização multivariada das técnicas.

**Tabela 2.** Parâmetros de mérito instrumentais obtidos para CV e PVG a partir da otimização univariada.

<b>Técnica</b>	<b>Regressão linear</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD / pg</b>	<b>LQ / pg</b>	<b>m<sub>0</sub> / pg</b>
CV	A=0,0345m (ng)+0	0,9992	29	96	124
CV	A <sub>int</sub> =0,269m (ng)+0,011	0,9995	19	64	17
PVG	A=0,0205m (ng)+0,001	0,9995	10	34	210
PVG	A <sub>int</sub> =0,358m (ng) +0,015	0,9992	6	19	13

Fonte: O autor

## 5.2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

### 5.2.1 Otimização multivariada das condições de geração de vapor frio

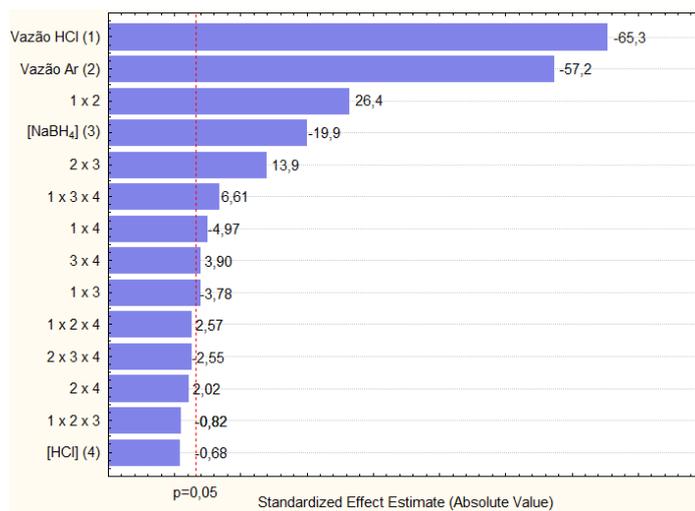
#### 5.2.1.1 Planejamento fatorial completo de dois níveis

O planejamento fatorial 2<sup>4</sup> foi realizado como experimento de triagem, com o objetivo de avaliar de forma preliminar quais variáveis e interações tem influência significativa na geração de vapor frio do Hg. Na Tabela 3 é apresentada a matriz do planejamento fatorial e os resultados de A<sub>int</sub> obtidos em cada experimento. Os valores dos efeitos para as variáveis e suas interações, obtidos a um nível de confiança de 95%, são apresentados na forma de gráfico de pareto (Figura 11). Como pode ser observado no gráfico, todas as variáveis estudadas, com exceção da [HCl], foram significativas. As variáveis V<sub>HCl</sub> e V<sub>Ar</sub> tiveram os efeitos mais significativos negativamente, indicando que maiores respostas são obtidas quando essas variáveis estão no nível inferior. Isso é evidenciado pelos experimentos 1, 5, 9 e 13 nos quais os maiores resultados foram encontrados. De forma análoga, a variável [NaBH<sub>4</sub>] também influenciou negativamente, porém em menor extensão.

Além disso, foram observadas duas interações importantes. A primeira foi a interação  $V_{\text{HCl}}-V_{\text{Ar}}$ , que pode ser justificada pelo aumento da produção de gás  $\text{H}_2$  com aumento da vazão de HCl. O gás  $\text{H}_2$  é formado durante a reação de hidrólise do  $\text{NaBH}_4$  em meio ácido. Assim, aumentando a vazão de HCl (o que também resulta no aumento da vazão de  $\text{NaBH}_4$ ), a quantidade desses reagentes que entra no sistema e a extensão com que eles reagem é maior, aumentando a produção de  $\text{H}_2$ . Assim como o Ar, o  $\text{H}_2$  também irá atuar como gás carreador, auxiliando no transporte do vapor até a cela de absorção. Logo, a vazão resultante de gás carreador é uma soma das vazões desses dois gases, e não depende apenas da vazão de Ar escolhida, mas também da vazão de HCl empregada. A segunda interação observada foi das variáveis  $V_{\text{Ar}}$  e  $[\text{NaBH}_4]$  que, de forma análoga a primeira interação, também pode ser explicada pela produção de gás  $\text{H}_2$ , já que com o aumento da concentração de  $\text{NaBH}_4$  há o aumento da extensão da sua hidrólise e da produção de  $\text{H}_2$ .

Sabendo quais variáveis e quais interações tiveram maior influência na resposta obtida, pode-se partir para o planejamento Doehlert. Como a  $[\text{HCl}]$  apresentou apenas duas interações de segunda ordem pouco significativas, essa variável foi desconsiderada da segunda parte da otimização.

**Figura 11.** Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas na CV-AAS, a um nível de confiança de 95%.



Fonte: O autor

**Tabela 3.** Matriz e resultados do planejamento 2<sup>4</sup> para a CV-AAS.

Experimento	Vazão Ar / mL min <sup>-1</sup>	Vazão HCl / mL min <sup>-1</sup>	[NaBH <sub>4</sub> ] / % (m/v)	[HCl] / mol L <sup>-1</sup>	A <sub>int</sub>
1	-1 (40)	-1 (3,0)	-1 (0,05)	-1 (0,5)	1,81
2	+1 (100)	-1 (3,0)	-1 (0,05)	-1 (0,5)	0,95
3	-1 (40)	+1 (9,0)	-1 (0,05)	-1 (0,5)	1,18
4	+1 (100)	+1 (9,0)	-1 (0,05)	-1 (0,5)	0,72
5	-1 (40)	-1 (3,0)	+1 (0,55)	-1 (0,5)	1,56
6	+1 (100)	-1 (3,0)	+1 (0,55)	-1 (0,5)	0,97
7	-1 (40)	+1 (9,0)	+1 (0,55)	-1 (0,5)	0,73
8	+1 (100)	+1 (9,0)	+1 (0,55)	-1 (0,5)	0,57
9	-1 (40)	-1 (3,0)	-1 (0,05)	+1 (2,5)	1,87
10	+1 (100)	-1 (3,0)	-1 (0,05)	+1 (2,5)	1,02
11	-1 (40)	+1 (9,0)	-1 (0,05)	+1 (2,5)	0,96
12	+1 (100)	+1 (9,0)	-1 (0,05)	+1 (2,5)	0,65
13	-1 (40)	-1 (3,0)	+1 (0,55)	+1 (2,5)	1,58
14	+1(100)	-1 (3,0)	+1 (0,55)	+1 (2,5)	0,97
15	-1 (40)	+1 (9,0)	+1 (0,55)	+1 (2,5)	0,77
16	+1 (100)	+1 (9,0)	+1 (0,55)	+1 (2,5)	0,62
PC	0 (70)	0 (6,0)	0 (0,30)	0 (1,5)	1,00
PC	0 (70)	0 (6,0)	0 (0,30)	0 (1,5)	1,00
PC	0 (70)	0 (6,0)	0 (0,30)	0 (1,5)	0,99
PC	0 (70)	0 (6,0)	0 (0,30)	0 (1,5)	1,03

Fonte: O autor

<sup>a</sup>Valor codificado (valor real)

### 5.2.1.2 Planejamento Doehlert

O planejamento Doehlert foi realizado para as três variáveis que apresentaram efeitos significativos no planejamento fatorial. A concentração de HCl foi escolhida segundo a otimização univariada, sendo mantida fixa em 1,0 mol L<sup>-1</sup> durante os experimentos. Novos domínios experimentais foram empregados com base nos resultados do planejamento 2<sup>n</sup>. A vazão de HCl foi avaliada em 7 níveis, por ter apresentado maior influência sobre o sinal. Por limitações instrumentais, essa variável já estava sendo investigada nas vazões máximas e mínimas possíveis. Assim, apenas níveis intermediários foram adicionados ao planejamento. Devido às mesmas limitações instrumentais a vazão de Ar também não pôde ser avaliada em vazões menores. Essa variável foi avaliada em 3 níveis. A variável [NaBH<sub>4</sub>] foi avaliada em 5 níveis, e concentrações ainda menores foram investigadas, já que foi observado um aumento no sinal quando essa variável se encontrava no nível inferior. A matriz de Doehlert empregada, os experimentos e as respostas obtidas estão apresentados na Tabela 4. A partir

desses dados foi possível gerar os gráficos de superfície de resposta apresentados na Figura 12. Essas superfícies de respostas podem ser representadas na forma da Equação 6, na qual a resposta ( $A_{int}$ ) é descrita em função das variáveis estudadas.

$$A_{int} = 0,86 - 0,07[\text{NaBH}_4] - 0,24V_{\text{HCl}} - 0,19V_{\text{Ar}} - 0,02[\text{NaBH}_4]^2 + 0,11V_{\text{HCl}}^2 + 0,08V_{\text{Ar}}^2 - 0,08[\text{NaBH}_4]V_{\text{HCl}} + 0,03[\text{NaBH}_4]V_{\text{Ar}} + 0,08V_{\text{HCl}}V_{\text{Ar}}$$

### Equação 6

**Tabela 4.** Matriz e resultados do planejamento Doehlert realizado para a CV-AAS.

Experimento	[NaBH <sub>4</sub> ] / (% m/v)	Vazão HCl / (mL min <sup>-1</sup> )	Vazão Ar / (mL min <sup>-1</sup> )	A <sub>int</sub>
1	0 (0,275)	0 (6,0)	0 (60)	1,04
2	+1 (0,525)	0 (6,0)	0 (60)	0,92
3	+0,5 (0,4)	+0,866 (9,0)	0 (60)	0,79
4	+0,5 (0,4)	+0,289 (7,0)	+0,817 (80)	0,84
5	-1 (0,025)	0 (6,0)	0 (60)	1,12
6	-0,5 (0,14)	-0,866 (3,0)	0 (60)	1,39
7	-0,5 (0,14)	-0,289 (5,0)	-0,817 (40)	1,41
8	+0,5 (0,4)	-0,866 (3,0)	0 (60)	1,39
9	+0,5 (0,4)	-0,289 (5,0)	-0,817 (40)	1,37
10	-0,5 (0,14)	+0,866 (9,0)	0 (60)	0,98
11	0 (0,275)	+0,577 (8,0)	-0,817 (40)	1,14
12	-0,5 (0,14)	+0,289 (7,0)	+0,817 (80)	0,90
13	0 (0,275)	-0,577 (4,0)	+0,817 (80)	1,06
CP	0 (0,275)	0 (6,0)	0 (60)	1,04
CP	0 (0,275)	0 (6,0)	0 (60)	1,05
CP	0 (0,275)	0 (6,0)	0 (60)	1,03

Fonte: O autor

<sup>a</sup>Valor codificado (valor real)

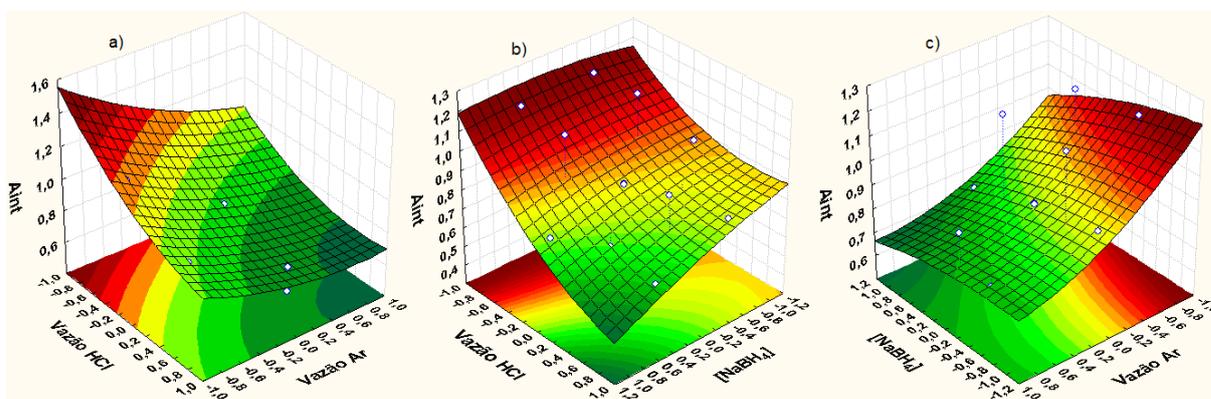
A equação matemática obtida apresenta coeficientes quadráticos positivos e negativos, o que caracteriza uma superfície com ponto crítico de sela.<sup>35, 56</sup> Nesses casos a determinação das condições ótimas não pode ser feita matematicamente, já que o ponto crítico de sela não representa o ponto de máximo da superfície. Assim, a escolha das condições ótimas deve ser feita seguindo a tendência que a superfície de resposta indica.<sup>29</sup>

Como pode ser visto nas Figuras 12a e 12b, a vazão de HCl resultou em aumento do sinal quando estava no nível inferior (3,0 mL min<sup>-1</sup>), sendo essa a condição escolhida. O

mesmo comportamento foi observado para a vazão de Ar (Figuras 12a e 12c), e a condição de 40 mL min<sup>-1</sup> foi escolhida. Para a concentração de NaBH<sub>4</sub> foi observado que o sinal diminuía com a variável no nível superior (Figuras 12b e 12c). Porém, houve apenas uma pequena variação entre o nível inferior e o ponto central, por isso uma concentração intermediária a esses dois pontos (0,15%) foi escolhida.

A otimização multivariada da CV-AAS mostrou que há interação entre as variáveis estudadas, indicando que utilizar estratégias como a univariada na qual isso não é levado em consideração não é o mais adequado. Isso é evidenciado pelas condições ótimas distintas determinadas pelas duas estratégias (Tabela 5).

**Figura 12.** Gráficos de superfícies de resposta para a CV-AAS.



Fonte: O autor

**Tabela 5.** Condições ótimas encontrada para a CV-AAS empregando as estratégias univariada e multivariada de otimização.

Variável	Otimização univariada	Otimização multivariada
[NaBH <sub>4</sub> ] / % (m/v)	0,10	0,15
[HCl] / mol L <sup>-1</sup>	1,0	1,0
Vazão HCl / mL min <sup>-1</sup>	7,0	3,0
Vazão Ar / mL min <sup>-1</sup>	50	40

Fonte: O autor

## 5.2.2 Otimização multivariada das condições de geração fotoquímica de vapor

### 5.2.2.1 Planejamento fatorial completo de dois níveis

A matriz com os experimentos empregados para o planejamento  $2^3$ , bem como as respostas de  $A_{int}$  obtidas, estão apresentados na Tabela 6. Os experimentos 1 e 2 tiveram as maiores respostas, e tem em comum a variável  $V_{Ar}$  no seu nível inferior. De fato, quando se observa o Gráfico de Pareto (Figura 13), essa variável apresenta a maior influência no sinal e um efeito negativo. O aumento da vazão de Ar resulta em maior diluição da nuvem atômica e diminuição da sensibilidade, o que justifica o comportamento observado para essa variável.

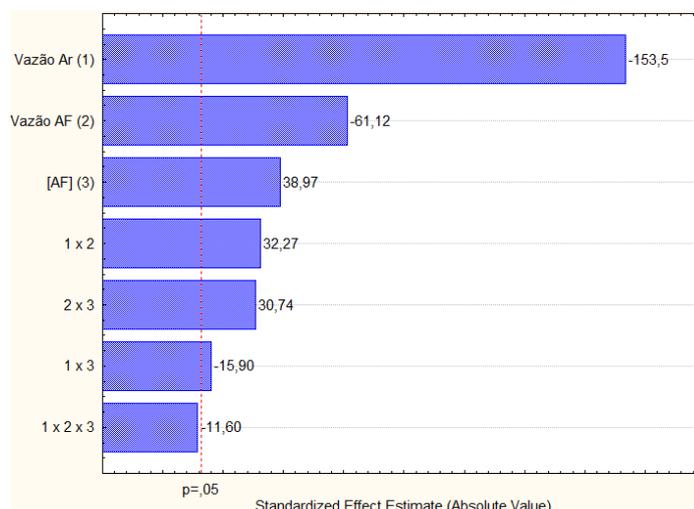
As variáveis  $V_{AF}$ ,  $[AF]$  e a interação da  $V_{AF}$ - $[AF]$  também foram significativas. Ambas variáveis estão relacionadas com a formação dos radicais do AF e a redução do Hg. O aumento da vazão de AF resulta em diminuição da exposição da solução a radiação UV, o que pode levar a menor formação de radicais e baixa eficiência na redução do Hg, por isso menores  $A_{int}$  foram obtidas quando essa variável estava no nível superior. De forma análoga, o mesmo pode ser observado para baixas concentrações de AF. O efeito da interação dessas variáveis pode ser observado pelos resultados dos experimentos 1,2 e 5,6 respectivamente. Quando a vazão de AF está no nível inferior (experimentos 1 e 2), ou seja, maior tempo de exposição a radiação UV, é observado um aumento de apenas 4% no sinal quando a concentração de AF aumenta de 2,5% (v/v) para 10% (v/v). Isso indica que os radicais do AF são formados na mesma extensão para duas concentrações. Porém, quando a vazão de AF está no nível superior (experimentos 5 e 6) a mesma mudança na concentração de AF resulta em um aumento de 40% no sinal. Nesse caso, devido ao menor tempo de exposição a radiação UV, é necessário uma concentração de AF maior pra formar os radicais em maior extensão. Isso evidencia que a concentração de AF ótima é dependente da vazão de AF empregada.

**Tabela 6.** Matriz e resultados do planejamento  $2^3$  para a PVG-AAS.

Experimento	[AF] / % (v/v)	Vazão Ar / mL min <sup>-1</sup>	Vazão AF / mL min <sup>-1</sup>	A <sub>int</sub>
1	-1 (2,5)	-1 (40)	-1 (6,0)	2,03
2	+1 (10,0)	-1 (40)	-1 (6,0)	2,10
3	-1 (2,5)	+1 (100)	-1 (6,0)	1,07
4	+1 (10,0)	+1 (100)	-1 (6,0)	1,09
5	-1 (2,5)	-1(40)	+1 (10,0)	1,31
6	+1 (10,0)	-1 (40)	+1 (10,0)	1,83
7	-1 (2,5)	+1 (100)	+1 (10,0)	0,82
8	+1 (10,0)	+1 (100)	+1 (10,0)	1,04
CP	0 (6,25)	0 (70)	0 (8,0)	1,28
CP	0 (6,25)	0 (70)	0 (8,0)	1,29
CP	0 (6,25)	0 (70)	0 (8,0)	1,29

Fonte: O autor

**Figura 13.** Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas na PVG-AAS, a um nível de confiança de 95%.



Fonte: O autor

### 5.2.2.2 Planejamento Doehlert

Com base no planejamento  $2^3$  foi possível concluir que todas as variáveis estudadas têm influência significativa no sinal de A<sub>int</sub>, por isso todas foram estudadas novamente no planejamento Doehlert. As variáveis V<sub>Ar</sub>, [AF] e V<sub>AF</sub> foram investigadas em 7, 5 e 3 níveis, respectivamente. De acordo com o planejamento  $2^3$  a variável [AF] teve um efeito positivo e por isso concentrações mais altas foram estudadas. No entanto, de forma análoga a CV, os

intervalos estudados para as variáveis  $V_{AF}$  e  $V_{Ar}$  não puderam ser alterados, pois, por limitações instrumentais, já estavam nas menores vazões possíveis. A matriz de Doehlert com os experimentos realizados e os resultados de  $A_{int}$  obtidos está apresentada na Tabela 7. O modelo matemático que descreve as superfícies de resposta (Figura 14) é mostrado na Equação 7. Semelhante ao encontrado na CV, o modelo matemático também apresenta coeficientes quadráticos positivos e negativos que caracterizam pontos críticos de sela e a escolha das condições ótimas foi feita a partir das superfícies de resposta.

$$A_{int} = 1,48 - 0,56V_{Ar} + 0,11[AF] - 0,05V_{AF} + 0,15V_{Ar}^2 + 0,24[AF]^2 - 0,06V_{AF}^2 - 0,06V_{Ar}V_{AF}$$

**Equação 7**

**Tabela 7.** Matriz e resultados do planejamento Doehlert realizado para a PVG-AAS.

Experimento	[AF] / % (v/v)	Vazão Ar / mL min <sup>-1</sup>	Vazão AF / mL min <sup>-1</sup>	A <sub>int</sub>
1	0 (15)	0 (70)	0 (8)	1,39
2	+1 (25)	0 (70)	0 (8)	1,79
3	+0,5 (20)	+0,866 (100)	0 (8)	1,12
4	+0,5 (20)	+0,289 (80)	+0,817 (10)	1,22
5	-1 (5)	0 (70)	0 (8)	1,43
6	-0,5 (10)	-0,866 (40)	0 (8)	2,00
7	-0,5 (10)	-0,289 (60)	-0,817 (6)	1,58
8	+0,5 (20)	-0,866 (40)	0 (8)	2,03
9	+0,5 (20)	-0,289 (60)	-0,817 (6)	1,57
10	-0,5 (10)	+0,866 (100)	0 (8)	1,04
11	0 (15)	+0,577 (90)	-0,817 (6)	1,19
12	-0,5 (10)	+0,289 (80)	+0,817 (10)	1,23
13	0 (15)	-0,577 (50)	+0,817 (10)	1,65
CP	0 (15)	0 (70)	0 (8)	1,37
CP	0 (15)	0 (70)	0 (8)	1,39
CP	0 (15)	0 (70)	0 (8)	1,38

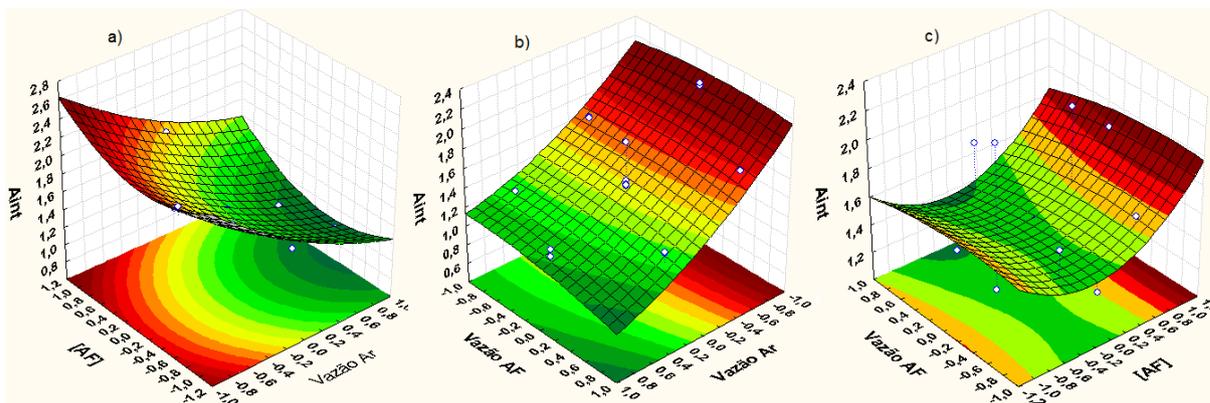
Fonte: O autor

<sup>a</sup>Valor codificado (valor real)

Pelas Figuras 14a e 14b, se observa que a variável  $V_{Ar}$  resultou em aumento da  $A_{int}$  quando se encontra no nível inferior, sendo a vazão de 40 mL min<sup>-1</sup> a escolhida. Nas Figuras 14b e 14c se observa que a variável  $V_{AF}$  praticamente não afetou o sinal analítico no intervalo estudado, indicando que a maior vazão (e menor tempo de exposição) utilizada foi suficiente para promover a redução do Hg. Dessa forma, visando uma condição mais robusta o ponto

central ( $8 \text{ mL min}^{-1}$ ) foi escolhido. Para a concentração de AF, analisando a Figura 14a não se observa nenhuma diferença significativa no sinal quando essa variável estava no nível superior ou no nível inferior. Na Figura 14c se observa que a resposta aumentou quando a variável estava no nível superior. Porém, como a diferença de concentração de AF no nível superior e inferior era de 5 vezes, e o aumento no sinal observado quando a variável estava no nível superior foi de apenas 10%, se optou por escolher a menor concentração (5% (v/v)). Entretanto, como será discutido posteriormente, foi necessário utilizar uma concentração de 25% (v/v) nas amostras, mantendo a concentração da solução carreadora em 5% (v/v). Como pode ser visto na Tabela 8, diferente do observado para a CV, as condições ótimas encontradas para a PVG empregando as duas estratégias de otimização foram concordantes. Entretanto, os comportamentos observados para as variáveis foram diferentes. A vazão de AF, por exemplo, teve comportamentos opostos pelas duas estratégias de otimização. A otimização univariada (item 5.1.2.3) mostrou que o aumento da vazão de AF (e diminuição do tempo de irradiação) resultava em aumento no sinal, já a otimização multivariada mostrou que diminuir a vazão (e aumentar o tempo de irradiação) resultava no aumento do sinal. Os dois comportamentos observados já foram reportados na literatura.<sup>23, 47</sup> Porém, nesse caso, devido as interações observadas entre as variáveis, otimização multivariada se mostrou mais adequada para a otimização das variáveis.

**Figura 14.** Gráficos de superfícies de resposta para a PVG-AAS.



Fonte: O autor

**Tabela 8.** Condições ótimas encontrada para a PVG-AAS empregando as estratégias univariada e multivariada de otimização.

Variável	Otimização univariada	Otimização multivariada
[AF] / % (v/v)	5-50	25
Vazão AF / mL min <sup>-1</sup>	8,0	8,0
Vazão Ar / mL min <sup>-1</sup>	40	40

Fonte: O autor

### 5.2.3 Parâmetros de mérito

Depois de otimizadas as condições de geração de vapor do Hg pela estratégia multivariada, foram construídas novas curvas de calibração (utilizando as mesmas concentrações e massas de Hg empregadas na otimização univariada) e calculados novos parâmetros de mérito para as duas técnicas (Tabela 9). Para a construção das curvas foram empregadas nove soluções com concentração entre 0,25 e 20 µg L<sup>-1</sup> Hg (0,125 a 10 ng Hg).

Os parâmetros calculados para a PVG não foram alterados, quando comparados com aqueles obtidos *via* otimização univariada, já que as mesmas condições ótimas foram obtidas pelas duas estratégias de otimização. Para a CV foi observada uma melhora no LD e LQ instrumental, além de um aumento de 40% na sensibilidade, utilizando a otimização multivariada. Porém, os valores de LD e LQ instrumentais obtidos para a PVG foram duas vezes melhores que os obtidos para CV. Isso ocorre pois os sinais de branco obtidos para a PVG foram menores e mais reprodutíveis que os da CV, que utiliza reagentes que podem ser fonte de contaminação como o NaBH<sub>4</sub>. Já a PVG utiliza como reagentes apenas ácidos orgânicos, que normalmente estão disponíveis com elevada pureza.

O LD da PVG, calculado neste trabalho, foi menor que o LD (60 ng L<sup>-1</sup>) encontrado por Oreste *et al.*<sup>24</sup> utilizando PVG-AAS e otimização univariada. Lisboa *et al.*<sup>25</sup> obtiveram maiores LD para a CV-AAS (com otimização univariada), utilizando NaBH<sub>4</sub> ou SnCl<sub>2</sub> como agente redutor, os valores encontrados foram de 110 e 40 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A eficiência da PVG foi estimada novamente, por comparação com a nova sensibilidade obtida para a CV, considerada 100%. Nessas condições a eficiência calculada para a PVG foi de 96%. Esse resultado mostra a importância de realizar a otimização multivariada para as técnicas, uma vez que a interação entre variáveis é significativa e influencia nas condições ótimas escolhidas. Diferente do observado para a otimização univariada, esse resultado está de acordo com o reportado na literatura. Potes *et al.*<sup>47</sup> obtiveram uma eficiência inferior a essa (85%), na determinação de Hg por PVG-GF AAS,

utilizando Au como modificador permanente para a pré-concentração do analito. Vieira *et al.*<sup>23</sup> obtiveram eficiência similar a deste trabalho (95%) utilizando PVG-QTA AAS. Lisboa *et al.*<sup>25</sup> obtiveram eficiências diferentes para a PVG comparando com a CV utilizando NaBH<sub>4</sub> ou SnCl<sub>2</sub> como agente redutor, os valores encontrados foram de 60% e 78%, respectivamente. As eficiências distintas obtidas indicam que o método empregando NaBH<sub>4</sub> provavelmente não estava nas condições ótimas, já que teve uma sensibilidade inferior ao método empregando SnCl<sub>2</sub>. Isso pode ser explicado considerando que os autores empregaram estratégia univariada para otimizar as condições de vapor, e possíveis interações entre as variáveis não foram consideradas.

**Tabela 9.** Parâmetros de mérito instrumentais obtidos para CV e PVG a partir da otimização multivariada.

<b>Técnica</b>	<b>Regressão linear</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD / ng L<sup>-1</sup></b>	<b>LD / pg</b>	<b>LQ / ng L<sup>-1</sup></b>	<b>LQ / pg</b>	<b>m<sub>0</sub> / pg</b>
CV	A <sub>int</sub> =0,372m (ng)+0,0267	0,9992	25	12	82	41	12
PVG	A <sub>int</sub> =0,358m (ng) +0,0150	0,9992	11	6	38	19	13

Fonte: O autor

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE PEIXE

Após otimizar as condições de geração de vapor do Hg através da estratégia multivariada, os métodos foram empregados na determinação de Hg em amostras de peixe. Aqui serão apresentados os procedimentos de preparo de amostras investigados para a CV e para a PVG, bem como os resultados referentes à avaliação da exatidão e precisão dos métodos otimizados.

#### 5.3.1 Preparo de amostra

##### 5.3.1.1 CV-AAS

Para o preparo das amostras foi empregada digestão em bloco de aquecimento, usando sistema de refluxo com dedos frio para evitar perdas do analito e reduzir o consumo de HNO<sub>3</sub>. Inicialmente, foi empregado o procedimento de preparo de amostra reportado por Oreste *et al.*<sup>46</sup> Para isso, a amostra foi digerida apenas com 1 mL de HNO<sub>3</sub>. No entanto, a análise utilizando esse procedimento resultou em baixos valores de recuperação para os

materiais de referência (40%), indicando que a digestão das amostras não foi completa. Um segundo teste foi realizado adicionando o dobro de  $\text{HNO}_3$ , resultando em melhores, porém, ainda baixas recuperações (60%). Então, em um terceiro teste, foi adicionado  $\text{KMnO}_4$  como um segundo oxidante para auxiliar na decomposição da matéria orgânica, e o mesmo procedimento inicial foi seguido, ao final da digestão foi necessário adicionar cloridrato de hidroxilamônio para redução do  $\text{KMnO}_4$  em excesso. Empregando esse procedimento os valores de Hg obtidos foram concordantes com os materiais de referência (resultados apresentados no item 5.3.2). Porém, os brancos obtidos nesse procedimento foram elevados, em comparação aos brancos obtidos no procedimento da PVG. Isso ocorre devido a utilização de reagentes como o  $\text{KMnO}_4$  que podem ser uma fonte de contaminação.

#### 5.3.1.2 PVG-AAS

É conhecido que uma problemática da PVG consiste na interferência decorrente da presença de oxidantes e outros íons no meio.<sup>21</sup> Espécies aniônicas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$  já foram reportadas como interferentes, pois atuam como supressores da PVG, competindo com o analito pelos radicais do precursor orgânico.<sup>20, 57</sup> Em contrapartida, uma vantagem da técnica no caso de determinação de Hg é a possibilidade de se realizar apenas uma solubilização das amostras, não sendo necessária a liberação do Hg de suas espécies orgânicas. Isso é possível, pois a radiação UV empregada para a redução fotoquímica do Hg é capaz de quebrar ligações Hg-C, presentes em espécies orgânicas de Hg, como metilmercúrio e etilmercúrio.<sup>23, 25</sup> Assim, diferente da abordagem utilizada para o preparo de amostras da CV, na PVG não foram empregados ácidos inorgânicos ou agentes oxidantes. Para essa técnica a abordagem utilizada consistiu apenas na solubilização das amostras com TMAH, seguida da adição de ácido fórmico como precursor orgânico.

Em um primeiro teste, a amostra foi solubilizada em 1 mL de TMAH, sendo mantida em um banho a 60 °C por 3h. Ao final as amostras foram avolumadas para 10 mL com ácido fórmico 5% (v/v). Empregando esse procedimento se observou que o ácido fórmico adicionado era neutralizado pelo TMAH (básico). Assim, para garantir a presença de ácido fórmico no meio, foi adicionado um excesso desse reagente (25% v/v). As soluções obtidas usando esse procedimento eram opacas e escuras (Figura 15a) e os valores encontrados não foram concordantes com o certificado. O mesmo já foi reportado em outros trabalhos utilizando ácido fórmico para o preparo das amostras, e os resultados insatisfatórios obtidos foram atribuídos a baixa penetração da radiação ultravioleta na solução.<sup>23, 47, 58</sup> Vieira *et al.*<sup>23</sup>

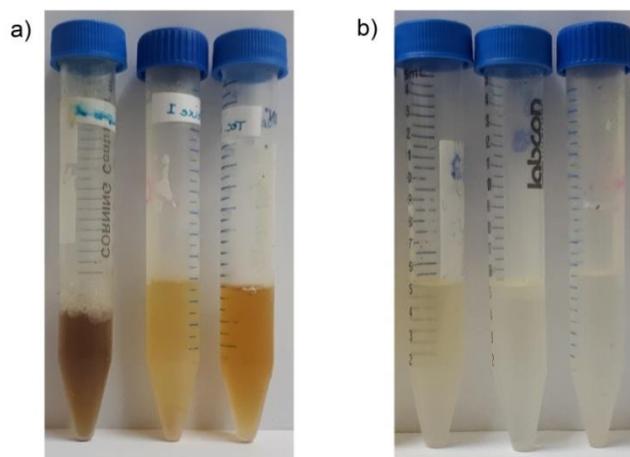
resolveram esse problema aumentando o tempo de exposição da solução a radiação UV. O mesmo foi testado por Potes *et al.*<sup>47</sup>, porém sem sucesso. No presente trabalho, uma simples diluição foi suficiente para obter soluções incolores e assim garantir maior irradiação das amostras, eliminado o efeito de matriz (Figura 15b).

### 5.3.2 Parâmetros de mérito e avaliação da exatidão dos métodos

Os valores de LD e LQ do método foram calculados a partir dos valores absolutos (Tabela 9), considerando a massa de amostra empregada no preparo (150 mg) e o volume final de 15 mL para a CV e 10 mL para a PVG, e estão apresentados na Tabela 10. O LD e o LQ do método obtidos para a PVG foram melhores que os encontrados para a CV. Porém ambos os métodos seriam adequados para a determinação de Hg em peixe, considerando a concentração máxima desse analito permitida pela legislação brasileira (entre 0,5 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup>)<sup>59</sup>.

A exatidão do método foi avaliada pela análise de dois candidatos a materiais de referência (músculo de peixe e tecido de atum) e um material de referência certificado (DOLT-4). Esses resultados estão descritos na Tabela 11. Todas as concentrações de Hg determinadas nos materiais analisados foram concordantes com os valores certificados a um nível de confiança de 95% (teste t-student). A precisão dos métodos foi confirmada pelo RSD das medidas, os valores obtidos são considerados aceitáveis segundo a Associação da Comunidade Analítica (AOAC internacional), que recomenda um RSD abaixo de 20% para a faixa de concentração analisada.<sup>60</sup>.

**Figura 15.** Aspecto das amostras a) antes e b) após diluição de 1:10. Da esquerda para a direita: DOLT-4, músculo de peixe e tecido de atum.



Fonte: O autor

**Tabela 10.** Parâmetros de mérito do método para a determinação de Hg por CV-AAS e PVG-AAS.

<b>Técnica</b>	<b>LD<sup>a</sup> / ng g<sup>-1</sup></b>	<b>LQ<sup>a</sup> / ng g<sup>-1</sup></b>	<b>RSD<sup>b</sup> / %</b>
CV-AAS	2,5	8,2	0,2 - 4,3
PVG-AAS	1,1	3,8	0,1 - 6,8

Fonte: O autor

<sup>a</sup>Calculados para uma massa de amostra de 150 mg<sup>b</sup>n = 3**Tabela 11.** Determinação de Hg em CRM e materiais de referência por CV-AAS e PVG-AAS.

<b>Amostra</b>	<b>Valor certificado ou de referência / µg g<sup>-1</sup></b>	<b>valor determinado<sup>a</sup> / µg g<sup>-1</sup></b>		<b>t<sub>calculado</sub><sup>b</sup></b>	
		<b>CV</b>	<b>PVG</b>	<b>CV</b>	<b>PVG</b>
CRM DOLT-4	2,58±0,22	2,65±0,04	2,43±0,11	2,69	2,44
Tecido de atum	3,03±0,22	3,32±0,34	3,00±0,11	1,52	0,46
Músculo de peixe	1,03±0,26	1,08±0,08	1,07±0,03	1,11	2,31

Fonte: O autor

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão (n=3)<sup>b</sup>t<sub>tabelado</sub> = 4,30

## 6. CONCLUSÕES

A otimização univariada das técnicas mostrou que avaliar a resposta em função de área do pico resulta em maior sensibilidade e melhores parâmetros de mérito. Nessas condições a PVG-AAS apresentou melhores limites de detecção e quantificação, além de uma eficiência de geração de vapor maior que a CV-AAS.

O planejamento fatorial realizado para as técnicas mostrou que há efeitos significativos de interação entre as variáveis (condições experimentais), e por isso avaliá-las individualmente, como na estratégia univariada, não é adequado. O planejamento Doehlert resultou em modelos matemáticos quadráticos que descrevem pontos críticos de sela. As condições ótimas determinadas para a CV-AAS foram distintas das encontradas pela estratégia univariada, resultando em melhorias nos limites de detecção e quantificação, além de um aumento na sensibilidade, demonstrando a importância de realizar a otimização multivariada. Para a PVG-AAS, não se observou mudanças significativas entre as condições ótimas obtidas através das estratégias univariada e multivariada. Porém, o planejamento fatorial também mostrou efeitos de interação significativos, indicando que a estratégia multivariada seria mais adequada nesse caso. Os parâmetros de mérito calculados para a PVG-AAS foram melhores que para a CV-AAS, e as eficiências de geração de vapor, estimadas *via* otimização multivariada, foram similares comparando as duas técnicas.

A otimização dos métodos permitiu a determinação de forma simples, exata e precisa de Hg em amostras de peixe por CV-AAS e PVG-AAS. Os limites de detecção e quantificação do método apresentaram valores coerentes com o que recomenda a legislação brasileira, o que demonstra que as técnicas são adequadas para a determinação de Hg em peixe.

## 7. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> LEERMAKERS, M. *et al.* Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 383-393, 2005.
- <sup>2</sup> MICARONI, R. *et al.* Mercury compounds. Review on determination, treatment and disposal methods. **Quimica Nova**, v. 23, p. 487-495, 2000.
- <sup>3</sup> CARRIER, G. *et al.* A 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**, v. 171, p. 50-60, 2001.
- <sup>4</sup> BJORKLUND, G. *et al.* The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. **Environmental Research**, v. 159, p. 545-554, 2017.
- <sup>5</sup> MAHBUB, K. R. *et al.* Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**, v. 74, p. 451-462, 2017.
- <sup>6</sup> SELIN, N. E. Global biogeochemical cycling of mercury: A review. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 43-63, 2009.
- <sup>7</sup> PACYNA, E. G. *et al.* Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 2487-2499, 2010.
- <sup>8</sup> MASON, R. P. *et al.* Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. **Environmental Research**, v. 119, p. 101-117, 2012.
- <sup>9</sup> KIM, K. H. *et al.* A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 376-385, 2016.
- <sup>10</sup> REIS, A. T. *et al.* An international proficiency test as a tool to evaluate mercury determination in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 64, p. 136-148, 2015.
- <sup>11</sup> POHL, P. Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p.21-27, 2004.
- <sup>12</sup> STURGEON, R. E. *et al.* Chemical vapor generation: are further advances yet possible? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 881-883, 2005.
- <sup>13</sup> WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3<sup>th</sup> ed. Weinheim: WILEY-VCH, 1999.
- <sup>14</sup> WELZ, B.; VALE, M. G. R. Atomic absorption spectrometry and related techniques *In*: CAZES, J. **Ewing's Analytical Instrumentation Handbook**. 3<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 2005. cap. 4, p.75-123.
- <sup>15</sup> DA SILVA, M. J. *et al.* Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, p. 43-48, 2010.

- <sup>16</sup> VOEGBORLO, R. B. *et al.* 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**, v. 123, p. 936-940, 2010.
- <sup>17</sup> KAN, M. *et al.* Determination of total mercury in biological samples using flow injection CVAAS following tissue solubilization in formic acid. **Talanta**, v. 68, p. 1259-1263, 2006.
- <sup>18</sup> ROCHA, D. L. *et al.* A critical review on photochemical conversions in flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 896, p. 11-33, 2015.
- <sup>19</sup> GUO, X. M. *et al.* UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2092-2099, 2003.
- <sup>20</sup> STURGEON, R. E. *et al.* Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 222-231, 2012.
- <sup>21</sup> STURGEON, R. E. Photochemical vapor generation: a radical approach to analyte introduction for atomic spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, p. 2319-2340, 2017.
- <sup>22</sup> CHEN, G. Y. *et al.* Mercury speciation by differential photochemical vapor generation at UV-B vs. UV-C wavelength. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 137, p. 1-7, 2017.
- <sup>23</sup> VIEIRA, M. A. *et al.* Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 837-847, 2007.
- <sup>24</sup> ORESTE, E. Q. *et al.* Determination of Hg in biological samples and ethanol fuel by photochemical vapor generation after pre-concentration in a gold trap. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1779-1787, 2017.
- <sup>25</sup> LISBOA, M. T. *et al.* Comparison between vapor generation methods coupled to atomic absorption spectrometry for determination of Hg in glycerin samples. **Energy & Fuels**, v. 29, p. 1635-1640, 2015.
- <sup>26</sup> LIU, Q. Y. Direct determination of mercury in white vinegar by matrix assisted photochemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry detection. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 65, p. 587-590, 2010.
- <sup>27</sup> ARAUJO, P. W. *et al.* Experimental design II. Optimization. **Trends in analytical chemistry**. v. 15 p.63-70, 1996.
- <sup>28</sup> FERREIRA, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.
- <sup>29</sup> BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.
- <sup>30</sup> NOVAES, C. G. *et al.* Optimization of analytical methods using response surface methodology – part I: Process variables. **Revista Virtual de Química**. v. 9, 2017.
- <sup>31</sup> FERREIRA, S. L. C. *et al.* Multivariate optimization techniques in analytical chemistry-an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176-182, 2018.

- <sup>32</sup> TEOFILO, R. F. *et al.* Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.
- <sup>33</sup> NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2<sup>th</sup> ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2001.
- <sup>34</sup> CALLAO, M. P. Multivariate experimental design in environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 86-92, 2014.
- <sup>35</sup> FERREIRA, S. L. C. *et al.* Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.
- <sup>36</sup> GAO, Y. *et al.* Multivariate optimization of photochemical vapor generation for direct determination of arsenic in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 34-40, 2015.
- <sup>37</sup> DOS SANTOS, V. C. G. *et al.* Multivariate optimization of mercury determination by flow injection-cold vapor generation-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analyst**, v. 137, p. 4458-4463, 2012.
- <sup>38</sup> PIÑEIRO, J. M. *et al.* Direct mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 460, p. 111-122, 2002.
- <sup>39</sup> ANTOLIN, R. *et al.* Optimisation of volatile elements determination by flow injection hydride generation-inductively coupled plasma spectrometry in electrolytic manganese. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 427, p. 73-77, 2007.
- <sup>40</sup> DA SILVA, D. G. *et al.* Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 137, p. 159-163, 2013.
- <sup>41</sup> DA SILVA, D. L. F. *et al.* Simultaneous determination of mercury and selenium in fish by CVG AFS. **Food Chemistry**, v. 273, p. 24-30, 2019.
- <sup>42</sup> GROTTI, M. *et al.* Multivariate study in chemical vapor generation for simultaneous determination of arsenic, antimony, bismuth, germanium, tin, selenium, tellurium and mercury by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 20, p. 1365-1373, 2005.
- <sup>43</sup> DOS SANTOS, E. J. *et al.* Evaluation of slurry preparation procedures for the determination of mercury by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line cold vapor generation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 659-665, 2005.
- <sup>44</sup> GUERRERO, M. M. L. *et al.* High resolution continuum source atomic absorption spectrometry and solid phase extraction for the simultaneous separation/preconcentration and sequential monitoring of Sb, Bi, Sn and Hg in low concentrations. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, p. 1169-1178, 2015.
- <sup>45</sup> GARCIA, M. *et al.* Determination of As, Se, and Hg in fuel samples by in-chamber chemical vapor generation ICP OES using a Flow Blurring (R) multinebulizer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 5481-5490, 2017.

- <sup>46</sup> ORESTE, E. Q. *et al.* New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 5-9, 2013.
- <sup>47</sup> POTES, M. L. *et al.* Determination of mercury in fish by photochemical vapor generation graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 8165-8172, 2016.
- <sup>48</sup> Perkin Elmer, FIMS 400/100 brochure. Disponível em: <[https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO\\_FIMS-100-400.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_FIMS-100-400.pdf)>- Acesso em: 22 de outubro de 2018.
- <sup>49</sup> MADDEN, J. T. *et al.* Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 925-927, 2009.
- <sup>50</sup> ZHANG, R. X. *et al.* Application of flow injection-green chemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometry to ultrasensitive mercury speciation analysis of water and biological samples. **Microchemical Journal**, v. 127, p. 62-67, 2016.
- <sup>51</sup> BEZERRA, M. D. A.; LEMOS, V. A. **Análises Químicas Por Sistemas De Injeção Em Fluxo**. Vitória da Conquista: Ed. UESB, 2017.
- <sup>52</sup> FANG, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration**. Weinheim: VCH, 1993.
- <sup>53</sup> KARLBERG, B.; PACEY, G. E. Flow injection analysis: A practical guide. *In: Techniques And Instrumentation In Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, v.10, 1989.
- <sup>54</sup> BEAUCHEMIN, D. Flow injection techniques. *In: Comprehensive Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, v.34, 2000. cap. 2, p.213-346.
- <sup>55</sup> SIEMER, D. D. *et al.* Optimization of arsine generation in atomic absorption arsenic determinations. **Analytical Chemistry**. v. 48, p. 836-840, 1976.
- <sup>56</sup> OEHLERT, G. W. **A first course in design and analysis of experiments**. 1<sup>th</sup> ed. Texas: Freeman, 2000.
- <sup>57</sup> HOU, X. L. *et al.* UV light-emitting-diode photochemical mercury vapor generation for atomic fluorescence spectrometry. **Analyst**, v. 137, p. 686-690, 2012.
- <sup>58</sup> LIU, R. *et al.* Determination of total mercury in biological tissue by isotope dilution ICP MS after UV photochemical vapor generation. **Talanta**, v. 117, p. 371-375, 2013.
- <sup>59</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 685, DE 27 DE AGOSTO DE 1998**- Brasil; D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, 1998.
- <sup>60</sup> AOAC International., Official methods of analysis of AOAC International, in guidelines for standard method performance requirements (Appendix F). Disponível em: <[http://www.coma.aoc.org/app\\_f.pdf](http://www.coma.aoc.org/app_f.pdf)>- Acesso em: 22 de outubro de 2018.