



DAIANE PLACIDO TORRES

**MERCÚRIO: VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO EM PEIXE
E CAMARÃO E AVALIAÇÃO DA SUA DISTRIBUIÇÃO EM TECIDOS DE
CARANGUEJOS E EFEITO DA PRESENÇA DE SELÊNIO**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

DAIANE PLACIDO TORRES

**MERCÚRIO: VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO EM PEIXE
E CAMARÃO E AVALIAÇÃO DA SUA DISTRIBUIÇÃO EM TECIDOS DE
CARANGUEJOS E EFEITO DA PRESENÇA DE SELÊNIO**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SOLANGE CADORE

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR DAIANE PLACIDO TORRES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SOLANGE
CADORE.

Solange Cadore
Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

T636m Torres, Daiane Placido (1984-).
Mercúrio: validação de método para determinação em peixe e camarão e avaliação da sua distribuição em tecidos de caranguejos e efeito da presença de selênio / Daiane Placido Torres. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Solange Cadore.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Mercúrio. 2. Selênio. 3. Organismos marinhos. 4. Técnicas espectrométricas de análise. I. Cadore, Solange. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Mercury: method validation for determination in fish and shrimp samples and evaluation of its distribution in tissues of crabs and effect of the selenium presence

Palavras-chave em inglês:

Mercury
Selenium
Marine organisms
Spectrometric techniques of analysis

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Solange Cadore [Orientadora]
Valderi Luiz Dressler
Andrea P. de Oliveira
Nivaldo Baccan
Celio Pasquini

Data de defesa: 13/03/2013

Programa de pós-graduação: Química

Discurso sobre o método

(Descartes, parte I).

“INEXISTE NO MUNDO coisa mais bem distribuída que o bom senso, visto que cada indivíduo acredita ser tão bem provido dele que mesmo os mais difíceis de satisfazer em qualquer outro aspecto não costumam desejar possuí-lo mais do que já possuem.”

Calvin Coolidge

“Nothing in the world can take the place of Persistence.
Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent.
Genius will not; unrewarded genius is almost a proverb.
Education will not; the world is full of educated derelicts.
Persistence and determination alone are omnipotent.
The slogan ‘Press On’ has solved and always will solve the problems of the
human race.”

Dedicatória

Dedico este trabalho a uma das pessoas mais nobres que conheci e a quem sempre admirarei, Adilson José Curtius (*In Memoriam*). Devo a ele o ingresso na vida científica, e me sinto privilegiada pela oportunidade de ter passado mais de cinco anos sob sua orientação. Além do grande amor em ensinar, ele foi um exemplo de dedicação, humildade, persistência, inteligência e ética profissional. Entretanto, o que mais me encantou desde que o conheci foi a sua humanidade, o seu coração bondoso e imensa generosidade e carinho pelos alunos e ex-alunos.

Agradecimentos

A Deus, por abençoar a minha vida diariamente.

Minha orientadora, professora Solange, que acreditou no meu potencial e por todo o seu suporte e generosidade durante o meu doutorado.

Meus orientadores alemães-escoceses Eva Krupp e Jörg Feldmann, pelo incansável apoio profissional e emocional.

Meus antigos orientadores, professores Adilson Curtius (*In Memoriam*) e Vera Frescura, e seu imenso e incansável suporte e carinho.

Professores do IQ Jarbas José Rodrigues Rohwedder e Roy Edward Bruns, cuja abertura e ajuda foram recorrentes durante meu doutorado.

Meus pais, Atair e Jucélia, e meus irmãos, Luciano e Juliana, pelo apoio incondicional.

Minha amiga Heloisa, por seu apoio pessoal e profissional desde o início do meu doutorado.

Minha grande amiga Laura, que me mostrou de uma forma muito especial o valor da amizade sem julgamento, e sua família (Sueli, Chico, Tom, Viviane, Eduardo) por todo o apoio, carinho e alegria que me proporcionam constantemente.

Amigos do laboratório TESLA, na Escócia, Cornelius Brombach, Sabine Freitag, Mark Shields, Mohammed Lawan, Patrick Czaja, Yayoi e Mei Kobayashi, Kenneth Amayo, Talke Marschall, Matthias Voigt, Johannes Kopp, Breda Novotnik, Rita Afonso, Abdelkarem Elgzali, Mohamed Farouk, Ou Ou, Asta Petursdottir, Katrina Newlands, Dagmar Urgast, Thilo Rahn e Andrea Raab.

Membros staff da Universidade de Aberdeen Steve Adams, Duncan Wood, Gary Smith, Russel Gray, Valerie McLeod e Rosemary McKenzie, que como bons escoceses, sempre foram infinitamente prestativos e doces comigo.

Meus grandes amigos brasuca-aberdonians, Letícia Costa, Shirley Motta, Bruno Lemos e Christiane Duyck, pelo apoio pessoal e profissional.

Amigas Ina Knieselies e Spela Mechora, pelo carinho e acolhimento.

Minhas queridas amigas do Lanagro-SP, Maristela Martins e Janaína Lima e seu apoio incondicional e constante.

Queridos amigos do laboratório GEAtom Manu Nascimento, Andrea Oliveira, Rafael Arromba e Mirla Cidade.

Meus queridos amigos de Florianópolis Eduardo Chaves, Tati Maranhão, Ingrid Dittert, Daniel Borges, Dai Paula, Jessee Severo, Luciano Tormen, Taize Pereira e Zoraide, que apesar da distância sempre me apoiaram durante o doutorado.

Casal Jaqueline De Bona e Cesar Preis, exemplo de amizade, carinho, amor e acolhimento. Amigos do IQ Gustavo Pessôa, Alessandra Vieira, Alessandra Sussulini e cônjuge, Milena Segato, Paula Fortes e cônjuge, Ana Cristi, Marcelo Oseas, Elidiane Silva, Lidiane Mataveli, Gizelle Bedendo, Herbert Barbosa e cônjuge, Adilson Brandão, Mariana de Almeida, Danilo Althmann, Rodrigo Galazzi, Lívia Ribeiro, Ricardo Mathias, Ivanilce Cristina, Mario Killner e Francisco Martins.

Meus queridos familiares, tios e tias, Salete, Fernanda (*In Memoriam*), Irlete, Elizete, Inês, Laudete, Cláudia, Flor, Gorete, Vanderlei e Valdir pelo apoio e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram com meu doutorado.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas suas contribuições.

CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

Formação acadêmica

- 2009 - 2013** Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, Brasil.
Título: Mercúrio: Validação de método para determinação em peixe e camarão e avaliação da sua distribuição em tecidos de caranguejos e efeito da presença de selênio
Orientador: Solange Cadore.
Bolsista do CNPq.
- 2011 - 2012** Doutorado Sanduíche em Química.
University of Aberdeen, Aberdeen, Escócia.
Orientador estrangeiro: Eva Maria Krupp.
Co-orientador estrangeiro: Jörg Feldmann.
Título: Investigation of mercury distribution in organs of crabs exposed to mercury species with or without co-exposition to selenium by using chromatographic and spectrometric techniques.
Bolsista da CAPES.
- 2007 - 2009** Mestrado em Química.
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil.
Título: Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio.
Orientador: Adilson José Curtius.
Bolsista do CNPq.
- 2002 - 2006** Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Química.
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil.
Bolsista do CNPq.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Torres, D.P.; Martins-Teixeira, M.B.; Silva, E.F.; Queiroz, H.M. Method development for the control determination of mercury in seafood by solid-sampling thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS). *Food Additives & Contaminants. Part A*. 29(4), 625-632, 2012.
2. Tormen, L.; Torres, D.P.; Dittert, I.M.; Araújo, R.G.O.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Fast assessment of mineral composition of commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 95-102, 2011.
3. Torres, D.P.; Dittert, I.M.; Höhn, H.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Determination of mercury in gasoline diluted in ethanol by GF AAS after cold vapor generation, pre-concentration in gold column and trapping on graphite tube. *Microchemical Journal*, 96, 32-36, 2010.
4. Torres, D.P.; Borges, D.L.G.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 24, 1118-1122, 2009.
5. Rodrigues, J.L.; Torres, D.P.; Souza, V.C.O.; Batista, B.L.; Souza, S.S.; Curtius, A.J.; Barbosa Jr, F. Determination of total and inorganic mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV ICP-MS) with alkaline sample preparation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 24, 1414-1420, 2009.
6. Torres, D.P.; Frescura, V.L.A.; Curtius, A.J. Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. *Microchemical Journal*. 93, 206-210, 2009.
7. Torres, D.P.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J. Slurry sampling for As determination in sediments by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18, 728-732, 2007.
8. Torres, D.P.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J. Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 20, 289-294, 2005.

Resumo

Mercúrio: Validação de método para determinação em peixe e camarão e avaliação da sua distribuição em tecidos de caranguejos e efeito da presença de selênio

A primeira etapa deste trabalho consistiu no desenvolvimento e na validação de um método para a determinação de mercúrio total em peixe e camarão por espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica/amalgamação (TDA AAS). O método foi validado segundo legislações nacionais e internacionais, específicas para gêneros alimentícios, e utilizado para a análise de amostras de peixe e camarão, atendendo o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para tanto, foram avaliadas a linearidade, efeitos de matriz/ interferências, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intra-laboratorial), robustez e exatidão (recuperação). Na segunda parte deste trabalho, desenvolvida no período de doutorado sanduíche na Universidade de Aberdeen, na Escócia, buscou-se avaliar as características da exposição de caranguejos a mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, com ou sem co-exposição a selenato, através da dieta, com a finalidade de avaliar o efeito do selênio em neutralizar a toxicidade do mercúrio, bem como o efeito da razão molar Hg:Se nas dietas e tecidos dos caranguejos expostos. Para os caranguejos expostos a mercúrio inorgânico, a acumulação do mesmo foi estatisticamente confirmada (p -valor $< 0,05$ para a comparação dos tecidos dos caranguejos expostos com aqueles dos caranguejos controle) no hepatopâncreas, músculo da carapaça, guelra e coração, ao passo que para o caso da co-exposição a selênio, a acumulação de mercúrio foi significativa somente no coração. Diferentemente, quando se considera a exposição a metilmercúrio, a acumulação de mercúrio foi estatisticamente significativa no músculo da carapaça e das pernas, hepatopâncreas, guelra, coração e testículo/ovário. Entretanto, para a co-exposição a selênio, a acumulação de mercúrio foi somente significativa no músculo da carapaça e guelra. Desta forma, o acúmulo de mercúrio e as interações Hg-Se no hepatopâncreas, coração e músculo dos caranguejos foram altamente significativas para as exposições às espécies de Hg sem co-exposição a Se. Assim, a co-exposição a selênio através da dieta desempenhou um papel importante na redução do impacto da toxicidade das espécies de mercúrio investigadas neste trabalho, mostrando uma mudança nos padrões de absorção e acumulação desses compostos nos tecidos dos caranguejos.

Abstract

Mercury: Method validation for determination in fish and shrimp samples and evaluation of its distribution in tissues of crabs and effect of the selenium presence

In the first step of this work the development and validation of a method for the determination of total mercury in fish and shrimp by thermal decomposition/ amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS) was accomplished. This methodology, validated according to national and international foodstuff protocols, has been employed for the analysis of fish and shrimp from the National Residue Control Plan, from the Ministry of Agriculture of Brazil. To comply with the international protocols, linearity, interferences/ matrix effects, detection and quantification limits, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), robustness and accuracy (recovery) of the method have been evaluated. The second step of this work, developed during a period of Sandwich Ph.D. at the University of Aberdeen, Scotland, aimed to evaluate the features between dietary inorganic mercury or methylmercury, with or without selenate co-exposure, in order to examine dietary selenium's role in counteracting mercury toxicity as well as the effect of Se:Hg molar ratio in the diets and tissues of exposed crabs. For the crabs exposed to inorganic mercury, the accumulation was statistically confirmed (p -value < 0.05 for the comparison of the tissues from the exposed crabs to those from the control crabs) in the hepatopancreas, muscle from thorax, gill and heart, whereas for the co-exposure to selenium, the accumulation of mercury was significant only in the heart. In contrast, when considering the methylmercury exposure, the Hg accumulation was statistically significant in the muscle from thorax and legs, hepatopancreas, gill, heart and testis/ovarium. However, for the co-exposure to selenium, the Hg accumulation was only significant in the muscle from thorax and gills. Therefore, the accumulation of Hg and the Hg-Se interactions in the hepatopancreas, heart and muscle of the crabs were highly significant for the exposures to Hg species without co-exposure to Se. Thus, the dietary exposure to Se played a very important role reducing the impact of the toxicity of the Hg species investigated in the present work, showing to change their toxicokinetics and toxicodynamics in crabs tissues, and in consequence their uptake and accumulation patterns.

Índice

Lista de abreviaturas	3
Lista de tabelas	4
Lista de figuras	6
Capítulo 1 – Introdução	7
1.1 Mercúrio, selênio e organismos marinhos.....	7
1.2 Espectrometria atômica	11
1.2.1 Espectrometria de emissão atômica.....	12
1.2.2 Espectrometria de absorção atômica	12
1.2.3 Espectrometria de fluorescência atômica.....	13
1.2.4 A técnica do vapor frio	13
1.3 Emprego de TDA AAS para a determinação de mercúrio.....	15
1.4 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.....	16
1.4.1 Analisador de massas com tecnologia de quadrupolo	19
1.4.2 Analisador de massas com tecnologia de setor magnético de dupla focalização	20
1.5 Validação de métodos para contaminantes inorgânicos.....	21
1.6 Objetivos gerais	22
Capítulo 2 – Determinação de mercúrio para o seu controle oficial em peixe e camarão de origem brasileira por TDA AAS.....	23
2.1 Considerações	23
2.2 Objetivos	24
2.3 Parte experimental.....	24
2.3.1 Instrumentação.....	24
2.3.2 Reagentes	25
2.3.3 Procedimento de preparo de amostra	25
2.4 Resultados e discussão	26
2.4.1 Desenvolvimento do método.....	26
2.4.1.1 Otimização da quantificação de mercúrio em peixe fresco por TDA AAS ..	26
2.4.1.2 Pré-concentração de mercúrio no sistema amalgamador	28
2.4.1.3 Efeito de memória	28
2.4.1.4 Robustez do método	30
2.4.1.5 Aplicação analítica.....	33
2.4.2 Validação do método	34
2.4.2.1 Linearidade, faixa de trabalho e curva analítica de calibração	36
2.4.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação	41
2.4.2.3 Repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial.....	42
2.4.2.4 Recuperação e exatidão.....	45
2.4.2.5 Interferências e efeitos de matriz.....	46
2.5 Conclusão	49
Capítulo 3 – Avaliação da exposição de caranguejos, através da dieta, a mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, com ou sem co-exposição a selênio.....	50
3.1 Considerações	50
3.2 Objetivos	51
3.3 Parte experimental.....	51
3.3.1 Instrumentação.....	51

3.3.2 Reagentes	52
3.3.4 Configuração para os experimentos de exposição dos caranguejos.....	55
3.3.5 Procedimento de preparo de amostra	57
3.4 Resultados e discussão	59
3.4.1 Desenvolvimento do método.....	59
3.4.1.1 Otimização da quantificação de mercúrio nas amostras de caranguejo por CV AFS	59
3.4.1.2 Otimização da quantificação de selênio nas amostras de caranguejo por HR-ICP-MS	60
3.4.2 Avaliação da distribuição de mercúrio e da razão Se:Hg nos tecidos dos caranguejos	61
3.5 Conclusão	72
4. Referências bibliográficas.....	74
5. Anexos.....	78
5.1 Curva analítica do DMA-80 e seus respectivos gráficos de dispersão de resíduos e normal probabilístico	78
5.2 Sinais analíticos do DMA-80	80
5.3 Medidas de segurança ao se trabalhar com compostos de mercúrio	82

Lista de abreviaturas

AA – Absorção atômica (Atomic absorption)

AAS – Espectrometria de absorção atômica (Atomic absorption spectrometry)

AFS – Espectrometria de fluorescência atômica (Atomic fluorescence spectrometry)

CV – Vapor frio (Cold vapor)

CV AAS - Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (Cold vapor atomic absorption spectrometry)

CV AFS - Espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (Cold vapour atomic fluorescence spectrometry)

CVG – Geração química de vapor (Chemical vapor generation)

CRM – Material de referência certificado (Certified reference material)

GF AAS - Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Graphite furnace atomic absorption spectrometry)

HR-ICP-MS - Espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado (High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry)

ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma mass spectrometry)

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

RSD - Desvio padrão relativo (Relative standard deviation)

SD - Desvio padrão (Standard deviation)

TDA AAS - Espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica/ amalgamação (Thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry)

TMC - Teor máximo de contaminante

Lista de tabelas

Tabela 1 – Valores de concentração de mercúrio, na base de massa fresca, coeficiente de variação e recuperação, obtidos para a avaliação da liofilização de amostras de músculo de peixe (n = 4).	27
Tabela 2 – Valores de massa, em ng, e concentração de mercúrio, em $\mu\text{g L}^{-1}$, coeficiente de variação (CV) e valor de recuperação, obtidos para a avaliação da ferramenta de pré-concentração do equipamento (n = 2).	28
Tabela 3 – Valores nominais para os sete fatores, descritos pelo presente método, bem como suas variações, para a avaliação da robustez do método para a determinação de Hg em peixe fresco por TDA AAS e estimativas do efeito para o planejamento 2_{III}^{7-4} ...	31
Tabela 4 – Valores de concentração de mercúrio na base de massa fresca (média \pm intervalo de confiança), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de variação e de recuperação, obtidos para amostras analisadas no DMA-80. n = 3.	33
Tabela 5 – Critérios adotados para a validação do método para a determinação de mercúrio em peixe e camarão por TDA AAS com base nos teores máximos de contaminante (TMCs) estabelecidos para esse contaminante nas matrizes de interesse.	35
Tabela 6 – Testes estatísticos para a verificação das suposições dos modelos cobrindo as faixas de calibração para mercúrio no DMA-80. Leituras aleatórias para os níveis de concentração. Condições: n = 7 para cada nível de concentração.	39
Tabela 7 – Testes estatísticos para a verificação das suposições dos modelos cobrindo as faixas de calibração para mercúrio no DMA-80. Leituras sequenciais para os níveis de concentração. Três leituras para cada nível de concentração.....	40
Tabela 8 – Valores de recuperação de mercúrio e comparação dos valores de CV obtidos pela equação de Horwitz e pelos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para seis níveis de concentração de mercúrio, estabelecidos de acordo com os valores de TMC, e valores de Horrat. n=7.	44
Tabela 9 – Resultados de concentração média de mercúrio, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, desvio padrão (SD), RSD e recuperação, obtidos para o ensaio de avaliação de interferências e efeitos de matriz nas amostras de peixe e camarão e em solução padrão, nos níveis 0,2, 1,0 e 1,5 do TMC 1 ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) e TMC 2 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). n = 7.....	48

Tabela 10 – Resultados dos testes t e F obtidos a partir da quantidade de mercúrio total nos tecidos (microgramas) para avaliar os experimentos de exposição. Valores significativos destacados em negrito. 64

Tabela 11 – Resultados dos testes t e F obtidos a partir da razão Se/Hg nos tecidos (micromol) para avaliar os diferentes experimentos de exposição. Valores significativos destacados em negrito. 71

Lista de figuras

Figura 1 – Efeitos biológicos potenciais a partir da exposição a diferentes concentrações de mercúrio e selênio. Formação do composto Hg-Se de razão molar 1:1, o qual não é biodisponível. $[Hg]_t$: concentração de limiar de toxicidade de Hg; $[Se]_d$ e $[Se]_t$: concentrações limiares de deficiência e toxicidade de Se, respectivamente. (Adaptação de Khan, & Wang, 2009).	9
Figura 2 – Representação esquemática do equipamento DMA-80 (Milestone).....	16
Figura 3 – Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS com analisador de quadrupolo (MS, Radiogenic Isotope Geology).....	17
Figura 4 – Gráfico normal dos valores dos efeitos referentes aos fatores ensaiados na robustez. Só o efeito (1)A parece ser significativo.....	32
Figura 5 – Configuração dos tanques plásticos para a exposição dos caranguejos aos compostos de mercúrio e/ou selênio.	56
Figura 6 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a: A - mercúrio inorgânico; B - mercúrio inorgânico na presença de selenato.	62
Figura 7 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a: A - metilmercúrio; B - metilmercúrio na presença de selenato.	65
Figura 8 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a selenato.....	68

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Mercúrio, selênio e organismos marinhos

Mercúrio é um componente natural das esferas da Terra, ou ecosfera (atmosfera, geosfera, hidrosfera e biosfera), com uma abundância relativamente baixa (classificação 62^a). O mercúrio ocorre em várias formas físicas e químicas no ambiente: minerais (cinabar, HgS), mercúrio metálico (Hg⁰), formas inorgânicas (mercurosa, Hg(I), e mercúrica, Hg(II)) e organomercuriais (metilmercúrio, dimetilmercúrio), entre outras. Essas diferentes formas e suas associações com ligantes regulam as vias de transporte, tempos de residência dentro de diferentes compartimentos do ciclo biogeoquímico (ecosfera), bioacumulação e transferências tróficas ao longo das cadeias alimentares, bem como efeitos tóxicos sobre os organismos vivos (Boudou & Ribeyre, 1997).

Todas as formas de mercúrio induzem efeitos tóxicos em espécies mamíferas, incluindo o ser humano. A extensão e os efeitos adversos induzidos pelo mercúrio dependem da forma do mercúrio e sua concentração no tempo de exposição, a duração da exposição e a rota da mesma. A absorção de mercúrio metálico por via oral é desprezível, sendo inferior a 0,01% da dose ingerida. Dependendo da solubilidade, acredita-se que cerca de 2 a 10% dos sais de mercúrio sejam absorvidos por aquela via no estômago. Para o metilmercúrio observa-se, tanto em animais como em humanos, uma alta porcentagem de absorção no trato gastrointestinal, entre 90 e 100%, relacionada à sua ingestão tanto na forma de sais como ligado a proteínas, por exemplo, em peixes. A afinidade do mercúrio pelo enxofre e grupos sulfidrilas é um fator fundamental que delinea as propriedades bioquímicas do mercúrio e seus compostos. A fração contendo mercúrio se liga ao grupo sulfidrilas de proteínas, em membranas e enzimas, interferindo, assim, com a estrutura e função da membrana e com a atividade da enzima. Salienta-se que a constante de formação para a ligação tiol-mercúrio é até 10 ordens de magnitude maior do que a constante para as ligações formadas entre os íons de mercúrio e outros nucleófilos presentes no mesmo ambiente. Além disso, mercúrio é o único metal atualmente identificado como capaz de sofrer biomagnificação

na cadeia alimentar através da biometilação a metilmercúrio, o qual é considerado uma neurotoxina (Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2007) (Azevedo, Nascimento, & Chasin, 2003).

O problema da contaminação por mercúrio é realçado quando este entra na cadeia alimentar via processos de biometilação e bioacumulação. Apesar de mercúrio inorgânico ser a forma predominante em água de mar (cerca de 95%), organismos marinhos, especialmente aqueles que ocupam os níveis tróficos mais altos, geralmente acumulam mercúrio na forma orgânica a níveis mais elevados do que o acúmulo para mercúrio inorgânico (Costa, Viegas, Pereira, Duarte, Palmeira, & Pardal, 2011). As formas orgânicas do mercúrio, formadas no sedimento do oceano e em sistemas de água doce, são enriquecidas a um alto grau na cadeia alimentar aquática, com os maiores níveis ocorrendo em peixes predadores. A partir do ambiente aquático, o metilmercúrio se incorpora ao ambiente terrestre pelas espécies que se alimentam de organismos aquáticos. A concentração de mercúrio em produtos alimentícios, excluindo peixe, varia de alguns microgramas a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, a ingestão diária de metilmercúrio depende do consumo de peixe e da concentração do mesmo no peixe consumido (Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2007) (Fischer, Rapsomanikis, & Andreae, 1993).

Sendo assim, a distribuição e especiação de mercúrio são de grande interesse, pois o metilmercúrio neurotóxico é a principal espécie de mercúrio na biota aquática e também a de maior interesse, em se tratando de avaliação de risco para a saúde humana. Os riscos envolvidos na ingestão em longo prazo de alimentos contendo metilmercúrio e na exposição ocupacional a metilmercúrio são devidos à eficiência de absorção dessa espécie de mercúrio no homem, de cerca de 90%, e ao longo tempo de retenção (meia-vida de 70 dias), sendo o cérebro o local de acumulação de metilmercúrio (Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2007) (Torres, Borges, Frescura, & Curtius, 2009).

Entretanto, há evidências que o selênio reduz os efeitos tóxicos do metilmercúrio, podendo haver um efeito antagônico. Esse efeito de neutralização parece surgir devido à alta afinidade de ligação entre o mercúrio e o selênio, por meio da qual o metilmercúrio se liga covalentemente ao selênio nos sítios ativos de enzimas selênio-dependentes (selenoenzimas) inibindo assim a atividade das mesmas (Ralston, 2008).

Por exemplo, o gráfico apresentado na Figura 1 ilustra, entre outras coisas, a formação de um composto de mercúrio-selênio de razão molar 1:1, o qual não é biodisponível (Khan & Wang, 2009). Esta razão está localizada em uma região onde há deficiência de selênio. A região branca, onde há predominância de selênio em relação ao mercúrio, denota a condição ótima. Adicionalmente, seguindo a seta “A”, em uma concentração específica de mercúrio, aumentando-se a concentração de selênio inicialmente ocorrerá uma diminuição da toxicidade do mercúrio, aliviando então a deficiência de selênio, mas eventualmente resultará na toxicidade do selênio.

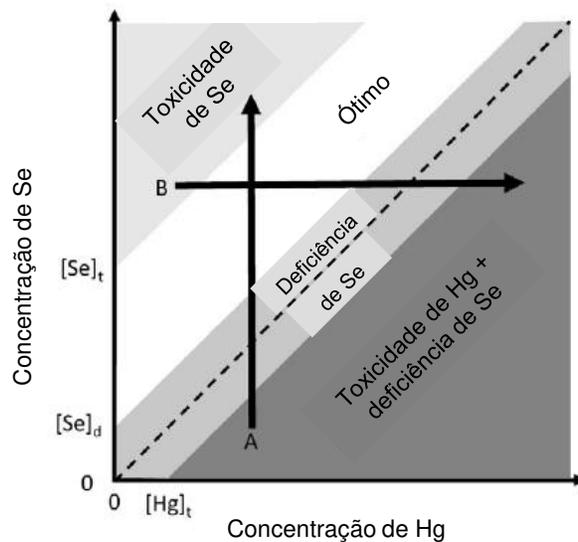


Figura 1 – Efeitos biológicos potenciais a partir da exposição a diferentes concentrações de mercúrio e selênio. Formação do composto Hg-Se de razão molar 1:1, o qual não é biodisponível. $[Hg]_t$: concentração de limiar de toxicidade de Hg; $[Se]_d$ e $[Se]_t$: concentrações limiares de deficiência e toxicidade de Se, respectivamente. (Adaptação de Khan, & Wang, 2009).

Selênio é um elemento nutricionalmente essencial, que está presente em todos os alimentos, mas é particularmente abundante em peixes oceânicos e é absolutamente necessário para a atividade de 25 a 30 enzimas geneticamente únicas (selenoenzimas). Todas as formas de vida que têm sistema nervoso possuem selenoenzimas para proteger o cérebro de danos de oxidação. Mecanismos homeostáticos normalmente mantêm a atividade das selenoenzimas em um nível ótimo nos tecidos do cérebro, mas a exposição a altas concentrações de metilmercúrio sequestram o selênio e inibem

irreversivelmente a atividade das selenoenzimas. As formas moleculares de selênio que predominam em alimentos são os aminoácidos selenocisteína e selenometionina (Ralston, 2008). Embora a selenocisteína seja estruturalmente análoga à cisteína, selenocisteína é genética, bioquímica e estruturalmente única. O grupo tiol da cisteína é protonado ($pK_a \sim 8,5$) no pH celular e o seu potencial redox não é tão elevado quanto o da selenocisteína. Esse alto potencial redox permite que as selenocisteínas conduzam reações que a cisteína não pode efetuar. Uma vez que o selênio da selenocisteína ($pK_a \sim 5,7$) é ionizado em pH fisiológico, ela é muito mais bioquimicamente ativa que a cisteína. Infelizmente, essas características que tornam esse aminoácido tão valioso, também o tornam muito vulnerável à toxicidade do metilmercúrio. A ligação do metilmercúrio à fração de selênio de uma selenocisteína inibe diretamente a atividade de enzimas que desempenham funções antioxidantes. A consequência da formação de metilmercúrio-cisteína é que o metilmercúrio ganha fácil ingresso no corpo e é rapidamente redistribuído através de barreiras biológicas. Bioquimicamente, um inibidor irreversível é aquele que forma uma ligação covalente com componentes do sítio ativo de uma enzima. Uma vez que a selenocisteína é o principal sítio ativo componente de selenoenzimas, o metilmercúrio é, por definição, um inibidor irreversível de selenoenzima altamente específico, pois forma ligações covalentes entre a sua fração de mercúrio e o selênio da selenocisteína da enzima. Entretanto, neste caso, o complexo inibidor da enzima não somente anula a atividade da selenoenzima inibida, mas também restringe a liberação de selênio a partir do complexo metilmercúrio-selenocisteína, limitando severamente a biodisponibilidade daquela forma de selênio para participação nos ciclos intracelulares posteriores da síntese da selenocisteína (Ralston, Ralston, Blackwell, & Raymond, 2008).

Visto que o monitoramento da concentração de mercúrio, especialmente em amostras de alimentos, é um tópico de relevância fundamental, técnicas analíticas confiáveis e com alta sensibilidade são requeridas para a sua determinação. Uma das técnicas mais populares para a determinação de mercúrio é a geração de vapor frio, seguida pela detecção por espectrometria de absorção atômica (Torres, Vieira, Ribeiro, & Curtius, 2005), (Tao, Willie, & Sturgeon, 1999) ou por espectrometria de fluorescência atômica (Cava-Montesinos, Domínguez-Vidal, Cervera, Pastor, & De la Guardia, 2004). Frequentemente, com a finalidade de se alcançar as melhores condições para analisar

diferentes amostras, a literatura sugere uma etapa de decomposição das mesmas, geralmente com ácidos específicos para diferentes matrizes, como o uso de água régia ou ácido nítrico com adição de peróxido de hidrogênio (Welz, & Sperling, 1999), (Ribeiro, Vieira, & Curtius, 2004).

1.2 Espectrometria atômica

A espectrometria atômica abrange três técnicas para uso analítico: emissão atômica, absorção atômica e fluorescência atômica. Quando energia eletromagnética de determinada magnitude é aplicada a um átomo, a energia será absorvida pelo átomo e um elétron da camada externa será promovido a uma configuração menos estável, ou estado excitado, o que está de acordo com a equação para o cálculo da energia térmica, $E_{\text{térmica}} = \frac{1}{2} \times KT$, sendo K a constante de Boltzmann, e T a temperatura. Além disso, quando um átomo absorve energia maior ou igual a sua energia de ionização, o elétron da camada externa será arrancado do mesmo, gerando desta forma íons, os quais também têm capacidade de absorver e emitir radiação. Como o estado excitado é instável, o átomo retornará imediata e espontaneamente para a sua configuração no estado fundamental. O elétron retornará ao seu estado inicial e energia radiante, equivalente à quantidade de energia inicialmente absorvida no processo de excitação, será emitida. Uma vez que cada elemento tem uma estrutura eletrônica única, o comprimento de onda da radiação emitida é uma propriedade única de cada elemento. Como a configuração do orbital de um átomo pesado é complexa, muitas transições eletrônicas podem ocorrer, cada uma delas resultando na emissão de radiação de comprimentos de onda característicos. O processo de excitação e decaimento ao estado fundamental está envolvido em todos os três campos da espectrometria atômica. Ambas, a energia absorvida no processo de excitação e a energia emitida no processo de decaimento, são medidas e usadas para finalidades analíticas (Beaty & Kerber, 1993).

1.2.1 Espectrometria de emissão atômica

A emissão atômica remonta em suas origens ao trabalho de Bunsen e Kirchhoff, na metade do século XIX (Bings, Bogaerts, & Broekaert, 2004). Em emissão atômica, a amostra é submetida à alta energia em um ambiente térmico, com a finalidade de produzir átomos no estado excitado capazes de emitir radiação. A fonte de energia pode ser uma chama ou um plasma, por exemplo. O espectro de emissão de um elemento exposto a tal fonte de energia consiste de uma coletânea de comprimentos de onda permissíveis, chamados linhas de emissão, devido à natureza discreta dos comprimentos de onda emitidos. Esse espectro de emissão pode ser usado como uma característica única para a identificação qualitativa de um elemento, mas também pode ser usado para determinar quanto de um elemento está presente na amostra. Para uma análise quantitativa, a intensidade da radiação emitida no comprimento de onda do elemento a ser determinado é medida. A intensidade de emissão neste comprimento de onda será maior quanto maior for o número de átomos do elemento de interesse. A técnica de fotometria de chama é uma aplicação da emissão atômica para a análise quantitativa (Beatty & Kerber, 1993).

1.2.2 Espectrometria de absorção atômica

Espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica para a determinação de elementos baseada na absorção de radiação por átomos livres. No atomizador, energia (geralmente térmica) é fornecida à amostra a fim de converter o analito em uma população de átomos livres (vapor atômico). Uma vez que o átomo está no estado fundamental, o mesmo é capaz de absorver a radiação de ressonância. Uma fonte de linha – uma lâmpada de cátodo oco ou uma lâmpada de descarga sem eletrodo, ambas contendo o elemento a ser determinado – emite uma radiação característica, isto é, o espectro do elemento (Tsalev & Zaprianov, 1985). À medida que o número de átomos no caminho da radiação aumenta, a quantidade de radiação absorvida aumenta de uma forma previsível. Pela medida da quantidade de radiação absorvida, uma determinação quantitativa do elemento de interesse presente pode ser feita. O uso de fontes de linha

e a seleção cautelosa de comprimento de onda permitem a determinação quantitativa específica de elementos individuais na presença de outros. A facilidade e rapidez com que determinações exatas e precisas podem ser feitas com esta técnica tornaram a espectrometria de absorção atômica uma das técnicas mais populares para a determinação de elementos metálicos (Beatty & Kerber, 1993). A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) é uma das técnicas mais empregadas para a determinação de baixas concentrações de elementos potencialmente tóxicos, o que se deve especialmente à sua alta seletividade e sensibilidade (Welz & Sperling, 1999).

1.2.3 Espectrometria de fluorescência atômica

A técnica de fluorescência atômica incorpora aspectos de ambas, absorção e emissão atômica. Assim como em absorção atômica, átomos no estado fundamental são excitados pela focalização de um feixe de radiação na nuvem atômica. Entretanto, ao invés de monitorar a quantidade de radiação que é absorvida neste processo, é a emissão resultante do processo de decaimento dos átomos excitados pela fonte que é medida. A fonte de radiação para fluorescência atômica é montada a um certo ângulo em relação ao resto do sistema óptico e, desta maneira, o detector enxerga somente a fluorescência e não a radiação da lâmpada em si (Beatty & Kerber, 1993). A fluorescência é mais sensível que a absorção porque é possível observar um fraco sinal de fluorescência sobre um fundo escuro. Em absorção são procuradas pequenas diferenças entre grandes quantidades de radiação alcançando o detector (Harris, 2011).

1.2.4 A técnica do vapor frio

A técnica do vapor frio (CV) é aplicada quase exclusivamente para a determinação de mercúrio e está baseada em um número de características típicas deste elemento. A única exceção é o cádmio, que também pode ser determinado por essa técnica. Visto que o mercúrio pode ser facilmente reduzido a partir de seus compostos ao estado elementar e exibe uma pressão de vapor de 0,0016 mbar a 20 °C,

ele pode ser determinado diretamente sem necessidade de uma unidade de atomização especial. Depois de uma etapa de redução, o mercúrio deve simplesmente ser transportado por uma corrente de gás até o atomizador. Nesta técnica, o mercúrio presente na amostra forma mercúrio metálico, espécie bastante volátil, ao reagir em meio ácido com o agente redutor tetraidroborato de sódio, NaBH_4 , ou cloreto estanoso, SnCl_2 , em um sistema de reação fechado. Os átomos de mercúrio são transportados por um fluxo de ar ou argônio através da tubulação conectada à célula de absorção, a qual é colocada no caminho óptico do espectrômetro de AA. Todo o processo de geração de vapor frio pode ser automatizado pelo emprego de técnicas de injeção em fluxo (Welz & Sperling, 1999).

A alta sensibilidade é uma grande vantagem da técnica de CV. Isto é atingido, primeiramente, pela eficiência de transporte do mercúrio de até 100% do frasco reacional à célula de absorção, mas também pela pré-concentração *in situ* do analito. A sensibilidade pode ser ainda mais pronunciada pelo emprego de grandes volumes de amostra. Considerando-se que todo o mercúrio contido na amostra é liberado para a medida, aumentar o volume da amostra significa que mais átomos de mercúrio estarão disponíveis para serem transportados à célula de absorção e serem medidos. Além disso, o vapor formado pela reação de redução é homogêneo, o que implica em alta precisão e seletividade (Welz & Sperling, 1999) (Beaty & Kerber, 1993). Finalmente, a técnica do vapor frio pode ser acoplada a diferentes técnicas para a detecção, além de AAS ou AFS, como ICP-MS (Rodrigues, *et al.*, 2009) ou ICP OES (dos Santos, Herrmann, Vieira, Frescura, & Curtius, 2005).

Uma desvantagem desta técnica é que o mercúrio não pode ser reduzido a mercúrio elementar a partir de vários de seus compostos, particularmente os compostos orgânicos, pelo emprego dos agentes redutores tetraidroborato de sódio ou cloreto estanoso. O cloreto estanoso, em particular, não é capaz de formar mercúrio elementar a partir de compostos orgânicos de mercúrio, devido ao seu baixo potencial de redução, em comparação àquele do tetraidroborato. A determinação deve então ser precedida por um tratamento da amostra, que tem uma influência definitiva na exatidão da medida. Para o tratamento da amostra, que deve solubilizar completamente a mesma, parâmetros como perda do analito e contaminação da amostra desempenham um papel fundamental (Welz & Sperling, 1999).

1.3 Emprego de TDA AAS para a determinação de mercúrio

Uma vez que as lâmpadas de mercúrio emitem somente um número limitado de linhas espectrais e, em se tratando de ferramentas que promovem a formação praticamente exclusiva de vapor de mercúrio, é possível dispensar os elementos ópticos e monocromadores em sistemas especialmente desenhados para a determinação desse elemento (Welz & Sperling, 1999). Este é o caso do analisador direto de mercúrio, DMA-80 (Milestone, Itália), o qual trata da técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica/amalgamação (TDA AAS). Esta técnica pode ser usada para a análise de amostras sólidas e líquidas. Neste sistema o tratamento da amostra consiste em etapas de secagem e combustão. O caráter seletivo da determinação de mercúrio do instrumento assegura uma sensibilidade ainda maior do que aquela obtida pelas técnicas de GF AAS (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite) ou CV AAS (espectrometria de absorção atômica com vapor frio). Para a determinação de mercúrio utilizando o DMA-80, uma alíquota de amostra, previamente pesada, é seca e, a seguir, térmica e quimicamente decomposta em um forno de decomposição com fluxo de oxigênio. Os produtos remanescentes da decomposição são então carregados para um amalgamador que retém seletivamente o mercúrio. O fluxo de oxigênio arrasta o vapor de mercúrio através das duas células de absorção, que estão em uma razão de comprimento de 10:1 (U.S.EPA 7473, 2007). A Figura 2 apresenta um esquema da configuração do equipamento.

Duas curvas analíticas são necessárias para trabalhar com o DMA-80, uma vez que existem duas células de absorção no equipamento, conforme ilustrado na Figura 2. A primeira faixa de trabalho, relativa à absorvância da célula 1, inclui respostas de 0,01 ng a cerca de 20,00 ng de mercúrio (faixa baixa). A segunda faixa de trabalho, relativa à absorvância da célula 2, inclui respostas de cerca de 20 ng a 1000 ng de mercúrio (faixa alta). Uma curva de calibração para ultratraços também é possível no início da célula 1.

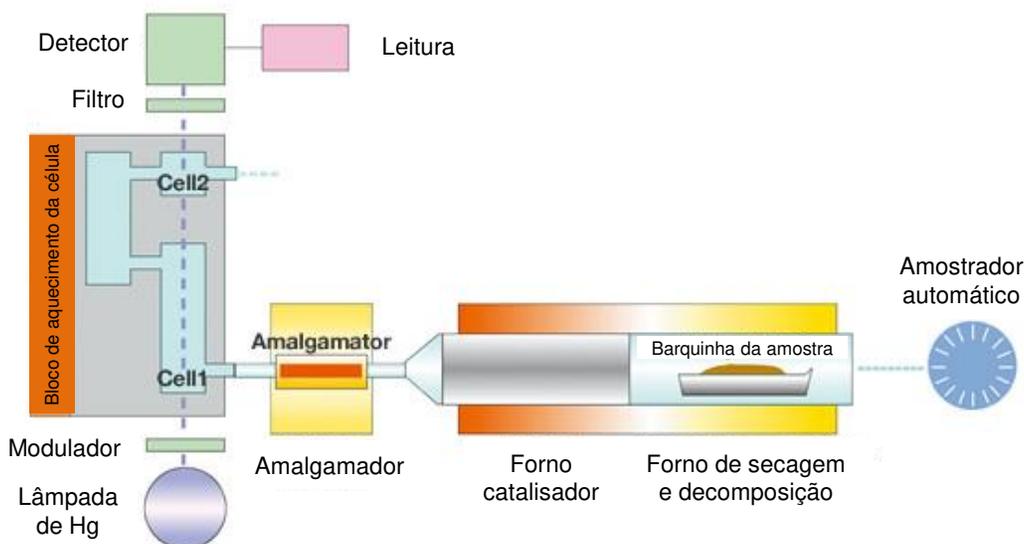


Figura 2 – Representação esquemática do equipamento DMA-80 (Milestone).

O emprego da técnica de TDA AAS para a análise de amostras sólidas proporciona vantagens para o processo analítico, já que não há necessidade de adotar procedimentos de preparo da amostra. A simples homogeneização da amostra é suficiente para a sua análise. Desta forma, as amostras são fáceis e rapidamente analisadas, sem necessitar um pré-tratamento químico agressivo, além de diminuir a susceptibilidade à contaminação e perda do analito antes da determinação. Adicionalmente, o equipamento permite que padrões aquosos sejam usados para a calibração (U.S.EPA Method 7473, 2007). Tais qualidades tornaram o seu emprego frequente para a determinação de mercúrio em várias matrizes (McClain, Chumchal, Drenner, & Newland, 2006) (Maggi, Berducci, Bianchi, Giani, & Campanella, 2009) (Ikem & Egilla, 2008) (Haynes, Gragg, Johnson, Robinson, & Orazio, 2006) (Carbonell, Bravo, Fernández, & Tarazona, 2009).

1.4 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

O plasma indutivamente acoplado (ICP) é uma descarga sem eletrodo em um gás a pressão atmosférica, mantido pela energia acoplada a ele a partir de um gerador de radiofrequência. O plasma é gerado dentro e na extremidade final de um conjunto de tubos de quartzo conhecido como tocha, de acordo com a Figura 3. O tubo central,

através do qual a amostra é introduzida no plasma, está localizado ao longo do eixo central da tocha. A vazão de gás externo, chamado de gás de resfriamento, protege as paredes do tubo e age como o principal gás de suporte para o plasma, geralmente com vazão de 10 a 15 L min⁻¹. A segunda vazão de gás que é introduzido no espaço anelar interior, chamado vazão auxiliar, é usado principalmente para assegurar que o plasma quente seja mantido longe da extremidade do tubo injetor capilar central, para prevenir a sua fusão. A vazão de gás central, ou injetor, transporta o aerossol a partir do sistema de introdução de amostra, com uma vazão de cerca de 1 L min⁻¹. Este é suficiente, no tubo injetor de diâmetro pequeno, para produzir um jato de alta velocidade de gás que penetra um canal mais frio através do centro do plasma, chamado canal axial ou central (Jarvis, Gray, & Houk, 1992).

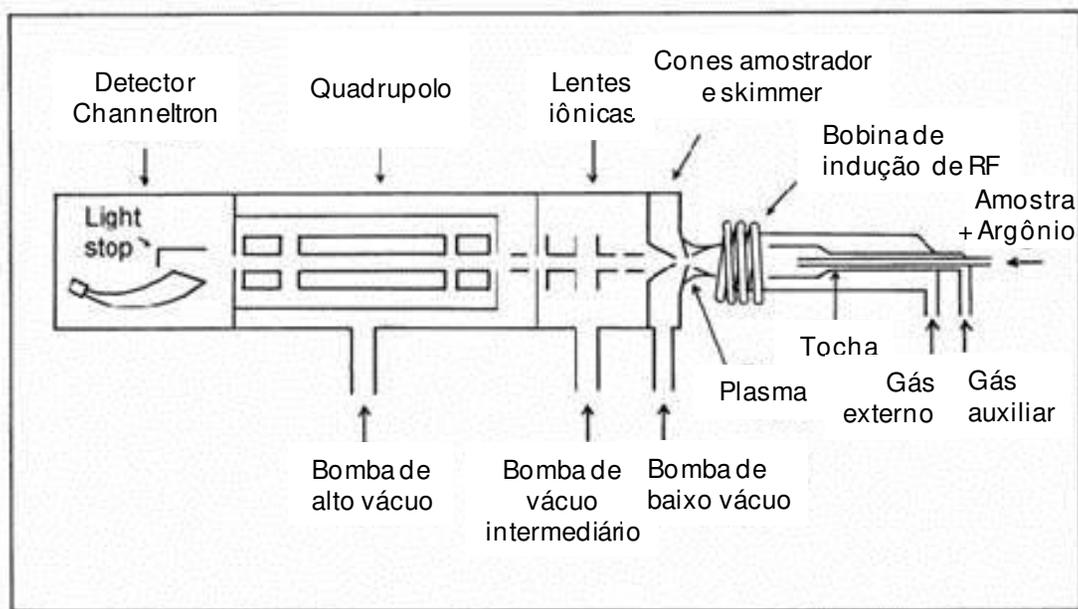


Figura 3 – Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS com analisador de quadrupolo (MS, Radiogenic Isotope Geology).

O acoplamento de duas a quatro voltas de tubo de cobre de alta qualidade, resfriado por um fluxo de gás ou água, está localizado com sua volta externa alguns milímetros abaixo da boca da tocha. A corrente de radiofrequência fornecida a partir de um gerador produz um campo magnético que varia no tempo de acordo com a frequência do gerador, geralmente 27 ou 40 MHz, e assim, dentro da tocha, o campo

permanece ao longo do eixo. A descarga é geralmente iniciada na tocha fria por uma faísca a partir da bobina de Tesla, a qual fornece elétrons livres para acoplar com o campo magnético. Uma vez que o plasma ultrapassa a boca da tocha, ele se torna acessível para extrair os íons para o espectrômetro de massas. Argônio é o gás mais comumente utilizado para alimentar o ICP. A temperatura na região de indução pode ser tão alta quanto 10000 K. No canal central, a temperatura do gás é de cerca de 5000 K, e na boca da tocha, de 7000 K (Jarvis, Gray, & Houk, 1992). Deste modo, o plasma é formado pela interação de um intenso campo magnético (produzido pela radiofrequência que passa através da bobina de cobre) em um fluxo tangencial de gás (geralmente argônio) de cerca de 15 L min⁻¹ fluindo através de um tubo de quartzo concêntrico (tocha). Isso tem o efeito de ionizar o gás, que quando é semeado com uma fonte de elétrons a partir de uma faísca de alta voltagem, forma uma descarga de plasma de temperatura muito alta na extremidade final do tubo. A tocha em ICP-MS, que é posicionada horizontalmente, é usada para gerar íons positivamente carregados, e não fótons. De fato, todo esforço é feito para impedir os fótons de alcançar o detector, pois eles têm o potencial de aumentar o sinal de ruído. É a produção e detecção de altas quantidades desses íons que dão ao ICP-MS sua capacidade característica de detecção da ordem de parte por trilhão. Assim, o equipamento de ICP-MS emprega o plasma como uma fonte de ionização e um analisador de massas para detectar os íons produzidos. Pode medir simultaneamente (na prática) a maioria dos elementos da tabela periódica e determinar a concentração dos analitos abaixo de sub-nanograma por litro (Thomas, 2008).

Nesse sistema, a amostra, a qual geralmente está na forma líquida, é comumente bombeada por uma bomba peristáltica para o nebulizador, onde esta é convertida a um fino aerossol pela ação de um fluxo de argônio de cerca de 1 L min⁻¹. As menores gotículas do aerossol, as quais representam somente de 1 a 2% da amostra, são separadas das gotículas maiores por meio de uma câmara de nebulização. O fino aerossol emerge a partir do tubo de saída da câmara e é transportado para a tocha. Uma vez que os íons são produzidos no plasma, eles são direcionados para o espectrômetro de massas através da região de interface (entre os cones amostrador e *skimmer*), a qual é mantida a um vácuo de 1-2 Torr com o auxílio de uma bomba mecânica. Uma vez que os íons foram extraídos para a região de

interface, eles são direcionados para a câmara de vácuo intermediário por uma série de lentes eletrostáticas. O vácuo nesta região é mantido em cerca de 10^{-3} Torr com uma bomba turbomolecular. A função desse conjunto de lentes é focalizar eletrostaticamente o feixe iônico através do dispositivo de separação de massa. O feixe iônico, contendo todos os analitos e íons provenientes da matriz, deixa a região de lentes e passa para o coração do espectrômetro de massas – o dispositivo de separação de massas, que é mantido em um vácuo de aproximadamente 10^{-6} Torr pela ação de uma segunda bomba turbomolecular. Existem vários tipos de dispositivos de separação de massas, sendo os três tipos mais comuns o quadrupolo, o setor magnético e o tempo-de-vôo (*time-of-flight*). Todos servem basicamente para a mesma finalidade, que é permitir que os íons dos analitos de uma razão massa/carga específica alcancem o detector, assim como excluir todos os outros íons e interferentes. O processo final é converter os íons a um sinal elétrico. Esse sinal é então processado pelo sistema e convertido a concentração do analito pelo uso de soluções padrão de calibração. A maioria dos sistemas de detecção pode manipular até oito ordens de faixa de concentração, o que significa que eles podem ser usados para analisar amostras com analitos a partir de níveis de parte por trilhão até algumas centenas de parte por milhão (Thomas, 2008).

1.4.1 Analisador de massas com tecnologia de quadrupolo

O dispositivo de separação de massas mais comumente empregado em ICP-MS é analisador de massas com tecnologia de quadrupolo. Um quadrupolo consiste de quatro hastes metálicas cilíndricas ou hiperbólicas de mesmo comprimento e diâmetro. Quadrupolos usados em ICP-MS têm tipicamente de 15 a 25 cm de comprimento, cerca de 1 cm de diâmetro, e operam a uma frequência de 2-3 MHz. Um quadrupolo opera pela aplicação de ambos, um campo de corrente direta (DC) e uma corrente alternada (AC) dependente da frequência de radiofrequência, nos pares opostos das quatro hastes. Pela seleção de uma razão ótima de AC/DC em cada par de hastes, íons de uma determinada razão massa/carga podem passar através das hastes e alcançar o detector, ao passo que os outros íons são instáveis e, assim, ejetados do quadrupolo. Na prática, vinte e cinco elementos podem ser determinados em duplicata com boa precisão em 1-2 minutos, dependendo dos requerimentos analíticos. Sistemas de ICP-

MS baseados nesse analisador de massas tipicamente oferecem uma resolução de 0,7-1,0 u.m.a., a qual é bastante adequada para a maioria das aplicações de rotina, mas provou ser inadequada para muitos elementos que são propensos às interferências espectrais provenientes do argônio, do solvente e/ou da amostra (Thomas, 2008).

1.4.2 Analisador de massas com tecnologia de setor magnético de dupla focalização

Embora os analisadores de massas de quadrupolo representem aproximadamente 85% de todos os equipamentos de ICP-MS instalados no mundo, limitações no seu poder de resolução levaram ao desenvolvimento de espectrômetros de alta resolução baseados no arranjo de setor magnético de focalização dupla. Esse arranjo consiste em dois analisadores, um eletromagnético convencional e um analisador eletrostático. Pelo emprego deste arranjo, os íons são amostrados a partir do plasma, da maneira convencional (assim como no quadrupolo – pela aplicação de uma diferença de potencial de alguns kilovolts), e então acelerados na região de lentes iônicas por alguns kilovolts antes de eles entrarem no analisador de massas (Thomas, 2008).

Esse potencial fornece a voltagem de aceleração iônica necessária para a formação de um feixe iônico apropriado para os analisadores subsequentes. Depois da interface, lentes são usadas para mudar o formato do feixe a partir de um formato seção transversal circular, para outro com um formato semelhante à fenda, para a transmissão iônica eficiente. O feixe passa através de um analisador de energia eletrostática que seleciona somente íons dentro de uma faixa de energia cinética para transmissão através da fenda de saída. Esses íons selecionados por energia são, então, analisados com base na razão massa/carga (m/z) em um setor magnético e, finalmente, detectados. Assim, a focalização da direção e velocidade é fornecida (Jarvis, Gray, & Houk, 1992).

1.5 Validação de métodos para contaminantes inorgânicos

A presença de resíduos em produtos de origem animal é um motivo de preocupação para a saúde pública (2002/657/CE, 2002). Assim, é essencial, a fim de se proteger a saúde pública, manter os contaminantes em níveis que são toxicologicamente aceitáveis (CE 1881, 2006). Por causa da toxicidade de alguns elementos, incluindo o mercúrio, a sua presença em gêneros alimentícios deve ser cuidadosamente avaliada para prevenir riscos toxicológicos (Noël, Dufailly, Lemahieu, Vastel, & Guérin, 2005). A fim de manter os contaminantes em alimentos em um nível mínimo, muitos países têm estabelecido teores máximos para contaminantes em produtos alimentícios. Os regulamentos da Comissão (CE) N.º 1881 de 19 de Dezembro de 2006 e N.º 629/2008, e Codex Alimentarius (Codex Standard, 2010) estabelecem os teores máximos para certos contaminantes em gêneros alimentícios. Complementarmente, o Regulamento da Comissão N.º 333, de 28 de Março 2007, relata cuidadosamente os métodos de amostragem e análise para o controle oficial dos teores de contaminantes como chumbo, cádmio e mercúrio, entre outros, em alimentos, assim como a Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002, (2002/657/CE) e MERCOSUL\GMC\RES N.º 57/94 (MERCOSUL, 1993), que descrevem o desempenho de métodos analíticos e a interpretação dos seus resultados.

Com o objetivo de garantir a qualidade e comparabilidade dos resultados analíticos gerados por laboratórios autorizados para realizar o controle oficial de contaminantes, os métodos devem ser validados. A validação de um método é um processo estabelecido que fornece prova documental que um sistema cumpre a sua especificação pré-definida, e um método analítico é aceitável para a finalidade pretendida. Também é uma etapa necessária no controle de qualidade de uma análise quantitativa (Ertas & Tezel, 2004). Tais medidas incluem o estabelecimento da rastreabilidade das medidas, além do uso de métodos de análise validados, de procedimentos de controle de qualidade internos, da participação em ensaios de proficiência e da acreditação para um padrão internacional, normalmente na norma ISO/IEC 17025.

A fim de atingir a validação do método, vários critérios considerados compulsórios (linearidade, repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial, exatidão,

robustez e avaliação de efeitos de matriz/ interferências) devem ser avaliados. Além disso, os limites de detecção e de quantificação são componentes fundamentais desse processo e podem ser estabelecidos de acordo com recomendações do Regulamento da Comissão (CE) N.º 333/2007. Além dos regulamentos citados da Comissão das Comunidades Europeias, neste trabalho também foram seguidos o documento DOQ-CGCRE-008, do organismo de acreditação do Brasil, INMETRO, e também pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005.

1.6 Objetivos gerais

O analisador direto de mercúrio, DMA-80 (Milestone, Itália), que trata da técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica/amalgamação (TDA AAS), foi empregado na primeira etapa deste trabalho para a determinação de mercúrio em peixe e em camarão de origem brasileira, visando o atendimento ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo a parte experimental desenvolvida no Laboratório Nacional Agropecuário – São Paulo (Lanagro-SP).

Na segunda etapa deste trabalho, desenvolvida em um período de doutorado sanduíche na Universidade de Aberdeen, na Escócia, as técnicas de espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS) e espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado (HR-ICP-MS) foram empregadas para a determinação de mercúrio e selênio, respectivamente, nos tecidos de caranguejos expostos através da dieta a compostos de mercúrio e/ou selênio.

Capítulo 2 – Determinação de mercúrio para o seu controle oficial em peixe e camarão de origem brasileira por TDA AAS

2.1 Considerações

Os organismos marinhos contribuem significativamente para a exposição a contaminantes inorgânicos, principalmente a mercúrio. Mesmo após o marcante incidente de Minamata, em 1953, no Japão, o qual vitimou cerca de mil japoneses que se alimentavam de peixes de uma baía contaminada com metilmercúrio, muitos casos de violação dos teores máximos permitidos para este metal continuam acontecendo no mundo todo, devido às suas propriedades de bioacumulação associadas ao permanente risco de contaminação ambiental antropogênica (Azevedo, Nascimento, & Chasin).

Nesse contexto, é fundamental que os laboratórios oficiais disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio executados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida, neste caso, o atendimento ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Mauricio, Lins, & Alvarenga, 2009). O laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (DOQ-CGCRE-008, 2010).

O PNCRC é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, baseado em análise de risco, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor (PNCRC-MAPA). Ademais, o PNCRC visa fornecer garantias de um sistema que forneça segurança e inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores e que seja equivalente aos requisitos sanitários internacionais estabelecidos pelo MERCOSUL, CODEX, OMC e órgãos auxiliares (FAO, OIE, WHO).

Assim, esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório Nacional Agropecuário – São Paulo (Lanagro-SP), visando o atendimento ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para o controle oficial de mercúrio em pescados (peixe e camarão) do Brasil.

2.2 Objetivos

O objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método rápido, simples, com desempenho analítico adequado e de baixo custo para o controle oficial e análise de rotina para a determinação de mercúrio em peixe e camarão de origem brasileira, usando espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica/ amalgamação (TDA AAS) pela análise direta de sólidos. De acordo com pesquisas bibliográficas, um estudo completo sobre os parâmetros envolvidos em TDA AAS ainda não existia e, em se tratando do propósito de segurança alimentar, é conveniente verificar a viabilidade da técnica, para um melhor uso do equipamento. Após esta etapa, foi feita a validação completa do método de acordo com legislações nacionais e internacionais sobre alimentos, visando a acreditação do método pela norma (ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005) e atendimento ao PNCRC.

2.3 Parte experimental

2.3.1 Instrumentação

Para a determinação de mercúrio total foi utilizado o equipamento DMA-80 (Direct Mercury Analyzer, Milestone, Sorisole, Itália), equipado com um sistema catalisador (DMA 8333, Milestone) que tem a função de liberar o mercúrio a partir da matriz da amostra, e um sistema amalgamador de ouro (DMA 8134, Milestone), empregado para a retenção dos vapores de mercúrio. O instrumento é equipado com pequenos containers, de quartzo ou níquel, usados para pesar e acondicionar as amostras a serem analisadas no amostrador automático. Neste trabalho, containers de quartzo para a pesagem e análise das amostras foram usados em todas as medidas, exceto para o experimento de robustez, no qual foram feitas medidas específicas empregando containers de níquel. As temperaturas e os tempos de secagem e de pirólise empregados foram de 200 °C, por 90 segundos, e 650 °C, por 120 segundos, respectivamente. O amalgamador retém o mercúrio seletivamente depois que o sistema

é purgado com oxigênio, para a remoção de gases remanescentes e/ou produtos de decomposição. A seguir, este é aquecido e libera o vapor de mercúrio. A linha de ressonância empregada foi 253,7 nm, usando a altura de pico para o processamento do sinal. Oxigênio (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás reagente e carreador para os vapores de mercúrio. Para a avaliação da necessidade de liofilização das amostras foi empregado o liofilizador LS3000 (Terroni, São Carlos/SP, Brasil).

2.3.2 Reagentes

Os seguintes reagentes foram empregados: ácido nítrico 65% (Merck, Darmstadt, Alemanha), o qual foi destilado abaixo do ponto de ebulição no equipamento DuoPUR (Milestone). A água foi desionizada em um sistema Milli-Q Integral 5 (Millipore, EUA, resistividade de 18,2 MΩ cm). Soluções de referência de mercúrio inorgânico foram preparadas diariamente pela diluição sequencial de uma solução estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Buchs, Suíça). O material de referência analisado durante a otimização deste método foi o tecido de peixe IAEA-407 (Analytical Quality Control Services, Áustria).

2.3.3 Procedimento de preparo de amostra

As amostras de peixe foram preparadas com base na simples homogeneização do músculo com o auxílio de uma faca de aço inoxidável (30 cm, Mundial, Brasil) ou um miniprocessador de carne doméstico (Black & Decker, Brasil), depois da remoção da pele, espinhos e vísceras, também com a faca de aço inoxidável. O músculo foi cortado em pequenos pedaços antes de ser transferido para o miniprocessador. Três amostras de músculo de peixe foram utilizadas para a otimização do método, adquiridas em supermercados da cidade de Campinas (São Paulo, Brasil), as quais foram denominadas como LG (*Lophius gastrophysus*), ON (*Oreochromis niloticus*) e SP (*Sardina pilchardus*). A amostra LG era naturalmente contaminada com mercúrio, e as amostras ON e SP tinham baixa concentração de mercúrio, o que foi confirmado pela análise dessas amostras pela técnica de CV AAS no Lanagro-RS (LOQ = 11 µg kg⁻¹),

cujo método é validado e acreditado pelo INMETRO na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

A amostra ON e uma amostra de camarão designada por LV (*Litopenaeus vannamei*), a qual também possui baixa concentração de mercúrio, obtida da fazenda Primar, em Goianinha (Rio Grande do Norte, Brasil), foram empregadas para a validação do método. As amostras foram homogeneizadas com faca de aço inoxidável ou com o uso do miniprocessador doméstico (no caso da avaliação da robustez).

Uma massa de cerca de 100 mg do músculo homogeneizado foi pesada no container de quartzo e inserida no sistema do DMA-80 a fim de determinar a concentração de mercúrio total. Todas as determinações se referem à massa úmida. No decorrer da otimização do método, as amostras ON e LG também foram submetidas a um procedimento de preparo alternativo: liofilização do músculo após homogeneização no miniprocessador.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Desenvolvimento do método

2.4.1.1 Otimização da quantificação de mercúrio em peixe fresco por TDA AAS

A viabilidade da liofilização das amostras de músculo de peixe foi avaliada para a amostra naturalmente contaminada, LG, bem como para a amostra com baixo teor de mercúrio, ON, ambas homogeneizadas no miniprocessador doméstico. O liofilizador foi empregado nesta etapa. Mercúrio foi adicionado em uma alíquota de aproximadamente 10,0 g dessas amostras, a fim de se obter uma concentração final de cerca de 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Deste modo, a concentração calculada para a amostra LG foi 99,54 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e para a amostra ON foi de 99,87 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esses valores foram considerados como 100% para o cálculo da recuperação para as amostras fortificadas e liofilizadas, sendo que para a amostra LG foi descontado o valor medido para a concentração de mercúrio na amostra sem adição de mercúrio (liofilizada ou *in natura*) para o cálculo da recuperação. Os resultados obtidos para a concentração de mercúrio na amostra LG liofilizada, sem

adição (LGL) e com adição (LGLA) de mercúrio, e na amostra ON liofilizada sem adição de mercúrio (ONL) e com adição de mercúrio (ONLA), com base de massa fresca, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de concentração de mercúrio, na base de massa fresca, coeficiente de variação e recuperação, obtidos para a avaliação da liofilização de amostras de músculo de peixe (n = 4).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
LGL ^a	207,19	1,94	95,6
LGLA	210,38	13,04	105,1
ONL ^a	103,16	0,25	103,2
ONLA	113,32	10,14	113,5

^a Adição de 10 ng de Hg no momento da medida sobre a alíquota de amostra pesada.

Os resultados apresentados, referentes ao processo de liofilização, não apresentaram nenhuma melhora ou vantagem em comparação com aqueles obtidos para a análise direta das amostras frescas, e valores de CV maiores que 10,0% foram obtidos para as amostras liofilizadas, os quais podem ser considerados altos. A análise da amostra fresca foi, então, a condição empregada para as análises subsequentes. Desta forma, a análise do peixe fresco foi a condição adotada para os experimentos posteriores. Assim, a análise tornou-se mais simples, sem a necessidade de nenhum pré-tratamento químico das amostras, o que também contribuiu para diminuir a susceptibilidade à contaminação da amostra e à perda do analito. Adicionalmente, o equipamento utilizado permite o emprego de soluções padrão aquosas para o processo de calibração. Outros parâmetros foram avaliados, incluindo a faixa linear das curvas de calibração, a pré-concentração de mercúrio no sistema amalgamador, o efeito de memória do sistema e a robustez do método, conforme relatado no trabalho de Torres *et al.* (Torres, Martins-Teixeira, Silva, & Queiroz, 2012).

2.4.1.2 Pré-concentração de mercúrio no sistema amalgamador

A ferramenta de múltiplas etapas de pré-concentração de mercúrio no sistema amalgamador do DMA-80 foi avaliada pela medida de 40,0 μL de uma solução padrão de mercúrio de 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que implica em 20,0 ng de mercúrio. Os resultados, mostrados na Tabela 2, demonstram que uma etapa extra de pré-concentração de 20,0 ng de Hg, o que resulta em 40,0 ng de Hg, fornece o mesmo valor de concentração, ou seja, 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, que aquele da medida direta de 20,0 ng de Hg (uma única etapa de amalgamação, condição padrão do equipamento).

Tabela 2 – Valores de massa, em ng, e concentração de mercúrio, em $\mu\text{g L}^{-1}$, coeficiente de variação (CV) e valor de recuperação, obtidos para a avaliação da ferramenta de pré-concentração do equipamento (n = 2).

Pré-concentração*	m encontrada (ng de Hg)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
Não	19,87	496,79	1,11	99,36
Sim (uma vez)	39,68	496,05	3,58	99,21

*20,0 ng de mercúrio.

Para a medida de 20,0 ng de Hg, a curva analítica empregada foi com regressão quadrática na faixa de 2,5 a 20,0 ng (faixa baixa), e para a medida com a etapa extra de pré-concentração (40,0 ng) foi empregada a curva analítica com regressão linear da faixa alta (25,0 na a 150,0 ng). Tal constatação possibilita a aplicação da ferramenta de pré-concentração quando a concentração de mercúrio em uma amostra estiver situada entre 20,0 ng e 25,0 ng, ou seja, a lacuna entre as células 1 e 2 do equipamento usado.

2.4.1.3 Efeito de memória

O efeito de memória foi investigado pois, após medidas de concentrações altas de mercúrio, valores de absorvância bastante altos foram registrados para a medida do

sistema vazio, ou seja, sem nenhuma solução de mercúrio ou amostra. Neste sentido, depois da leitura de oito soluções padrão para a construção de uma curva analítica na faixa alta, as quais tinham massas de mercúrio entre 100,0 ng e 400,0 ng, observou-se que os valores de absorvância registrados para onze medidas sequenciais do sistema sem nenhuma solução ou amostra foram bastante altos, sendo as duas primeiras, obtidas logo após a medida do ponto de 400,0 ng de Hg, iguais a uma massa de Hg de 7,5 ng, o que implica em $75 \mu\text{g kg}^{-1}$, sob as condições empregadas (100 mg de amostra ou 100 μL de solução padrão). Mesmo depois das onze medidas do sistema vazio, o valor de absorvância foi correspondente a uma massa de Hg de cerca de 1,0 ng ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). Essa investigação mostra a importância da remoção do mercúrio remanescente no sistema antes de se iniciar a medida de uma amostra ou solução subsequente, especialmente se esta tiver uma concentração de mercúrio menor que a da amostra antecedente, o que pode resultar em um erro sistemático. Assim, constatou-se que o forte efeito de memória apresentado foi uma consequência de um lote antigo do catalisador empregado (responsável pela conversão dos vapores de mercúrio liberados a partir da amostra a mercúrio elementar). Como seria esperado, o efeito de memória se torna mais pronunciado com o envelhecimento do catalisador e depois da medida de amostras com uma alta concentração de mercúrio. Nestas situações foi comum que os valores de absorvância para o sistema vazio alcançassem de 10-20% do teor de mercúrio da amostra previamente analisada.

Com o envelhecimento do catalisador, outra dificuldade encontrada foi a obtenção do parâmetro de verificação diário da curva de calibração. Assim, a frequência da calibração se torna mais alta. Após a troca do catalisador, o valor de absorvância do sistema vazio indicado pelo fabricante é 0,0030 (para a célula 1). O tempo de vida do catalisador depende da frequência de análise de amostras no DMA-80 e também, no caso de um equipamento utilizado com baixa frequência, do tempo decorrido após a instalação do catalisador, sendo portanto, difícil de ser estimado. Fazer a leitura de soluções de reagentes a cada 10 medidas é uma boa prática e também uma recomendação de U.S.EPA Method 7473. Além disso, fazer a análise de brancos de reagentes, geralmente ácido nítrico 5% v/v, antes do início do trabalho é aconselhável como parte da rotina na operação do equipamento.

2.4.1.4 Robustez do método

O programa para cálculos de estatística STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA) foi usado para a otimização por análise fatorial de sete fatores experimentais através da ferramenta *Experimental Design*. O teste de Youden, um planejamento fatorial fracionário 2^{7-4} , foi empregado nesta etapa. Este teste permite avaliar não somente a robustez do método, mas também a influência de cada uma das variáveis no resultado final (2002/657/CE, 2002). Assim, a Tabela 3 foi preenchida com o valor nominal para os sete fatores, ou nível 1 (aqueles que estavam sendo adotados durante a otimização do método), e suas variações, ou nível 2, propostas para a avaliação da robustez do método. Valores nominais são representados por letras maiúsculas e suas variações por letras minúsculas. Esses fatores devem ser combinados para a avaliação da robustez. As medidas foram feitas com a adição de 50,0 ng de Hg em cada alíquota de amostra, o que corresponde a 500,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, teor máximo para Hg em peixe de cultivo, estabelecido pelo regulamento CE N° 1881/2006. A Tabela 3 também apresenta os resultados para essas combinações, de acordo com a variação dos fatores, bem como a estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário. O efeito de cada fator é, por definição, a média dos resultados deste nos dois níveis avaliados, ou seja, a média para os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas, menos o valor médio resultante dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas. Cada efeito é a diferença de duas médias. Assim, para calcular qualquer efeito são usadas todas as respostas observadas (Barros Neto, Scarminio, & Bruns, 2007).

Os ensaios da robustez foram feitos em duplicata (repetição autêntica) e aleatoriamente para que se pudesse estimar o erro experimental, e a partir daí avaliar a significância estatística dos efeitos. Admitindo-se que a variância das repetições é a mesma em toda a região investigada, é possível combinar a variação de todos os ensaios e obter uma estimativa da variância experimental com mais graus de liberdade. No presente caso, cada ensaio foi repetido duas vezes e houve oito ensaios diferentes, pelo uso da equação:

$$s^2 = (v_1s_1^2 + v_2s_2^2 + \dots + v_8s_8^2) / v_1 + v_2 + \dots + v_8$$

Onde:

s = variância experimental, e ν = número de graus de liberdade.

$$s^2 = 848,3935 \text{ (Média quadrática do erro puro)}$$

$$s = 29,1272$$

$$\text{Erro puro} = s/2 = 29,1272/2 = 14,5636$$

O valor da estimativa do efeito padronizado de um fator ($t(8)$) é obtido pela relação entre o valor do efeito de cada fator, dividido pelo erro puro.

Tabela 3 – Valores nominais para os sete fatores, descritos pelo presente método, bem como suas variações, para a avaliação da robustez do método para a determinação de Hg em peixe fresco por TDA AAS e estimativas do efeito para o planejamento 2_{III}^{7-4} .

Fator	Nível 1	Nível 2	Efeito	$t(8)$	-95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Massa de amostra (mg)	100,0 (A)	50,0 (a)	46,250	3,176	12,666	79,834
Homogeneização da amostra	Mixer (B)	Faca (b)	-14,710	-1,010	-48,293	18,874
Tempo de secagem (s)	90 (C)	56 (c)	16,664	1,144	-16,920	50,247
Tempo de combustão (s)	120 (D)	140 (d)	12,977	0,891	-20,607	46,560
Container	Quartzo (E)	Níquel (e)	-5,699	-0,391	-39,283	27,884
Espera para leitura (min)	0 (F)	30 (f)	-14,462	-0,993	-48,046	19,122
Espécie do peixe	ON (G)	SP (g)	8,350	0,573	-25,234	41,934
Interação média	-	-	490,293	67,331	473,501	507,085

Média quadrada do erro puro = 848,3935.

A Figura 4 mostra o gráfico normal para o valor dos efeitos referente aos fatores experimentais na investigação da robustez do método. Esse gráfico é obtido dividindo cada valor de efeito pelo seu erro puro, o que resulta no valor absoluto ($t(8)$). Como é possível observar, o gráfico resultante ajusta muito bem os pontos a uma linha reta, que

cruza o valor normal igual à zero (ou probabilidade acumulada de 50%) sobre o ponto zero do eixo horizontal. Faz sentido, portanto, considerar esses pontos provenientes de uma população normal de média zero. Ou seja, eles representam efeitos não significativos. O mesmo não se pode dizer do efeito do fator A. Esse ponto, tão afastado da reta, dificilmente pertenceria à mesma população que produziu os pontos centrais, já que o experimento foi realizado aleatoriamente (Barros Neto, Scarminio, & Bruns, 2007). Essa conclusão foi confirmada pelo cálculo dos efeitos usando o programa estatístico mencionado. A estimativa do efeito padronizado, $t(8)$ na Tabela 3, para o fator massa de amostra foi $t(8)=3,176$, o único valor mais alto que aquele para oito graus de liberdade a um nível de confiança de 95%, a saber, 2,306 (Barros Neto, Scarminio, & Bruns, 2007).

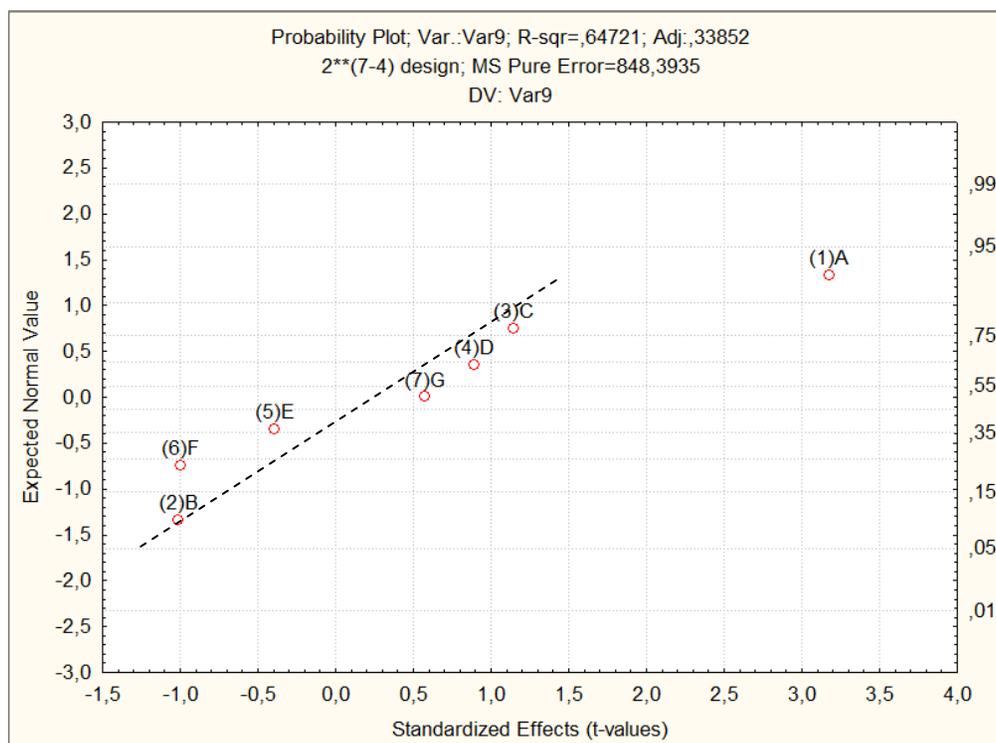


Figura 4 – Gráfico normal dos valores dos efeitos referentes aos fatores ensaiados na robustez. Só o efeito (1)A parece ser significativo.

Nesse contexto, a variação da massa de amostra foi o fator investigado mais importante e existe uma restrição experimental na sua variação quando a mesma foi diferente de 100 mg. Isso porque nesta situação há variação da quantidade de matéria orgânica a ser calcinada. Adicionalmente, para um nível de confiança de 95%, o

intervalo para o fator massa de amostra foi [12,666; 79,834], o único no qual o zero não estava contido, conforme Tabela 3. Assim, a hipótese nula foi rejeitada, ou seja, a existência da significância do fator A foi provada. Levando esses fatos em consideração, a massa de amostra foi fixada em 100 ± 5 mg. Tal constatação mostra claramente a restrição do uso de materiais de referência sólidos para a calibração do equipamento DMA-80, uma vez que nesta situação massas de amostra significativamente diferentes de 100 mg devem ser empregadas, a qual não se mostrou uma condição confiável, diante dos resultados apresentados.

2.4.1.5 Aplicação analítica

Três amostras reais e a amostra certificada IAEA-407 foram analisadas nas condições experimentais otimizadas. Os resultados são apresentados na Tabela 4. O teste de adição e recuperação foi aplicado para as amostras ON e LG e valores de recuperação entre 95,6% e 103,2% foram obtidos, sendo o coeficiente de variação sempre menor que 8%. Igualmente, o valor determinado para a concentração de mercúrio total no material de referência está de acordo com o valor de referência, para o intervalo de confiança de 95%, demonstrando a exatidão do método desenvolvido.

Tabela 4 – Valores de concentração de mercúrio na base de massa fresca (média \pm intervalo de confiança), em $\mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de variação e de recuperação, obtidos para amostras analisadas no DMA-80. $n = 3$.

Amostra	Certificado	Encontrado	CV (%)	Recuperação (%)
LG	N.A.	$111,54 \pm 12,07$	4,4	N.A.
LG ^a	N.A.	$207,19 \pm 9,96$	1,9	95,6
ON	N.A.	< LOQ	N.A.	N.A.
ON ^a	N.A.	$103,16 \pm 0,63$	0,2	103,2
SP	N.A.	$13,55 \pm 2,63$	7,8	N.A.
IAEA-407	222 ± 6	225 ± 7	1,3	101,4

^a Adição de 10,0 ng de Hg ($100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) no momento da medida sobre a alíquota da amostra (aproximadamente 100 mg). N.A.: não aplicável.

Deste modo, pode-se concluir que as amostras desconhecidas do PNCRC estão sendo analisadas com segurança, no que concerne a determinação da concentração de mercúrio pelo emprego desse método robusto e simples, o qual tem uma ampla faixa de calibração.

2.4.2 Validação do método

Todos os dados referentes ao procedimento de validação do método para a determinação de mercúrio em peixe e camarão por TDA AAS foram verificados pelo teste de Dixon, para valores discrepantes (*outliers*). Além do músculo de peixe, matriz-alvo do estudo, o músculo de camarão também representa grande interesse para o PNCRC, e por isso esta matriz também faz parte da validação, especificamente quando se avaliam os possíveis efeitos de matriz e interferências. Assim, nesta parte do trabalho, desenvolvida no Lanagro-SP, foram avaliadas a linearidade, efeitos de matriz/interferências, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intra-laboratorial), robustez e exatidão (recuperação).

Esses critérios, avaliados no presente estudo de validação, são apresentados na Tabela 5, assim como os ensaios que devem ser feitos para as suas avaliações. De fato, esse processo de validação foi iniciado seguindo-se o trabalho de Torres *et al.* (Torres, Martins-Teixeira, Silva, & Queiroz, 2012).

Tabela 5 – Critérios adotados para a validação do método para a determinação de mercúrio em peixe e camarão por TDA AAS com base nos teores máximos de contaminante (TMCs) estabelecidos para esse contaminante nas matrizes de interesse.

Parâmetro	Procedimento	Número de determinações
Linearidade	Análise de soluções padrão	7 soluções padrão para cada nível de concentração, os quais foram: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio
Limites de quantificação e de detecção	Análise de matriz de amostra com baixo teor do analito	No mínimo 21 amostras com baixo teor do analito
Interferências, efeitos de matriz	Análises replicadas de soluções padrão e matriz(es) de amostra com baixo teor do analito, fortificada(s) no nível dos TMCs	No mínimo 7 soluções padrão e 7 amostras com baixo teor do analito, fortificadas nos níveis 0,2; 1,0 e 1,5* dos TMCs da(s) matriz(es)
Repetitividade	Mesmo teste para interferências, mas somente com matriz de amostra	No mínimo 7 amostras com baixo teor do analito fortificadas nos níveis 0,2; 1,0 e 1,5 dos TMCs da matriz e analisadas em curto período de tempo
Reprodutibilidade intralaboratorial	Mesmo teste que para repetitividade, mas em dias diferentes, com diferentes analistas	No mínimo 7 amostras com baixo teor do analito fortificadas nos níveis 0,2; 1,0 e 1,5 do TMC, analisadas por diferentes analistas ao longo de um período de alguns dias
Exatidão	Análise de matriz de amostra com baixo teor do analito fortificada e/ou material de referência (certificado)	No mínimo 7 análises do RM/CRM ou amostras com baixo teor do analito fortificadas nos níveis 0,2; 1,0 e 1,5 do TMC

* Os níveis 0,2; 1,0 e 1,5 representam, respectivamente, o valor máximo permitido para o LOQ do método, o próprio valor do TMC, e uma condição de amostra violada.

2.4.2.1 Linearidade, faixa de trabalho e curva analítica de calibração

Linearidade é a capacidade de resultados de ensaios serem, diretamente ou por meio de aplicação de transformações matemáticas bem definidas, proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma dada faixa. Considerando que a maioria dos métodos analíticos usa relação linear, a avaliação da função de calibração para a linearidade é um parâmetro importante na validação de um método, assim como uma tarefa diária nas operações analíticas de rotina (de Souza & Junqueira, 2005). A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. Deste modo, a linearidade pode ser obtida por padronização externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (DOQ-CGCRE-008, 2010).

Um procedimento detalhado para testar a linearidade das curvas de calibração para a validação do método e análise de rotina pelo modelo dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), incluindo avaliação de valores discrepantes (*outliers*) e das suposições para o modelo, foi feito no presente trabalho. O método dos mínimos quadrados ordinários apresenta o inconveniente de ser muito sensível à presença de *outliers* e/ou pontos de alta influência. Neste sentido, após a obtenção dos dados da linearidade, deve-se verificar a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, averiguar a variância dos resíduos e verificar se os resíduos são independentes e têm distribuição normal. Descartados os valores discrepantes, em se tratando de homogeneidade da variância dos resíduos, bem como resíduos independentes e distribuição normal dos dados, pode-se definir a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação, R^2 , a partir do método dos mínimos quadrados ordinários (de Souza & Junqueira, 2005). As suposições consideradas foram normalidade (p -valor $\geq 0,05$), homocedasticidade ($F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$) e independência dos resíduos ($D \geq 1,5$), bem como ajuste dos dados ao MMQO ($R^2 \geq 0,995$).

A calibração do equipamento foi feita para ambas as faixas, baixa (célula 1, de 2,5 a 20,0 ng) e alta (célula 2, de 25,0 a 150,0 ng), embora a massa final de mercúrio de 200 ng não tenha sido excedida, visando minimizar o efeito de memória do sistema,

o qual é acentuado para massas relativamente altas de Hg. Neste trabalho, a linearidade do equipamento DMA-80 foi avaliada com base em onze níveis de concentrações de mercúrio, excluindo o zero, com no mínimo sete replicatas para cada nível de concentração. Esses níveis foram estabelecidos de acordo com o teor máximo de contaminante para mercúrio em peixes de cultivo e de captura, de 500 e de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, impostos pelos Regulamentos da Comissão (CE) N.º 1881/2006 e N.º 629/2008, segundo orientação da Decisão da Comissão (2002/657/CE, 2002). Além disso, o INMETRO recomenda que o primeiro ponto da curva de calibração seja correspondente ao limite de quantificação do método (DOQ-CGCRE-008, 2010).

As Tabelas 6 e 7 apresentam os valores dos parâmetros das curvas construídas para as células 1 e 2, aleatória e sequencialmente, avaliadas neste estudo. Os dados obtidos foram testados para homoscedasticidade, independência dos resíduos e distribuição normal. A avaliação da regressão linear para a calibração de forma aleatória da faixa de 2,5 a 20,0 ng de Hg apresentou resíduos homoscedásticos e normais, entretanto os resíduos foram dependentes e o coeficiente de correlação insatisfatório, sendo menor que 0,995. O mesmo se aplica para a avaliação aleatória da faixa de 25,0 a 200,0 ng de Hg, exceto pela heterocedasticidade dos resíduos. Esses resultados sugerem que a regressão quadrática é mais apropriada para a faixa baixa, uma vez que todos os requisitos são cumpridos para esta condição. Uma justificativa para a necessidade da inclusão do componente quadrático na regressão da faixa baixa, o que é bastante incomum para propostas de AAS, é que para esta técnica as curvas analíticas são lineares apenas para valores de absorvância de cerca de 0,5-0,8 (Welz & Sperling, 1999), e para a célula 1 esses valores são alcançados para cerca de 10 ng de Hg, basicamente a metade da faixa. Por outro lado, como a curva analítica da célula 2 foi explorada até 200 ng, o componente quadrático não poderia ser justificado e o ajuste para esse modelo demandaria mais informação para o cálculo da regressão. De acordo com Welz e Sperling (1999), os desvios padrão para todos os níveis da calibração em AAS exibem valores muito similares, e a função da calibração pode ser geralmente descrita por uma simples regressão linear.

De outra forma, para contornar o problema com a regressão na faixa alta, o nível de 200,0 ng de Hg foi excluído. Uma explicação razoável para este inconveniente é que as soluções de referência empregadas para estabelecer o nível de 200,0 ng de Hg

foram preparadas através de uma única diluição, a partir da solução estoque de 1000 mg L⁻¹, devido a restrições de pipeta e frascos volumétricos certificados em conformidade com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, resultando em um fator de diluição de 500, o qual é sabidamente inadequado para o propósito (Welz & Sperling, 1999). As discrepâncias em ambas as faixas de calibração, entretanto, não poderiam ter sido constatadas somente levando em consideração o coeficiente de correlação da curva, o que induziria a um julgamento incorreto. Em conclusão, a verificação dos parâmetros do modelo para a curva quadrática (faixa baixa) e para a curva linear (faixa alta) sem o nível de 200,0 ng de Hg foram satisfatórios, apresentando independência e homoscedasticidade dos resíduos, bem como distribuição normal dos resíduos e coeficiente de correlação adequado. Assim, pode-se inferir que o modelo de mínimos quadrados ordinários é adequado e representa corretamente a relação entre a massa de mercúrio e a absorvância nos níveis avaliados.

Além disso, para avaliar uma condição de linearidade mais semelhante àquela empregada na rotina, calibrações sequenciais foram estabelecidas para as mesmas faixas estudadas na forma aleatória, conforme Tabela 7. Para alcançar esta condição, as faixas baixa e alta foram calibradas pelo uso de diferentes volumes de duas soluções de referência de mercúrio, de 100,0 µg L⁻¹ e 500,0 µg L⁻¹, respectivamente. A verificação dos parâmetros do modelo para ambas as faixas, incluindo o nível de 200,0 ng de Hg, foram satisfatórias, apresentando independência e homoscedasticidade dos resíduos, bem como distribuição normal dos dados. Assim como observado na calibração de forma aleatória para a faixa baixa, o modelo linear não representa corretamente a relação entre a massa de mercúrio e a absorvância nos níveis avaliados de forma sequencial, portanto, também para a análise de rotina a regressão quadrática deve ser adotada. Assim, também para a condição sequencial, é possível afirmar que o MMQO representa corretamente a relação entre a massa de mercúrio e a absorvância nos níveis estudados. Um ponto a ser destacado é que o estudo da calibração sequencial foi concretizado um longo tempo após o estudo completo da linearidade, o que justifica a diferença na inclinação das curvas de calibração.

Tabela 6 – Testes estatísticos para a verificação das suposições dos modelos cobrindo as faixas de calibração para mercúrio no DMA-80. Leituras aleatórias para os níveis de concentração. Condições: n = 7 para cada nível de concentração.

Teste estatístico	Levene (homoscedasticidade)		Durbin-Watson (resíduos aleatórios)	Anderson-Darling (normalidade)	Coeficiente de correlação	Inclinação	Níveis de concentração
	$F_{\text{encontrado}}$	F_{tabela}	D^a	p-valor	R^2	α	-
Linear – 2,5 – 20,0 ng	2,0310	2,6896	0,5483	0,1481	0,9914	0,0382	5
Quadrática – 2,5 – 20,0 ng	2,0310	2,6896	1,6282	0,0987	0,9984	0,0530 ^b	5
Linear – 25,0 – 150,0 ng	1,3923	2,7014	1,7138	0,1030	0,9964	0,0008	5
Linear – 25,0 – 200,0 ng	4,4265	2,4851	1,0598	0,0000	0,9877	0,0008	6

^a Critério: $D \geq 1,5$ – resíduos independentes. ^b Componente linear. Três leituras para cada solução de referência.

Tabela 7 – Testes estatísticos para a verificação das suposições dos modelos cobrindo as faixas de calibração para mercúrio no DMA-80. Leituras sequenciais para os níveis de concentração. Três leituras para cada nível de concentração.

Teste estatístico	Levene (homoscedasticidade)		Durbin-Watson (resíduos aleatórios)	Anderson-Darling (normalidade)	Coeficiente de correlação	Inclinação	Níveis de concentração
	$F_{\text{encontrado}}$	F_{tabela}	D^a	p-valor	R^2	α	-
Linear – 1,0 – 5,0 ng	3,2866	3,6331	1,7287	0,1561	0,9972	0,0496	5
Linear – 2,5 – 20,0 ng	1,3649	4,1203	0,8216	0,0418	0,9930	0,0373	5
Quadrática – 2,5 – 20,0 ng	1,3649	4,1203	3,0482	0,1189	0,9994	0,0530 ^b	5
Linear – 25,0 – 200,0 ng	1,0281	3,2039	1,7157	0,2163	0,9978	0,0009	6

^a Critério: $D \geq 1,5$ – resíduos independentes. ^b Componente linear.

A Tabela 7 também apresenta dados para a verificação da suposição do modelo para a curva de ultratraços de Hg, baseados em cinco níveis de soluções padrão de mercúrio, com três leituras para cada solução. Pode-se observar que o MMQO atingiu o critério requerido do coeficiente de correlação maior que 0,995, bem como normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos. De acordo com esses resultados, foi estabelecido que: para massas de Hg até 20,0 ng, a regressão quadrática é empregada (célula 1); para massas de Hg a partir de 25,0 ng a regressão linear foi escolhida (célula 2). Por causa da ampla faixa de calibração do DMA-80, a sua calibração é bastante trabalhosa, exigindo um dia inteiro ou mais para a sua finalização. Por outro lado, as curvas obtidas podem ser usadas por vários meses, contanto que o procedimento de verificação diário gere um fator de correção entre 0,9 e 1,1 para a curva analítica gravada no equipamento (U.S.EPA 2007).

Uma consideração final sobre o DMA-80 e os testes estatísticos para estimar as melhores regressões é desencorajar os usuários a usar regressão com componente quadrático para curvas analíticas na faixa alta, e em qualquer uma das faixas a regressão polinomial de terceiro grau, designada como S-curve pelo fabricante, as quais podem não ser condições seguras, além de forçar os dados a parecerem melhores do que realmente são. Adicionalmente, o emprego do teste Dixon para a avaliação de valores discrepantes não mostrou o efeito esperado para os dados do estudo de linearidade. Observando-se que em um grupo de valores de absorvância do mesmo nível de concentração, havia alguns valores que causavam um coeficiente de variação (CV) maior que 10% e ainda assim não eram eliminados pelo referido teste. Para contornar essa situação foi adotada a seguinte condição, com base nas recomendações do fabricante: valores de absorvância que causam um CV maior que 5,0% devem ser eliminados, sem empregar o teste de Dixon.

2.4.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do método (LDM) é a concentração mínima de uma medida, declarada com 95% de confiança, em que a concentração do analito é maior que zero, demonstrando a sensibilidade do método. É numericamente igual a três vezes o desvio

padrão das medidas de uma amostra branca ($n > 20$). Já o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito a partir da qual se pode determinar sua concentração com um nível de confiança de 95%. Se a exatidão e a precisão são constantes nas faixas de concentração em torno do LDM, então o LOQ é igual a seis ou dez vezes o desvio padrão da análise de amostra branca ($n > 20$), de acordo com os requisitos estabelecidos pelo Regulamento N.º 333/2007 da Comissão (CE). Essa definição leva em consideração a matriz da amostra e também os procedimentos para o seu preparo, o que torna os limites de quantificação e de detecção do método bastante realísticos quando comparado ao procedimento que emprega apenas soluções reagentes para o estabelecimento dos mesmos. Neste caso, os resultados são afetados pela variação diária da sensibilidade do equipamento, flutuações do branco e concentração do elemento (Noël, Dufailly, Lemahieu, Vastel, & Guérin, 2005).

Para estabelecer o LDM foram feitas vinte e duas leituras da amostra ON, com baixo teor de mercúrio, tomada como amostra branca. A partir dos valores obtidos para a concentração de mercúrio nessa amostra e do desvio padrão das análises em replicata, o LDM calculado foi $0,78 \mu\text{g kg}^{-1}$ (designado como $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). O LOQ calculado foi de $2,59 \mu\text{g kg}^{-1}$ (designado como $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Esses valores estão de acordo com os requisitos estabelecidos no Regulamento (CE) N.º 333/2007, o qual demanda um valor de limite de detecção menor que um quinto do valor do TMC, que para mercúrio são $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, para peixe de cultivo e captura, respectivamente. Para confirmar o valor obtido do LOQ, uma solução padrão de mercúrio foi adicionada sobre uma alíquota da amostra ON de cerca de 100,0 mg para uma concentração final de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, de acordo com a disponibilidade de pipetas certificadas do laboratório. Esse procedimento foi realizado quinze vezes e o valor médio de recuperação encontrado foi 93,5%, com o coeficiente de variação menor que 5%, o qual é compatível com o requisito das normas de validação das legislações 2002/657/CE e CE N.º 333/2007.

2.4.2.3 Repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial

Precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições específicas, pré-estabelecidas. O valor da precisão é geralmente

expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. A repetitividade trata da precisão de um método considerando as condições de obtenção de resultados de ensaios independentes em um curto período de tempo com o mesmo método, material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento. Já a reprodutibilidade trata das condições de obtenção de resultados de ensaios com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, em laboratórios diferentes, com operadores diferentes e utilizando equipamento diferente (2002/657/CE, 2002). A reprodutibilidade deve ser considerada no caso de padronização de um procedimento analítico (Noël, Dufailly, Lemahieu, Vastel, & Guérin, 2005). Como esta é uma condição nem sempre factível, a reprodutibilidade intralaboratorial, que são as condições de obtenção de resultados de ensaios independentes com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, por diferentes operadores e utilizando o mesmo equipamento, assume um papel bastante importante na avaliação da precisão do método.

Para o estabelecimento da repetitividade do método foram analisadas sete replicatas da amostra ON, em seis níveis de concentração, os quais foram 100,0; 200,0; 500,0; 750,0; 1000,0 e 1500,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que corresponde à leitura no equipamento de 10,0; 20,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 ng de Hg, uma vez que a massa de amostra analisada é aproximadamente 100,0 mg. Os valores de concentração foram baseados nos valores de TMC de mercúrio de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em peixe de cultivo e de captura, respectivamente, multiplicados pelos fatores 0,2; 1,0 e 1,5. Esses fatores representam, respectivamente, o valor máximo permitido para o LOQ do método, o próprio valor do TMC, e uma condição de amostra violada. Esse estudo foi feito em um único dia e os dados obtidos também subsidiam as investigações de recuperação, o que será tratado adiante. A estratégia de combinar experimentos é encorajada na Decisão da Comissão 2002/657/EC, a fim de minimizar a carga de trabalho do processo de validação tanto quanto possível. Para que a reprodutibilidade intralaboratorial pudesse ser estabelecida, a análise realizada para o ensaio da repetitividade foi repetida em dois dias diferentes, com analistas distintos.

Após esta etapa, foi possível comparar o desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), obtido em condições de repetitividade, com aqueles

obtidos pela equação de Horwitz (valor teórico de CV, Equação 1) (2002/657/CE, 2002), assim como valores de Horrat, sob condições de repetitividade ($Horrat_r$) e reprodutibilidade intralaboratorial ($Horrat_R$). O valor de $Horrat_r$ é obtido pela razão do CV (em condições de repetitividade) pelo $CV_{Horwitz}$. Do mesmo modo, o valor de $Horrat_R$ é obtido pela razão do CV em condições de reprodutibilidade intralaboratorial pelo valor do $CV_{Horwitz}$ (CE N.º 333/2007).

$$\text{Equação 1 - } CV_{Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de dez.

Os dados da Tabela 8 apresentam os valores para o coeficiente de variação teórico e experimental dos níveis ensaiados em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, bem como os valores de Horrat. Os critérios de aceitabilidade, de acordo com o Regulamento CE No. 333/2007 e a Decisão da Comissão 2002/657/CE, são: CV menor ou igual a 15% para concentrações entre $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$; CV menor ou igual a 10% para concentrações maiores que $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$; o CV experimental ($CV_{R e r}$) deve ser menor ou igual a $0,66 \times CV_{Horwitz}$, e valores de $Horrat_{(R e r)}$ menores que 2.

Tabela 8 – Valores de recuperação de mercúrio e comparação dos valores de CV obtidos pela equação de Horwitz e pelos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para seis níveis de concentração de mercúrio, estabelecidos de acordo com os valores de TMC, e valores de Horrat. n=7.

Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CV_{Horwitz}$ (%)	$CV_{Horwitz} \times 0,66$ (%)	Repetitividade			Reprodutibilidade intralaboratorial	
			Recup. (%)	CV_r (%)	$Horrat_r$	CV_R (%)	$Horrat_R$
100,0	22,63	14,94	92,2	3,4	0,15	5,4	0,24
200,0	20,39	13,46	98,5	3,1	0,15	4,0	0,20
500,0	17,76	11,72	89,0	1,7	0,10	3,0	0,17
750,0	16,71	11,03	94,7	2,0	0,12	2,4	0,14
1000,0	16,00	10,56	93,0	1,2	0,08	2,7	0,17
1500,0	15,05	9,93	93,7	1,7	0,11	2,3	0,15

Levando-se em consideração os dados obtidos para os ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, todos os valores experimentais foram menores que os seus correspondentes aceitáveis teóricos, apesar da variação do dia, do analista e da solução-mãe de referência do analito. Para o ensaio de repetitividade, o coeficiente de variação foi sempre menor que 3,5%, com valores de H_{orrat_r} menores que 0,15. Para o ensaio de reprodutibilidade intralaboratorial, os valores de CV foram menores que 5,4%, com H_{orrat_R} menor que 0,24. Assim, é possível afirmar que o método desenvolvido é preciso em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial.

Neste contexto, salienta-se que a avaliação do parâmetro Horrat, apesar de mandatória pelo regulamento CE N.º 333/2007, consiste em um teste contraditório, uma vez que seu critério de aceitabilidade é 2. Isso implica que os valores de CV obtidos sob condições de repetitividade e reprodutibilidade (intra ou interlaboratorial) poderiam ser até duas vezes maiores que os respectivos valores de CV teórico, ou seja, CV_{Horwitz} , o que certamente seria um valor inconvenientemente alto para CV, independente do nível de concentração.

2.4.2.4 Recuperação e exatidão

Um dos critérios mais importantes que um processo de medida deve assegurar para receber a denominação de “amplamente aceito” ou “de referência” é que este seja capaz de produzir resultados com exatidão e precisão suficientes para o uso pretendido quando executado por um operador qualificado. A exatidão é o grau de concordância entre um valor experimental obtido e o valor de referência aceito como verdadeiro. Esta pode ser verificada pela análise de materiais de referência, quando disponíveis, que contenham os analitos em concentrações adequadas. Se não há materiais de referência disponíveis, a recuperação do analito pode ser determinada com a finalidade de estimar a exatidão, assim como a comparação com métodos oficiais (2002/657/CE, 2002).

Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada a partir do teste de adição e recuperação do analito, calculado com os dados gerados no ensaio de repetitividade. Assim, foi possível calcular os valores de recuperação média e CV em cada nível, os

quais também são apresentados na Tabela 8. De acordo com o critério de aceitabilidade para o ensaio de adição e recuperação estabelecido pela Decisão da Comissão 2002/657/CE, pode-se concluir que a mesma foi satisfatória em todos os níveis de concentração, ficando dentro do intervalo esperado de 80 a 110% para concentrações do analito de $100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$, podendo-se também inferir que o método é exato. Além disso, um aspecto importante da recuperação para a determinação de contaminantes inorgânicos é que fatores de recuperação para corrigir os resultados finais dessas análises não são recomendados, a menos que o método inclua alguma etapa de extração (Noël, Dufailly, Lemahieu, Vastel, & Guérin, 2005).

2.4.2.5 Interferências e efeitos de matriz

Um método deve ser livre de interferências espectrais ou de efeitos de matriz, ou seja, o mesmo deve ter a capacidade de distinguir o analito das outras substâncias presentes na amostra (CE N.º 333/2007). Neste sentido, a resposta analítica de soluções padrão do elemento de interesse é comparada com a matriz da amostra na qual se pretende validar o método, fortificada em níveis de concentração específicos do analito. Apesar de a matriz alvo da validação ser músculo de peixe, o músculo de camarão também é de grande interesse para esse processo de validação. Assim, a comparação do sinal analítico gerado a partir de uma solução padrão de certa concentração do analito com o sinal analítico da matriz da amostra fortificada (músculo de peixe), no mesmo nível de concentração da solução padrão, caracteriza o estudo de interferências e efeitos de matriz. A comparação deste com o sinal analítico do músculo de camarão, ambos com baixo teor do analito e fortificados no mesmo nível de concentração, caracteriza a extensão da aplicação do método (ou extensão do escopo), o que visa a ampliação da validação para outra espécie. A combinação desses experimentos garante uma grande economia de tempo e reagentes, uma vez que a matriz alvo da validação será analisada uma única vez para a concretização da investigação de vários parâmetros de grande importância na validação de um método.

Para tanto, as amostras de peixe, ON, e de camarão, LV, foram analisadas em sete replicatas para três níveis de concentração diferente de cada TMC, os quais foram $100,0$, $200,0$, $500,0$, $750,0$, $1000,0$ e $1500,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, o que corresponde a $10,0$, $20,0$,

50,0, 75,0, 100,0 e 150,0 ng de Hg para uma massa de amostra de cerca de 100,0 mg. Esses níveis de concentração são baseados no TMC para camarão ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) e peixe ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, de cultivo e de captura, respectivamente) multiplicado pelos fatores 0,2; 1,0 e 1,5. Para esse estudo foram necessários três dias de análise. A partir dos dados obtidos foram calculados a média, o desvio padrão relativo (RSD) e a recuperação, para todas as espécies. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para esse estudo, em que o valor de concentração do analito medido nas amostras consideradas brancas foi subtraído dos cálculos da concentração nas amostras adicionadas.

O critério de aceitabilidade para esse experimento é que a média de concentração do analito obtida para as matrizes em cada nível de concentração avaliado não deve apresentar diferença maior que 10% para a recuperação do analito. Além disso, o CV deve ser menor ou igual a 15% para concentrações entre $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, ou CV menor ou igual a 10% para concentrações maiores que $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, além de uma faixa de recuperação de 80 a 110% para concentrações do analito maiores que $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando-se que os dados obtidos para todos os níveis avaliados nas amostras e nas soluções de referência apresentaram um valor de CV menor que 3,5% e uma faixa de recuperação entre 96,9% e 106,2%, é possível assumir que não há diferença significativa na análise de peixe ou camarão para a determinação de mercúrio por TDA AAS, empregando-se calibração contra padrões aquosos, uma vez que não houve diferença entre o sinal do analito a partir da solução aquosa e/ou da matriz pescado. Esse aspecto é valioso e fundamental para a análise de rotina e controle oficial do mercúrio no peixe e no camarão brasileiro.

Tabela 9 – Resultados de concentração média de mercúrio, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, desvio padrão (SD), RSD e recuperação, obtidos para o ensaio de avaliação de interferências e efeitos de matriz nas amostras de peixe e camarão e em solução padrão, nos níveis 0,2, 1,0 e 1,5 do TMC 1 ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) e TMC 2 ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). n = 7.

Matriz	Solução padrão			Peixe			Camarão		
	0,2	1,0	1,5	0,2	1,0	1,5	0,2	1,0	1,5
Múltiplos TMC 1									
Média ^a	100,44	502,19	741,91	103,32	507,97	788,03	104,84	513,11	770,83
SD	1,02	7,11	10,16	2,215	10,71	12,31	2,13	10,99	11,48
RSD (%)	1,0	1,4	1,4	2,1	2,1	1,6	2,0	2,1	1,5
Recuperação (%)	100,4	100,4	98,9	102,9	101,2	106,2	104,4	102,2	96,9
Múltiplos TMC 2									
Média ^a	203,58	1023,54	1470,27	206,17	1022,35	1494,26	208,23	1006,89	1490,92
SD	2,85	7,31	25,38	6,89	22,95	37,95	3,83	30,25	18,58
RSD (%)	1,4	0,7	1,7	3,3	2,2	2,5	1,8	3,0	1,2
Recuperação (%)	101,8	102,4	98,0	101,3	103,9	101,6	102,3	102,3	101,4

^a Concentração média obtida pela adição de solução de referência de mercúrio na alíquota de amostra, no máximo trinta minutos antes da medida.

2.5 Conclusão

A otimização do método para a determinação de mercúrio em peixe pelo emprego do DMA-80 foi bem sucedida, assim como a sua validação. A análise das amostras de peixe e camarão empregando este equipamento é rápida e não requer procedimentos trabalhosos de preparo de amostra, o que torna o método atrativo para a análise de rotina. Alguns cuidados devem ser tomados para a utilização do equipamento, como avaliação da linearidade da curva analítica antes da análise, efeito de memória (principalmente para altas concentrações de Hg), bem como homogeneização e massa da amostra. Esses aspectos não haviam sido discutidos por nenhum usuário do DMA-80, de acordo com pesquisa na literatura.

Para a curva analítica da faixa baixa, de 2,5 a 20,0 ng de Hg, a regressão quadrática foi mais adequada. Os gráficos dos resíduos para as curvas quadrática (faixa baixa) e linear (faixa alta) mostraram que os resíduos são aleatórios e homoscedásticos, com distribuição normal para as faixas adotadas. O LOQ obtido foi satisfatório, já que ficou muito abaixo do valor exigido pelos regulamentos CE 333/2007, DOQ-CGCRE-008 e 2002/657/CE. Os ensaios de repetitividade e reprodutibilidade confirmaram a precisão do método proposto, o que também foi complementado pelos valores adequados de recuperação encontrados. Por fim, o ensaio da robustez comprovou a adequabilidade do DMA-80 em análise de rotina visando à determinação de mercúrio em amostras de peixe e camarão frescos.

Os critérios adotados neste estudo de validação para a determinação de mercúrio em peixe e camarão por TDA AAS confirmaram a confiabilidade do método no tocante às legislações nacionais e internacionais para alimentos, através das investigações de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), robustez, exatidão (recuperação) e efeitos de matriz/ interferências do método.

O método desenvolvido, validado e implantado na rotina do Laboratório Nacional Agropecuário - São Paulo (Lanagro-SP) desde Junho de 2010, para controle da concentração de mercúrio em peixe e camarão provenientes de todo o Brasil, foi acreditado em Agosto de 2011 pelo INMETRO na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

Capítulo 3 – Avaliação da exposição de caranguejos, através da dieta, a mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, com ou sem co-exposição a selênio

3.1 Considerações

Espécies predadoras, tanto vertebradas como invertebradas, estão sujeitas a processos de biomagnificação (principalmente do metilmercúrio) ao longo da cadeia alimentar e, potencialmente, apresentarão teores de mercúrio mais elevados no corpo. Uma vez que caranguejos são frequentemente consumidos pelo homem e também usados como isca para peixe, essa espécie pode, direta ou indiretamente, representar uma importante rota para a contaminação humana (Coelho, Reis, Ventura, Pereira, Duarte, & Pardal, 2008). O caranguejo *Carcinus maenas* é um predador onívoro, agressivo e voraz, que se alimenta de uma grande variedade de presas, e encontra-se, assim, em um alto nível trófico da cadeia alimentar (Baeta, Cabral, Marques, & Pardal, 2006). Ele está amplamente distribuído nos litorais e estuários da Europa, sendo também encontrado no sul da África, Austrália e costa do Pacífico dos Estados Unidos (Baeta A., Cabral, Neto, Marques, & Pardal, 2005).

Levando em consideração esses fatores, o crustáceo caranguejo, da espécie *Carcinus maenas*, foi selecionado para a realização dos experimentos de exposição a compostos de mercúrio e/ou selênio e avaliação da distribuição do mercúrio nos seus diferentes tecidos. Os caranguejos também são relativamente grandes e, por isso, fornecem uma quantidade razoável de cada um de seus tecidos, o que é importante para a etapa analítica das investigações. Adicionalmente, considerando que o experimento foi realizado no Reino Unido, na Universidade de Aberdeen, Escócia, a exposição de animais a compostos tóxicos é muito menos burocrática naqueles que não possuem espinha dorsal, que é o caso dos caranguejos. Desta forma, o trabalho foi feito seguindo os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética da School of Biological Sciences, da Universidade de Aberdeen, Escócia.

3.2 Objetivos

Considerando o caráter tóxico do mercúrio e a possibilidade de ocorrência de efeito antagônico quando há co-exposição a selênio, este estudo visa explorar as características para a exposição de caranguejos, através da dieta, a mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, com ou sem co-exposição a selenato, com a finalidade de avaliar o papel do selênio fornecido pela dieta em neutralizar a toxicidade do mercúrio, bem como o efeito da razão molar Se:Hg nas dietas e tecidos dos caranguejos expostos.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Instrumentação

A determinação de mercúrio foi feita por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV AFS) e conduzida no equipamento de fluorescência atômica PSA 10.025 Millennium Merlin (P S Analytical, Londres, Inglaterra), equipado com um sistema em fluxo contínuo de geração de vapor frio, usando o agente redutor cloreto estanoso e um amostrador automático ASX-510 (CETAC Technologies, Omaha, EUA). O espectrômetro foi empregado no modo de emissão e a altura de pico foi selecionada para a avaliação do sinal analítico. Além disso, o equipamento possui duas bombas peristálticas para as soluções redutora e carreadora, as quais foram configuradas para a vazão de 100%, um separador gás-líquido de 17 mL de capacidade, uma unidade desumidificadora Permapure, um detector ultravioleta e um sistema de aquisição de dados. Os tempos de espera, análise e coleta de dados foram de 28, 60 e 90 segundos, respectivamente. Os tubos empregados são de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,8 mm de diâmetro. Uma solução de cloreto estanoso dihidratado 2,0% m/v, dissolvida em HCl 10,0% v/v, foi usada como agente redutor e uma solução a 5,0% v/v de ácido nítrico de alta pureza foi empregada como carreador. As vazões para as soluções de redutor e carreador foram 4-5 mL min⁻¹ e 8-10 mL min⁻¹, respectivamente. Argônio (Pureshield, 99,998%, BOC, Reino Unido) foi empregado como gás carreador do vapor de mercúrio,

sendo a pressão ajustada em 40 Psi. A determinação do mercúrio total foi alcançada pela análise em duplicata das amostras digeridas com água régia. Cada amostra ou solução padrão foi medida no sistema CV AFS duas vezes. Alíquotas de amostra e de solução padrão, bem como de reagentes, foram pesados em uma balança analítica AB 204-S/FACT (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça). Uma chapa de aquecimento SCT1 (Stuart, Reino Unido) foi empregada para a digestão das amostras e também para o preparo do agente redutor. O banho ultra-sônico digital XUB25 (Grant Instruments, Cambridge, Reino Unido) foi usado no procedimento de descontaminação dos materiais.

A determinação de selênio nas amostras digeridas no forno de micro-ondas Mars-5 (CEM Corporation, Buckingham, Reino Unido) foi feita com o emprego do ICP-MS de alta resolução Element 2 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemanha), equipado com um amostrador automático ASX-260 (CETAC Technologies). A potência de radiofrequência adotada foi de 1350 W. Todas as medidas (^{77}Se , ^{78}Se e ^{72}Ge) foram feitas no modo de alta resolução ($m/\Delta m \sim 9000$) do espectrômetro com a finalidade de separar o sinal analítico de sérias interferências espectrais, como por exemplo aquelas causadas por $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ e $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$. O instrumento foi otimizado para a intensidade mais alta possível (107 cps para uma solução de $\text{In } 1 \mu\text{g L}^{-1}$) e a massa calibrada todos os dias. Cones de níquel e tocha de quartzo foram empregados. O nebulizador Meinhard foi alimentado por uma bomba peristáltica a uma vazão de solução de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Germânio, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, foi usado como padrão interno para todas as soluções. Amostras, soluções padrão e reagentes foram pesados na balança analítica AB 204-S/FACT (Mettler Toledo).

3.3.2 Reagentes

Todos os reagentes usados foram no mínimo de grau analítico e as soluções foram preparadas com água bidestilada obtida a partir do sistema Aquatron water still A4000D (Stuart). Uma solução de cloreto estânico 2,0% m/v em HCl 10,0% v/v foi preparada a partir de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ACS reagent, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) e ácido clorídrico 37% m/m de grau analítico (Fisher Scientific, Reino Unido). Essa solução foi submetida à ebulição em chapa de aquecimento por no mínimo um minuto antes da

análise por CV AFS. O mesmo ácido clorídrico também foi empregado em uma das etapas do processo de descontaminação dos materiais empregados no processamento e análise das amostras para a determinação de Hg. Ácido nítrico de grau analítico (ACS, Fisher Scientific, Reino Unido) também foi usado no processo de descontaminação dos materiais em uma etapa para Se e em duas etapas para os materiais destinados às medidas de Hg. Para o preparo da água régia, usada para a digestão das amostras para a determinação de mercúrio e também para o preparo das soluções padrão de mercúrio para a curva analítica, o ácido nítrico de alta pureza (TraceMetal Grade, Fisher Chemical, Reino Unido) e o ácido clorídrico concentrado (AnalaR NORMAPUR ACS, VWS, Reino Unido) foram usados. A solução carreadora de ácido nítrico 5,0% v/v empregada no sistema de geração de vapor frio também foi preparada com HNO₃ de alta pureza. Soluções padrão de trabalho com concentrações de mercúrio de 0,05, 0,20, 0,50, 1,0 e 1,5 µg L⁻¹ foram preparadas a partir de uma solução padrão de mercúrio de 10,0 µg L⁻¹ em meio de ácido nítrico 5,0% v/v. Essa solução intermediária foi preparada a partir da diluição sequencial de solução padrão de mercúrio para ICP de 1000,0 mg L⁻¹ em meio de ácido nítrico 12% v/v (Fluka). Entretanto, as soluções padrão de trabalho foram preparadas em meio de água régia, as quais foram submetidas à mesma condição de aquecimento que aquela empregada para a digestão das amostras, antes da adição do padrão.

Para as medidas por ICP-MS, o peróxido de hidrogênio (Fisher Scientific) e o ácido nítrico de alta pureza foram usados para digerir as amostras usando o forno de micro-ondas. Soluções de calibração (branco; 0,1; 0,75; 5,0; 25,0; 60,0 e 100,0 µg L⁻¹) para selênio foram preparadas diariamente pela diluição apropriada de uma solução padrão multi-elementar 10 mg L⁻¹ (Merck), também com ácido nítrico de alta pureza, para ser equivalente à concentração ácida das amostras. Uma solução padrão de germânio 10 µg L⁻¹ foi empregada como padrão interno para todas as soluções e preparada a partir de uma solução estoque 10.200 mg L⁻¹ (Aldrich Chemical, Milwaukee, EUA).

Uma solução padrão de mercúrio de 100,0 mg L⁻¹, em meio de água bidestilada e usada nos experimentos de exposição dos caranguejos, também foi preparada a partir da solução de mercúrio para ICP, de 1000,0 mg L⁻¹.

Para as exposições a metilmercúrio, foi utilizada uma solução padrão de 100,0 mg kg⁻¹, também em meio de água bidestilada, preparada pela diluição de uma solução estoque de cloreto de metilmercúrio 9543 mg kg⁻¹, para a qual cloreto de metilmercúrio sólido (Cloreto de metilmercúrio II, Sigma, Reino Unido) foi dissolvido em metanol (VWR, BDH Prolabo, Lutterworth, Reino Unido). Para as exposições a selenato, uma solução 40,0 mg L⁻¹ foi preparada a partir do reagente sólido Na₂SeO₄ anidro (99,8%, Alfa Aesar, Heysham, Reino Unido) em água bidestilada. Os materiais de referência certificados (CRM) proteína de peixe DORM-3 e fígado de cação DOLT-4 (National Research Council of Canada, Ottawa, Canadá) foram empregados em todos os procedimentos de digestão para o monitoramento das determinações de mercúrio e selênio, respectivamente.

Todos os materiais usados no processamento das amostras e também aqueles destinados à determinação de mercúrio nas amostras foram primeiramente lavados com água da torneira e deixados durante a noite em um banho de 5-10% v/v de detergente líquido (5545805, Arco LTD, Reino Unido) preparado com água de torneira. Em seguida, foram enxaguados com água de torneira até a remoção total do detergente, seguido de enxague com água bidestilada e, então, submetidos a um extenso processo de descontaminação de quatro etapas, sendo cada uma delas um banho de reagente preparado em água bidestilada em que os materiais foram mantidos sob ultra-som, durante uma hora. Essas etapas são: ácido nítrico 10% v/v (Banho 1), ácido nítrico 10% v/v (Banho 2), ácido clorídrico 10% v/v (Banho 3) e finalmente água bidestilada pura (Banho 4). Entre essas etapas os materiais foram exaustivamente enxaguados com água bidestilada. Os pequenos tanques de plástico usados nos experimentos de exposição dos caranguejos foram descontaminados pela limpeza com solução de 5-10% de detergente líquido e em seguida uma solução de 10% v/v de ácido nítrico.

Containers de plástico (polipropileno, PP) usados no preparo de amostra para a determinação de selênio foram lavados com água de torneira e em seguida em uma máquina lava-louças a 75 °C (AA 15place megaload Nextra, Hoover, Reino Unido) com sabão em pó para lava-louça. Posteriormente, os containers foram exaustivamente enxaguados com água bidestilada e então imersos em uma solução de HNO₃ 10% v/v

durante a noite, e antes do uso, novamente enxaguadas exaustivamente com água bidestilada.

3.3.4 Configuração para os experimentos de exposição dos caranguejos

Para os experimentos de exposição foram empregados caranguejos *Carcinus maenas*, fornecidos pela University Marine Biological Station Millport (Isle of Cumbrae, Escócia, Reino Unido), capturados na costa oeste da Escócia, os quais apresentavam tamanhos variados e coloração acastanhada, e eram em sua maioria machos. A massa corporal dos animais variou de 35 a 229 gramas. Todos os experimentos tiveram um grupo controle, o qual foi alimentado com peixe ou lula sem adição dos compostos de mercúrio ou selênio, para cada um dos cinco grupos de exposição, os quais foram: (I) selenato, (II) mercúrio inorgânico, (III) mercúrio inorgânico mais selenato, (IV) metilmercúrio e (V) metilmercúrio mais selenato. Cada exposição foi feita como um experimento independente com, no mínimo, quatro caranguejos expostos e dois caranguejos controle.

No laboratório de aquários, os caranguejos foram primeiramente colocados em tanques grandes com água de mar artificial, suprimento de ar e sistema de recirculação de água a uma temperatura de 15 ± 4 °C. Para os experimentos de exposição, um determinado número de caranguejos era transferido para pequenos tanques plásticos individuais estáticos com volume de cerca de 10,0 litros, contendo aproximadamente 5,0 L de água de mar artificial, de salinidade 33. Os caranguejos controle sempre foram colocados juntos em um dos tanques plásticos. Havia suprimento de ar para todos os tanques plásticos. A configuração dos tanques individuais adotada no experimento tornou possível o controle do nível de exposição a mercúrio e/ou selênio de cada caranguejo. A Figura 5 demonstra a configuração adotada para a realização dos experimentos de exposição dos caranguejos nos tanques plásticos.

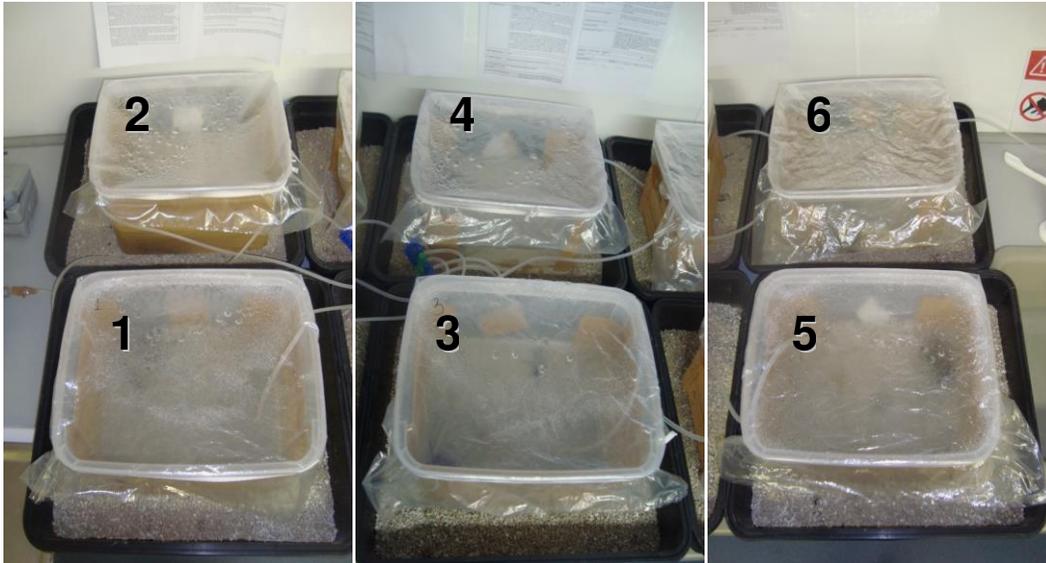


Figura 5 – Configuração dos tanques plásticos para a exposição dos caranguejos aos compostos de mercúrio e/ou selênio.

A concentração de mercúrio testada nesse experimento foi planejada de acordo com algumas considerações. A primeira delas foi o teor máximo de mercúrio permitido para crustáceos de $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso úmido, estabelecido pelo regulamento da Comissão CE N.º 1881/2006. Então, fazendo-se uma aproximação da massa corporal dos menores caranguejos usados neste experimento, assumiu-se que nenhum deles pesaria menos de 30,0 g. Assim, pela exposição dos caranguejos a $15 \text{ } \mu\text{g}$ de mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, o teor máximo permitido não seria excedido e os caranguejos também não seriam submetidos a condições extremas ($15 \text{ } \mu\text{g}/0,030 \text{ kg} = 500 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, ou $0,50 \text{ mg kg}^{-1}$).

Para a adição dos compostos de mercúrio e/ou selênio nas porções de peixe ou lula, foram usados $5,0 \text{ } \mu\text{g}$ de mercúrio inorgânico ou metilmercúrio e $2,0 \text{ } \mu\text{g}$ de selenato em cada porção, a qual pesava de 1,0 a 2,0 gramas. O peixe e a lula apresentavam baixa concentração de mercúrio e selênio. Esse procedimento foi feito com o auxílio de uma seringa para cromatografia gasosa de $100 \text{ } \mu\text{L}$, entretanto o volume de $50 \text{ } \mu\text{L}$ não foi excedido para cada composto, caso contrário ocorria o vazamento da solução a partir da porção, o que prejudicaria o experimento pela perda dos compostos. A concentração das soluções de mercúrio e de selenato empregadas foram de 100 mg L^{-1}

e 40 mg L^{-1} , respectivamente. Os experimentos de exposição duraram $14,2 \pm 1,44$ dias (média \pm desvio médio). Nesse período os caranguejos foram alimentados três vezes. Sendo assim, ao final de cada exposição cada caranguejo foi exposto a $15,0 \mu\text{g}$ da espécie de mercúrio e/ou $6,0 \mu\text{g}$ de selenato, o que resultou em uma razão molar mercúrio:selênio de 1:1, quando ambos estavam presentes.

Para efetuar a dissecação, os caranguejos foram transferidos dos seus respectivos tanques para um container com água de mar artificial limpa, onde eles foram individualmente submetidos a um processo de limpeza por um período de aproximadamente uma hora. Em seguida, foram pesados e, em um container de plástico, os caranguejos foram completamente cobertos com nitrogênio líquido. Uma média de dez amostras pôde ser obtida para cada caranguejo, as quais correspondiam à carapaça, hepatopâncreas, estômago, intestino, músculo da carapaça e das pernas, guelras, testículo/ovário e coração, além das fezes, a qual quando disponível, foi coletada a partir da água do tanque plástico onde se deu a exposição. Todas as amostras foram homogeneizadas, com exceção da carapaça e das fezes, e então transferidas para embalagens plásticas do tipo “zip lock” e armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise. Considerando-se que os cinco grupos de exposição envolveram 34 caranguejos, ao final foram originadas cerca de 350 amostras. Todos os tecidos foram analisados por CV AFS para a determinação de mercúrio total e por HR-ICP-MS para a determinação de selênio total.

3.3.5 Procedimento de preparo de amostra

As amostras foram preparadas após a homogeneização de cada tecido com o auxílio de uma faca de cerâmica e tabuleiro de plástico, com exceção da carapaça e das fezes, as quais não foram homogeneizadas. Uma massa de cerca de 100 mg de cada tecido foi transferida para um frasco (PP para selênio e vidro para mercúrio), os quais foram previamente descontaminados e pesados. Para os CRMs, uma massa de $20,0$ a $30,0$ miligramas foi usada, pois considerando que o teor natural de água no peixe é de aproximadamente 80% (The Composition of Fish), essa massa implica em aproximadamente $100,0 \text{ mg}$ de peixe fresco, assim como a massa adotada para as

amostras de caranguejo desse estudo. Todas as medidas se referem ao peso fresco, e a digestão das amostras e dos CRMs foi feita em duplicata. Com a finalidade do controle analítico das medidas, em todos os procedimentos de digestão foram incluídos os materiais de referência certificados DORM-3 e DOLT-4.

Para a determinação de mercúrio, as amostras foram pesadas em frascos de vidro, aos quais se adicionou um volume de 5,0 mL de água régia. Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento de cerca de 90 °C, em banho-maria, por um período de duas horas em chapa de aquecimento. Para tanto, os frascos foram suavemente fechados com as tampas, possibilitando a liberação de vapores dos reagentes. Para a análise, água bidestilada foi adicionada às amostras até um volume final de cerca de 25 mL, sendo a massa final da amostra digerida e diluída medida na balança analítica. Deste modo, a concentração final de água régia na amostra foi de aproximadamente 20% v/v. As amostras digeridas apresentaram uma coloração entre amarelo e marrom, frequentemente contendo pequenas partículas brancas, especialmente para o CRM DORM-3. Os valores de recuperação para mercúrio a partir da análise do CRM ficaram entre 76 e 112%, e o coeficiente de variação entre as duplicatas nunca excedeu 5,0%.

Para a determinação de selênio, a pesagem das amostras foi feita em frascos de PP e as amostras foram digeridas em forno de micro-ondas nesses frascos. Ácido nítrico concentrado, de alta pureza, foi adicionado e deixado em contato com a amostra durante a noite. Pouco antes da digestão, foi adicionado peróxido de hidrogênio concentrado, de forma a obter a proporção $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ igual a 1:2, v/v. A seguir, a mistura foi submetida ao seguinte programa no forno de micro-ondas: 5 minutos a 50 °C (rampa de temperatura de 1 minuto), 5 minutos a 75 °C (rampa de temperatura de 1 minuto), e 30 minutos a 95 °C (rampa de temperatura de 2 minutos), a 1600 W. Para a análise, água bidestilada foi adicionada às amostras para um volume final de aproximadamente 25 mL, sendo a massa final da amostra digerida e diluída medida na balança analítica. Deste modo, a concentração final de ácido nítrico nas amostras foi de aproximadamente 4% v/v. Uma solução da amostra foi obtida a partir desse procedimento. Os valores de recuperação obtidos para selênio a partir da análise do CRM DOLT-4 ficaram entre 70% e 110%, e o coeficiente de variação entre duplicatas foi em geral melhor que 12,0%.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Desenvolvimento do método

3.4.1.1 Otimização da quantificação de mercúrio nas amostras de caranguejo por CV AFS

Para a determinação de mercúrio por CV AFS a amostra digerida ou a solução padrão, ambas em meio de água régia, foi misturada com as soluções carreadora e redutora dentro da válvula de mistura. Esta foi transportada para o separador gás-líquido e o vapor de mercúrio gerado foi transportado através de uma membrana desumidificadora até o detector com o auxílio de um fluxo de argônio. Tendo em vista que o instrumento foi operado no modo contínuo, a solução carreadora, que também é o branco dos reagentes, foi reciclada.

Para as amostras que excederam a faixa de calibração adotada, uma etapa de diluição de 1:30 com a solução de ácido nítrico de alta pureza 5,0% v/v foi empregada. As soluções de calibração foram preparadas em meio de água régia, exatamente como as amostras, sendo a água régia usada nas soluções padrão submetida ao mesmo processo de aquecimento da digestão das amostras, com a finalidade de igualar a condição do meio do reagente entre as amostras e as soluções padrão. As soluções de mercúrio usadas para a construção da curva analítica foram de 0,05; 0,20; 0,50; 1,0 e 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, além da solução do branco. O limite de quantificação para mercúrio, definido como dez vezes o desvio padrão de oito soluções do branco dos reagentes submetidos ao procedimento de digestão, dividido pela inclinação da curva analítica, foi de 43,1 ng L^{-1} , ou 10,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, considerando-se o emprego de uma massa de amostra de 0,1 g e a diluição final com água bidestilada para 25 g.

Durante os primeiros testes usando água régia para a digestão das amostras, investigou-se o emprego de 5,0 mL de água régia fresca, diluída para 25 g com água bidestilada, para o preparo das soluções padrão para a construção da curva analítica, a qual em princípio foi pensada ter a mesma condição ácida das amostras. Entretanto, com esse procedimento, valores de recuperação para o CRM da ordem de 200% foram obtidos, demonstrando assim a diferença da condição ácida da água régia antes e

depois da submissão ao processo de aquecimento. O problema foi contornado submetendo alíquotas de 5,0 mL de água régia ao processo de aquecimento empregado para a digestão das amostras, em frascos de vidro, simultaneamente com as amostras. Em seguida, as soluções padrão foram preparadas a partir da água régia “fervida” e a curva analítica obtida a partir dessas soluções foi bem sucedida, gerando valores de recuperação para o CRM de cerca de 100%. Deste modo, as condições para a determinação de mercúrio total por CV AFS nas amostras de caranguejo foram completamente otimizadas. Essa constatação ressalta a extrema importância de se ter a mesma condição ácida para as amostras e as soluções padrão quando se trata de CV AFS, a fim de se evitar interferências.

3.4.1.2 Otimização da quantificação de selênio nas amostras de caranguejo por HR-ICP-MS

Para a determinação de selênio por HR-ICP-MS, a amostra digerida ou solução padrão, ambas em meio de ácido nítrico, foi misturada com a solução do padrão interno dentro de uma válvula de mistura com o auxílio de uma bomba peristáltica. Essa mistura foi transportada para o nebulizador, para a formação do fino aerossol pela ação do fluxo de argônio e introdução na tocha do plasma. O sinal analítico para soluções padrão e amostras foi sempre normalizado com aquele obtido para o padrão interno, ambos no modo de alta resolução. Uma solução de ácido nítrico de alta pureza 1% v/v foi aspirada para o plasma entre as amostras para fins de limpeza.

Considerando-se a vasta faixa de calibração adotada, nenhuma etapa de diluição foi necessária. As soluções de calibração foram preparadas em meio de ácido nítrico, a fim de igualar a condição do meio do reagente entre as amostras e as soluções padrão. Entretanto, uma vez que ao final do processo de digestão em forno de micro-ondas grande parte dos reagentes é volatilizada, especialmente o peróxido de hidrogênio, a quantidade de ácido nítrico usada para o preparo das soluções padrões foi metade daquela empregada para a digestão das amostras, considerando que o volume final da amostra digerida foi de aproximadamente 0,5 mL. As soluções de selênio para a construção da curva analítica foram de 0,1; 0,75; 5,0; 25,0; 60,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, além do

branco de reagentes. O limite de quantificação para selênio foi de $300,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Este valor foi definido como dez vezes o desvio padrão da razão do sinal para selênio e germânio, em alta resolução, obtido para o branco de reagente, dividido então pela inclinação da curva analítica e levando em consideração a massa de amostra de 0,1 g e a diluição final com água bidestilada para 25 g.

3.4.2 Avaliação da distribuição de mercúrio e da razão Se:Hg nos tecidos dos caranguejos

Todas as amostras obtidas a partir das sessões de dissecação dos caranguejos foram analisadas em duplicata por CV AFS ou HR-ICP-MS. Para CV AFS, cada digestão com água régia na chapa de aquecimento teve o material de referência certificado DORM-3 digerido em duplicata, e para cada procedimento de digestão das amostras com ácido nítrico mais peróxido, no forno de micro-ondas, para as medidas por HR-ICP-MS, foi feita a digestão do CRM DOLT-4, também em duplicata. Nas figuras a seguir, as barras representam a quantidade de Hg em cada um dos tecidos investigados, levando em consideração a massa total de cada tecido, sendo “Controle 1” e “Controle 2” os caranguejos controle, “E” os caranguejos expostos aos compostos de mercúrio/selênio, “Músculo C”, a amostra de músculo proveniente da carapaça e “Músculo P”, a amostra de músculo proveniente das pernas do caranguejo. Nos gráficos são considerados somente os caranguejos que comeram ao menos duas das três porções com a adição dos compostos de interesse. Mortalidade aconteceu uma vez na exposição a metilmercúrio na presença de selenato, assim como na exposição a mercúrio inorgânico com co-exposição a selenato. Neste sentido, decidiu-se não considerar estes animais para nenhuma das investigações.

A Figura 6A apresenta o gráfico de distribuição do mercúrio nos diferentes tecidos para a exposição dos caranguejos a mercúrio inorgânico. Pode-se observar que os tecidos dos caranguejos do grupo controle apresentaram uma quantidade muito baixa de mercúrio, e para os caranguejos expostos, designados pela letra E acompanhada por seus respectivos números, a quantidade total de mercúrio nos tecidos está entre 10,0 e 12,0 μg .

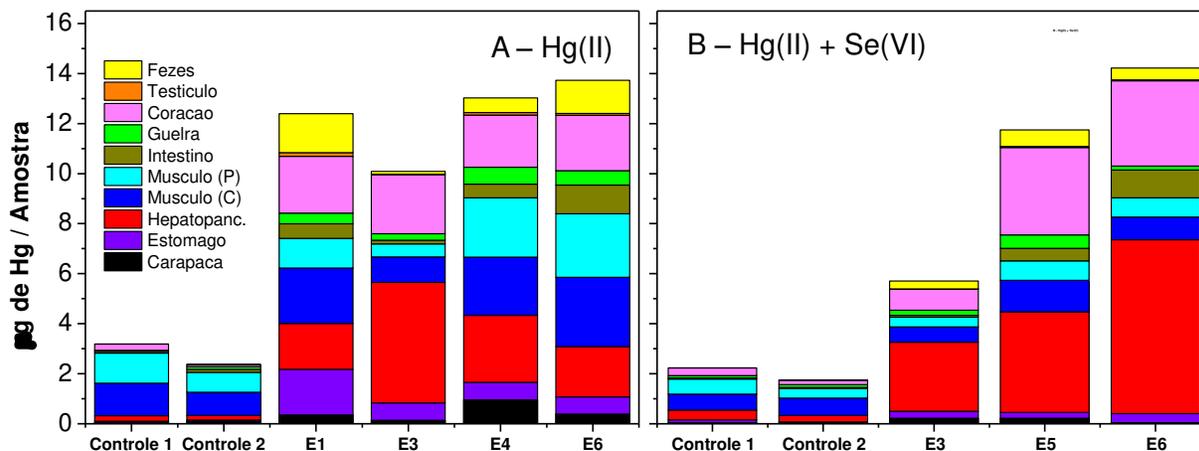


Figura 6 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a: A - mercúrio inorgânico; B - mercúrio inorgânico na presença de selenato.

Dos 15,0 µg de mercúrio aos quais os caranguejos foram expostos foi possível recuperar, a partir dos tecidos investigados, cerca de 10,0 µg, havendo desta forma uma discrepância. Para esta exposição, aparentemente o mercúrio foi principalmente acumulado no hepatopâncreas, no músculo das pernas e da carapaça e no coração, mas é necessário ressaltar que durante a exposição, o mercúrio também está sendo excretado, o que pode explicar a diferença observada. Entretanto, apesar de os resultados do teste *t*-Student para a exposição a mercúrio inorgânico, apresentados na Tabela 10, terem mostrado diferenças significativas entre a quantidade de Hg do grupo controle e dos caranguejos expostos (*p*-valor < 0,05 para a comparação dos tecidos dos caranguejos expostos com aqueles dos caranguejos controle) para hepatopâncreas, músculo da carapaça, guelra e coração, isso não foi provado para o músculo das pernas, apesar da diferença visual muito proeminente para este tecido entre os caranguejos controle e os expostos, especialmente os caranguejos E4 e E6.

Assim como observado no presente trabalho, a acumulação de mercúrio na guelra e também no intestino de caranguejos *Callinectes sapidus* já foi relatada na literatura por Laporte *et al.* (Laporte, Andres, & Mason, 2002), os quais afirmaram que a absorção de mercúrio inorgânico e metilmercúrio através da guelra e do intestino dos caranguejos é rápida e da mesma magnitude, e que isso é devido à natureza não

específica da absorção, com o potencial para a acumulação de mercúrio por uma variedade de vias.

No caso da co-exposição a selênio, apresentada na Figura 6B, pode-se observar que a acumulação de mercúrio parece ocorrer principalmente no hepatopâncreas e no coração, sendo muito menos acentuada nos músculos, principalmente quando comparada com o padrão de distribuição da exposição a mercúrio inorgânico, Figura 6A. Por outro lado, a aplicação do teste *t*-Student para esses resultados, como apresentado na Tabela 10, comprovou somente a acumulação de mercúrio no coração, apesar de a quantidade média de Hg no hepatopâncreas ser mais que dezessete vezes maior nos caranguejos expostos em comparação àquela dos caranguejos controle. Para a acumulação de Hg no hepatopâncreas ser estatisticamente significativa nesta exposição, seria necessário adotar um valor de limite de confiança mais conservador para o teste *t*-Student, como de 90% ($\alpha=0,1$).

Adicionalmente, a aplicação do teste *t*-Student para a quantidade total de Hg medida em todos os tecidos investigados confirmou que a recuperação de mercúrio foi estatisticamente similar para ambas as exposições a mercúrio inorgânico na presença ou não de selenato ($p\text{-valor} = 0,7877$), sendo a variância homogênea ($F = 0,3534$).

Destaca-se que em ambos os experimentos de exposição, a mercúrio inorgânico e mercúrio inorgânico mais selenato, os caranguejos expostos número 3, E3, comeram somente duas das três porções com a adição dos compostos, o que justifica a menor quantidade de mercúrio encontrada para os tecidos desses caranguejos, em comparação com aqueles que comeram as três porções. Considerando-se este fato, esses caranguejos não foram incluídos na avaliação do teste *t*-Student. A recuperação do mercúrio para o experimento de co-exposição a selênio foi similar àquela para a exposição a mercúrio inorgânico, como confirmado pela aplicação do teste *t*-Student, entretanto, a distribuição de mercúrio nos tecidos apresentou um padrão diferente.

Tabela 10 – Resultados dos testes t e F obtidos a partir da quantidade de mercúrio total nos tecidos (microgramas) para avaliar os experimentos de exposição. Valores significativos destacados em negrito.

Exposição	Hg(II)		Hg(II) + Se(VI)		MeHg		MeHg + Se(VI)		Se(VI)	
	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F
Carapaça	0,1461	0,1125	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Estômago	0,1135*	0,0085	0,1053	0,6511	0,0662	0,2953	<LOQ	<LOQ	N.D.	N.D.
Hepatopâncreas	0,0098	0,0890	0,0717	0,0583	0,0026	0,2467	<LOQ	<LOQ	0,1979	0,3442
Músculo (Carapaça)	0,0143	0,9515	0,1492	0,2046	0,0319	0,8857	0,0053	0,5144	0,1354*	0,0430
Músculo (Pernas)	0,1684	0,5279	0,1266	0,0511	0,0018	0,1244	0,0872	0,7108	0,0238	0,2309
Intestino	0,0763	0,1229	0,2400*	0,0281	0,0951	0,1196	0,0666	0,6724	N.D.	N.D.
Guelra	0,0141	0,4609	0,4162*	0,0188	0,0191	0,2720	0,0164	0,5579	0,5680	0,8500
Coração	0,0002	0,6666	0,0005	0,7686	0,0457	0,9477	0,2313	0,2199	N.D.	N.D.
Testículo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,0047	0,5903	<LOQ	<LOQ	N.D.	N.D.

* Teste *t*-Student para variâncias diferentes (heterocedástico), aplicado quando F calculado foi menor que 0,05.

N.D.: Tecido não disponível.

< LOQ: Concentração de mercúrio medida nos respectivos tecidos dos caranguejos controle abaixo do LOQ.

Para cada uma das exposições a mercúrio inorgânico, com e sem selenato, houve um caranguejo que não ingeriu nenhuma das porções com adição dos compostos. Nesses casos, a condição pode ser comparada com a de um ambiente poluído, e então, a acumulação nas guelras pode ser esperada. De fato, a concentração de mercúrio encontrada na guelra desses caranguejos foi cerca de três vezes maior que aquela dos caranguejos que comeram todas as porções com a adição dos compostos, e da mesma ordem que a concentração medida nos seus músculos. Geralmente, a concentração de mercúrio na guelra é cerca de duas a três vezes menor que aquela nos músculos. Essa descoberta coincide com aquela de Coelho *et al.* (Coelho, Reis, Ventura, Pereira, Duarte, & Pardal, 2008), os quais observaram que para uma área de estuário em Portugal, com altas concentrações de mercúrio, os caranguejos *C. maenas* acumularam o mercúrio principalmente nas guelras, o que foi realçado pela idade dos animais.

Quando se considera a exposição ao metilmercúrio, apresentada na Figura 7A, observa-se que a maioria do mercúrio parece ser acumulada nos músculos, o que também pode ser observado na co-exposição a selênio, Figura 7B. Entretanto, no caso de co-exposição a selênio, a excreção do mercúrio é mais proeminente.

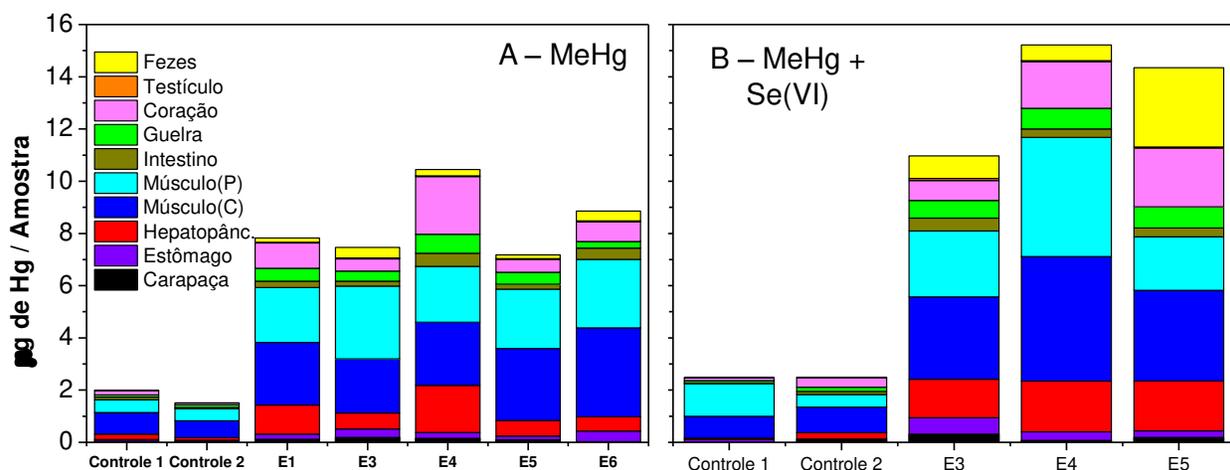


Figura 7 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a: A - metilmercúrio; B - metilmercúrio na presença de selenato.

Porém, quando se considera o teste *t*-Student para essas exposições, Tabela 10, a acumulação de mercúrio foi significativa para a exposição a metilmercúrio não

somente nos músculos, mas também no hepatopâncreas, coração, guelra e testículo/ovário. Para a co-exposição a selênio, a acumulação de mercúrio foi somente estatisticamente confirmada no músculo da carapaça e na guelra. Assim como no caso anterior, para que a acumulação de Hg no músculo da perna fosse estatisticamente significativa nesta exposição, seria necessário adotar um limite de confiança de 90% ($\alpha=0,1$). Além disso, a recuperação do mercúrio para a exposição à metilmercúrio, de cerca de 8 μg , parece ser menor que aquela para metilmercúrio com co-exposição a selênio, quando se comparam as figuras 7A e 7B, o que foi então provado pela aplicação do teste *t*-Student (p -valor = 0,0428, F = 0,2354). Esse comportamento sugere que o metilmercúrio é menos absorvido pelos tecidos dos caranguejos do que o mercúrio inorgânico, bem como ambas as espécies de mercúrio na presença de selenato.

No trabalho de Coelho *et al.* (Coelho, Reis, Ventura, Pereira, Duarte, & Pardal, 2008), também foi observado, através de análise de especiação, que o maior acúmulo de metilmercúrio se dá no músculo (cerca de 90% do mercúrio total), sendo que os autores investigaram os tecidos músculo, hepatopâncreas, guelra e carapaça. Isso está em concordância com o que foi verificado no presente experimento, apesar de não se ter realizado análise de especiação para mercúrio.

Em geral, a absorção das espécies de mercúrio pelas células se dá por difusão passiva através das membranas. Uma alta facilidade de bioacumulação é frequentemente atribuída ao caráter lipofílico desse composto orgânico. Na verdade, a predominância da taxa de metilmercúrio no músculo de peixe e não nos tecidos adiposos claramente mostra que a bioacumulação não é governada somente pela lipossolubilidade desta forma química. De fato, espécies químicas neutras de mercúrio inorgânico têm coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}) semelhante ou mesmo mais elevado que aquele do metilmercúrio: HgCl_2 , 3,3; HgOHCl , 1,2; $\text{Hg}(\text{OH})_2$, 0,05; CH_3HgCl , 1,7; CH_3HgOH , 0,07 (Boudou & Ribeyre, 1997). Esses relatos concordam com o que foi observado no presente experimento, ou seja, a acumulação marcadamente preferencial do mercúrio nos músculos quando se trata da exposição à metilmercúrio.

Vale destacar que o hepatopâncreas pode ter a função de absorver o excesso de metais pesados, ou outros contaminantes, a partir do sistema circulatório e, deste modo, prevenir os outros órgãos de serem afetados, limitando assim a distribuição de

mercúrio (analito da presente avaliação) para outros órgãos internos e, provavelmente, seus efeitos tóxicos ao organismo (Costa, Viegas, Pereira, Duarte, Palmeira, & Pardal, 2011). Essa constatação sugere que o mercúrio inorgânico representa uma condição tóxica para os caranguejos mais acentuada que o próprio metilmercúrio, a julgar pelas maiores concentrações de mercúrio encontradas no hepatopâncreas em se tratando da exposição a mercúrio inorgânico. Em conformidade, a recuperação de mercúrio para a exposição a metilmercúrio, a partir dos tecidos investigados, foi a mais baixa de todas as exposições com espécies de mercúrio, de cerca de 8 µg, o que foi confirmado pelo teste *t*-Student para a comparação com a co-exposição a selenato, como discutido anteriormente, e também para a comparação com a exposição a mercúrio inorgânico (p -valor = 0,0046, F = 0,7281), e para mercúrio inorgânico mais selenato (p -valor = 0,0202, F = 0,3838).

Para a exposição a metilmercúrio, os caranguejos expostos 1 e 4, E1 e E4, comeram somente duas das três porções com a adição dos compostos, o que também foi o caso do caranguejo E4 da exposição a metilmercúrio na presença de selenato. De modo contrário, para todos esses caranguejos que não comeram todas as porções com os analitos, o somatório da quantidade de Hg a partir dos seus tecidos parece maior que aquele para os caranguejos que comeram todas as porções com os compostos. Por outro lado, os caranguejos empregados nos experimentos são de captura, portanto uma variabilidade relativamente grande pode ser esperada, o que pode ter contribuído para a diferença observada.

Adicionalmente, um grupo de caranguejos também foi exposto a selenato, cujos resultados estão apresentados na Figura 8. Surpreendentemente, também para a exposição a selenato, a quantidade de mercúrio foi mais pronunciada nos tecidos dos caranguejos expostos em comparação com aquela dos caranguejos controle, sendo o músculo o tecido mais atingido. Quando se considera o teste *t*-Student para essa exposição, apresentado na Tabela 10, do mesmo modo, a acumulação de mercúrio foi estatisticamente significativa no músculo das pernas. Esses resultados sugerem que na presença de selênio a absorção do mercúrio do ambiente ou mesmo de outros tecidos dos caranguejos expostos foram realocados para o músculo. Porém, apesar da clara distinção visual entre a quantidade de Hg no músculo da carapaça do grupo controle e dos caranguejos expostos, essa diferença não foi estatisticamente comprovada.

Entretanto, a quantidade de Hg no músculo da carapaça, fazendo-se a relação entre a quantidade média nos caranguejos expostos e no controle, foi quase duas vezes maior que aquela para o músculo das pernas, a saber, 4,7 versus 2,6.

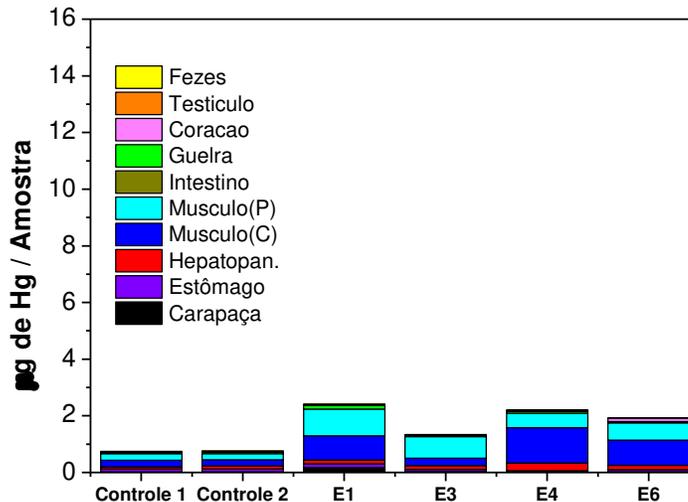


Figura 8 – Avaliação da distribuição de mercúrio nos tecidos e fezes dos caranguejos expostos a selenato.

Os caranguejos desse grupo de exposição foram os de menor massa corporal, o que tornou difícil a coleta (em si ou significativa) de alguns dos menores tecidos, como testículo/ovário, coração, intestino e estômago, o que justifica a ausência desses dados para as avaliações. Adicionalmente, a coleta das fezes foi bastante crítica, sendo que frequentemente ao final do período de exposição o que restava da mesma era somente um pó bastante pulverizado na água de mar do tanque plástico. Assim, não foi possível levar essa amostra em consideração para a avaliação estatística dos experimentos de exposição, principalmente pela ausência de dados para os grupos controle.

Também foi feita a avaliação estatística do teor de selênio nos tecidos dos caranguejos de todas as exposições. De forma geral, para todas as exposições a quantidade de selênio variou bruscamente nos diversos tecidos investigados. O somatório do teor de selênio em cada caranguejo, estimado a partir da concentração medida para todos os seus tecidos disponíveis, bem como a massa total de cada tecido, variou de 9 µg a 80 µg. Certamente, para os caranguejos com os teores mais elevados de selênio, a exposição a 6 µg de selenato, quantidade empregada na

exposição dos caranguejos no presente trabalho, não foi significativa (do ponto de vista de bioacumulação) e, por conseguinte, a aplicação do teste *t*-Student para esses resultados não comprovou a acumulação de selênio em nenhum dos experimentos com exposição a selenato, ou a diminuição de selênio em qualquer uma das exposições. A única exceção foi a diminuição do teor de selênio no coração dos caranguejos expostos simultaneamente a mercúrio inorgânico e selenato, a qual foi estatisticamente significativa. Além disso, o teste *t*-Student comprovou o aumento do teor de selênio na guelra dos caranguejos expostos a mercúrio inorgânico. Em conformidade, a acumulação de mercúrio foi significativa em ambos os casos, guelra para a exposição a mercúrio inorgânico e coração para a exposição a mercúrio inorgânico mais selenato.

Por fim, analisando-se o número de diferenças significativas entre os tecidos dos caranguejos controle e os expostos de todos os experimentos de exposição com relação a acumulação de mercúrio, conforme Tabela 10, verifica-se que o selênio de fato teve um papel muito importante na proteção dos tecidos contra a acumulação das espécies de mercúrio. Enquanto que para as exposições a mercúrio inorgânico e metilmercúrio, quatro e seis tecidos acumularam Hg, respectivamente, na presença de selenato a acumulação diminuiu para um e dois tecidos, respectivamente, a saber, coração (para Hg(II) + Se(VI)), e músculo da carapaça e guelra (para MeHg + Se(VI)), os quais também foram atingidos quando selênio não estava presente. Além disso, a recuperação de mercúrio a partir de todos os tecidos investigados foi estatisticamente igual para todas as exposições, exceto para a exposição a metilmercúrio.

Neste sentido, a avaliação estatística da razão entre a quantidade de selênio e mercúrio nos tecidos também foi feita, conforme apresentado na Tabela 11. Para todos os dados estatísticos significativos a um nível de confiança de 95%, destacados em negrito, ocorreu a diminuição da razão Se:Hg. Além disso, de acordo com o que foi observado a partir da avaliação estatística da quantidade de Hg nos tecidos dos caranguejos co-expostos a selênio, a razão Se:Hg foi preservada para todos os tecidos investigados, enfatizando o importante papel do selênio, neste caso na forma de selenato, para a proteção dos tecidos. Por outro lado, quando selenato não estava presente, os tecidos dos caranguejos expostos às espécies de mercúrio tiveram a razão Se:Hg significativamente alterada, apresentando a diminuição da razão Se:Hg para todos os valores estatisticamente significativos da Tabela 11. Levando-se esses fatos

em consideração, é possível afirmar que o selênio muda o mecanismo de ação das espécies de mercúrio investigadas e reduz o dano nos tecidos causados por essas espécies. Esses fatores definem uma modificação na toxicodinâmica dessas espécies nos caranguejos. Além disso, a co-exposição a selênio confirmou uma alteração no transporte das espécies de mercúrio através do sangue para os vários órgãos, assim como diminuiu a absorção e a acumulação dessas espécies, o que também foi observado para a avaliação da razão Se:Hg, mostrando assim uma mudança na toxicocinética das espécies de mercúrio nos tecidos dos caranguejos. De acordo com Khan e Wang (2009), embora a presença de selênio possa diminuir a biodisponibilidade das espécies de mercúrio por causa da forte ligação Hg-Se, a formação de tais compostos pode, por outro lado, induzir a deficiência de selênio, especialmente quando se considera o grande número de tecidos afetados na avaliação da razão Se:Hg para as exposições às espécies de mercúrio sem selenato.

Tabela 11 – Resultados dos testes t e F obtidos a partir da razão Se/Hg nos tecidos (micromol) para avaliar os diferentes experimentos de exposição. Valores significativos destacados em negrito.

Exposição	Hg(II)		Hg(II) + Se(VI)		MeHg		MeHg + Se(VI)		Se(VI)	
	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F
Carapaça	0,2912*	0,0130	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
Estômago	0,2279*	0,0031	0,4723	0,2012	0,0004	0,5564	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.
Hepatopâncreas	0,1071*	0,0471	0,2962*	0,0213	0,0354	0,3493	D.I.	D.I.	0,9322*	0,0001
Músculo (Carapaça)	0,0128	0,1175	0,7880	0,1568	0,2405*	0,0269	0,0758	0,4449	0,0049	0,8626
Músculo (Pernas)	0,0033	0,9870	0,5129	0,8180	0,0672	0,6421	0,0585	0,5547	0,4144*	0,0268
Intestino	0,0077	0,4076	0,4502*	0,0145	0,0042	0,4002	0,2257	0,1674	D.I.	D.I.
Guelra	0,3250*	0,0091	0,2283	0,2904	0,0053	0,1170	0,1492	0,0783	0,3339	0,9017
Coração	0,0004	0,1293	0,1970*	0,0211	0,1323*	0,0259	0,1975*	0,0073	D.I.	D.I.
Testículo	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.	0,0038*	0,0105	D.I.	D.I.	D.I.	D.I.

* Teste *t*-Student para variâncias diferentes (heterocedástico), aplicado quando F calculado é menor que 0,05.

D.I.: Dados insuficientes para o cálculo da razão.

3.5 Conclusão

Um estudo de contaminação em nível do organismo e em nível dos órgãos principais proporciona uma melhor compreensão dos mecanismos de acumulação global envolvidos durante a exposição. Considerando-se os experimentos de exposição feitos com mercúrio inorgânico ou metilmercúrio na presença ou não de selênio, na forma de selenato, a recuperação de mercúrio a partir dos tecidos investigados foi bastante similar, exceto para a exposição a metilmercúrio, a qual foi estatisticamente menor que para as outras exposições às espécies de mercúrio, o que sugere que esta espécie é menos absorvida pelos tecidos dos caranguejos. O perfil dos caranguejos controle foi bastante semelhante, com baixa quantidade de Hg em todos os tecidos investigados. Para os caranguejos expostos a mercúrio inorgânico, a acumulação do mesmo foi estatisticamente confirmada (p -valor $< 0,05$ para a comparação dos tecidos dos caranguejos expostos com aqueles dos caranguejos controle) no hepatopâncreas, músculo da carapaça, guelra e coração, ao passo que para o caso da co-exposição a selenato, a acumulação de mercúrio foi significativa somente no coração. Diferentemente, quando se considera a exposição à metilmercúrio, a acumulação de mercúrio foi estatisticamente significativa no músculo da carapaça e das pernas, hepatopâncreas, guelra, coração e testículo/ovário. Entretanto, para a co-exposição a selênio, a acumulação de mercúrio foi somente significativa no músculo da carapaça e guelra.

A acumulação de mercúrio e a razão Se:Hg no hepatopâncreas, coração e músculos foram altamente significativas para as exposições aos compostos de mercúrio sem co-exposição a selenato, suportando o conceito de que ambos os elementos devem ser medidos quando se avaliam as potenciais consequências para a saúde a partir da exposição a compostos de mercúrio. Em todos os experimentos de exposição, a concentração de mercúrio medida na carapaça dos caranguejos expostos foi muito baixa, sugerindo que este tecido não está associado a processos de desintoxicação de mercúrio, a qual é trocada regularmente. Além disso, a acumulação de mercúrio nos músculos dos caranguejos expostos a metilmercúrio, com ou sem selenato, foi muito mais acentuada que aquela nos tecidos com maior teor de lipídeos, a saber, hepatopâncreas e coração, o que dá evidente respaldo que a bioacumulação do

metilmercúrio não pode ser explicada unicamente pela lipossolubilidade do metilmercúrio. Ademais, a co-exposição a selênio através da dieta desempenhou um papel muito importante contra a toxicidade das espécies de mercúrio investigadas no presente trabalho, mostrando alterar a toxicocinética e toxicodinâmica nos tecidos dos caranguejos, e conseqüentemente, os padrões de absorção e acumulação dessas espécies. Essa descoberta também é suportada pela avaliação da razão Se:Hg para os tecidos, a qual foi constante para todos aqueles das co-exposições a selenato.

Adicionalmente, uma vez que o caranguejo *C. maenas* é consumido pelo homem e é também uma presa para alguns tipos de peixes e pássaros, esse animal pode representar uma via de acumulação de mercúrio através da cadeia alimentar.

4. Referências bibliográficas

- ABNT NBR ISO/IEC 17025, Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. (I. O. Standardization, Ed.)
- Azevedo, F. A., Nascimento, E. S., & Chasin, A. A. (2003). Mercúrio. In: F. A. Azevedo, & A. A. Chasin, *Metais, gerenciamento da toxicidade* (pp. 299-352). Atheneu.
- Baeta, A., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Pardal, M. A. (2006). Feeding ecology of the green crab, *Carcinus maenas* (L., 1758) in a temperate estuary, Portugal. *Crustaceana*, 79(10), 1181-1193.
- Baeta, A., Cabral, H., Neto, J., Marques, J., & Pardal, M. (2005). Biology, population dynamics and secondary production of the green crab *Carcinus maenas* (L.) in a temperate estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65, 43-52.
- Barros Neto, B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (2007). *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria* (3ª edição ed.). Campinas, SP, Brasil: Editora da UNICAMP.
- Beaty, R. D., & Kerber, J. D. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. (T. P.-E. Corporation, Ed.) Norwalk, CT, EUA.
- Bings, N. H., Bogaerts, A., & Broekaert, J. A. (2004). Review: Atomic Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76(12), 3313-3336.
- Boudou, A., & Ribeyre, F. (1997). Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental Health Perspectives*, 105 (Suppl. 1), 21-35.
- Carbonell, G., Bravo, J., Fernández, C., & Tarazona, J. (2009). A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 210-213.
- Cava-Montesinos, P., Domínguez-Vidal, A., Cervera, M. L., Pastor, A., & De la Guardia, M. (2004). On-line speciation of mercury in fish by cold vapour atomic fluorescence through ultrasound-assisted extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(10), 1386-1390.
- CODEX STANDARD, 1.-1. (2010). CODEX general standard for contaminants and toxins in food and feed. CODEX STAN 193-1995.
- Coelho, J., Reis, A., Ventura, S., Pereira, M., Duarte, A., & Pardal, M. (2008). Pattern and pathways for mercury lifespan bioaccumulation in *Carcinus maenas*. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1104–1110.
- Costa, S., Viegas, I., Pereira, E., Duarte, A. C., Palmeira, C. M., & Pardal, M. A. (2011). Differential sex, morphotype and tissue accumulation of mercury in the crab *Carcinus maenas*. *Water Air Soil Pollution*, 222, 65–75.
- de Souza, S. V., & Junqueira, R. G. (2005). A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552(1-2), 25-35.
- Decisão da Comissão de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados - 2002/657/CE. (C. Europeia, Ed.) Bruxelas, Bélgica.
- DOQ-CGCRE-008. (Fevereiro de 2010). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, Revisão 03. (INMETRO, Ed.)
- dos Santos, E. J., Herrmann, A. B., Vieira, M. A., Frescura, V. L., & Curtius, A. J. (2005). 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: Atomic Spectroscopy*, 60(5), 659-665.

- Ertas, O., & Tezel, H. (2004). A validated cold vapour-AAS method for determining mercury in human red blood cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(4), 893-897.
- Fischer, R., Rapsomanikis, S., & Andreae, M. O. (1993). Determination of methylmercury in fish samples using GC/AA and sodium tetraethylborate derivatization. *Analytical Chemistry*, 65(6), 763-766.
- Harris, D. C. (2011). *Quantitative Chemical Analysis*. NY, EUA: W. H. Freeman.
- Haynes, S., Gragg, R. D., Johnson, E., Robinson, L., & Orazio, C. E. (2006). An evaluation of a reagentless method for the determination of total mercury in aquatic life. *Water, Air, & Soil Pollution*, 172(1-4), 359-374.
- Ikem, A., & Egilla, J. (2008). Trace element content of fish feed and bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) from aquaculture and wild source in Missouri. *Food Chemistry*, 110(2), 301-309.
- Jarvis, K., Gray, A., & Houk, R. (1992). *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Blackie Academic & Professional.
- Khan, M. A., & Wang, F. (2009). Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(8), 1567-1577.
- Laporte, J., Andres, S., & Mason, R. (2002). Effect of ligands and other metals on the uptake of mercury and methylmercury across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131, 185-196.
- Maggi, C., Berducci, M. T., Bianchi, J., Giani, M., & Campanella, L. (2009). Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641(1-2), 32-36.
- Mauricio, A., Lins, E., & Alvarenga, M. (2009). A national residue control plan from the analytical perspective—The Brazilian case. *Analytica Chimica Acta*(637), 333-336.
- McClain, W. C., Chumchal, M. M., Drenner, R. W., & Newland, L. W. (2006). Mercury concentrations in fish from Lake Meredith, Texas: Implications for the issuance of fish consumption advisories. *Environmental Monitoring and Assessment*, 123(1-3), 249-258.
- MERCOSUL. (1993). MERCOSUL\GMC\RES Nº 57/94 Criterios para a validacao de metodologias analiticas para a determinação de resíduos de principios ativos de medicamentos veterinários (RMV) em produtos de origem animal.
- Milestone. (s.d.). *DMA-80*. Acesso em 8 de Janeiro de 2012, disponível em <http://www.milestonesrl.com/analytical/products-mercury-determination-dma-80-and-dma-803-principle-of-operation.html>
- MS. (s.d.). *Radiogenic Isotope Geology*. Acesso em 20 de Novembro de 2012, disponível em Alan P. Dickin, Cambridge University Press: <http://www.onafarawayday.com/Radiogenic/Ch2/Ch2-2.htm>
- Noël, L., Dufailly, V., Lemahieu, N., Vastel, C., & Guérin, T. (2005). Simultaneous analysis of cadmium, lead, mercury, and arsenic content in foodstuffs of animal origin by inductively coupled plasma/mass spectrometry after closed vessel microwave digestion: method validation. *Journal of AOAC International*, 88(6), 1811-1821.

- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2007). *Handbook on the Toxicology of Metals* (3th Edition ed.). Academic Press.
- PNCRC-MAPA. (s.d.). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Acesso em 23 de Outubro de 2012, disponível em Resíduos e Contaminantes - MAPA: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>
- Ralston, N. V. (2008). Selenium health benefit values as seafood safety criteria. *EcoHealth*, 5(4), 442-455.
- Ralston, N. V., Ralston, C. R., Blackwell, J. L., & Raymond, L. J. (2008). Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *NeuroToxicology*(29), 802–811.
- Regulamento (CE) da Comissão das Comunidades Europeias 1881, de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. (C. Europeia, Ed.) Bruxelas, Bélgica.
- Regulamento (CE) da Comissão, de 28 de Março de 2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno em géneros alimentícios. (C. Europeia, Ed.) Bruxelas, Bélgica.
- Regulamento (CE) de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. (C. Europeia, Ed.) Bruxelas, Bélgica.
- Reis, B. F., Ródenas-Torralba, E., Sancenón-Buleo, J., Morales-Rubio, A., & Guardia, M. (2003). Multicommutation cold vapour atomic fluorescence determination of Hg in water. *Talanta*, 60, 809-819.
- Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., & Curtius, A. J. (2004). Slurry sampling for Hg determination in sediments, sewage sludge and coal samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(6), 825-831.
- Rodrigues, J. L., Torres, D. P., Souza, V. C., Batista, B. L., Souza, S. S., Curtius, A. J., & Barbosa Jr, F. (2009). Determination of total and inorganic mercury in whole blood by cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (CV ICP-MS) with alkaline sample preparation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(10), 1414-1420.
- Sanzo, J., Dorransoro, M., Amiano, P., Amurrio, A., Aguinagalde, F., & Azpiri, M. (2001). Estimation and validation of mercury intake associated with fish consumption in an EPIC cohort of Spain. *Public Health Nutrition*, 4(5), 981-988.
- Tao, G., Willie, S. N., & Sturgeon, R. E. (1999). Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(12), 1929-1931.
- The Composition of Fish*. (s.d.). Acesso em 19 de Outubro de 2012, disponível em FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e01.htm>
- Thomas, R. (2008). *Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners*. New York, EUA: CRC Press.
- Torres, D. P., Borges, D. L., Frescura, V. L., & Curtius, A. J. (2009). A simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and in situ oxidation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(8), 1118-1022.

- Torres, D. P., Vieira, M. A., Ribeiro, A. S., & Curtius, A. J. (2005). Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(4), 289-294.
- Torres, D., Martins-Teixeira, M., Silva, E., & Queiroz, H. (2012). Method development for control determination of mercury in seafood by solid direct analysis thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(4), 625–632.
- Tsalev, D. L., & Zaprianov, Z. K. (1985). *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice* (2th ed., Vols. I - Analytical aspects and health significance). Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press, Inc.
- U.S. EPA Method 7473, Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry.
- Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. Weinheim (Alemanha): Wiley-VCH.

5. Anexos

5.1 Curva analítica do DMA-80 e seus respectivos gráficos de dispersão de resíduos e normal probabilístico

Curva analítica para a faixa baixa de 2,5 a 20,0 ng (célula 1), com regressão quadrática.

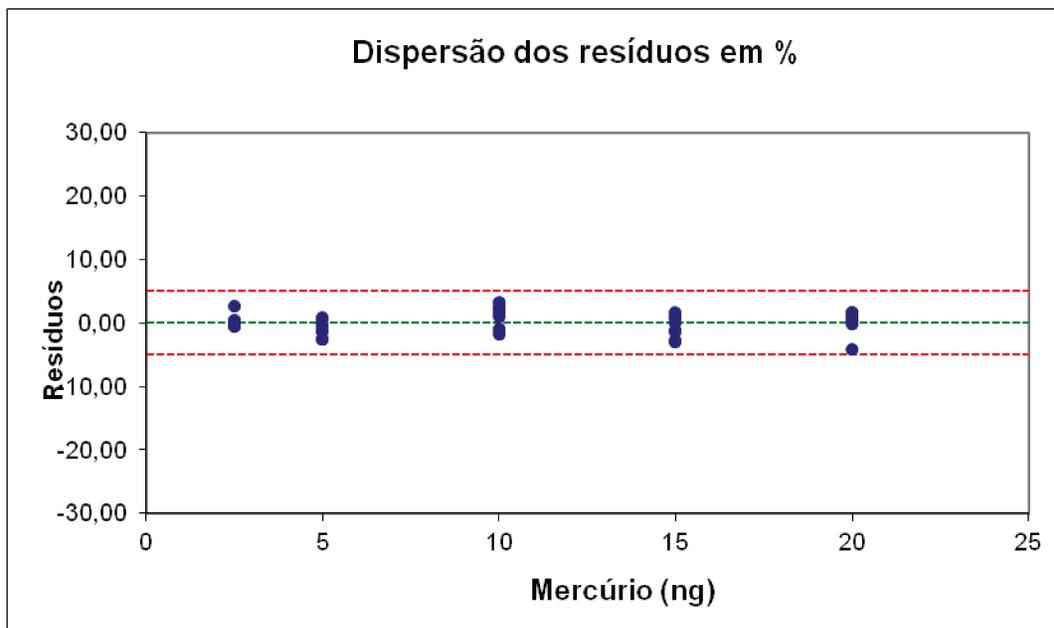
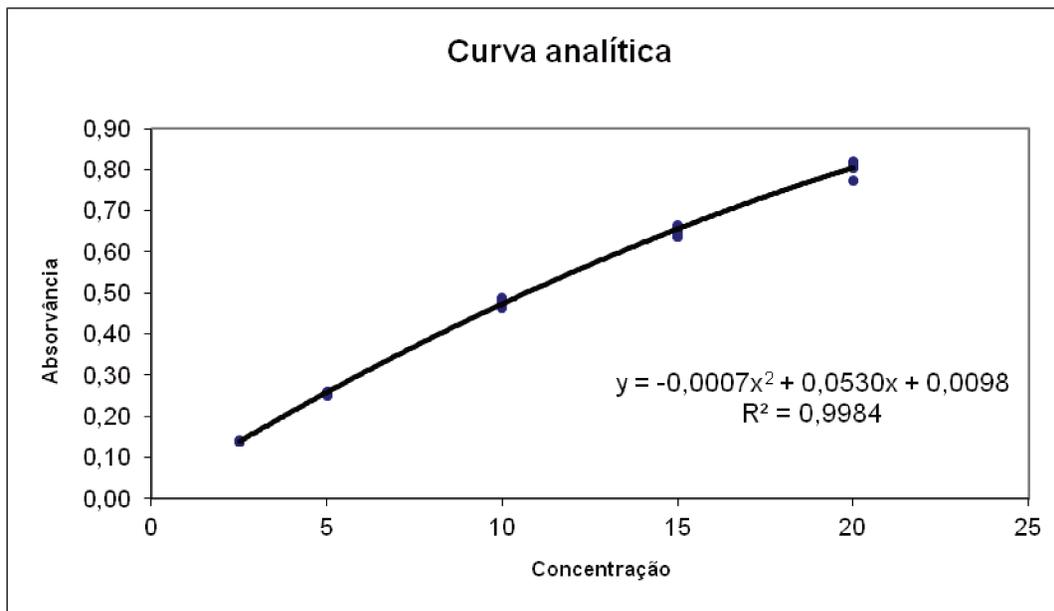
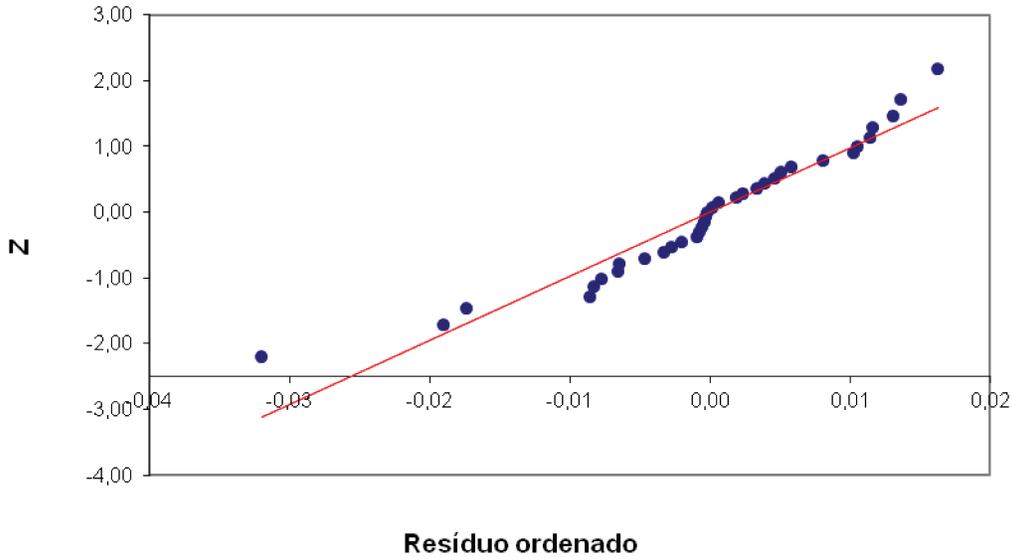
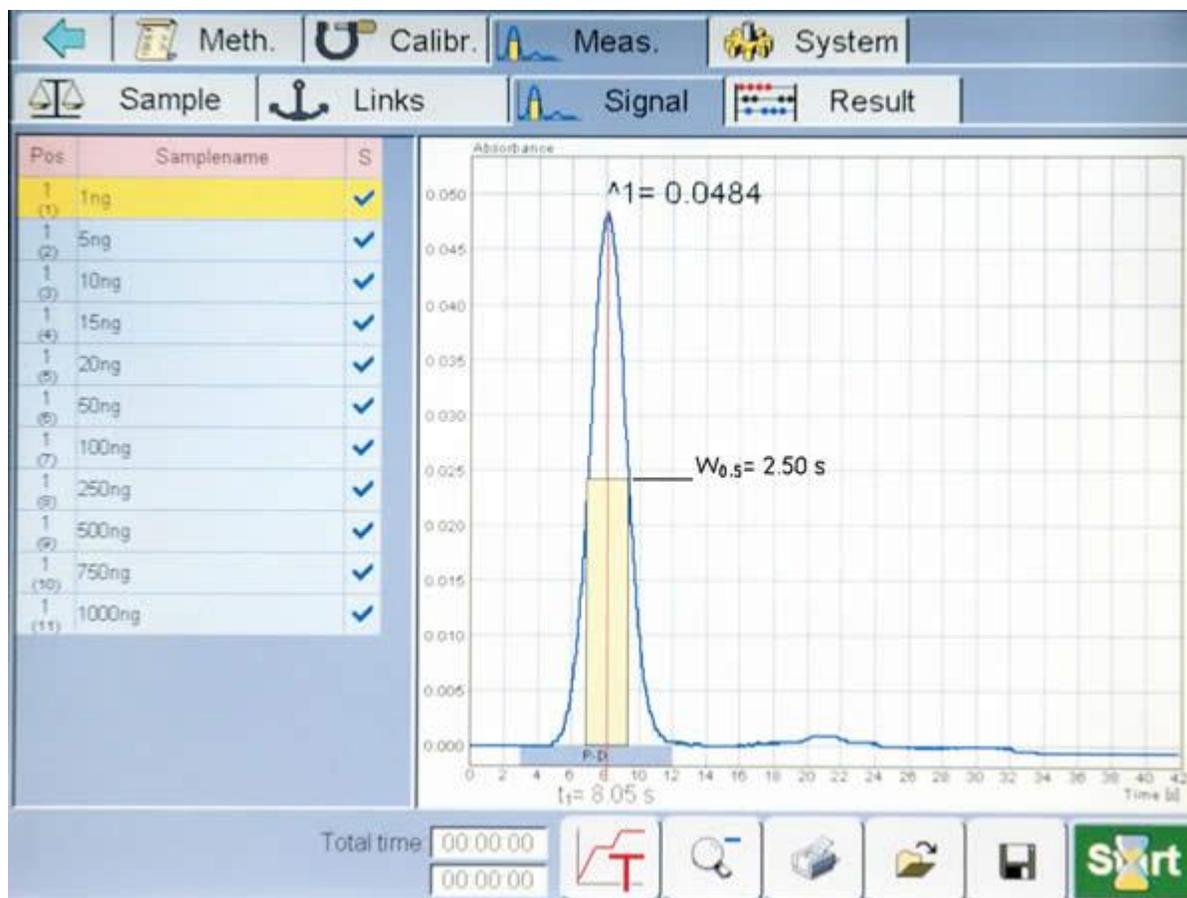


Gráfico normal probabilístico

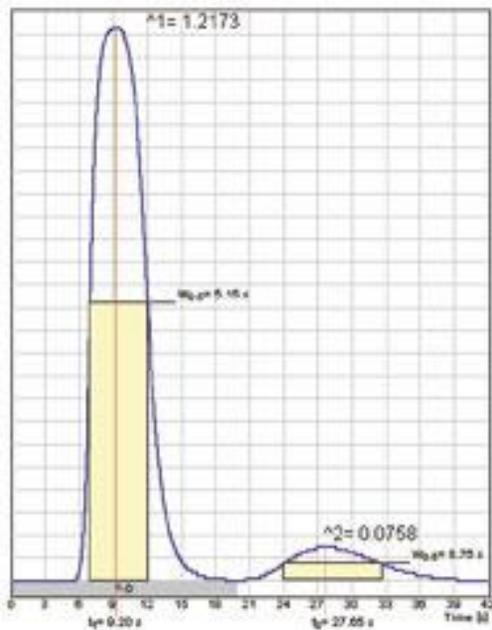


5.2 Sinais analíticos do DMA-80

Perfil do pico resultante da determinação de 1 ng de mercúrio no DMA-80. Visualização da tela do programa do equipamento. Neste caso, somente o sinal medido na célula 1, com valor de absorvância de 0,0484, é considerado. O sinal da célula 2 para esse nível de mercúrio é insignificante, e o que se visualiza a partir de cerca de 20 s de coleta de sinal é somente ruído (Fonte: <http://www.milestonesrl.com/analytical/products-mercury-determination-dma-80-and-dma-803-principle-of-operation.html>).



Perfil do pico para massas de mercúrio maiores que 20,0 ng (valor exato não especificado). Neste caso, o sinal da célula 1 gera um valor de absorvância maior que 1,0000, então o equipamento passa a levar em consideração o sinal da célula 2, que nesta ilustração corresponde a altura de 0,0758, referente ao tempo leitura do sinal em cerca de 27 segundos (Fonte: <http://www.milestonesrl.com/analytical/products-mercury-determination-dma-80-and-dma-803-analytical-performance.html>).



5.3 Medidas de segurança ao se trabalhar com compostos de mercúrio

Compostos inorgânicos de mercúrio são muito tóxicos por ingestão ou inalação. Compostos orgânicos de mercúrio são geralmente muito mais tóxicos que suas formas inorgânicas. Eles podem causar danos aos órgãos através da exposição prolongada e/ou repetida. São muito tóxicos por inalação, em contato com a pele e se engolidos, apresentando riscos de efeitos acumulativos. As espécies metiladas de mercúrio são extremamente tóxicas. Absorção de doses tão baixas quanto 0,1 mL foi comprovada fatal. Monometilmercúrio e dimetilmercúrio atravessam latex, PVC, butil e neopreno rapidamente (dentro de segundos) e é absorvido através da pele. O uso de luva nitrílica é mandatório quando se trabalha com as espécies metiladas de mercúrio (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=442534&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F442534%3Flang%3Dpt>)