UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de método analítico para especificação química de
mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente
empacotado (MEPS)**

Ana Paula dos Santos Poles

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente empacotado (MEPS)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Ana Paula dos Santos Poles

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 15/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Poles, Ana Paula dos Santos

Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente empacotado (MEPS). Ribeirão Preto, 2016.

74p.:il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

1. Especiação. 2. Mercúrio. 3. HPLC-ICP-MS. 4. MEPS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula dos Santos Poles

Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente empacotado (MEPS).

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa
Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Letícia e Toninho, por acreditarem mais em mim do que eu mesma e ao meu namorado Ricardo por nunca me deixar desistir.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, pela paciência, compreensão e respeito com a minha decisão de desempenhar atividades profissionais paralelas às do mestrado. Serei eternamente grata pela oportunidade, apoio e disponibilidade.

Aos integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, os antigos e os novos, pelo convívio e companheirismo.

À técnica e amiga Vanessa, pela dedicação, disponibilidade e impagável contribuição intelectual para esse trabalho. Obrigada pelas risadas e por tornar toda essa experiência mais leve.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por fazer parte da minha história e por todas as oportunidades e ensinamentos.

Ao meu namorado Ricardo, pelo incentivo, carinho e compreensão durante todos esses anos.

Aos meus pais, Toninho e Letícia, pela dedicação e amor incondicional. Vocês são meu alicerce e meus maiores exemplos.

À todos que me apoiaram e estiveram ao meu lado durante esta etapa.

*É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê.*

Los Hermanos

RESUMO

POLES, A. P. S. **Desenvolvimento de método analítico para especiação química de mercúrio por HPLC-ICP-MS utilizando microextração em sorvente empacotado (MEPS)**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico para a especiação de mercúrio em água com preparação de amostra por microextração em sorvente empacotado (MEPS) e determinação das espécies de mercúrio utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS). Para isso foram otimizadas as condições do sistema cromatográfico, do sistema de detecção e do procedimento de extração, considerando os parâmetros que influenciam diretamente na eficiência da análise, como o solvente de eluição, o agente complexante, o número de ciclos de extração e a velocidade de amostragem da seringa semi-automática eVol®. As melhores condições para o preparo de amostra foram encontradas com o uso de ditizona 0,001% m/v como agente complexante e eluição com 50µL de fase móvel, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹. Esse método apresentou valores de limite de detecção (LOD) de 0,19ng/L, 0,13ng/L e 0,16ng/L e recuperação de 100 ± 3%, 112 ± 0,9% e 91 ± 0,9% para mercúrio inorgânico (IHg), metilmercúrio (MeHg) e etilmercúrio (EtHg), respectivamente. A precisão intra-dia para cada espécie apresentou valores inferiores a 6,2% e a precisão inter-dia, valores inferiores a 8,3%. Finalmente, o método proposto é uma excelente alternativa para a especiação química de mercúrio em amostras de água, garantindo uma melhor sensibilidade e reduzido volume de amostra. Além disso, poderá ser uma boa opção para pré-concentração de espécies de mercúrio *in loco* em estudos de contaminação ambiental em locais de difícil acesso e com pouca infraestrutura.

Palavras-chave: Especiação, mercúrio, HPLC-ICP-MS, MEPS

ABSTRACT

POLES, A. P. S. **Development of an analytical method for mercury speciation with HPLC-ICP-MS using microextraction by packed sorbent (MEPS)**. 2016. 74f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The aim of this study was to develop and validate a novel preconcentration method for determination of mercury species in water using a microextraction by packed sorbent (MEPS) based protocol followed by high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The optimized conditions of the HPLC and ICP-MS were determined and critical factors in MEPS protocol were established, including elution solvent, complexing agent, number of extraction cycles and sample flow rate of the semi-automated MEPS format (eVol®). The best sample preparation conditions were found with the use of dithizone 0,001% m/v as complexing agent and elution in 50µL of the mobile phase, containing 2-mercaptoethanol 0,05% v/v + L-cysteine 0,4% m/v + ammonium acetate 0,06 mol/L. The proposed method detection limit (LOD) was 0,19ng/L, 0,13ng/L and 0,16ng/L and the recovery was $100 \pm 3\%$, $112 \pm 0,9\%$ and $91 \pm 0,9\%$ for inorganic mercury (IHg), methylmercury (MeHg) and ethylmercury (EtHg), respectively. The within-day precision was always lower than 6,2%, while the between-day precision was lower than 8,3% for the species determined. Finally, the proposed method is an excellent alternative for mercury speciation in water samples, ensuring a better sensitivity associated to small sample volume. Additionally, it may be a good option for preconcentration of mercury species in situ for environmental contamination studies in places of difficult access and poor infrastructure.

Keywords: Speciation, mercury, HPLC-ICP-MS, MEPS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio (Adaptado de JACOB, 2014).....	3
Figura 2: Esquema de um sistema de ICP-MS.....	10
Figura 3: Classificação das técnicas de microextração (SPME: Microextração em fase sólida; SBSE: Extração sortiva em barra de agitação; TFME: Microextração em filme delgado; SPDE: Extração dinâmica em fase sólida; FNME: Microextração em fibra empacotada; MEPS: Microextração em sorvente empacotado) (Adaptado de SILVA et al., 2014).....	12
Figura 4: Representação esquemática da seringa utilizada para MEPS.....	14
Figura 5: Cromatograma representativo da curva de calibração das espécies de mercúrio (Coeficientes de correlação linear: IHg = 0,99867; MeHg = 0,99996; EtHg = 0,99995). Condições experimentais de acordo com as Tabelas 2 e 3.....	24
Figura 6: Estudo da eficiência de três diferentes soluções para a dessorção de espécies de mercúrio do sistema MEPS (fase móvel, extrator e tiosulfato de sódio 0,1 mol/L) (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em 50µL da solução teste (extrator composto de HCl 0,1% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,1% v/v e fase móvel de 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L ⁻¹).....	26
Figura 7: Estruturas dos agentes complexantes.....	27
Figura 8: Estudo da eficiência da funcionalização da fase estacionária de MEPS por DTZ 0,001% m/v em metanol, 2-mercaptoetanol 0,5% v/v, 2-mercaptoetanol 1% v/v e APDC 0,1% m/v (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas	

nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em $50\mu\text{L}$ de fase móvel.....28

Figura 9: Gráfico comparativo de experimento realizado sem qualquer funcionalização da coluna MEPS e com a modificação desta com DTZ 0,005% em meio básico, seguindo o protocolo estabelecido por YIN et al., 2010 ($n=3$). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em $50\mu\text{L}$ de fase móvel.....29

Figura 10: Estruturas químicas da ditizona, seus ditizonatos metálicos e a difeniltiocarbodiazona (Adaptado de AZEVEDO, 2003).....30

Figura 11: Estudo da influência da concentração da ditizona na funcionalização da fase estacionária de MEPS para especiação de mercúrio ($n=3$). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em $50\mu\text{L}$ de fase móvel.....31

Figura 12: Cromatograma obtido para especiação de Hg utilizando o sistema proposto MEPS-HPLC-ICP-MS. Foi utilizada amostra de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio e submetidas a 5 ciclos extração MEPS, após funcionalização da fase estacionária utilizando ditizona 0,001% m/v em metanol. As condições experimentais estão representadas nas Tabelas 2 e 3.....34

Figura 13: Cromatograma obtido para especiação de Hg por HPLC-ICP-MS sem previa pré-concentração por MEPS, utilizando $10\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio. As condições experimentais estão representadas nas Tabelas 2 e 3.....34

Figura 14: Estudo da influência do número de ciclos de extração na determinação das espécies de mercúrio (amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado utilizando ditizona 0,001% m/v em metanol como agente complexante, amostragem sob velocidade 2 do dispositivo eVol® e eluição em 50µL de fase móvel.....35

Figura 15: Estudo da influência da velocidade de aspiração da amostra na eficiência da extração das espécies de mercúrio (amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado utilizando ditizona 0,001% m/v em metanol como agente complexante, 5 ciclos de amostragem e eluição em 50µL de fase móvel.....37

Figura 16: Comparação dos valores de limite de detecção do método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto com outros métodos existentes na literatura para especiação de mercúrio em amostras de água.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre parâmetros de MEPS, SPE e SPME (Adaptado de SILVA et al., 2014)	13
Tabela 2: Condições operacionais otimizadas do HPLC para especiação química de mercúrio em água.....	23
Tabela 3: Condições experimentais do ICP-MS visando a especiação química de mercúrio em água.....	24
Tabela 4: Recuperação obtida com o estudo das variáveis dependentes.....	32
Tabela 5: Características analíticas do método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hg ⁰	Mercúrio elementar
IHg	Mercúrio inorgânico
Hg-o	Mercúrio orgânico
MeHg	Metilmercúrio
EtHg	Etilmercúrio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
MEPS	Microextração em sorvente empacotado (do inglês <i>Microextraction by packed sorbent</i>)
ATSDR	Agência para o <i>Registro</i> de Substâncias Tóxicas e Doenças (do inglês <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
BHE	Barreira hematoencefálica
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)

GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid chromatography</i>)
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>Capillary electrophoresis</i>)
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês <i>Atomic fluorescence spectrometry</i>)
AES	Espectrometria de emissão atômica (do inglês <i>Atomic emission spectrometry</i>)
AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i>)
CV	Vapor frio (do inglês <i>Cold vapour</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase extraction</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid-phase microextraction</i>)
SDME	Microextração em gota suspensa (do inglês <i>Single-drop microextraction</i>)
HF-LPME	Microextração em fase líquida em fibra oca (do inglês <i>Hollow-fiber liquid-phase microextraction</i>)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês <i>Stir-bar sorptive extraction</i>)
TFME	Microextração em filme delgado (do inglês <i>Thin film microextraction</i>)
SPDE	Extração dinâmica em fase sólida (do inglês <i>Solid phase dynamic extraction</i>)
FNME	Microextração em fibra empacotada (do inglês <i>Fiber-packed needle microextraction</i>)

SCX	Trocador forte de cátions (do inglês <i>Strong cation exchange</i>)
SAX	Trocador forte de ânions (do inglês <i>Strong anion exchange</i>)
RAM	Materiais de acesso restrito (do inglês <i>Restricted access media</i>)
MIP	Polímeros molecularmente impressos (do inglês <i>Molecularly imprinted polymer</i>)
DTZ	Ditizona
APDC	Pirrolidinaditiocarbamato de amônio (do inglês <i>Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate</i>)
ICH	Conferência Internacional em Harmonização (do inglês <i>International Conference on Harmonization</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of quantification</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative standard deviation</i>)
HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
MEPS-HPLC-ICP-MS	Microextração em sorvente empacotado associado à cromatografia líquida de alta eficiência hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Lista de figuras.....	III
Lista de tabelas.....	VI
Lista de abreviaturas e siglas.....	VII
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 Mercúrio.....	1
1.2 Toxicologia do mercúrio.....	2
1.2.1 Mercúrio elementar.....	4
1.2.2 Mercúrio inorgânico.....	4
1.2.3 Mercúrio orgânico.....	5
1.3 Especificação química do mercúrio.....	6
1.4 Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).....	8
1.5 Acoplamento HPLC-ICP-MS para especificação química de Hg.....	11
1.6 Avanços no preparo de amostras para especificação química.....	12
1.6.1 Microextração em sorvente empacotado (MEPS).....	13
1.6.1.1 Variáveis da MEPS.....	15
1.7 Validação analítica.....	18
 2. OBJETIVOS.....	 19
 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 20
3.1 Instrumentação.....	20
3.2 Reagentes e soluções.....	20
3.3 Preparo de soluções padrão e fase móvel.....	21
3.4 Preparo de amostras.....	21
3.5 Preparo dos agentes complexantes.....	22

3.6 Especificação de Hg por HPLC-ICP-MS.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Otimização do sistema cromatográfico e do sistema de detecção.....	23
4.2 Otimização dos parâmetros de extração.....	25
4.2.1 Eluente.....	25
4.2.2 Agente complexante.....	27
4.2.3 Variáveis dependentes.....	31
4.2.4 Influência do número de ciclos de extração.....	35
4.2.5 Influência da velocidade de amostragem.....	36
4.3 Estudos de validação.....	38
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS.....	42

1 – Introdução

1.1 - Mercúrio

O mercúrio é um metal altamente tóxico, conhecido e utilizado desde a antiguidade. Seu nome homenageia o planeta mais próximo do sol, bem como o Deus Mercúrio, mensageiro dos deuses, filho de Júpiter e de Maia na mitologia romana. O símbolo químico correspondente, Hg, é derivado do latim *Hidragyrum*, que significa prata líquida.

Para executar desenhos nas paredes das cavernas em que habitava, em objeto de argila e em pinturas faciais, o homem pré-histórico utilizava uma pedra vermelha, o cinábrio (sulfeto de mercúrio, HgS), principal minério de mercúrio. Na antiguidade, esse minério foi utilizado pelos hindus e chineses e foi encontrado em tumbas do Egito datadas de antes de 1500 a.C. e em tumbas da Grécia. Esse emprego decorativo de tintas contendo pigmento vermelho à base de mercúrio talvez tenha sido a primeira forma de utilização desse metal, perdurando até o início do século XX. O primeiro uso não decorativo do mercúrio ocorreu com o famoso arquiteto romano Vitruvius, que descreveu o processo de amalgamação.

Historicamente, o mercúrio foi explorado por alquimistas, na tentativa de produzir ouro e também foi extensamente utilizado na terapêutica, desconhecendo-se seus efeitos tóxicos. Relatos da toxicidade associada aos compostos mercuriais aparecem também ao longo dos séculos, sendo o mercúrio o primeiro metal a ser objeto de legislação para controle de doença ocupacional. Tal acontecimento se deu em meados do século XVII, com a redução da carga horária diária de trabalho de 14 para 6 horas nas minas de mercúrio em Idrija, Iugoslávia. O hidrargismo ou mercurialismo (intoxicação crônica por mercúrio) é a mais antiga das doenças ocupacionais conhecidas e foi descrita por Pope em 1665, embora Paracelso já a tivesse mencionado em 1567 (AZEVEDO, 2003).

O século XX foi um marco na história da toxicologia do mercúrio e de seus compostos. Dentre os principais episódios de intoxicação em massa por compostos de mercúrio destacam-se o ocorrido em Minamata e no Iraque. O caso de Minamata caracterizou-se pelo aparecimento de uma doença neurológica incomum em uma comunidade de pescadores da baía de Minamata, sul do Japão, na década de 50. Descobriu-se posteriormente que a *Chisso Fertilizer*, uma das maiores indústrias químicas do Japão, foi responsável por despejar efluentes industriais contendo

resíduos de mercúrio gerados como subproduto do processo de produção de acetaldeído e cloreto de vinila. Esses resíduos eram lançados nas águas da Baía de Minamata, gerando uma contaminação dos organismos aquáticos e, conseqüentemente, dos habitantes locais, cuja dieta consistia essencialmente de peixes e frutos do mar. Ficou oficialmente reconhecido que 2.252 pessoas foram diretamente contaminadas pelo metilmercúrio, sendo que 1.043 óbitos ocorreram e um total de 12.127 pessoas reivindicaram ter a doença. Na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação de agricultores e seus familiares, que utilizavam grãos tratados com fungicidas à base de metil e etilmercúrio na confecção de pão caseiro. No caso particular do Iraque, mais de 6.900 pessoas foram hospitalizadas e pelo menos 459 morreram (BISINOTI e JARDIM, 2004; AZEVEDO, 2003).

1.2 – Toxicologia do mercúrio

O mercúrio pode ser encontrado no ambiente em três formas químicas, com diferentes características de biodisponibilidade e toxicidade: (i)- na forma de mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), (ii)-Mercúrio inorgânico (IHg) e (iii)-Mercúrio orgânico (Hg-o) (ATSDR, 1999). Dentre estas, a forma orgânica é a mais considerada do ponto de vista toxicológico, pois apresenta alta estabilidade, atravessa facilmente membranas biológicas, é capaz de se bioacumular e é eliminada lentamente quando comparada a outras formas mercuriais (TAO et al., 1998; BISINOTI e JARDIM, 2004).

A contaminação ambiental por mercúrio pode ocorrer como resultado da liberação deste por fontes naturais ou antropogênicas (HUGGETT et al., 2001). Emissões antropogênicas incluem queima de combustíveis fósseis, mineração e tratamento de resíduos, sendo responsáveis pela emissão de mais de 2500 toneladas de mercúrio a cada ano (KLAASSEN et al., 2008; LUBICK, 2009). Fontes naturais incluem desgaseificação da crosta terrestre, incluindo áreas de terra, rios e oceanos, além de atividade vulcânica e emissões biogênicas de compostos voláteis e particulados (RASMUSSEN, 1994).

O mercúrio liberado na atmosfera, proveniente tanto de fontes naturais quanto antropogênicas, encontra-se predominantemente na forma de mercúrio elementar (JITARU e ADAMS, 2004). No entanto, transformações biogeoquímicas

podem modificar seu estado de oxidação e a forma inorgânica (Hg^{2+}), após deposição, pode ser transformada por microrganismos, originando metilmercúrio (MeHg) (LEOPOLD et al., 2010; BULLOCK, 2000). O metilmercúrio pode entrar na cadeia alimentar e sofrer bioacumulação e biomagnificação, sendo o consumo de peixe ou alimentos marinhos sua principal fonte de exposição (SEGADE e TYSON, 2003) (**Figura 1**).

Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio (Adaptado de JACOB, 2014).

O mercúrio e seus compostos figuram em 3º lugar na lista de prioridades da ATSDR, que consideram as substâncias que apresentam o maior potencial de ameaçar a saúde humana, em virtude de sua conhecida ou suspeitada toxicidade. Além disso, na União Europeia esse metal é classificado como um dos 30 poluentes prioritariamente perigosos. Consequentemente, a determinação de mercúrio em água é regulamentada por lei (LEOPOLD et al., 2010). No Brasil, o padrão de potabilidade de água fixado pela Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, admite valor máximo de $1\mu\text{g/L}$ de mercúrio. Esse valor é bastante permissivo, uma vez que a concentração basal de mercúrio é da ordem de 1 a 5ng/L em água doce não contaminada e valores da ordem de $\mu\text{g/L}$ caracterizam água natural contaminada (LEOPOLD et al., 2009).

O metabolismo e os efeitos tóxicos da exposição ao mercúrio dependem da espécie química (LEERMAKERS et al., 2005), sendo importante apontar suas características individuais.

1.2.1 – Mercúrio elementar

A exposição ao mercúrio elementar ocorre, principalmente, pela inalação do vapor originário de amálgamas dentários ou de atividades mineradoras de ouro (ATSDR, 1999). O vapor de mercúrio é eficientemente absorvido por via inalatória, devido à rápida difusão dessa forma química através da membrana alveolar, entrando na corrente sanguínea. Sua absorção a partir do trato gastrointestinal, porém, é insignificante (AZEVEDO, 2003).

Em virtude da alta lipossolubilidade, o mercúrio elementar atravessa facilmente as membranas celulares e pode ser transportado através das barreiras hematoencefálica (BHE) e placentária. Essa forma elementar existe por tempo transitório pois é rapidamente oxidado a Hg^{2+} na corrente sanguínea, embora não tão rapidamente para prevenir absorção considerável pelo sistema nervoso central (SNC) e por outros tecidos, onde se acumula e pode manifestar sua toxicidade (BERNHOF, 2012).

A inalação aguda de vapor de mercúrio pode induzir problemas respiratórios, como bronquite erosiva e bronquiolite, podendo levar à insuficiência respiratória. A exposição crônica, por sua vez, está principalmente associada a efeitos no SNC, incluindo tremores, delírios, perda de memória e desordens neurocognitivas (SYVERSEN e KAUR, 2012).

1.2.2 – Mercúrio inorgânico

Compostos de mercúrio inorgânico tiveram vasta aplicação em produtos médicos e cosméticos, como cremes clareadores e antissépticos. Além disso, relatos de intoxicações acidentais ou intencionais decorrentes da ingestão de cloreto mercúrico não são incomuns (SYVERSEN e KAUR, 2012).

A intoxicação aguda por ingestão acidental ou proposital de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) ou outros sais mercúricos afeta predominantemente os rins e o trato gastrointestinal (TGI). O efeito corrosivo de uma solução concentrada de sal de Hg^{2+} sob a mucosa do TGI causa extensa precipitação de proteínas, podendo ocorrer dores do estômago e vômitos. A passagem deste sal para áreas inferiores do

TGI, podem levar a dores abdominais generalizadas e diarreia com sangue, associados à necrose da mucosa intestinal. Se o paciente sobreviver aos danos gastrointestinais, os órgãos críticos serão os rins. Dentro de 24 horas, ocorre falência renal causada por necrose do epitélio tubular proximal. Por sua vez, a intoxicação crônica causada exclusivamente por sais de Hg^{2+} é bastante incomum, sendo que a maior parte dos casos ocorre concomitantemente com a exposição ao vapor de mercúrio elementar (NORDBERG et al., 2015).

1.2.3 – Mercúrio orgânico

Os compostos orgânicos, em razão de sua específica atividade biológica, foram e, em pequena escala, ainda são, utilizados na prática médica e agrícola. Assim, como medicamentos foram empregados como diuréticos, antissépticos, germicidas e contraceptivos. Também foram usados como praguicidas, na forma de algicidas, herbicidas e antitraças; conservantes em pinturas, ceras e pastas; antimofos em tintas, em pinturas à base de látex; fungicida em tecidos, papel, cortiça, borracha e madeira, em países de clima úmido. Terapeuticamente, foram usados como laxantes e catárticos em medicina veterinária e como agentes antimicrobianos (AZEVEDO, 2003).

Dentre os compostos orgânicos de mercúrio, aqueles ligados a grupamentos alquila de cadeia curta são os de maior interesse toxicológico, com destaque para o metilmercúrio (MeHg) e o etilmercúrio (EtHg). As principais fontes de exposição a esses compostos organomercuriais estão no consumo de peixes ou de alimentos marinhos e uso de vacinas contendo timerosal, respectivamente (BERMAN et al., 2007; GUZMÁN-MAR ET AL., 2011; SOUZA et al., 2013; GEIER et al., 2015). Ambos apresentam alta absorção pelas vias respiratórias e pelo trato gastrointestinal e exibem propriedades toxicológicas similares, com capacidade de atravessar a BHE e a barreira placentária. No entanto, o EtHg é degradado em Hg^{2+} mais rapidamente que o MeHg , para um dose equivalente e, conseqüentemente, uma quantidade menor desde é encontrada no cérebro quando da exposição comparativa (SYVERSEN e KAUR, 2012; CARNEIRO et al., 2015).

O vapor de metilmercúrio é absorvido com eficiência similar ao do vapor de mercúrio elementar (aproximadamente 80%). Após exposição oral, por sua vez, cerca de 95% do metilmercúrio ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal e

distribuído pelo organismo, incluindo o cérebro, onde a concentração alcançada é cinco vezes maior do que no sangue (ORTIZ et al., 2002; CASTOLDI et al., 2008).

Os sintomas decorrentes da exposição ao metilmercúrio são de origem neurológica e consistem em distúrbios visuais, ataxia, parestesia, neurestenia, perda de audição, disartria, deterioração mental, tremor muscular, distúrbios de motilidade e nos casos de exposição grave, paralisia e morte (BISINOTI e JARDIM, 2004).

1.3 – Especificação química do mercúrio

A espécie química do metal determina sua toxicidade, biodisponibilidade e biogeoquímica (HARRINGTON, 2000). Dessa forma, apenas a determinação de mercúrio total não é suficiente para se caracterizar o comportamento dos elementos particulares, pois não permite dimensionar a contribuição de cada uma destas formas químicas para o potencial efeito tóxico. Assim, é necessário determinar e quantificar as espécies nas quais esses elementos são encontrados (ROSEN e HIEFTJE, 2004). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a análise de especificação é definida como a atividade analítica de identificação e/ou determinação das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra, sendo o termo espécies químicas relacionado à forma específica de um elemento quanto à sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou estrutura molecular (TEMPLETON et al., 2000).

Na especificação química, são empregadas técnicas de separação acopladas à técnicas de detecção de alta sensibilidade (SUTTON e CARUSO, 1999). A separação pode ser realizada utilizando-se métodos cromatográficos ou não-cromatográficos. Os métodos não-cromatográficos baseiam-se nas propriedades químicas e/ou físicas das diferentes espécies de mercúrio (como solubilidade, volatilidade ou potencial redox) e determinam principalmente apenas uma espécie ou fração química (LEOPOLD et al., 2010). Os métodos cromatográficos, por sua vez, são capazes de determinar todas as espécies de mercúrio simultaneamente e incluem cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), cromatografia com fluido supercrítico e eletroforese capilar (CE) (JIA et al., 2011, SUTTON e CARUSO, 1999). Para a determinação das espécies de mercúrio podem ser utilizadas técnicas como espectrometria de fluorescência atômica (AFS), espectrometria de emissão atômica (AES), espectrometria de

absorção atômica (AAS) e espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (MENG et al., 2007).

A cromatografia líquida (LC) tem sido atualmente a técnica de escolha na especiação química de mercúrio (RODRIGUES, et al., 2010a). Os sistemas de detecção utilizados juntamente com HPLC podem ser amplamente divididos em três abordagens: fotometria, técnicas de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, ICP-AES) e espectrometria de absorção e fluorescência atômica de vapor frio (CV-AAS, CV-AFS) (HARRINGTON, 2000). Dentre os métodos mencionados, o acoplamento HPLC-ICP-MS é um dos mais utilizados em virtude da facilidade de preparação de amostra, simplicidade da interface entre as técnicas, disponibilidade de informação da razão isotópica e especificidade da intensidade do sinal do elemento determinado (MENG et al., 2007).

A especiação de mercúrio no meio aquático é muito importante para a avaliação da contaminação ambiental. Em virtude das características de metabolismo, toxicidade, transporte, bioacumulação e biomagnificação associadas à esse metal, a poluição em água tem um impacto negativo sobre organismos aquáticos e sobre humanos. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos simples, sensíveis e confiáveis para a determinação de espécies de mercúrio em amostras de água é extremamente relevante (YIN et al., 2010). No entanto, a concentração das espécies de mercúrio no ambiente aquático são, geralmente, muito menores que o limite de detecção dos métodos analíticos convencionais, sendo necessária uma etapa de pré-concentração (XIONG et al., 2014). Muitos trabalhos envolvendo a especiação de mercúrio no ambiente aquático foram desenvolvidos nos últimos anos e são apresentados na revisão de LEOPOLD et al. (2010), além de outros estudos mais recentes, como de YIN et al. (2010), XIONG et al. (2014) e ZHANG, et al. (2015).

Xiong et al. (2014) realizaram a comparação entre o uso de dietilditiocarbamato e 2-mercaptoetanol como modificadores de cartuchos C18 de extração em fase sólida (SPE) para a pré-concentração da espécie de mercúrio em amostras de água, com posterior determinação por HPLC-AFS. A funcionalização da SPE com dietilditiocarbamato forneceu limites de detecção de 3,5ng/L, 2,5ng/L e 4ng/L para mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio, respectivamente. Para a SPE modificada com 2-mercaptoetanol os limites de detecção foram de 1,4ng/L para mercúrio inorgânico, 1ng/L para metilmercúrio e 1,6ng/L etilmercúrio.

Em 2015, Zhang et al. propuseram um método para especiação de mercúrio em amostras de água utilizando uma prévia pré-concentração das amostras *in loco* por extração em fase sólida com sorvente magnético e determinação das espécies de mercúrio por HPLC-ICP-MS. Os limites de detecção obtidos foram de 1ng/L e 0,3ng/L para mercúrio inorgânico e metilmercúrio, respectivamente.

1.4 – Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

O plasma acoplado indutivamente é uma fonte bem caracterizada de alta temperatura, apropriada para a atomização e ionização de espécies elementares. O plasma é formado em uma tocha de quartzo, que consiste em três tubos concêntricos de quartzo através dos quais flui gás argônio. O fluxo externo, chamado de gás de “plasma”, de “resfriamento” ou “gás suporte”, é introduzido tangencialmente na tocha e é responsável por sustentar o ICP. O fluxo de gás central, chamado de “auxiliar”, é usado para manter o plasma afastado das laterais da tocha de quartzo. O fluxo interno de gás, conhecido como gás “nebulizador”, transporta a solução do analito para o plasma. Uma fonte de radiofrequência de 27,12 ou 40,68 MHz é acoplada à tocha usando-se um filamento metálico. Assim, campos elétricos e magnéticos oscilantes são formados no topo da tocha. O plasma é formado quando uma faísca é usada para produzir elétrons que são acelerados vetorialmente pelos campos elétricos e magnéticos tendo energia suficiente para ionizar o gás argônio. Colisões sucessivas causam novas ionizações e o plasma se torna auto-sustentável. Parte da energia do plasma é então transferida para excitar e ionizar o analito.

A forma convencional de introdução de amostra no ICP é líquida e um sistema típico de introdução de amostra consiste de um nebulizador (pneumático ou ultrassônico), que forma um aerossol fino, seguido por uma câmara de nebulização que separa as gotas maiores das menores vindas do nebulizador. O aerossol é, então, transportado para o plasma pelo fluxo do gás nebulizador, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização.

O ICP produz, eficientemente, íons monocarregados positivamente que são transportados para o espectrômetro de massa (MS), usando uma interface com bomba de vácuo de múltiplos estágios. Os íons são extraídos do plasma a uma

pressão atmosférica para o espectrômetro de massa à baixa pressão através de um cone de amostragem de níquel ou platina refrigerado. O orifício deste cone tem aproximadamente 1mm de diâmetro. Na região de baixa pressão atrás do cone de amostragem ocorre expansão do gás antes de uma fração dos íons passar através de outro cone, conhecido como *skimmer*, com um orifício de menor diâmetro. Os íons são focalizados diretamente no caminho do analisador de massa usando lentes, que são eletrodos submetidos a diferentes voltagens. Os íons são então separados no analisador de massa de acordo com sua razão massa/carga. O analisador de massa mais comumente usado é um quadrupolo (SUTTON e CARUSO, 1999). A **Figura 2** ilustra esquematicamente os componentes de um sistema comercial de ICP-MS.

Figura 2: Esquema de um sistema de ICP-MS.

1.5 - Acoplamento HPLC-ICP-MS para especiação química de Hg

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação muito versátil em virtude da variedade de mecanismos de separação que podem ser desenvolvidos utilizando diferentes fases móveis e estacionárias e aplicada para a separação de diversos analitos biologicamente e ambientalmente importantes (WANG, 2007). A maioria dos métodos de especiação de mercúrio, por sua vez, utilizam cromatografia de fase reversa com uma fase estacionária não polar (normalmente C8 ou C18) ligada a um suporte de sílica e uma fase móvel contendo um solvente orgânico juntamente com um agente complexante ou de par iônico (como 2-mercaptoetanol, pirrolidinaditiocarbamato ou L-cisteína), sob condições otimizadas de pH (LEOPOLD et al., 2010; WANG, 2007). Esses reagentes complexantes ou de par iônico são empregados para aumentar a eficiência da separação cromatográfica e para evitar a adsorção das espécies na fase estacionária (MARGETÍNOVÁ et al., 2008). Além disso, o emprego de fases móveis sem a presença de solventes orgânicos pode constituir uma alternativa para a determinação das espécies de Hg por ICP-MS, sem perda de eficiência da separação cromatográfica.

Uma das principais vantagens do acoplamento de HPLC com ICP-MS envolve a utilização de uma interface simples e direta entre essas técnicas. Sendo as vazões utilizadas na separação por HPLC compatíveis com aquelas necessárias para a nebulização pneumática, o efluxo da coluna pode ser diretamente introduzido por um nebulizador. Além disso, as separações por HPLC são normalmente realizadas a temperatura ambiente ou a temperaturas ligeiramente elevadas (30-40°C), eliminando a necessidade de regulação da temperatura da interface HPLC-ICP-MS (POPP et al., 2010).

Salienta-se que atualmente estudos envolvendo a análise por especiação de mercúrio por meio do acoplamento de HPLC com ICP-MS vêm sendo realizada com sucesso no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais na FCFRP-USP para amostras de cabelo, sangue, plasma e diferentes tipos de tecidos (SOUZA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010a; RODRIGUES, et al., 2010b; BATISTA et al., 2011; SOUZA et al., 2013). Entretanto, o preparo de amostra ainda é uma etapa limitante do processo, requerendo inúmeras etapas e elevado consumo de reagentes.

1.6 – Avanços no preparo de amostras para especiação química

Apesar do grande avanço em instrumentação analítica nos últimos anos, metodologias de pré-concentração e/ou separação são ainda frequentemente necessárias, principalmente devido à baixa concentração dos analitos na amostra e à presença de interferentes na matriz (ANDRUCH et al., 2012). Embora uma maior atenção não tenha sido dada a esta etapa crucial no passado, a situação mudou com a introdução de novas técnicas de preparação de amostra, que objetivam a simplificação e miniaturização dos procedimentos, com redução do uso de solventes e de resíduos gerados em laboratórios analíticos (PENA-PEREIRA et al., 2010; ANTHERMIDIS e IOANNOU, 2009). Essa nova tendência, denominada “green chemistry” ou química verde, busca métodos alternativos de conduzir análises química com o intuito de reduzir o impacto ambiental (WARDENCKI et al., 2007).

Dentro deste contexto, técnicas convencionais como extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE) vem sendo modificadas de forma a eliminar as desvantagens a elas associadas. Essas técnicas derivadas de microextração estão disponíveis em diversos formatos, que podem ser agrupados em microextração em fase líquida e microextração em fase sólida (**Figura 3**).

Figura 3: Classificação das técnicas de microextração (SPME: Microextração em fase sólida; SBSE: Extração sortiva em barra de agitação; TFME: Microextração em filme delgado; SPDE: Extração dinâmica em fase sólida; FNME: Microextração em fibra empacotada; MEPS: Microextração em sorvente empacotado) (Adaptado de SILVA et al., 2014).

Dentre estas, a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em sorvente empacotado (MEPS) são os dois formatos miniaturizados mais bem sucedidos e utilizados atualmente, com número crescente de aplicações nas mais diversas áreas (SILVA et al., 2014).

1.6.1. Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

Mohamed Abdel-Rehim e colaboradores (2003) introduziram o conceito de microextração em sorvente empacotado a partir da miniaturização da técnica de extração em fase sólida convencional. Essa técnica permite a eliminação de componentes de matriz, extração e concentração do analito alvo utilizando um menor volume de amostra e de solventes (SAID et al., 2012). Diferentemente da SPE, nesse método de extração o sorvente empacotado é integrado diretamente na seringa e não em uma coluna separada. Além disso, o sorvente pode ser usado mais de 100 vezes, o que pode reduzir significativamente os custos de análise quando comparado com extração em fase sólida tradicional (ABDEL-REHIM, 2010). A **Tabela 1** apresenta a comparação entre alguns parâmetros envolvidos em técnicas de preparação de amostras com procedimentos de extração em fase sólida.

Tabela 1. Comparação entre parâmetros de MEPS, SPE e SPME (Adaptado de SILVA et al., 2014)

Parâmetro	MEPS	SPE	SPME
Quantidade de sorvente	0,5-4 mg	50-2000mg	Espessura: 150 mm
Tempo de preparo de amostra	1-2 min	10-15 min	10-40 min
Reutilização do sorvente	40-100 extrações	Uma vez	50-100 extrações
Recuperação	Boa	Boa	Baixa
Sensibilidade	Boa	Boa	Baixa
<i>Carryover</i>	Baixo	Alto	Alto
Custo	Baixo	Alto	Alto

Em MEPS, uma microcoluna ($\approx 1\text{cm} \times 0,2\text{mm d.i.}$) empacotada com cerca de 4mg de sorvente é integrada à agulha de uma seringa (5-1000 μL) (**Figura 4**). A extração da amostra ocorre nessa microcoluna, que pode ser modificada/revestida para proporcionar condições adequadas e seletivas de amostragem. Os métodos existentes para SPE tradicional podem ser convertidos para MEPS dimensionando-

se os volumes de reagentes e amostras. Assim como SPE, essa técnica de preparo de amostra é adequada para fase reversa (extração de analitos hidrofóbicos ou analitos orgânicos polares de matrizes aquosas), fase normal (extração de analitos polares de solventes orgânicos apolares), além de fase mista e de troca iônica (extração de analitos carregados de amostras aquosas ou orgânicas apolares) (SILVA et al, 2014). De modo geral, MEPS é uma adaptação da SPE que incorpora todas as características desejáveis em um dispositivo miniaturizado com um volume morto inferior a 10µL (MOEIN et al., 2015).

Figura 4: Representação esquemática da seringa utilizada para MEPS.

O procedimento de MEPS apresenta quatro etapas principais: condicionamento, amostragem, limpeza e eluição. Na primeira etapa, o volume de solvente e o número de ciclos aspirar/dispensar devem ser otimizados para evitar *carryover* das extrações prévias. Normalmente, recomenda-se o uso de dois volumes da capacidade total da seringa, começando com um solvente orgânico forte

e seguindo-se a isso um equilíbrio com água que, eventualmente, pode ser acidificada (MOEIN et al., 2015).

Na etapa de amostragem os analitos são adsorvidos na fase sólida após passagem pelo sorvente empacotado, em ciclos de aspirar/dispensar realizados manualmente ou automaticamente. No caso de amostras complexas, como fluidos biológicos (urina, sangue e plasma) deve haver um pré-tratamento para otimizar a interação entre o analito de interesse e o sorvente bem como aumentar a vida útil da microcoluna. Isso pode envolver diluição da amostra (para reduzir viscosidade), ajuste de pH, centrifugação (para remoção de macropartículas), além de outras técnicas adicionais (ABDEL-REHIM, 2011; SILVA et al., 2014).

Em seguida, a fase sólida é lavada com água ou solução água/metanol para remover interferentes fracamente retidos. Nesta etapa de limpeza, a porcentagem de solvente orgânico, bem como o pH da solução, devem ser avaliados para minimizar a perda do analito. Por fim, os analitos são eluídos em solvente adequado e volume compatível com o sistema analítico utilizado.

Apesar da microextração em sorvente empacotado ser uma técnica muito simples e direta, envolve uma ampla gama de variáveis a serem otimizadas para uma extração adequada.

1.6.1.1 – Variáveis da MEPS

Número de ciclos de extração (Aspirar/Dispensar)

A amostra pode ser aspirada através do sorvente uma ou mais vezes, caso a pré-concentração do analito seja necessária. Esse parâmetro deve ser otimizado para cada aplicação, de modo a garantir uma recuperação adequada. Os ciclos de extração múltiplos podem ser da mesma alíquota (aspirar/dispensar no mesmo frasco) ou por aspiração de uma alíquota e descarte em outro frasco (extração/descarte) (ABDEL-REHIM, 2010; SILVA et al, 2014). Idealmente, uma pré-concentração adequada para o analito alvo deveria ser obtida com um menor número possível de ciclos de amostragem. No entanto, não é incomum encontrar protocolos de MEPS utilizando múltiplos ciclos de extração (até 10 ou mais) (MOEIN et al., 2015).

Fluxo de amostragem

A velocidade de amostragem pode influenciar a interação entre o analito e o sorvente. Isso, por sua vez, pode ser uma desvantagem no caso da extração manual, já que essa etapa é dependente do manipulador e, conseqüentemente, susceptível a erro experimental. No entanto, ao longo da última década os dispositivos do MEPS evoluíram de manual, para semi-automático e totalmente automatizado, sendo possível controlar a velocidade de amostragem e diminuir os coeficientes de variação interensaios (precisão analítica) (MOEIN et al., 2015; QUEIROZ, 2011).

Tipo de sorvente

Diferentes fases estacionárias, com diferentes mecanismos de extração, são comercialmente disponíveis, tais como sílica (fase normal), C2, C8, C18 (fase reversa), trocador forte de cátions (SCX), trocador forte de ânions (SAX) e fase mista (C8 + SCX). Além destas, fases poliméricas, materiais de acesso restrito (RAM) ou polímeros molecularmente impressos (MIPs) também podem ser utilizados.

A escolha do sorvente adequado para cada aplicação é determinante para a obtenção de alta recuperação no processo de extração. Os sorventes modificados ou customizados para um analito de interesse estão sendo cada vez mais utilizados como forma de se obter uma melhor performance analítica.

Solução de limpeza

Nessa etapa, interferentes indesejáveis e fracamente retidos no sorvente podem ser descartados. A concentração do solvente e o pH são fatores importantes a serem considerados para reduzir a perda do composto de interesse, já que estudos demonstraram que ocorre perda do analito com o aumento da concentração de solvente orgânico na solução de limpeza (ABDEL-REHIM, 2010). Geralmente, essa etapa é realizada com o mesmo solvente utilizado para equilibrar o sorvente durante o condicionamento devendo-se, por sua vez, determinar o número e o volume dos ciclos de limpeza para cada aplicação específica (MOEIN et al., 2015).

Solução de eluição

A solução de eluição pode ser um solvente orgânico, como metanol, isopropanol ou acetonitrila, puro ou misturado com soluções ácidas e básicas (0,1%-

3%), e deve ser capaz de retirar todos os analitos retidos no sorvente em pequeno volume (20-50 μ L). A escolha do solvente bem como o pH da solução de eluição exercem uma grande influência na recuperação. A eluição do analito aumenta com o aumento da concentração do solvente e do volume de eluição. No entanto, o solvente de eluição ideal deve ser capaz de eluir a maior quantidade de analito usando o menor volume possível, aumentando, portanto, a concentração do analito (SILVA, 2014).

As principais vantagens associadas a essa técnica incluem a simplicidade, rapidez, redução do uso de solventes orgânicos, de volume de amostra e da quantidade de sorvente, baixo custo de análise e possibilidade de automatização. Além disso a microcoluna empacotada pode ser utilizada diversas vezes sem perda significativa da eficiência das extrações. O número de vezes que a microcoluna pode ser reutilizada depende da complexidade da amostra, podendo ser usada mais de 100 vezes para amostras de plasma e urina e mais de 400 vezes para amostras de água (ABDEL-REHIM, 2010).

Assim como todas as técnicas de preparação de amostra, a MEPS também apresenta algumas limitações. Dentre elas inclui-se a facilidade de obstrução do sorvente, quando utilizado para amostras muito viscosas ou concentradas. Para que isso não ocorra, geralmente as amostras são submetidas a tratamentos prévios, como desproteinização ou diluição, que contribuem ainda para o aumento da vida útil da microcoluna. Além disso, MEPS não é muito adequada para grandes volumes de amostras, uma vez que apenas 500 μ L podem ser aspirados por vez, sendo necessário um protocolo com múltiplos ciclos de extração, o que torna o procedimento muito longo e trabalhoso, mesmo para versões semi-automáticas e automatizadas, e também afeta a capacidade de reutilização do sorvente. Outra desvantagem é a limitação de fases estacionárias disponíveis comercialmente para MEPS. Essa limitação, por sua vez, está gradualmente sendo suprimida com a popularização dessa técnica e desenvolvimento de novos sorventes.

A microextração em sorvente empacotado tem sido amplamente empregada para análises por LC-MS e GC-MS de uma variedade de fármacos e metabólitos em amostras biológicas e ambientais. No entanto, estudos envolvendo

determinação de metais por ICP-MS utilizando MEPS como método de preparo de amostra ainda não foram realizados até onde vai nosso conhecimento.

1.7 – Validação analítica

Estudos de validação analíticas são necessários para garantir, através de determinações experimentais, que o método proposto atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, RE nº 899, de 29 de maio de 2003). Para isso, vários parâmetros devem ser avaliados, incluindo o limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação.

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Esse parâmetro por ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (ICH Guideline, 2005). Os mesmos critérios utilizados para a determinação de LOD podem ser adotados para o limite de quantificação (LOQ), que é estabelecido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Estudos de precisão avaliam a dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-dia) é definida como a concordância entre os resultados quando uma mesma amostra é analisada pelo mesmo procedimento analítico, pelo mesmo analista e a mesma instrumentação, dentro de um curto período de tempo e pode ser expressa como o desvio padrão relativo (RSD) de uma série de medidas. A precisão intermediária ou inter-dia, por sua vez, indica o efeito de variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (RIBANI, 2004).

A determinação da recuperação é utilizada como forma de retratar a eficiência da extração e é expressa como porcentagem da quantidade conhecida do analito, sendo calculada pela equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração real}} \times 100$$

2 – Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação analítica de um método de especiação química de mercúrio em água através do acoplamento de HPLC-ICP-MS com preparo de amostra por microextração em sorvente empacotado (MEPS).

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Instrumentação

Para a especiação de mercúrio utilizou-se um equipamento de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) ELAN DRC II PerkinElmer, Norwalk CT (EUA), operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair – White Martins, Brasil) e HPLC PerkinElmer modelo L-200 (EUA), ligado a um computador Dell Pentium 4 com o *Software* ELAN[®] versão 3.4 para ICP-MS e Chromera[®] para HPLC e impressora Hewlett-Packard Laserjet 4250. Para a preparação de amostra utilizando o sistema MEPS, utilizou-se uma seringa automática eVol[®] XR (SGE Analytical Science, Melbourne, Austrália).

3.2 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico e as soluções foram preparadas usando água deionizada de alta pureza com resistividade 18,2 M Ω .cm obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]), previamente purificada em sistema de Osmose Reversa (RiOs-DITM da Millipore[®]). O ácido nítrico (HNO₃) e o ácido clorídrico (HCl) (Synth, Brasil) foram purificados empregando-se um destilador *subboiling* de quartzo (*KürnerAnalysestechnik*) para eliminação de impurezas. Também foram utilizados L-cisteína (Fluka, Japão), 2-mercaptoetanol (Fluka, Alemanha); acetato de amônio (Merck, Alemanha), metanol (J.T.Baker, Mexico), ditizona (Sigma-Aldrich, EUA), pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC) (Sigma-Aldrich, EUA), hidróxido de amônio (Fluka, EUA), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA), solução estoque de mercúrio inorgânico de 10mgL⁻¹ (PerkinElmer, EUA) e soluções padrão estoque de 1000mgL⁻¹ de metilmercúrio e etilmercúrio em meio aquoso (Sigma-Aldrich, EUA).

As soluções e amostras foram preparadas no laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, onde se encontram instalados os equipamentos aqui descritos em um sala limpa classe 1000. Os frascos plásticos e materiais de vidro foram descontaminados com solução de HNO₃ 10%v/v por 48 horas e lavados 5 vezes com água do sistema Milli-Q, sendo posteriormente secos em capela de fluxo laminar (classe 100) antes do uso. Os *vials* de plásticos utilizados no LC foram submetidos a uma limpeza especial sendo, logo após a injeção, escovados e

lavados com Extran®, enxaguados com água de torneira 5 vezes e 3 vezes com água ultra pura e colocados em banho de HNO₃ 30% v/v por 48 horas. Por fim, foram novamente lavados 3 vezes com água ultra pura e secos em câmara de fluxo laminar.

3.3 – Preparo de soluções padrão e fase móvel

As soluções padrão para construção da curva analítica (2 – 20µg/L) foram preparadas diariamente por meio de diluição das soluções estoque das espécies de mercúrio (mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio) na solução extratora, composta por HCl 0,1% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,1% v/v ou na fase móvel utilizada, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹.

3.4 – Preparo de amostras

O desenvolvimento do método de extração por MEPS foi realizado utilizando-se amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio (inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio). O procedimento foi feito em triplicata, utilizando uma microcoluna C18 integrada à seringa MEPS de 100µL (SGE Analytical Science, Melbourne, Austrália). Esta microcoluna apresenta aproximadamente 4mg de sorvente, com tamanho médio de partícula de 45µm e porosidade nominal de 60Å.

Antes de iniciar as análises, o sorvente foi condicionado com 4 x 100µL de metanol, seguido por 4 x 100µL de água deionizada. Em seguida, a microcoluna foi funcionalizada com diferentes agentes complexantes previamente à percolação da amostra para aumentar a adsorção dos analitos na fase sólida. Por fim, procede-se à etapa de eluição dos analitos por diferentes soluções em teste. Os múltiplos ciclos de extrações foram realizados através da aspiração de amostra de uma alíquota e descarte em outro frasco. Após cada ciclo de extração, repete-se o uso de 4 x 100µL de metanol e 4 x 100µL de água deionizada, para limpar e condicionar a microcoluna MEPS para a próxima etapa.

3.5 – Preparo dos agentes complexantes

Foram preparados e testados como agentes complexantes as seguintes soluções:

- Solução aquosa de 2-mercaptoetanol 0,5% v/v;
- Solução aquosa de 2-mercaptoetanol 1% v/v;
- Solução aquosa de APDC 0,1% m/v;
- Solução de ditizona 0,0001%, 0,0005%, 0,001%, 0,005% e 0,01% m/v em metanol;
- Solução de ditizona em meio básico (preparada segundo YIN et al., 2010 através da dissolução de 5mg de ditizona em 500µL de hidróxido de amônio 25% v/v, seguido de ajuste de pH para 9.0 com ácido fórmico e com volume final completado para 100ml com água deionizada).

3.6 – Especificação de Hg por HPLC-ICP-MS

O acoplamento do HPLC com o ICP-MS foi feito por meio de um injetor de seis saídas (Rheodyne 9725). O efluente da coluna do HPLC foi diretamente conectado no nebulizador (Meinhard) do ICP-MS através tubos do tipo *Peek* (1,59 mm de diâmetro externo) e de conectores de baixo volume morto. A coluna de fase reversa utilizada para a especificação de mercúrio foi uma Pecosphere Cartridge C8 (3µm, 33mm x 4,6 mm, PerkinElmer, EUA). As amostras foram colocadas em um amostrador automático com um volume de 50µL. As separações foram feitas à temperatura ambiente no modo isocrático. A quantificação foi feita considerando-se a área do pico.

O sistema de introdução de amostra utilizado no ICP-MS foi composto por uma câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e um nebulizador de Meihard® conectados por tubos Tygon® a bomba peristáltica do ICP-MS (geralmente a 20rpm). O ICP-MS foi equipado com cone de amostragem e *skimmer* de platina (PerkinElmer, Norwalk, EUA).

4 – Resultados e discussão

4.1 - Otimização do sistema cromatográfico e do sistema de detecção

Inicialmente foram otimizadas as condições de separação das espécies de mercúrio (IHg, MeHg e EtHg) pelo sistema HPLC-ICP-MS. Para isso, foram seguidas as condições operacionais do sistema cromatográfico e do sistema de detecção dos estudos realizados para a especiação de mercúrio em trabalhos prévios realizados pelo grupo de pesquisa no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais na FCFRP-USP (SOUZA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010a; RODRIGUES, et al., 2010b; BATISTA et al., 2011; SOUZA et al., 2013). Os resultados estão apresentados na **Tabela 2** e na **Tabela 3**.

A **Figura 5** apresenta os cromatogramas da curva de calibração obtidos na separação das espécies de mercúrio, utilizando as condições experimentais apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Condições operacionais otimizadas do HPLC para especiação química de mercúrio em água.

Parâmetro	Condição / Característica
Coluna (fase reversa)	C8 (Pecosphere Cartridge, 3µm, 33mm x 4,6mm)
Fase móvel	2-mercaptoetanol 0,05% v/v L-cisteína 0,4% m/v Acetato de amônio 0,06 mol.L ⁻¹
Vazão da fase móvel	1 mL.min ⁻¹
Volume da amostra injetada	20µL
Equilíbrio	1 minuto
Tempo de corrida	7 minutos
Lavagem	1 minuto
Modo de transição	Isocrático
Modo de determinação	Área do pico

Tabela 3: Condições experimentais do ICP-MS visando a especiação química de mercúrio em água.

Parâmetro	Condição / Característica
Potência de Radiofrequência	1200W
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Modo de varredura	Peak hopping
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L.min ⁻¹ ; Auxiliar 1,2 L.min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,56-0,98 L.min ⁻¹
Rotação da bomba peristáltica	20 rpm
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1 mm
Skimmer	0,9 mm
Resolução	0,7uma
Replicatas	3
Sweeps	40
Leituras	1
Dwell time	250ms
Isótopo	²⁰² Hg

Figura 5: Cromatograma representativo da curva de calibração das espécies de mercúrio (Coeficientes de correlação linear: IHg = 0,99867; MeHg = 0,99996; EtHg = 0,99995.) Condições experimentais de acordo com as Tabelas 2 e 3.

4.2 - Otimização dos parâmetros de extração

A microextração em sorvente empacotado é uma técnica relativamente simples, porém é dependente de importantes variáveis como a escolha do solvente de eluição, agente complexante e determinação do número de ciclos de extração (aspirar/dispensar) e fluxo de amostragem adequados ao método proposto. Estas variáveis foram otimizadas e são detalhadas separadamente a seguir:

4.2.1 - Eluente

Como mencionado anteriormente, a escolha da solução de eluição é uma etapa crítica na otimização da técnica de MEPS. Idealmente, busca-se um solvente compatível com o método analítico utilizado e que seja capaz de remover a maior quantidade de analito da fase estacionária usando o menor volume possível, de modo a garantir sua pré-concentração. Apesar do uso de solventes orgânicos puros, como o metanol, ser uma boa opção para a dessorção dos complexos hidrofóbicos de mercúrio, eles podem aumentar a instabilidade do plasma e afetar diretamente a sensibilidade do ICP-MS.

Considerando isso, soluções aquosas contendo agentes complexantes de mercúrio foram selecionados como eluentes alternativos e, com o intuito de simplificar a etapa de pré-concentração com o sistema MEPS e facilitar a aplicação direta da solução resultante da eluição no HPLC-ICP-MS foram avaliadas as soluções propostas por Souza et al. (2009) para extração de espécies de Hg em amostras de cabelo, composta por HCl 0,1% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,1% v/v; a fase móvel do sistema de separação de Batista et al. (2011) para determinação de mercúrio em amostras de frutos do mar, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ e uma terceira solução contendo tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0,1 \text{ mol/L}$, proposta por YIN, et al. (2010) para especiação de mercúrio em amostras de água. A **Figura 6** mostra o comportamento destes eluentes em relação às espécies de mercúrio.

Figura 6: Estudo da eficiência de três diferentes soluções para a dessorção de espécies de mercúrio do sistema MEPS (fase móvel, extrator e tiosulfato de sódio 0,1 mol/L) (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em 50µL da solução teste (extrator composto de HCl 0,1% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,1% v/v e fase móvel de 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹).

Para avaliar a eficiência dos três eluentes selecionados, foram realizados experimentos fixando-se as condições das outras etapas do protocolo de MEPS:

- Sistema cromatográfico e sistema de detecção seguiram as condições apresentadas nas Tabelas 2 e 3;
- Condicionamento da microcoluna: 4 x 100µL de metanol + 4 x 100µL de água;
- Amostragem: 5 x 100µL de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio;
- Eluição: 50µL de solução teste.

Através da comparação da contagem normalizada da resposta obtida pelas soluções eluentes avaliadas (Figura 6), selecionou-se a fase móvel, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06

mol.L⁻¹, como eluente da pré-concentração por MEPS para as etapas subsequentes desse estudo, pois essa solução apresentou valores de dessorção superiores para cada uma das espécies de mercúrio avaliadas.

4.2.2 - Agente complexante

A escolha do agente complexante utilizado foi realizada considerando os protocolos existentes para extração das espécies de mercúrio em SPE tradicional, adequando-se os volumes de reagentes e amostras visando a otimização do procedimento da técnica miniaturizada de MEPS. Dessa maneira, foram selecionados três agentes complexantes: 2-mercaptoetanol, utilizado por Aizpún et al. (1994) como modificador de cartuchos C18 Sep-pack para especiação de mercúrio inorgânico e metilmercúrio em amostras de água do mar e urina; ditizona (DTZ), utilizada por Yin et al. (2010) para funcionalizar cartuchos de SPE C18 disponíveis comercialmente para especiação de mercúrio em amostras de água; e pirrolidinaditiocarbamato de amônio (APDC), utilizado por Houserová et al. (2007) como modificador em cartuchos SPE C18 para especiação de mercúrio em amostras de água de rio.

Todos esses compostos apresentam em sua estrutura grupamentos sulfidril, que exibem alta afinidade pelo mercúrio e possibilitam a formação de complexos (**Figura 7**).

Figura 7: Estruturas dos agentes complexantes.

Esses agentes complexantes foram utilizados na etapa de condicionamento da microcoluna C18, de maneira similar à funcionalização do cartucho de SPE. De modo geral, ocorre a formação de complexos e retenção na fase estacionária quando da percolação de amostras contendo espécies de mercúrio. A eficiência da extração, por sua vez, está intimamente ligada ao agente complexante escolhido.

Com o intuito de determinar o agente complexante mais adequado ao protocolo de MEPS, foram realizados experimentos fixando-se outros parâmetros:

- Sistema cromatográfico e sistema de detecção seguiram as condições apresentadas nas Tabelas 2 e 3;
- Condicionamento da coluna: 4 x 100µL de metanol + 4 x 100µL de água;
- Funcionalização da coluna: 2 x 100µL do agente complexante em estudo;
- Amostragem: 5 x 100µL de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio;
- Eluição: 50µL de fase móvel.

O resultado obtido está demonstrado na **Figura 8** abaixo.

Figura 8: Estudo da eficiência da funcionalização da fase estacionária de MEPS por DTZ 0,001% m/v em metanol, 2-mercaptoetanol 0,5% v/v, 2-mercaptoetanol 1% v/v e APDC 0,1% m/v (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em 50µL de fase móvel.

Cabe ressaltar que a solução de ditizona utilizada por Yin et al. (2010) para a funcionalização do cartucho C18 da SPE foi preparada pela dissolução do

agente complexante em meio básico e sua aplicação foi associada à etapas adicionais de percolação de soluções tampão de ácido fórmico $0,5\text{mol.L}^{-1}$ e $0,04\text{mol.L}^{-1}$ com pH 4 antes e depois do seu uso. No entanto, a aplicação desse método validado para SPE em escala miniaturizada para MEPS, adequando-se os volumes, não apresentou o resultado esperado (**Figura 9**). Houve, na verdade, uma diminuição nos valores de contagens quando do uso desse modificador em comparação com procedimento sem uso de nenhum agente complexante.

Figura 9: Gráfico comparativo de experimento realizado sem qualquer funcionalização da coluna MEPS e com a modificação desta com DTZ 0,005% m/v em meio básico, seguindo o protocolo estabelecido por YIN et al. 2010 (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostra de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em $50\mu\text{L}$ de fase móvel.

Como a determinação do mercúrio pela complexação com ditizona, formando o ditizonato correspondente, já é bem estabelecida (**Figura 10**) e, considerando sua solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, foi estudado a eficiência desse modificador em metanol (DTZ-MeOH). As concentrações avaliadas inicialmente se basearam naquelas utilizadas por YIN et al. (2010) considerando,

também, que a saturação da solução ocorre em uma faixa próxima à maior concentração estudada (**Figura 11**).

Forma cetônica e enólica da ditizona e da difeniltiocarboditizona

Ditizonatos de metal (M) monovalente

Ditizonatos de metal (M) divalente

Figura 10: Estruturas químicas da ditizona, seus ditizonatos metálicos e a difeniltiocarbodiazona (Adaptado de AZEVEDO, 2003).

Figura 11: Estudo da influência da concentração da ditizona na funcionalização da fase estacionária de MEPS para especiação de mercúrio (n=3). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado com amostras de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio submetidas a 5 ciclos de extração, em velocidade 2 do dispositivo eVol® e com eluição em 50µL de fase móvel.

A solução de ditizona 0,001% m/v em metanol foi o agente complexante selecionado para a funcionalização da microcoluna MEPS na extração das espécies de mercúrio pois apresenta as melhores contagens relativas em comparação com os outros modificadores avaliados.

4.2.3 - Variáveis dependentes

Experimentos realizados utilizando-se diferentes agentes complexantes e diferentes eluentes forneceram indícios da interdependência dessas variáveis, muito possivelmente relacionada com a força do complexo formado entre as espécies de mercúrio com o agente modificador e a capacidade de deslocamento deste pelo eluente.

Considerando o exposto, foi realizada um estudo envolvendo a combinação entre as variáveis, com a avaliação da eficiência do método de extração proposto utilizando os agentes complexantes 2-mercaptoetanol 0,5% v/v, DTZ 0,001% m/v em metanol e APDC 0,1% m/v na funcionalização da microcoluna

MEPS com posterior eluição com solução extratora (composta por HCl 0,1% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,1% v/v), fase móvel (composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹) e tiosulfato de sódio 0,1 mol/L. Para todos os experimentos foram fixados os seguintes parâmetros:

- Sistema cromatográfico e sistema de detecção seguiram as condições apresentadas nas Tabelas 2 e 3;
- Condicionamento da coluna: 4 x 100µL de metanol + 4 x 100µL de água;
- Funcionalização da coluna: 2 x 100µL do agente complexante;
- Amostragem: 5 x 100µL de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio, utilizando a velocidade 2 do dispositivo semi-automático eVol®;
- Eluição: 50µL da solução de eluição.

Os valores de recuperação foram obtidos pela relação entre a concentração experimental obtida e a concentração teórica, considerando a pré-concentração da quantidade total de analito percolado pela microcoluna MEPS. Os resultados apresentados na **Tabela 4**:

Tabela 4: Recuperação obtida com o estudo das variáveis dependentes.

Agente complexante/Eluente	Recuperação (%)		
	Mercúrio inorgânico	Metilmercúrio	Etilmercúrio
Mercaptoetanol 0,5%/Extrator	85% ± 1,9	50% ± 1,5	39% ± 1,1
Mercaptoetanol 0,5%/Fase móvel	117% ± 4,8	72% ± 0,7	66% ± 0,8
Mercaptoetanol 0,5%/Na ₂ S ₂ O ₃	29% ± 0,4	31% ± 0,7	25% ± 0,1
DTZ-MeOH/Extrator	81% ± 1,1	66% ± 2,3	42% ± 1,8
DTZ-MeOH/Fase móvel	100% ± 3	112% ± 0,9	91% ± 0,9
DTZ-MeOH/Na ₂ S ₂ O ₃	49% ± 2	59% ± 1,7	37% ± 0,9
APDC 0,1%/Extrator	ND	ND	ND
APDC 0,1%/Fase móvel	50,1% ± 0,5	77,9% ± 0,2	40,3% ± 0,2
APDC 0,1%/Na ₂ S ₂ O ₃	ND	ND	ND

ND: Não detectado

n=3

Por meio da análise dos dados obtidos, tem-se que as melhores recuperações foram obtidas quando do uso da ditizona 0,001% m/v em metanol como agente complexante e eluição com fase móvel, corroborando com os experimentos preliminares de determinação das variáveis isoladas.

O cromatograma apresentado na **Figura 12** ilustra o ganho em sensibilidade quando do uso da ditizona 0,001% m/v em metanol, com concentração final de $8,5\mu\text{g.L}^{-1}$ para o mercúrio inorgânico, $10,8\mu\text{g.L}^{-1}$ para o metilmercúrio e $8,4\mu\text{g.L}^{-1}$ para o etilmercúrio, partindo de uma amostra de água fortificada com $2\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada uma das espécies. Pode-se inclusive estabelecer um paralelo com os resultados obtidos com o padrão de $10\mu\text{g.L}^{-1}$ analisado por injeção direta no HPLC-ICP-MS sem uso de pré-concentração por MEPS (**Figura 13**).

Figura 12: Cromatograma obtido para especiação de Hg utilizando o sistema proposto MEPS-HPLC-ICP-MS. Foi utilizada amostra de água fortificada com $2\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio e submetidas a 5 ciclos extração MEPS, após funcionalização da fase estacionária utilizando ditizona $0,001\%$ m/v em metanol. As condições experimentais estão representadas nas Tabelas 2 e 3.

Figura 13: Cromatograma obtido para especiação de Hg por HPLC-ICP-MS sem previa pré-concentração por MEPS, utilizando $10\mu\text{g/L}$ de cada uma das espécies de mercúrio. As condições experimentais estão representadas nas Tabelas 2 e 3.

4.2.4 - Influência do número de ciclos de extração

A influência do número de ciclos de extração foi determinada (**Figura 14**) utilizando-se as condições previamente otimizadas e fixadas durante a execução do experimento:

- Sistema cromatográfico e sistema de detecção seguiram as condições apresentadas nas Tabelas 2 e 3;
- Condicionamento da coluna: 4 x 100µL de metanol + 4 x 100µL de água;
- Funcionalização da coluna: 2 x 100µL de DTZ 0,001% m/v em metanol;
- Amostragem: Número de ciclos variáveis de 100µL de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio, utilizando a velocidade 2 do dispositivo semi-automático eVol®;
- Eluição: 50µL de fase móvel, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹.

Figura 14: Estudo da influência do número de ciclos de extração na determinação das espécies de mercúrio (amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado utilizando ditizona 0,001% m/v em metanol como agente complexante, amostragem sob velocidade 2 do dispositivo eVol® e eluição em 50µL de fase móvel.

De acordo com a Figura 14, observa-se um aumento de sensibilidade com o aumento do número de ciclos de extração de amostra, sem características de saturação. No entanto, essa elevação de sensibilidade se dá de forma não linear para cada uma das espécies de mercúrio a partir de 10 ciclos de amostragem. Desta forma, seleciona-se 5 ciclos de amostragem para esse protocolo de extração das espécies de mercúrio por MEPS, por garantir uma recuperação adequada e proporcional de cada espécie do metal. Esta escolha se deve a um compromisso entre performance analítica adequada ao objetivo do estudo e tempo total de análise, além de prolongar a vida útil da microcoluna MEPS.

4.2.5. Influência da velocidade de amostragem

Para o presente estudo foi utilizado um dispositivo semi-automático eVol®, capaz de selecionar a velocidade de aspiração e descarte das soluções durante as etapas do protocolo de MEPS. A otimização desse parâmetro é de fundamental importância, pois permite uma maior ou menor interação entre o analito e a fase estacionária, influenciando diretamente na eficiência da metodologia de extração. Cabe ressaltar também que o uso do dispositivo semi-automático possibilita uma melhor precisão dos resultados, pois elimina os erros experimentais associados à manipulação do analista, uma vez que é praticamente impossível manter exatamente as mesmas condições de extração com o modo manual, considerando a dificuldade de manter a mesma pressão e velocidade exercida na seringa MEPS.

Dentre as dez velocidades disponíveis no equipamento eVol®, foram avaliadas as quatro inferiores (**Figura 15**), uma vez que as opções que apresentam vazões maiores de aspiração limitam a interação entre o analito e a fase estacionária e levam à ocasional formação de bolhas em virtude da pressão exercida, com consequente diminuição do desempenho da técnica. É importante esclarecer que as vazões de aspiração disponíveis no dispositivo MEPS são dependentes da velocidade de movimentação do êmbolo da seringa e de sua área de secção transversal, sendo que a informação da correlação entre a velocidade de amostragem com o tempo não é disponibilizada no manual. Dessa forma, para estabelecer uma correlação prática cronometrou-se o tempo necessário para a

aspiração de 100µL de amostras de água nas quatro velocidades inferiores disponíveis, observando que nas velocidades 1, 2, 3 e 4 o dispositivo demora aproximadamente 28, 14, 7 e 4 segundos, respectivamente.

Figura 15: Estudo da influência da velocidade de aspiração da amostra na eficiência da extração das espécies de mercúrio (amostras de água fortificadas com 2µg/L de cada uma das espécies). As condições experimentais utilizadas estão representadas nas Tabelas 2 e 3. O procedimento de extração foi realizado utilizando ditizona 0,001% m/v em metanol como agente complexante, 5 ciclos de amostragem e eluição em 50µL de fase móvel.

A avaliação das menores velocidades disponíveis permitiu estabelecer e assegurar o compromisso entre o tempo da preparação da amostra e a sensibilidade do método, optando pela velocidade 2 do dispositivo semi-automático de MEPS. O estudo da influência desse parâmetro na eficiência da extração das espécies de mercúrio apresentou resposta semelhante para a velocidade 1 e 2. No entanto, a velocidade 1 aumenta significativamente o tempo de análise e torna o procedimento de preparação de amostra moroso, enquanto que a velocidade 2 torna a prática mais dinâmica sem que haja perda significativa na sensibilidade do método.

4.3 – Estudos de validação

As características analíticas avaliadas para o método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto estão apresentadas na **Tabela 5**.

O limites de detecção e de quantificação do método proposto foram calculados através dos parâmetros da curva analítica, sendo o limite de detecção calculado como 3,3 vezes o desvio padrão de 10 replicatas do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (slope) e o limite de quantificação calculado como 10 vezes o desvio padrão de 10 replicatas do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração (slope).

A repetibilidade (precisão intra-dia) e a precisão inter-dia são expressas como o desvio padrão relativo (RSD) de uma série de medidas a partir de amostras de água fortificadas com $2\mu\text{gL}^{-1}$ de cada uma das espécies de mercúrio ($n=9$). Para a precisão intra-dia, as medidas foram realizadas sob as mesmas condições (analista e instrumentação) em um único dia de experimento. As medidas para a determinação da precisão inter-dia, por sua vez, foram realizadas em dias diferentes, mantendo-se também o analista e a instrumentação.

Os valores de recuperação, já apresentados na Tabela 4, foram obtidos através da comparação dos resultados analíticos de amostras fortificadas com os padrões e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Tabela 5: Características analíticas do método proposto

Características analíticas	Espécies de mercúrio		
	Mercúrio inorgânico	Metilmercúrio	Etilmercúrio
LOD ($n=10$)	$0,19 \text{ ngL}^{-1}$	$0,13 \text{ ngL}^{-1}$	$0,16 \text{ ngL}^{-1}$
LOQ ($n=10$)	$0,66 \text{ ngL}^{-1}$	$0,44 \text{ ngL}^{-1}$	$0,54 \text{ ngL}^{-1}$
Repetibilidade ($n=9$)	4,6%	5,7%	6,2%
Precisão inter-dia ($n=9$)	7,3%	7,8%	8,3%
Recuperação ($n=3$)	100% (± 3)	112% ($\pm 0,9$)	91% ($\pm 0,9$)

Por fim, foi feita uma comparação dos limites de detecção do método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto com outros métodos existentes na literatura para especiação de mercúrio em amostras de água. Observa-se na **Figura 16** que o

método proposto apresenta valores de LOD significativamente menores que aqueles das metodologias já existentes, sendo o mais adequado para as análises em amostras com baixas concentrações das espécies de mercúrio.

Figura 16: Comparação dos valores de limite de detecção do método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto com outros métodos existentes na literatura para especiação de mercúrio em amostras de água.

5 – Conclusões

É importante destacar que esse é o primeiro trabalho que utiliza a microextração em sorvente empacotado para especiação química de mercúrio, uma vez que a maioria dos trabalhos relacionados a essa técnica envolvem a determinação de compostos orgânicos.

O método MEPS-HPLC-ICP-MS proposto demonstrou ser uma excelente alternativa para a pré-concentração e determinação das espécies de mercúrio em amostras de água comparativamente aos métodos existentes na literatura, apresentando menores limites de detecção. Além disso, o procedimento de preparação de amostra por MEPS proporciona vantagens significativas associadas à simplicidade e facilidade da operação, rapidez e redução de volume de amostra e de solventes utilizados.

O protocolo MEPS estabelecido, envolve a funcionalização da microcoluna C18 com ditizona 0,001% m/v em metanol para aumentar a afinidade com as espécies de mercúrio, extração e pré-concentração com 5 ciclos de amostragem (ou mais, se maior pré-concentração for necessária) sob velocidade determinada do dispositivo semi-automático eVol® e eluição com a fase móvel, composta por 2-mercaptoetanol 0,05% v/v + L-cisteína 0,4% m/v + acetato de amônio 0,06 mol.L⁻¹, com aplicação direta da solução resultante no HPLC-ICP-MS. A recuperação obtida através da análise de amostra de água fortificada com 2µg/L de cada uma das espécies de mercúrio utilizando as condições otimizadas é de 100% (± 3) para o mercúrio inorgânico, 112% (± 0,9) para metilmercúrio e 91% (± 0,9) para o etilmercúrio, evidenciando a eficiência do procedimento proposto.

Além disso, esse método MEPS-HPLC-ICP-MS poderá ser uma boa opção para a pré-concentração de espécies de mercúrio *in loco* em estudos de contaminação ambiental, em locais de difícil acesso e com pouca infraestrutura. Essa estratégia limita os problemas de contaminação e perda do analito durante o transporte e armazenamento e, ao mesmo tempo, fornece menores limites de detecção (LEOPOLD et al., 2009).

Cabe ressaltar que esse método deverá ser aplicado futuramente para determinação das espécies de mercúrio em amostras biológicas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP-USP. A associação entre as baixas concentrações das espécies de mercúrio e do

reduzido volume de amostra disponível torna o plasma sanguíneo um alvo interessante para estudos posteriores.

6 – Referências bibliográficas

ABDEL-REHIM, M., Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis, **Journal of Chromatography A**, 1217, 2569-2580, 2010.

ABDEL-REHIM, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, **Analytica Chimica Acta**, 701, 119-128, 2011.

AIZPÚN, B; FERNÁNDEZ, M.L; BLANCO, E; SANZ-MEDEL, A., Speciation of inorganic mercury(II) and methylmercury by vesicle-mediated high-performance liquid chromatography coupled to cold vapour atomic absorption spectrometry, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 9, 1279-1284, 1994.

AL OTHMAN, Z.A.; DAWOD, M.; KIM, J.; CHUNG, D.S., Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review, **Analytica Chimica Acta**, 738, 14-24, 2012.

ANDRUCH, V.; KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I.S.; SKRLÍKOVÁ, J., Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid-liquid microextraction with UV-vis spectrophotometry and related detection techniques, **Microchemical Journal**, 102, 1-10, 2012.

ANTHEMIDIS, A.N.; IOANNOU, K.G., Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review, **Talanta**, 80, 413-421, 2009.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta, 1999.

AZEVEDO, F.A.; **Toxicologia do mercúrio**, 1ª edição, RiMa, São Carlos, SP, Brasil, 2003.

BATISTA, B.L.; RODRIGUES, J.L.; SOUZA, S.S.; SOUZA, V.C.O.; BARBOSA, F., Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples, **Food Chemistry**, 126, 2000-2004, 2011.

BEAUCHEMIN, D., Inductively coupled plasma mass spectrometry in hyphenation: a multielemental analysis technique with almost unlimited potential, **Trends in Analytical Chemistry**, 10, 71-76, 1991.

BERMAN, R.F.; PESSAH, I.N.; MOUNTON, P.R.; MAV, D.; HARRY, J., Low-level neonatal thimerosal exposure: further evaluation of altered neurotoxic potential in SJL mice, **Toxicological Sciences**, 101, 294-309, 2007.

BERNHOF, R.A., Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature, *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 1-10, 2012.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F., O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente, **Química Nova**, 27, 593-600, 2004.

BLANCO, R.M.; VILLANUEVA, M.T.; URÍA, J.H.; SANZ-MEDEL, A., Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters, **Analytica Chimica Acta**, 419, 137-144, 2000.

BULLOCK, O.R., Modeling assessment of transport and deposition patterns of anthropogenic mercury air emissions in the United States and Canada, **Science of The Total Environment**, 259, 145-157, 2000.

CARNEIRO, M.F.H.; SOUZA, J.M.O.; GROTO, D.; BATISTA, B.L.; SOUZA, V.C.O.; BARBOSA, F., A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury), **Environmental Research**, 134, 218-227, 2015

CASTOLDI, A.F.; JOHANSSON, C.; ONISHCHENKO, N.; COCCINI, T.; RODA, E.; VAHTER, M.; CECCATELLI, S.; MANZO, L., Human developmental neurotoxicity of methylmercury: Impact of variables and risk modifiers, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 51, 201-214, 2008.

CHAMSAZ, M.; ARBAB-ZAVAR, M.H.; NAZARI, S., Determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace liquid phase microextraction after *in situ* hydride generation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 18, 1279-1282, 2003.

CLÉMENS, S.; MONPERRUS, M.; DONARD, O.F.X.; AMOUROUX, D.; GUÉRIN, T., Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review, **Talanta**, 89, 12-20, 2012.

Fourth National Report on Human Exposure to Environmental chemicals, Updated Table, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA, 2012.

GAO, Y.; SHI, Z.; LONG, Z.; WU, P.; ZHENG, C.; HOU, X., Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry, **Microchemical Journal**, 103, 1-14, 2012.

GEIER, D.A.; KING, P.G.; HOOKER, B.S.; DÓREA, J.G.; KERN, J.K, SYKES, L.K.; GEIER, M.R., Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies, **Clinica Chimica Acta**, 444, 212-220, 2015.

GIL, S.; FRAGUEIRO, S.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C., Determination of methylmercury by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace single-drop microextraction with in situ hydride generation, **Spectrochimica Acta Part B**, 60, 145-150, 2005.

GUZMÁN-MAR, J.L.; HINOJOSA-REYES, L.; SERRA, A.M.; HERNÁNDEZ-REMÍREZ, A.; CERDÀ, V., Applicability of multisyringe chromatography coupled to cold-vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation analysis, **Analytica Chimica Acta**, 708, 11-18, 2011.

HARRINGTON, C.F., The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography, **Trends in analytical chemistry**, 19, 167-179, 2000.

HOUSEROVÁ, P.; MATĚJÍČEK, D.; KUBÁŇ, V., High-performance liquid chromatographic/ion-trap mass spectrometric speciation of aquatic mercury as its pyrrolidinedithiocarbamate complexes, **Analytica Chimica Acta**, 596, 242-250, 2007.

HUGGETT, D.B.; STEEVENS, J.A.; ALLGOOD, J.C.; LUTKEN, C.B.; GRACE, C.A.; BENSON, W.H., Mercury in sediment and fish from North Mississippi Lakes, **Chemosphere**, 42, 923-929, 2001.

JAGTAP, R.; MAHER, W., Measurement of mercury species in sediments and soils by HPLC-ICPMS, **Microchemical Journal**, 121, 65-98, 2015.

JEANNOT, M.A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J.M., Single drop microextraction – Development, applications and future trends, **Journal of Chromatography**, 1217, 2326-2336, 2010.

JIA, X.; HAN, Y.; LIU, X.; DUAN, T.; CHEN, H., Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, 66, 88-92, 2011.

JITARU, P.; ADAMS, F., Toxicity, sources and biogeochemical cycle of mercury, **Journal de Physique IV**, 121, 185-193, 2004.

JACOB, D.J, Atmospheric Chemistry lecture slides, 2014. Disponível em: <http://acmg.seas.harvard.edu/people/faculty/dji/book/powerpoints/lecture_eps133_a_cidrain_hg.ppt>. Acesso em: 10 de dezembro de 2015.

KLAASSEN, C.D.; WATKINS, U.B. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7 ed., Editora McGraw-Hill, 2008.

KOKOSA, J.M., Advances in solvent-microextraction techniques, **Trends in Analytical Chemistry**, 2012.

LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; QUEVAUVILLER, P.; HORVAT, M., Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation, **Trends in Analytical Chemistry**, 24, 383-393, 2005.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P., Methods for the determination and speciation of mercury in natural water – A review, **Analytica Chimica Acta**, 663, 127-138, 2010.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P., Preconcentration techniques for the determination of mercury species in natural waters, **Trends in Analytical Chemistry**, 28, 426-435, 2009.

LUBICK, N., Funding struggle for mercury monitoring, **Nature**, 459, 620-621, 2009

MARGETÍNOVÁ, J.; HOUSEROVÁ-PELCOVÁ, P.; KUBÁN, V., Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction, **Analytica Chimica Acta**, 615, 115-123, 2008.

MENG, W.; WEIYUE, F.; JUNWEN, S.; FANG, Z.; BING, W.; MOTAO, Z.; BAI, L.; YULIANG, Z.; ZHIFANG, C., Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS, **Talanta**, 71, 2034-2039, 2007.

MOEIN, M.M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS), **Trends in Analytical Chemistry**, 67, 34-44, 2015.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Control of Pre-Analytical Variation in Trace Element Determinations*; Approved Guideline, Document C38-A, 15, 1997.

NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M., Handbook on the toxicology of metals, 4^a ed., 2015.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H., A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, **Analytica Chimica Acta**, 656, 8-35, 2009.

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

PARSONS, P.J.; BARBOSA, F., Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine, **Spectrochimica Acta Part B**, 62, 992-1003, 2007.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C., Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, **Spectrochimica Acta Part B**, 64, 1-15, 2009a.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C.; VIDAL, L.; CANALS, A., Speciation of mercury by ionic liquid-based single drop microextraction combined with high-performance liquid chromatography-photodiode array detection, **Talanta**, 78, 537-541, 2009b.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C., Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review, **Analytica Chimica Acta**, 669, 1-16, 2010.

POPP, M.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G., Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry – A review, **Analytica Chimica Acta**, 668, 114-129, 2010.

QUEIROZ, M.E.C., Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos, **Scientia Chromatographica**, 3, 223-229, 2011.

RAMALHOSA, E.C.D.; RÍO-SEGADE, S., Analytical methods for mercury speciation in several matrixes: A review, **Trends in Chromatography**, 44-77, 2008.

RAMOS, L., Overview of selected contemporary sample preparation techniques, **Journal of Chromatography A**, 1221, 84-98, 2012.

RASMUSSEN, P.E., Current methods of estimating atmospheric mercury fluxes in remote areas, **Environmental Science & Technology**, 28, 2233-2241, 1994.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.S.F.; MELO, L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, 27, 5, 771-780, 2004.

RODRIGUES, J.L.; SERPELONI, J.M.; BATISTA, B.L.; SOUZA, S.S.; BARBOSA, F., Identification and distribution of mercury species in rat tissues following

administration of thimerosal or methylmercury, **Archives of Toxicology**, 84, 891-896, 2010b.

RODRIGUES, J.L.; SOUZA, S.S.; SOUZA, V.C.O.; BARBOSA, F., Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure, **Talanta**, 80, 1158-1163, 2010a.

ROSEN, A.L.; HIEFTJE, G.M., Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation, **Spectrochimica Acta Part B**, 59, 135-146, 2004.

SAID, R.; POHANKA, A.; ABDEL-REHIM, M.; BECK, O., Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC-MS/MS allowing automated sample work-up and analysis, **Journal of Chromatography B**, 897, 42-49, 2012.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, 6^a ed., Bookman, Brasil, 2009.

SEGADE, S.R.; TYSON, J.F., Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent, **Spectrochimica Acta Part B**, 28, 797-807, 2003.

SILVA, C.; CAVACO, C.; PERESTRELO, R.; PEREIRA, J.; CÂMARA, J.S., Microextraction by packed sorbent (MEPS) and solid-phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine, **Metabolites**, 4, 71-97, 2014.

SOUZA, S.S.; CAMPIGLIA, A.D.; BARBOSA, F., A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography-cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, 761, 11-17, 2013.

SOUZA, S.S.; RODRIGUES, J.L.; SOUZA, V.C.O.; BARBOSA, F., A fast sample preparation procedure for mercury speciation in hair samples by high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 79-83, 2010.

SUTTON, K.L.; CARUSO, J.A., Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, 856, 243-258, 1999.

SYVERSEN, T.; KAUR, P., The toxicology of mercury and its compounds, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 26, 215-226, 2012.

TAO, G.; WILLIE S.N.; STURGEON, R.E., Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion, **Analyst**, 123, 1215-1218, 1998.

TEMPLETON, D.M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L.G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H.P.; LOBINSKI, R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), **Pure and Applied Chemistry**, 72, 1453-1470, 2000.

XIONG, X., QI, X., LIU, J., WANG, J., WU, C.; Comparison of modifiers for mercury speciation in water by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry, **Analytical Letters**, 47, 2417-2430, 2014.

WANG, T., Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS), **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 30, 807-831, 2007.

WARDENCKI, W.; CURYLO, J.; NAMIESNIK, J., Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 70, 275-288, 2007.

YIN, Y.; CHEN, M.; PENG, J.; LIU, J.; JIANG, G., Dithizone-functionalized solid phase extraction-displacement elution-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury speciation in water samples, **Talanta**, 81, 1788-1792, 2010.

ZHANG, S.; LUO, H.; ZHANG, Y.; LI, X; LIU, J.; XU, Q.; WANG, Z., In situ rapid magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-ICP-MS for mercury speciation in environmental water, **Microchemical Journal**, 126, 25-31, 2016.