

Daiane Paula Cunha de Quadros

**EMPREGO DA GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR PARA
ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE
ELEMENTOS-TRAÇO POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA E DE
MASSA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Daniel L.G. Borges

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Quadros, Daiane Paula Cunha de

Emprego da geração fotoquímica de vapor para análise de
especiação e determinação de elementos-traço por
espectrometria atômica e de massa / Daiane Paula Cunha de
Quadros ; orientador, Daniel Lázaro Gallindo Borges -
Florianópolis, SC, 2015.

130 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

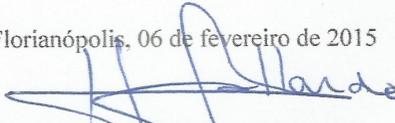
1. Química. 2. Geração fotoquímica de vapor. 3. Reator de
micro-ondas/ultravioleta. 4. Especiação. 5. Elementos-traço.
I. Borges, Daniel Lázaro Gallindo. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Daiane Paula Cunha de Quadros

**EMPREGO DA GERAÇÃO FOTOQUÍMICA DE VAPOR PARA
ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS-
TRAÇO POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA E DE MASSA**

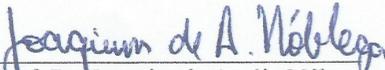
Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do título de Doutor em Química Analítica no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 06 de fevereiro de 2015



Prof. Dr. Hugo Gallardo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

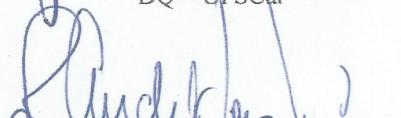
Banca Examinadora



Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega
DQ - UFSCar



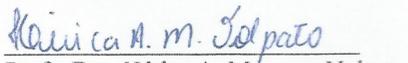
Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Orientador - UFSC



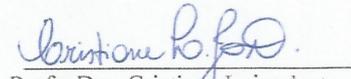
Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto
IQ - UNESP



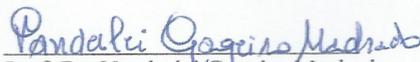
Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves
DQ - UTFPR



Prof. Dra. Hérica A. Magosso Volpato
DQ - UFSC



Prof. Dra. Cristiane Luisa Jost
DQ - UFSC



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
DQ - UFSC

DEDICATÓRIA

*À minha mãe e meu irmão, Cláudia e
Patrick, exemplos de força e superação.
Ao meu amado Geovani, amor
constante em todos os momentos.
A Deus, meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

- Ao meu professor e orientador Dr. Daniel L.G. Borges, pela orientação, pelo belo exemplo de dedicação e honestidade, pelas perguntas instigantes e as várias oportunidades que me proporcionou e, principalmente, pela amizade e confiança em mim depositada;
- Ao professor Dr. Alessandro D'Ulivo pelo gentil convite para desenvolver parte desta Tese sob sua supervisão na Itália e por sua dedicação e contribuição neste trabalho;
- À professora Dra. Vera L.A. Frescura por me oferecer todo apoio, diversos conselhos e pela amizade;
- Ao professor Adilson Curtius (*in memoriam*) pelos valiosíssimos ensinamentos e exemplo de dedicação a pesquisa;
- Aos professores membros da banca, Dr. Joaquim A. Nóbrega, Dr. José Anchieta G. Neto, Dr. Eduardo S. Chaves, Dra. Hérica A.M. Volpato, Dra. Cristiane L. Jost e Dr. Vanderlei G. Machado, pela disponibilidade e por toda a contribuição que foi muito significativa na avaliação e finalização desse trabalho;
- Aos amigos do lab 211, Prof.^a Dra. Tatiane Maranhão, Adriana, Graziela, Jesse, Tarcísio, Patrícia, Jairo, Juliano, Pacheco, Luci, Thebny, Letícia, Victor, Jefferson, pela amizade, carinho e companheirismo;
- A todos os professores do departamento de química por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade no processo de formação profissional;
- Aos meus amigos do Grupo de Oração Universitário, carinhosamente conhecido como GOU, por inúmeras discussões sobre fé e razão, pelo apoio, sustento e muitas alegrias compartilhadas;
- Aos meus amigos de Pisa, Helena, Fernanda B., Ingrid, Ana, Franci, Dayse, Nati, Breno, Lucas, Igo, Vini, especialmente às minhas amadas parceiras de todas as horas, Fernanda A. e Suzane, certamente, vocês tornaram a minha estadia na Itália muito mais agradável.
- A todos os amigos do curso de química e dos laboratórios vizinhos que sempre foram nossos parceiros para a concretização deste e de outros trabalhos;
- A todas as amigas e amigos, aos meus tios e primos, que sempre me apoiaram;
- Ao CNPq por ter concedido a bolsa de doutorado e o suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho;
- À CAPES por ter concedido a bolsa de doutorado sanduíche no exterior e pelo incentivo à pesquisa;

- Ao Consiglio Nazionale delle Ricerche Itália, pela receptividade e disponibilização de todos os recursos necessários ao desenvolvimento de parte desta Tese. A todos os pesquisadores do ICCOM-CNR, em particular, ao Massimo Onor, Emilia Bramanti e à aluna Beatrice Campanella. Agradeço especialmente à pesquisadora e amiga Emanuela Pitzalis, por toda a amizade e ajuda durante este período em Pisa.
- À Universidade Federal de Santa Catarina, seu corpo docente, direção, secretaria e administração que oportunizaram a realização desse trabalho e de toda minha formação acadêmica;
- A todos brasileiros que contribuem para manter as universidades públicas e de qualidade;
- E por fim, mas não com menor importância, quero agradecer especialmente minha mãe linda, Dona Cláudia, meu querido irmão Patrick, meu amado Geovani, por me apoiarem em minhas decisões, mesmo que com aquele “friozinho na barriga”; por sempre acreditarem em mim e em minhas potencialidades, quando nem mesmo eu o fazia. Por me incentivarem e me sustentarem com muito amor durante essa etapa da minha vida... Sem esse amor que recebi de vocês, certamente, eu não chegaria até aqui, muito obrigada!

Deus: Por tudo que vivi, obrigada!
Por tudo que viverei, SIM!

“Nas corridas de um estádio, todos correm, mas bem sabeis que um só recebe o prêmio. Correi, pois, de tal maneira que o consigais. Todos os atletas impõem a si muitas privações e o fazem para alcançar uma coroa corruptível. Nós o fazemos por uma coroa incorruptível. Assim, eu corro, mas não sem rumo certo.”

(I Corintios 9, 24-26)

RESUMO

Este trabalho abrange duas técnicas distintas para a determinação de elementos traço com auxílio da geração fotoquímica de vapor: uma utilizando uma lâmpada de ultravioleta (UV) para a geração da radiação UV com detecção por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e outra utilizando uma interface micro-ondas/ultravioleta (MW/UV) para a geração da radiação UV e acoplamento com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de fluorescência atômica (AFS) para fins de especificação de Hg. Para a análise por ICP-MS, foi desenvolvido um reator fotoquímico aplicável à determinação de Co, Ni e Te em bebidas alcoólicas e determinação de Fe, Sc, Hg e V em amostras de água de mar. Espécies voláteis de Co, Ni, Te, Fe, Sc, Hg e V foram geradas a partir da combinação entre as respectivas soluções padrão e uma mistura dos ácidos fórmico e acético após exposição a uma fonte de UV. Os limites de quantificação de 0,5, 0,1 e 0,4 ng mL⁻¹ para Co, Ni e Te, respectivamente, foram obtidos para a análise de bebidas alcoólicas, os quais correspondem a ganhos de 9, 35 e 3 vezes em relação à análise com nebulização pneumática. Para Hg e V, os limites de quantificação foram de 1,5 e 5,0 ng mL⁻¹, respectivamente, ao passo que Fe e Sc não puderam ser quantificados nas amostras de água do mar, embora a detecção tenha sido realizada com sucesso. Em um segundo projeto, a técnica de geração fotoquímica de vapor por meio de uma interface MW/UV foi acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência e à espectrometria de fluorescência atômica (HPLC-AFS) para a quantificação de mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio. Durante o processo de desenvolvimento da metodologia foram utilizados os ácidos fórmico, acético, malônico e cítrico para estudos, e o emprego de ácido fórmico como fase móvel mostrou-se mais eficiente para a foto-decomposição de compostos organometálicos de mercúrio e para a redução de Hg²⁺ a Hg⁰ sob as condições de MW/UV. Diversos parâmetros operacionais foram avaliados, incluindo o tipo de ácido orgânico e sua concentração, potência de MW, composição da fase móvel de HPLC e ação catalítica de nanopartículas de TiO₂. Sob as condições otimizadas, os limites de detecção foram de 0,15, 0,15 e 0,35 ng mL⁻¹ para o mercúrio inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio,

respectivamente. O método desenvolvido foi aplicado à análise de três materiais de referência certificados, todos de procedência biológica. A interface *online* da cromatografia líquida com a fluorescência atômica e a geração fotoquímica de vapor para a determinação de mercúrio é simples, contribui para redução do impacto ambiental associado à análise e representa uma alternativa atraente para o sistema de geração química de vapor baseada no uso de tetraidroborato.

Palavras-chave: Geração fotoquímica de vapor. Elementos-traço. Mercúrio. Especiação. Análise de bebidas alcoólicas. Análise de água de mar. Reator de micro-ondas/ultravioleta. Cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

This work consists of two distinct approaches for the determination of trace elements by spectrometric techniques, following photochemical vapor generation: in the first approach, an ultraviolet lamp (UV) was used for the generation of volatile species prior to determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); the second approach involved a microwave/ultraviolet (MW/UV) interface for the generation of UV radiation and coupling with high performance liquid chromatography (HPLC) and atomic fluorescence spectrometry (AFS) to carry out speciation analysis. Firstly, a photochemical reactor was built and applied to the development of a new and sensitive method for the determination of Co, Ni and Te in alcoholic beverages and for the identification of Fe, Sc, Hg and V in seawater samples. For these applications, photochemical vapor generation was coupled to an ICP-MS instrument. The volatile species of Co, Ni, Te, Fe, Sc, Hg and V were generated from the combination of a mixture of formic and acetic acid after exposure to a UV source. Limits of quantification of 0.5, 0.1 and 0.4 ng mL⁻¹ for Co, Ni and Te, respectively, were obtained for the analysis of alcoholic beverages, which correspond to 9 (Co), 35 (Ni), and 3 (Te) times improvements over those obtained with conventional pneumatic nebulization. The same setup was adopted for the detection of Hg and V, resulting in quantification limits of 1.5 and 5.0 ng mL⁻¹, respectively. Iron and Sc could not be quantified in seawater samples, although both elements could be effectively detected. On a second project, the hyphenation of photochemical vapor generation with HPLC-AFS was described for the quantification of inorganic mercury, methylmercury and ethylmercury in biological tissues. Formic acid, which was chosen as the mobile phase, was used for the photodecomposition of organomercury compounds and for the reduction of Hg²⁺ to Hg⁰ vapor under MW/UV irradiation. The influence of several operating parameters on the response and chromatographic separation efficiency of the species were evaluated, including the type of organic acid and its concentration, MW power, composition of the HPLC mobile phase and catalytic action of TiO₂ nanoparticles. Under the optimized conditions, the limits of detection were 0.15, 0.15 and 0.35 ng mL⁻¹ for inorganic mercury, methylmercury and ethylmercury, respectively. The main analytical figures of merit were determined and

the method was applied to the analysis of three certified reference materials. The online interfacing of liquid chromatography with photochemical-vapor generation–atomic fluorescence spectrometry for mercury determination was proven relatively simple, environmentally friendly and represents an attractive alternative to the use of chemical vapor generation methods that adopt tetrahydroborate as a reagent.

Keywords: Photochemical vapor generation. Trace elements. Mercury. Speciation. Alcoholic beverage analysis. Seawater analysis. Microwave/ultraviolet photochemical reactor. High performance liquid chromatography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais do ICP-MS para a determinação de elementos-traço usando a PVG.	26
Tabela 2. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Ni, Co e Te em bebidas alcoólicas por PVG-ICP-MS.	42
Tabela 3. Resultados obtidos para a determinação de Ni, Co e Te em amostras de bebidas alcoólicas por PVG-ICP-MS e ICP-MS com nebulização pneumática (digestão de amostra).	44
Tabela 4. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Hg e V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS.	55
Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de Hg e V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS comparado com a determinação por nebulização pneumática em ICP-MS.	57
Tabela 6. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Hg(II), MeHg e EtHg por HPLC-MW/UV-PVG-AFS.	87
Tabela 7. Resultados obtidos para a determinação de Hg(II), MeHg e EtHg em materiais de referência certificados (média \pm intervalo de confiança de 95%; n = 3).	89
Tabela 8. Resultados obtidos a partir dos testes de recuperação para a determinação de Hg(II), MeHg e EtHg em materiais de referência certificados (média \pm intervalo de confiança para 95%; n = 3).	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do reator de PVG acoplado ao ICP-MS. 24
- Figura 2.** Imagem ilustrativa do sistema de PVG e reator UV construído em laboratório. 25
- Figura 3.** Efeito da concentração dos ácidos orgânicos no sinal obtido após PVG para (a) ^{59}Co , (b) ^{60}Ni e (c) ^{130}Te em amostra de vodca diluída. Condições: Potência de RF 1200 W, $0,80 \text{ L min}^{-1}$ para vazão do gás carreador, 105 s de tempo de exposição à radiação UV. 30
- Figura 4.** Efeito do tempo de irradiação UV sobre os sinais analíticos obtidos para os isótopos ^{59}Co , ^{60}Ni e ^{130}Te em amostra de vodca diluída e preparada em 7,5% v/v de ácido acético e 7,5% v/v de ácido fórmico. 32
- Figura 5.** Influência da vazão do gás carreador nos sinais obtidos para os isótopos ^{60}Ni , ^{59}Co e ^{130}Te presentes em (a) padrão aquoso e em (b) amostra de vodca diluída, utilizando RF de 1200 W, tempo de exposição à radiação UV de 105 s e preparo das soluções em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 33
- Figura 6.** Efeito da potência de RF nos sinais obtidos para os isótopos ^{60}Ni , ^{59}Co e ^{130}Te em (a) padrão aquoso e em (b) amostra de vodca diluída, utilizando vazão de gás carreador $0,80 \text{ L min}^{-1}$, tempo de radiação UV de 105 s e preparo das soluções em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 35
- Figura 7.** Sinais analíticos obtidos para Co, Ni e Te por PVG-ICP-MS na presença de diferentes concomitantes simulando as interferências por espécies adicionadas de NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ e K^+ com concentração individual de 10 mg L^{-1} . Sinais obtidos a partir de soluções aquosas contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni e Co (individualmente) e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Te em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 36
- Figura 8.** Curvas de calibração para Co obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermut doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 39

- Figura 9.** Curvas de calibração para Ni obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermute doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 40
- Figura 10.** Curvas de calibração para Te obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermute doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. 42
- Figura 11.** Efeito da vazão de gás carreador no sinal obtido por PVG-ICP-MS para ^{57}Fe , ^{45}Sc e ^{51}V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e ^{202}Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. RF= 1200 W; tempo de exposição à radiação de 105 s. 45
- Figura 12.** Efeito da variação na potência de RF sobre o sinal obtido por PVG-ICP-MS para ^{57}Fe , ^{45}Sc e ^{51}V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e ^{202}Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. Vazão de gás carreador de $0,75 \text{ L min}^{-1}$ e tempo de exposição à radiação de 105 s. 46
- Figura 13.** Influência do tempo de exposição à radiação UV para os isótopos ^{57}Fe , ^{45}Sc e ^{51}V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e ^{202}Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v por PVG-ICP-MS. RF= 1300 W; Vazão de gás carreador= $0,75 \text{ L min}^{-1}$. 48
- Figura 14.** Avaliação da concentração e tipo de ácido orgânico utilizado para a geração fotoquímica de vapor para os elementos Fe, Sc e V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Condições: potência RF= 1300 W; vazão de gás carreador= $0,75 \text{ L min}^{-1}$; tempo de exposição à radiação UV= 145 s. 50
- Figura 15.** Curvas de calibração para os elementos Hg e V. RF= 1300 W; Vazão de gás carreador= $0,75 \text{ L min}^{-1}$; tempo de exposição à radiação UV de 145 s. 53
- Figura 16.** Diagrama esquemático do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com PVG (a) e do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com tetraidroborato de sódio para a CVG (b). 60
- Figura 17.** Imagens ilustrativas do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com PVG-MW/UV-AFS. 62

- Figura 18.** Ilustração do experimento com ponto central, no qual cada ponto representa uma condição experimental aplicada para a otimização, variando a concentração de ácido orgânico e potência de micro-ondas. 66
- Figura 19.** Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido fórmico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido fórmico 5% v/v. Foram plotadas as áreas de picos dos sinais de FI. 68
- Figura 20.** Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido acético ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido acético 5% v/v. Foram plotadas as áreas de picos dos sinais de FI. 69
- Figura 21.** Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido malônico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido malônico 5% m/v. Foram plotadas as áreas de picos dos sinais de FI. 71
- Figura 22.** Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido cítrico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido cítrico 5% m/v. Foram plotadas as áreas de picos dos sinais de FI. 72
- Figura 23.** Sinais para as espécies de mercúrio obtidas por FI nas condições otimizadas para cada ácido LMW (volume de injeção 50 μL): (a) ácido fórmico a 10% v/v e 30 W (b) de ácido acético a 10% v/v e 40 W (c), ácido malônico 5% m/v e 30 W (d), ácido cítrico 5% m/v e 40 W (picos com asteriscos correspondem a sinais obtidos na etapa de limpeza com *L*-cisteína). 74

- Figura 24.** Sinais obtidos por FI-AFS (volume de injeção 50 μL) para Hg(II) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pHMB 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MeHg 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e EtHg 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparados em ácido fórmico 10% v/v (a), ácido malônico 5% m/v (b) e ácido cítrico 5% m/v (c), injetado na fase móvel: metanol 1%, ácido fórmico 1%, 5 mmol L^{-1} de *L*-cisteína, 0,15 mol L^{-1} de NaClO_4 a 2 mL min^{-1} ; adicionado com ácido fórmico 30% v/v (a), ácido malônico 15% m/v (b), ácido cítrico 15% m/v (c) em 1 mL min^{-1} . 76
- Figura 25.** Comparação do sinal em área de pico por FI-AFS (volume de injeção 50 μL) das espécies de mercúrio analisadas utilizando ácido fórmico por PVG (antes das condições otimizadas) e o sinal obtido por CVG com NaBH_4 , para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EtHg preparados em ácido fórmico 15% v/v. Fase eluente: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 0,15 mol L^{-1} . 77
- Figura 26.** Comparação do sinal em área de pico normalizada (volume de injeção 50 μL) para Hg(II) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MeHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e EtHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparados em ácido fórmico 10% v/v, utilizando ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} e fase eluente: metanol (a) e acetonitrila (b) em ácido fórmico 1% v/v e *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} . 78
- Figura 27.** Comparação do sinal de FI com uma microchama Ar/ H_2 (volume de injeção 50 μL) para (1) Hg(II) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (2) MeHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (3) EtHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparados em ácido fórmico 10% v/v, utilizando ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} e fase eluente no HPLC: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} sem adição de sal (a), com 0,15 mol L^{-1} NaCl (b), com 0,15 mol L^{-1} KCl (c) e com 0,15 mol L^{-1} NaClO_4 (d) adicionados na fase eluente e utilizando somente a pré-coluna para a separação. 80
- Figura 28.** Comparação do sinal em área de pico por FI-AFS (volume de injeção 200 μL) para as espécies de mercúrio obtidas utilizando HPLC-MW/UV com e sem a microchama Ar/ H_2 (500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II), 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ EtHg) e com um fluxo de argônio 850 mL min^{-1} no *shielding* (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II), 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ EtHg). Fase eluente: metanol 1%, ácido fórmico 1%, *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 0,15 mol L^{-1} . 82

(utilizando a pré-coluna) a 1 mL min^{-1} e 30% v/v ácido fórmico a 1 mL min^{-1} (utilizando a bomba após a pré-coluna cromatográfica).

Figura 29. Efeito da concentração de TiO_2 no sinal obtido por HPLC-MW/UV-AFS para espécies de Hg usando *shielding* de 850 mL min^{-1} . Condições: $200\text{ }\mu\text{L}$ de Hg(II), MeHg, EtHg e pHMB todas espécies com concentração de $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ injetadas na fase eluente: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, L-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 $0,15\text{ mol L}^{-1}$ a 2 mL min^{-1} (utilizando a pré-coluna) e ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} (adicionado após a pré-coluna cromatográfica). 84

Figura 30. Cromatogramas para $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução contendo (a) Hg(II) $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, MeHg $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e EtHg $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, (b) $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução da amostra DOLT-1 com adição de EtHg $3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, (c) $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução da amostra TORT-1 com adição de EtHg $3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e injetados na fase eluente: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, L-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 $0,15\text{ mol L}^{-1}$ a 2 mL min^{-1} (utilizando a coluna cromatográfica) e ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} (adicionado após a coluna cromatográfica). 86

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIÇÕES

- AAS - Espectrometria de absorção atômica (*atomic absorption spectrometry*)
- AFS - Espectrometria de fluorescência atômica (*atomic fluorescence spectrometry*)
- CVG - Geração química de vapor (*chemical vapor generation*)
- DBD - Descarga de barreira dielétrica (*dielectric barrier discharge*)
- ECVG - Geração de vapor frio eletrolítico (*electrolytic cold vapor generation*)
- EtHg – Etilmercúrio (*ethylmercury*)
- GC- Cromatografia gasosa (*gas chromatography*)
- FI - Injeção em fluxo (*flow injection*)
- HG – Geração de hidretos (*hydride generation*)
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)
- ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma mass spectrometry*)
- ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*)
- LOD - Limite de detecção (*limit of detection*)
- LOQ - Limite de quantificação (*limit of quantification*)
- LMW - Baixa massa molecular (*low molecular weight*)
- MeHg - Metilmercúrio (*methylmercury*)
- MW/UV - Micro-ondas/Ultravioleta (*microwave/ultraviolet*)
- OES- Espectrometria de emissão óptica (*optical emission spectrometry*)
- pHMB - Ácido *p*-hidroximercuriobenzoico (*p-hydroxymercuric benzoic acid*)
- PN-ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e nebulização pneumática (*pneumatic nebulizer-inductively coupled plasma mass spectrometry*)
- PTFE - Politetrafluoretileno (*polytetrafluoroethylene*)
- PVG - Geração fotoquímica de vapor (*photochemical vapor generation*)
- RF - Potência de radiofrequência (*radiofrequency power*)
- RSD - Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
- THB - Tetraidroborato(III) (*tetrahydroborate (III)*)
- TMAH - Hidróxido de tetrametilamônio (*tetramethylammonium hydroxide*)
- US - Ultrassom (*ultrasound*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIACÕES.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Geração Química de Vapor (CVG).....	03
2.2. Geração Fotoquímica de Vapor (PVG).....	04
2.2.1 Aplicações da PVG acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	07
2.2.2 PVG acoplada à Espectrometria de Fluorescência Atômica (AFS).....	10
2.2.3. Outras aplicações da geração fotoquímica de vapor.....	12
2.3. Geração de vapor por irradiação com micro-ondas.....	15
2.4. Sistemas alternativos para geração de vapor.....	18
2.4.1. Geração de Vapor por Ultrassom.....	18
2.4.2. Geração de Vapor por Descarga de Barreira Dielétrica....	19
2.4.3. Geração Eletroquímica de Vapor.....	20
PARTE I – Determinação de elementos-traço por PVG-ICP-MS.....	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivos gerais.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Instrumentação.....	23
4.2. Reagentes e Amostras.....	26
4.3. Procedimento experimental.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Determinação de Ni, Co e Te em amostras de bebidas alcoólicas.....	29
5.1.1. Avaliação da concentração de ácidos orgânicos.....	29
5.1.2. Influência do tempo de exposição à radiação UV.....	31
5.1.3. Avaliação da vazão de gás carreador e da potência de RF.....	32
5.1.4. Avaliação de potenciais espécies interferentes.....	36
5.1.5. Avaliação de estratégias de calibração para a determinação de Co, Ni e Te em bebidas alcoólicas.....	38

5.1.6. Parâmetros de desempenho analítico e aplicação analítica.....	42
5.2. Determinação de Fe, Sc, Hg e V em amostras de água do mar.....	45
5.2.1. Avaliação da vazão de gás carreador e potência de radiofrequência.....	45
5.2.2. Influência do tempo de exposição à radiação UV.....	47
5.2.3. Otimização das concentrações de solvente orgânico para a geração fotoquímica de espécies voláteis de Fe, Sc, Hg e V.....	49
5.2.4. Avaliação de estratégias de calibração para a determinação de Fe, Sc, Hg e V em água do mar.....	52
6. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	58
PARTE 2 – Especificação de Hg por HPLC-AFS usando uma interface MW/UV integrada.....	59
7. OBJETIVOS.....	59
7.1. Objetivos gerais.....	59
7.2. Objetivos específicos.....	59
8. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
8.1. Instrumentação.....	60
8.2. Reagentes e Amostras.....	64
8.3. Procedimento experimental.....	65
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
9.1. Experimentos com FI-PVG-AFS.....	66
9.2. Avaliação da fase móvel em HPLC.....	77
9.3. Identificação das espécies voláteis por GC-MS.....	82
9.4. Ação catalítica de nanopartículas de TiO ₂	83
9.5. Parâmetros de desempenho analítico.....	85
10. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	91
11. CONCLUSÕES GERAIS.....	92
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
13. ANEXOS.....	105

1. INTRODUÇÃO

Muitos compostos metálicos voláteis e não voláteis estão presentes no ambiente como resultado de processos antrópicos e também por processos naturais. Assim, a necessidade de metodologias analíticas sensíveis e eficientes para a determinação de metais e não metais em amostras diversas constitui-se em uma das principais áreas de pesquisa em química analítica [1,2].

Em química analítica, a geração de espécies voláteis através de uma reação química é utilizada para aumentar a eficiência de transporte e/ou facilitar a introdução de amostras para a determinação de elementos traço por espectrometria atômica, tipicamente por meio de derivatização de compostos iônicos ou organometálicos para produzir espécies voláteis, que podem ser facilmente transferidas a partir da fase condensada para a fase gasosa. A geração química de vapor (CVG) tem sido considerada uma importante ferramenta de introdução de amostras para espectrometria atômica. Dentre as técnicas de CVG, geração de hidretos (HG) usando tetraidroborato(III) (THB) é atualmente considerada como sendo a mais difundida e bem sucedida para a determinação de elementos em níveis de concentração traço e ultra-traço, que incluem As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn e Te [3]. Mercúrio também é geralmente incluído nesta lista, embora seja volatilizado diretamente na forma de átomos livres. A abrangência da CVG baseada em THB foi expandida para incluir dois metais de transição - Cd e Zn [2, 4] - mas a aplicação da técnica ainda se restringe tradicionalmente aos elementos listados anteriormente.

Utilizando-se CVG, é possível obter uma melhor eficiência na introdução de amostra, que pode se aproximar de 100%. Em alguns casos, a técnica possibilita a eliminação do nebulizador e da câmara de nebulização, produzindo um vapor homogêneo que é conduzido, por exemplo, a um espectrômetro de massas. Esta abordagem leva a limites de detecção (LOD) ordens de grandeza melhores quando comparados com os obtidos usando preparo de amostras por digestão ou utilizando a introdução de amostra por nebulização pneumática convencional. A separação da matriz também contribui para uma redução das interferências e pode, adicionalmente, melhorar o poder de detecção. Além disso, a possibilidade de especiação e acoplamento da CVG com uma variedade de técnicas também constituem vantagens inerentes ao procedimento [2].

Um problema comum da CVG usando THB consiste nas interferências devido à presença de metais de transição, que normalmente diminuem a sensibilidade e a repetitividade, e podem conduzir a resultados analíticos incorretos. Tais interferências ocorrem tipicamente durante a etapa de geração das espécies voláteis, devido à co-produção de metais ativos que decompõem THB ou adsorvem os hidretos gerados, o que requer um esquema de remoção de interferentes, tais como o uso de reagentes de mascaramento (por exemplo, tiouréia e *L*-cisteína) [5] que nem sempre são efetivos. Além disso, o THB é instável em solução e pode ser uma fonte potencial de contaminação. A grande quantidade de hidrogênio gerado pelo sistema ácido THB pode reduzir a estabilidade de uma fonte de plasma ou mesmo extingui-la. Apesar das investigações para redução das interferências em sistemas baseados em reações com THB, as aplicações ainda permanecem limitadas, porque poucos elementos são suscetíveis às reações de geração de hidretos por CVG [6].

Além da CVG baseada em THB, alguns sistemas alternativos para geração de vapor encontram aplicações em espectrometria atômica, incluindo a geração de haletos, geração eletroquímica de hidretos e geração de óxidos. Recentemente, a geração fotoquímica de vapor (PVG) [7], a geração química de vapor promovida por ultrassom [8,9] e a geração de vapor promovida por radiação de micro-ondas/ultravioleta (MW/UV) [10, 11] foram descritos, nos esforços para reduzir as interferências encontradas com HG convencional ou ampliar a aplicabilidade da CVG a elementos que incluem os metais de transição [2].

Novas técnicas analíticas são desejadas para a determinação de diversos compostos organometálicos que muitas vezes não são passíveis de determinação utilizando apenas as técnicas espectrométricas ou a CVG convencional. A PVG é um campo de pesquisa emergente em química analítica que pode fornecer uma excelente alternativa para a CVG convencional devido à sua simplicidade, versatilidade, baixo custo efetivo e possibilidade de especificação [3,7]. Ressalta-se, entretanto, que apesar do enorme potencial da técnica de PVG, ainda há um número relativamente pequeno de publicações sobre o assunto, particularmente se comparado ao número de publicações com CVG convencional, o que indica que a técnica ainda requer investigações mais incisivas. Os procedimentos envolvendo PVG ainda são pouco explorados na literatura e sua aplicação está restrita a um pequeno grupo de elementos.

Almeja-se, portanto, ampliar as investigações acerca de processos envolvendo PVG, permitindo aliar a técnica a instrumentos que incluem a espectrometria de fluorescência atômica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Geração Química de Vapor (CVG)

A geração química de vapor é uma técnica amplamente utilizada aliada às técnicas de espectrometria atômica e de massa, visando à geração de espécies voláteis para a determinação de metais, metaloides e compostos organometálicos. Tradicionalmente, a técnica restringe-se à determinação dos chamados “elementos formadores de hidretos”, que incluem As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te e Tl, entre outros, além de Hg e Cd, que produzem populações consideráveis de átomos em temperatura ambiente sob condições redutoras. A formação de espécies voláteis desses elementos dá-se por meio de características físicas, químicas ou processos biológicos, resultando na transferência do analito de uma fase condensada para a fase gasosa [3]. Muitos compostos de elementos voláteis e semi-voláteis estão presentes no meio ambiente como consequência de processos antropogênicos e naturais. Alguns exemplos são relatados na literatura, como a formação de hidretos de estanho a partir de sedimentos marinhos [12]. Outras espécies de hidretos metálicos também podem ser formadas em depósitos de resíduos de tratamento de água ou em locais de depósito de resíduos urbanos, como o resultado da atividade bacteriana [13,14].

Em química analítica, a geração de espécies voláteis por CVG propicia diversas vantagens às análises quantitativas conduzidas por técnicas espectrométricas, dentre as quais são notórias a separação eficiente do analito da matriz, que muitas vezes leva a uma redução de interferências e melhores limites de detecção, elevada eficiência de transporte do analito para o espectrômetro, alta seletividade para permitir a diferenciação de espécies químicas de um elemento em particular, instrumentação simples e de baixo custo [3,15].

As técnicas de geração de vapor são amplamente utilizadas para introdução de amostras e posterior detecção de elementos-traço por técnicas espectrométricas. Um dos sistemas mais utilizados para a CVG utiliza agentes redutores para a transformação das espécies iônicas em

hidretos metálicos, através da reação com SnCl_2 ou com NaBH_4 em meio ácido [16]. O mecanismo inicialmente proposto para essas reações sugeria que a formação de hidrogênio atômico na fase condensada era responsável pela formação das espécies voláteis, tornando-se conhecido como mecanismo do “hidrogênio nascente” [17]. Robbins e Caruso [18], os primeiros a postularem a hipótese do mecanismo de geração de hidretos em 1979, argumentaram que a espécie ativa no processo de derivatização/redução era o hidrogênio atômico, ou o “hidrogênio nascente”, o qual se pensava ser formado durante a hidrólise ácida do THB. Entretanto, na última década, D’Ulivo e colaboradores [19, 20] demonstraram diversas evidências experimentais, coletadas a partir de estudos sobre troca de deutério, que sugeriam que a formação de hidrogênio atômico em solução não era favorecida nas condições reacionais tipicamente empregadas em CVG e que intermediários hidroboranos eram responsáveis pela formação das espécies voláteis do analito [21]. Além disso, os autores conduziram experimentos com NaBD_4 e outros reagentes deuterados (D_3O^+ em D_2O , NaOD) que indicaram que a reação de geração de vapor em meio ácido ocorre a partir da transferência direta de hidrogênio ligado ao boro durante a geração de AsH_3 , SbH_3 e CH_3HgH . Essas evidências constituíram-se em argumentos sólidos contra o mecanismo do hidrogênio nascente, comprovando que o mecanismo de hidrólise do THB está estritamente relacionado com o mecanismo da CVG [21].

Diversos avanços no que concerne a compreensão do mecanismo predominante em reações de CVG têm sido relatados na literatura corrente, acompanhados pelo desenvolvimento de novas metodologias e pela concepção de novos sistemas de CVG. Mais recentemente, alguns grupos de pesquisa têm conduzido experimentos utilizando a radiação eletromagnética como coadjuvante nas reações de CVG, o que se tornou conhecido como geração fotoquímica de vapor (PVG). Nesses casos, em geral, a radiação ultravioleta (UV) é utilizada juntamente com compostos orgânicos para converter íons do analito em espécies voláteis, que são posteriormente introduzidas em um instrumento adequado para executar a medida do analito.

2.2. Geração Fotoquímica de Vapor (PVG)

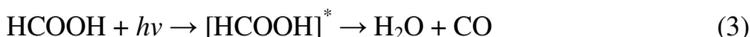
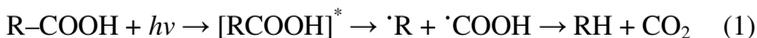
A geração fotoquímica de vapor é um campo de pesquisa emergente em química analítica, que pode proporcionar uma alternativa interessante para a CVG convencional, devido a sua simplicidade,

versatilidade e baixo custo-benefício [22]. Esta metodologia teve suas origens no tratamento de águas residuais, em que o uso de processos fotocatalíticos com base na irradiação UV/Vis promoveu a oxidação da matéria e a esterilização frente a bactérias. Assim, os compostos orgânicos podem ser oxidados, os íons ser convertidos a suas espécies atômicas, como no caso do Hg [23], e os metais podem ser reduzidos na superfície de partículas de semicondutores para as estratégias de recuperação ou convertidos nas suas formas menos tóxicas [24]. Os primeiros trabalhos sobre geração foto-assistida de espécies voláteis foram voltados para a produção de mercúrio no ambiente aquático [25]. Akagi *et al.* [25] observaram a alquilação fotoquímica de mercúrio induzida pela ação da luz solar na presença de vários ácidos orgânicos de baixa massa molar (ácido acético e propiônico). Posteriormente, Canário e Vale [26] realizaram experimentos com sedimento marinho submetendo sedimento contaminado com Hg à exposição à luz solar e parte desse sedimento foi mantida em um ambiente escuro, ambos com as mesmas temperaturas. As concentrações totais de Hg foram relativamente constantes nos sedimentos mantidos no escuro, mas diminuíram de 17,6 para 7,65 e de 3,45 para 1,35 nmol g⁻¹ nas amostras mantidas sob incidência da luz solar [26]. Assim, as descobertas iniciais foram apoiadas por observações adicionais sobre a eliminação de mercúrio a partir de sedimentos entre marés à presença de matéria orgânica dissolvida de massa molar relativamente baixa.

A PVG teve seu desenvolvimento a partir do século XXI e pouco se conhece ainda sobre os aspectos mecanísticos destas reações. A PVG é uma técnica que visa à transformação de espécies químicas em compostos voláteis, a partir da exposição da amostra à radiação UV [16]. A ação da radiação UV sobre compostos orgânicos e inorgânicos resulta na formação de radicais (como $\cdot\text{OH}$, $\text{O}\cdot$, $\text{CO}\cdot$ e pequenos radicais orgânicos, entre outros), que possuem a capacidade de reduzir o analito a seu estado elementar ou propiciar a formação de espécies voláteis do mesmo quando ácidos orgânicos de baixa massa molecular, tais como ácido fórmico, acético ou propiônico, são adicionados ao meio aquoso [27, 28].

Em estudos realizados por Gho *et al.* [29, 30] foi sugerido que a clivagem dos ácidos orgânicos de baixa massa molar utilizados na PVG em meio de hidrogênio, radicais metil, butil e carbonil reduzia os íons dos analitos para a produção de produtos voláteis hidrogenados, alquilados ou carbonilados. No caso específico de redução fotoquímica

de selênio em meio de ácido acético, por exemplo, o produto da reação é o dimetilselênio, segundo a proposta de Gho e colaboradores [30]:



Sabe-se que H_2 , CO , CH_4 , CO_2 , CH_3OH e C_2H_6 , entre outros, podem ser produtos finais estáveis da fotólise dos ácidos acético e fórmico, enquanto espécies intermediárias podem incluir os radicais reativos, tais como $\cdot\text{H}$, $\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{R}$ e $\cdot\text{COOH}$ (e provavelmente ânions radicais $\cdot\text{COO}$). Especula-se que espécies voláteis dos metais sejam geradas a partir de combinações desses metais com os radicais formados pela radiação incidente em ácidos orgânicos de baixa massa molar [31]. Destaca-se que, na literatura, não há relatos de possíveis mecanismos para a geração fotoquímica de vapor que não envolvam radicais. O fenômeno PVG ainda é um tópico pouco explorado e os únicos sistemas que foram tratados em profundidade são os de mercúrio, muito reconhecido na literatura como um elemento que sofre reações fotoquímicas complexas [32], e de iodeto [33], em que sua foto-oxidação na água do mar também pode ser responsável por seu transporte e distribuição.

As taxas de reações fotoquímicas são geralmente caracterizadas por baixas energias de ativação aparentes (alguns kcal/mol, o que muitas vezes reflete a dependência da temperatura das reações térmicas secundárias), mas devem responder diretamente ao fluxo de fóton incidente [31]. Assim, através da volatilização do analito por PVG é possível separá-lo da matriz problemática de uma amostra, aumentando a seletividade da técnica, além de permitir a pré-concentração e melhores limites de detecção. Outra vantagem da PVG está na alta eficiência de introdução da amostra, uso de reagentes de menor toxicidade, reduzindo o custo da técnica e eliminando mais uma fonte de contaminação, com a possibilidade de acoplamento à diversas técnicas de detecção espectrométricas.

Além de permitir a determinação dos elementos para os quais a CVG convencional é tradicionalmente utilizada, a PVG permite também a determinação de alguns metais de transição. A foto-reação induzida

por radiação na região UV foi descrita para analitos que incluem Hg [16, 34], As, Sb [35], Cd [36], Ni, Fe, Se [37], I [38] e Co [39].

A geração fotoquímica de vapor pode auxiliar também em técnicas de especiação. Vieira e colaboradores [16] desenvolveram métodos para a determinação de mercúrio total e metilmercúrio (MeHg) em amostras biológicas utilizando a geração fotoquímica de vapor e detecção por espectrometria de absorção atômica (AAS). Duas abordagens foram investigadas: na primeira as amostras foram solubilizadas em ácido fórmico ou em hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e o mercúrio total foi determinado após a redução de ambas as espécies por exposição da solução à radiação UV; na segunda abordagem as amostras foram solubilizadas em TMAH, diluídas para uma concentração final de 0,125% m/v de TMAH e foi adicionado ácido acético 10% v/v para a determinação de CH_3Hg^+ (MeHg), o qual foi seletivamente quantificado nas amostras biológicas. Para cada caso, foram investigadas as condições ideais para a geração fotoquímica de vapor e a análise de especiação de mercúrio foi conduzida com boa eficiência. O método não requereu um preparo de amostras complexo, eliminou a necessidade de uso de agentes redutores e forneceu limites de detecção que são comparáveis com os métodos convencionais para a determinação de mercúrio por CVG [16].

A flexibilidade da técnica de PVG permite ainda sua utilização junto aos mais diversos sistemas de detecção, como ICP-MS [37, 38], AFS [27, 38], a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [34, 37], AAS [16] e também técnicas cromatográficas acopladas a técnicas espectrométricas [40].

2.2.1 Aplicações da PVG acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado consiste na união de uma fonte de alta energia, o plasma indutivamente acoplado (ICP), com a espectrometria de massa. O ICP tem sido descrito como uma fonte de íons ideal para a espectrometria de massa inorgânica, devido a sua elevada temperatura, o que garante a quase completa decomposição da amostra em seus átomos constituintes e a ionização altamente eficiente da maior parte dos elementos da tabela periódica [41]. Porém, o sistema de introdução de amostra é considerado o “calcanhar de Aquiles” da técnica, pois é a parte mais crítica do instrumento, sendo que apenas 1 a 2% da amostra chega ao plasma

através de sistemas tradicionais de nebulização, o que se deve, majoritariamente, ao processo de seleção de gotículas que ocorre na câmara de nebulização [42].

A introdução da amostra em espectrometria de massa continua sendo um assunto de alta relevância, especialmente para a análise de amostras complexas ou aquelas nas quais se deseja determinar analitos em níveis ultra-traço. Neste sentido, a PVG surge como um método alternativo para a introdução de amostra para a espectrometria de massa. As espécies voláteis produzidas a partir de analitos não-voláteis, como espécies iônicas ou espécies organometálicas, podem ser transferidas a partir da fase líquida para a fase gasosa, obtendo-se as vantagens da separação eficiente da matriz, aumento na eficiência de transporte do analito, elevada seletividade e uso de instrumentação simples [22].

A associação da PVG com a técnica de ICP-MS merece destaque, pois fornece excelente poder de detecção, seletividade, mínimas interferências e detecção isotópica de analitos nas amostras. A técnica de ICP-MS pode ser acoplada a uma variedade de técnicas de introdução de amostras, incluindo a cromatografia gasosa, ablação a laser, vaporização eletrotérmica e geração de vapor frio [38].

Sun e colaboradores [43] desenvolveram um método para a determinação de Se(IV) e Se(VI) por PVG-ICP-MS utilizando nanopartículas de TiO_2 e HPLC para a separação das diferentes espécies. Com esse sistema, não houve a necessidade da utilização de técnicas convencionais de CVG, pois o método proposto permitiu tanto a geração de espécies voláteis de Se (IV) como de Se (VI), que foram convertidas, a partir de sistemas em fluxo, em espécies voláteis de Se e então medidas por ICP-MS. Esse método resultou na redução dos riscos de contaminação decorrentes da utilização de reagentes químicos tipicamente associados à CVG e permitiu obter limites de detecção de $0,06$ e $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ para Se (IV) e Se (VI), respectivamente, devido às elevadas eficiências de conversão de Se (IV) e Se (VI) para os seus respectivos produtos voláteis e ao baixo nível de branco, quando comparado a sistemas que recorrem ao uso da CVG. Os autores reportam uma alta eficiência de conversão das espécies de Se em espécies voláteis, permitindo intensidade máxima de sinal com 36 s de irradiação UV. Neste caso, o tempo total de análise (aproximadamente 12 min) foi limitado principalmente pelo tempo necessário para a separação cromatográfica.

Metodologias voltadas à determinação de um não metal foram desenvolvidas por Grinberg e Sturgeon [38, 44], visando à determinação

de iodo por PVG-ICP-MS. Vários procedimentos de preparo de amostras foram avaliados, incluindo a digestão ácida com HNO_3 , solubilização com TMAH, NH_4OH , ácido fórmico e ácido acético, para a determinação de iodo após PVG. A decomposição térmica das amostras a $1000\text{ }^\circ\text{C}$, seguidos pela captura do iodo volatilizado em ácido acético diluído permitiu a geração fotoquímica de espécies voláteis de iodo com alta eficiência. O método possibilitou o aumento da sensibilidade em até 25 vezes se comparado à análise utilizando nebulização convencional, fornecendo limites de detecção de $8,75\text{ pg g}^{-1}$ para ^{127}I e $0,075\text{ pg g}^{-1}$ para ^{129}I em amostras sólidas (massa de amostra de 400 mg). A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação de iodo total em diversos materiais de referência certificados, incluindo amostras de folhas cítricas, leite em pó desnatado, ostras e solo. A calibração foi possível a partir da utilização de padrões inorgânicos preparados em meio de ácido acético diluído [38, 44].

Zheng e colaboradores [37] realizaram a determinação de Ni, Fe e Se em amostras ambientais utilizando um fotorreator UV para introdução de amostra acoplado à ICP-MS. Em comparação com a introdução da amostra através de nebulização pneumática, houve melhorias significativas na sensibilidade variando entre 27 a 355 vezes e limites de detecção entre 28 a 150 vezes mais baixos para Ni, Se e Fe, em comparação com a análise por nebulização pneumática. Essa foi a primeira aplicação *online* incorporando a geração fotoquímica com radiação UV e com diluição isotópica para a detecção por ICP-MS [37].

Um método foi desenvolvido por Gao e colaboradores [45] para a determinação de mercúrio em amostras de cosméticos também utilizando calibração por diluição isotópica (ID) e geração fotoquímica de vapor acoplada à técnica de ICP-MS para a detecção. As amostras de cosméticos foram diretamente dissolvidas em solução de ácido fórmico e, subsequentemente, submetidas a PVG para a redução de mercúrio para Hg^0 seguida pela detecção por ICP-MS. Portanto, os riscos de contaminação e perda de analito foram evitados. Padrões isotópicos enriquecidos com ^{201}Hg foram adicionados as amostras de cosméticos e a razão isotópica de $^{201}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$ foi utilizada para as medidas e quantificação de mercúrio nas amostras de cosméticos. Os efeitos de vários parâmetros experimentais, tais como a concentração do ácido fórmico e as vazões do gás de arraste foram investigados. O método forneceu boa reprodutibilidade e os limites de detecção encontrados foram de $0,6\text{ ng L}^{-1}$. O método desenvolvido foi utilizado com sucesso

para a determinação de mercúrio em seis amostras de cosméticos e a exatidão foi verificada com testes de adição e recuperação [45].

2.2.2 PVG acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (AFS)

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma técnica de emissão atômica na qual os elétrons são promovidos a um nível energético excitado através da absorção de radiação proveniente de uma fonte de radiação, para logo em seguida retornarem a um estado de menor energia, emitindo uma radiação de comprimento de onda igual ou diferente do comprimento de onda absorvido para o processo de excitação [46, 47].

A exemplo de outras técnicas de análise instrumental, a introdução da amostra representa uma etapa importante na AFS, e a sensibilidade e os limites de detecção (LODs) são dependentes da eficiência do sistema de introdução de amostra. A nebulização pneumática e sistemas de injeção em fluxo, quando utilizados em AFS, podem expandir a gama de elementos detectáveis, mas também apresentam algumas desvantagens intrínsecas, dentre as quais se destacam a baixa eficiência de transporte em sistemas de nebulização (normalmente entre 1-5%) e o alto custo com a instrumentação para a introdução de amostra quando comparado a métodos alternativos, como por exemplo, a técnica de PVG [48, 49].

Considerando esses parâmetros, a CVG e PVG têm sido amplamente adotadas como técnicas de introdução de amostra em AFS, agregando as vantagens inerentes a essas técnicas à análise, e viabilizando, por exemplo, o acoplamento a sistemas de separação com vias à análise de especiação [50, 51].

A PVG acoplada à AFS constitui-se em uma das técnicas mais sensíveis e seletivas para a determinação de metais e metalóides de interesse ambiental e biológico, tais como As, Bi, Hg, Sb, Se e Te. A AFS apresenta sensibilidade comparável ou superior à obtida por análise em ICP-MS, especialmente para a determinação de alguns elementos com potencial de ionização elevados, como Hg, As e Se. A AFS também requer instrumentação de custo relativamente baixo e com baixo custo operacional, sendo ainda caracterizada por propiciar alta frequência analítica, facilidade de operação e a flexibilidade de determinação mono ou multielementar [51, 52].

A maior parte dos trabalhos envolvendo PVG-AFS disponíveis na literatura refere-se à determinação de elementos tradicionalmente

quantificáveis por meio da técnica de CVG convencional [27, 53]. Hou *et al.* [54] determinaram com sucesso Hg(II) e Hg total utilizando a técnica de PVG acoplada à AFS com ácido fórmico. Os autores demonstraram a boa tolerância quanto à presença de metais de transição nas amostras sem apresentar interferências e um bom desempenho do método, como boa reprodutibilidade e baixos limites de detecção. Guo *et al.* [55] apresentou uma abordagem distinta, aliando a PVG à técnica de AFS para a identificação de espécies voláteis a partir de metais de transição.

A PVG, como a técnica de introdução de amostra, foi adaptada pela primeira vez para análise por AFS por Deng *et al.* [39], em um trabalho voltado à determinação de cobalto. Espécies voláteis de cobalto puderam ser geradas quando o sistema tampão ácido fórmico/formiato contendo a espécie Co(II) foi exposto à radiação UV [39]. Os produtos gasosos resultantes foram separados da fase líquida dentro de um separador de gás-líquido e, então, transportados para o espectrômetro de fluorescência atômica para a determinação de cobalto. Fatores que afetam a eficácia da PVG foram investigados em detalhes, incluindo o tipo e concentração dos ácidos orgânicos de LMW, o sistema tampão, o tempo de irradiação UV, a temperatura de reação, vazão do gás de arraste e vazão de hidrogênio. Com 4% (v/v) de HCOOH e 0,4 mol L⁻¹ de HCOONa e 150 s de irradiação com uma lâmpada de mercúrio de 15 W, uma eficiência de geração de 23-25% foi alcançada. Um limite de detecção (LOD) de 0,08 µg L⁻¹, sem adoção de qualquer procedimento de pré-concentração, e uma precisão de 2,2% (RSD, n = 11) foram obtidos nas condições otimizadas. O método foi aplicado com sucesso para a análise de diversas amostras de água potável [39].

Como uma nova aplicação da PVG, um método inovador foi proposto para remover vestígios de impurezas de níquel em materiais de catalisadores de nanotubos de carbono utilizando a geração fotoquímica de carbonil induzida por UV, e o processo em tempo real foi monitorado por AFS. Os nanotubos de carbono foram purificados sob as condições experimentais otimizadas e as propriedades do material purificado foram mantidas. Após purificação, o teor de níquel no material de nanotubos de carbono foi reduzida de 1% a 0,4%, com uma eficiência de remoção de 60% do Ni presente nas amostras. O Ni carbonil volátil produzido foi separado e introduzido em um atomizador com chama Ar/H₂ de um espectrômetro de fluorescência atômica para medir o sinal de fluorescência atômica de Ni e monitorar em tempo real o processo de purificação [56].

A PVG pode auxiliar no desenvolvimento de técnicas de especiação utilizando a AFS. Liang e colaboradores [40] aplicaram pela primeira vez o método de fotólise por UV em fluxo catalisada por TiO_2 como dispositivo de redução em célula eletroquímica para a geração de vapor como uma interface entre HPLC e AFS, visando à análise de especiação de Se – Se(IV), Se(VI), selenocisteína e selenometionina. O objetivo do estudo foi separar espécies de selênio por HPLC acoplada à AFS para a geração de espécies voláteis de Se através de fotólise *online* mediada por radiação UV e através da pré-redução por UV/ TiO_2 . Esse sistema analítico foi aplicado com sucesso na análise de especiação de Se em extratos hidrossolúveis obtidos a partir de brotos de alho cultivados com diferentes espécies de selênio [40].

Diversas características desejáveis podem ser atribuídas à técnica de PVG, que incluem o fato de as reações envolvidas serem relativamente simples, a capacidade de utilizar a técnica em procedimentos de especiação química com ou sem separação cromatográfica, o baixo custo operacional associado à técnica, a expansão no número de elementos detectáveis (especialmente interessante quando a PVG é utilizada junto a técnicas multielementares) e os menores riscos de interferências [57].

2.2.3. Outras aplicações da geração fotoquímica de vapor

A técnica de ICP OES também pode ser utilizada para a quantificação associada a processos de PVG. Santos e colaboradores [34] desenvolveram um método simples e rápido para a determinação de Hg presente como timerosal em vacinas por PVG-ICP OES. A emissão de mercúrio foi detectada em 253,652 nm. Nenhum tratamento da amostra foi necessário além da simples diluição em água deionizada e adição de ácido fórmico 10% v/v. As condições para a geração de vapor foram otimizadas e incluíram a concentração de ácido fórmico, vazão de injeção de amostra, dimensões do tubo que compunha o reator e vazão de gás de arraste (argônio). Com essa metodologia foi possível realizar a calibração externa utilizando soluções com padrões aquosos de Hg^{2+} contendo 10% v/v de ácido fórmico. O limite de detecção foi de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Hg inorgânico e $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para timerosal em solução, equivalente a $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de timerosal na vacina original ou $0,03 \mu\text{g}$ de timerosal por dose de vacina. O procedimento foi aplicado para vacinas de influenza, anti-rábicas, tétano, difteria e hepatite B, as quais

demonstraram valores concordantes com os especificados pelos fabricantes [34].

Metais de transição também foram investigados e/ou identificados por Zheng *et al.* [35, 58] em abordagens utilizando a PVG-ICP OES. Para a determinação de ferro em amostras biológicas e ambientais [58], os autores desenvolveram uma nova abordagem para a produção de compostos voláteis de ferro com alta eficiência, na qual as soluções contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} e ácidos orgânicos de baixa massa molar, tais como fórmico, acético ou propiônico eram expostos a uma fonte de radiação UV. Uma eficiência de geração de 60% foi alcançada em 50 % v/v de ácido fórmico a pH 2,5 com um tempo de irradiação de 250 s com utilização de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão de 17 W. Em comparação com a técnica de nebulização convencional, a sensibilidade e limite de detecção foram de 80 a 100 vezes melhores, respectivamente, utilizando a linha de emissão em 238,204 nm para Fe(II). Desvio padrão relativo de 0,75% foi alcançado numa concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A introdução de amostras por PVG foi utilizada para a determinação de concentrações em níveis traço de ferro em vários materiais de referência certificados ambientais e biológicos, incluindo água de rio, músculo e fígado de peixes, fornecendo resultados analíticos em concordância com os valores certificados com base em uma calibração externa simples [58].

Zheng e colaboradores [35] também desenvolveram um novo reator de película fina e avaliaram seu desempenho analítico com a PVG. O dispositivo, que compreende o gerador de radiação UV e um separador gás-líquido, utiliza uma vareta de quartzo vertical central sobre o qual a amostra é bombeada para produzir um filme líquido fino propício à geração de espécies voláteis. Eles utilizaram um arranjo diferente, onde uma haste é alojada dentro de um tubo de quartzo concêntrico através do qual um fluxo de gás de arraste/separador é passado para remover e transportar as espécies geradas a um detector ICP OES. O tubo de quartzo concêntrico é cercado por uma lâmpada de mercúrio de 0,5 m em forma de uma bobina de quartzo de baixa pressão operando a 20 W. O desempenho do fotorreator de película fina foi avaliado através da comparação de parâmetros analíticos de desempenho para a detecção de diversos elementos submetidos à PVG na presença de ácido fórmico ou acético. O método apresentou aumento de sensibilidade de 1,3 a 250, com limites de detecção significativamente melhores que os obtidos na análise com introdução de amostras por nebulização pneumática. Porém, os autores demonstraram a aplicação

dessa técnica apenas para a determinação de Fe e Ni em amostra biológicas de materiais de referência, com boa concordância com os valores certificados [35].

A técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para a identificação de espécies voláteis de Fe formadas através da técnica de PVG foi utilizada por Grinberg e colaboradores [59], que analisaram o espectro de massa correspondente às espécies formadas para Fe em meio de ácido fórmico. Fragmentos contendo ferro foram identificados nas razões m/z correspondentes ao elemento Fe e de acordo com a abundância isotópica desse elemento (Fe^{54} (5,8%), Fe^{56} (91,72%), Fe^{57} (2,2%), Fe^{58} (0,28%)). Outros fragmentos importantes foram observados nas razões m/z 84, 112, 140, 168 e 196. Esses picos têm fragmento de íons de massa 28 ligados ao Fe^{56} , sugerindo a adição de um ligante CO para cada fragmento, o que implica na presença de pentacarbonil ferro na razão m/z 196. Concluiu-se que a irradiação com UV em soluções contendo Fe na presença de ácido fórmico resulta na formação de $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Os resultados obtidos com a utilização de ácido acético foram semelhantes aos resultados obtidos quando foi utilizado o ácido fórmico para a PVG, o que corrobora com a conclusão de que, na presença de ácido acético, também ocorre a formação de $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Porém, as intensidades relativas para o ácido acético foram cerca de 2,5 vezes menores do que as obtidas em reação com ácido fórmico [59].

A PVG aliada à técnica de AAS oferece vantagens que incluem a possibilidade de eliminação das etapas de secagem e pirólise, aumentando a frequência analítica devido à redução do tempo e das etapas do programa de temperatura. Elementos como o Hg, que pode ser volatilizado ainda nas etapas de secagem e pirólise do programa de aquecimento do forno de grafite, são particularmente beneficiados [60]. Com essa visão, Jesus e colaboradores [61, 62] desenvolveram uma metodologia para viabilizar a determinação de mercúrio em gasolina, nafta e petróleo condensado por PVG-AAS. As amostras de nafta e petróleo condensado foram bombeadas através do reator fotoquímico como microemulsões e os compostos voláteis formados foram conduzidos para uma célula de quartzo para a medida de absorção atômica [62]. Já as amostras de gasolina foram preparadas em meio de propan-2-ol e foram analisadas por AAS com atomização em forno de grafite [61]. Foram investigados todos os parâmetros do sistema, tais como as técnicas de preparação das amostras e os meios orgânicos para a PVG. A adição de ácido orgânico de baixa massa molar foi

investigada pelos autores, que verificaram que não houve a necessidade de utilização de ácidos orgânicos, uma vez que o próprio propanol foi eficiente para promover a geração dos compostos voláteis de mercúrio em ambos os casos. Curvas de calibração foram construídas com padrões orgânicos e inorgânicos, e não foi detectada diferença significativa nas sensibilidades obtidas para padrões de origens distintas. Um limite de detecção de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ foi obtido [61, 62].

Nóbrega e colaboradores [36] demonstraram a produção de uma espécie molecular volátil de Cd em meio de ácido acético por PVG-AAS usando um gerador de película fina e uma fonte de UV de baixa pressão de 20 W, semelhante ao sistema utilizado por Zheng *et al.* [35]. O gás argônio foi utilizado para carrear a espécie até um atomizador constituído por um tubo de quartzo aquecido a $900 \text{ }^\circ\text{C}$. Segundo os autores, foi necessário o aquecimento do tubo de quartzo, pois a espécie gasosa de Cd que estava sendo gerada e transportada para o atomizador frio sofria condensação nas paredes do tubo. Assim, uma temperatura superior a $900 \text{ }^\circ\text{C}$ foi necessária para a eficiente atomização de Cd, pois abaixo de $770 \text{ }^\circ\text{C}$ nenhum sinal de absorvância foi observado. A adição de 10% de H_2 junto ao gás de arraste (Ar) foi necessária para aumentar em três vezes o sinal analítico e obter uma ótima atomização, o que sugere um processo de atomização termoquímica semelhante à sofrida por hidretos metálicos. Efeito de memória foi observado e os autores sugeriram que as espécies voláteis de Cd voláteis seriam adsorvidas em superfícies de vidro de borossilicato e de quartzo. A eficiência de geração de vapor foi superior a 90%, mas a transferência do analito para o detector foi crítica, resultando em precisão próxima a 30% (RSD) [36].

2.3. Geração de vapor por irradiação com micro-ondas

Devido às vantagens do aquecimento rápido e uniforme, a radiação de micro-ondas é frequentemente utilizada em química analítica, incluindo processos de digestão [63], extração [64], produção de plasma [65] e combustão de amostras [66, 67]. Em contraste com as técnicas convencionais de aquecimento, o aquecimento por micro-ondas é mais rápido porque as ondas eletromagnéticas atuam diretamente sobre íons e dipolos, aquecendo rapidamente a solução a partir do interior, em vez de basear-se na transferência de calor por processos convectivos, a partir de uma fonte externa. A energia de micro-ondas tem sido aplicada para acelerar reações que envolvem a cisão de

ligações duplas e a hidrogenólise de vários grupos funcionais, utilizando ácido fórmico ou formiato como doador de hidrogênio [68].

Os aspectos característicos de uma nova técnica utilizando um fotoreator micro-ondas/ultravioleta (MW/UV), úteis para processos fotoquímicos assistido por micro-ondas foram apresentados por Ferrari *et al.* [69] para obter resultados na fotodescoloração de *acid orange 7* em uma solução aquosa contendo H_2O_2 . As vantagens em relação a outros procedimentos experimentais, como a redução do consumo de reagentes, economia de energia e configuração mais simples foram realçadas. O reator fotoquímico construído pelos autores foi constituído inteiramente de quartzo fundido. A lâmpada MW/UV foi construída em um bulbo de quartzo com 15 mm de diâmetro externo e preenchida com cerca de 1 mg Hg e 0,66 kPa de argônio. Um tubo de quartzo fundido com 5 mm x 3 mm, foi colocado de modo coaxial com a lâmpada de mercúrio e foi utilizado para acomodar uma antena de micro-ondas, operando a 2450 MHz e produzindo uma descarga de plasma no interior da lâmpada. A antena de micro-ondas foi feita de um cabo coaxial de 2,5 mm semi-rígido, com uma capacidade máxima de processamento de potência de cerca de 80 W. O método proposto pelos autores permitiu ativar uma reação química com micro-ondas e radiação UV usando uma fonte de micro-ondas imersa no sistema sem a necessidade de um forno de micro-ondas. A degradação do *acid orange 7* foi monitorada por HPLC e por espectrometria de absorção molecular no UV-Vis. Nesta configuração experimental, a energia de MW disponível foi completamente utilizada para produzir radiação UV e aquecimento do sistema, ambos contribuindo para o processo de descoloração, sem perda de energia para o ambiente ou para as paredes de um forno. A possibilidade de gravar os dados espectrométricos durante o processo sem a necessidade de retirada da amostra e usando técnicas auxiliares comuns demonstraram uma grande vantagem. Essa técnica muito eficiente aumentou o controle de rendimento da fotodegradação. O método mostrou-se versátil e a escala para aplicações industriais foi considerada viável pelos autores [69].

Angeli e colaboradores [10] utilizaram o sistema construído por Ferrari *et al.* [69] e desenvolveram um método fotoquímico para a oxidação do *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB), uma espécie de mercúrio orgânico amplamente utilizada para mercaptanas e compostos lábeis contendo o grupamento tiol. O *p*HMB é um composto orgânico de mercúrio que reage através da afinidade mercúrio-enxofre com grupos sulfidril em peptídeos, proteínas e outras moléculas. O método

baseia-se em uma técnica totalmente integrada MW/UV, ou seja, um reator fotoquímico para a digestão de *p*HMB, seguido pela detecção por AFS acoplada à geração de vapor frio (AFS-CVG) [10]. Esse sistema inovador MW/UV possui uma antena de MW que está inserida dentro de uma lâmpada de quartzo contendo vapores de mercúrio. A radiação MW excita o Hg^0 dando origem a uma fonte de radiação UV. Além disso, a radiação MW é capaz de interagir com as moléculas polares em solução e produzir uma espécie de efeito sinérgico MW + UV, potencialidades que ainda não foram completamente exploradas. A vantagem desse sistema MW/UV é que ele está imerso em um banho termostático e pode ser operado a uma temperatura controlada, em particular, em condições de baixas temperaturas (menores que $-10\text{ }^\circ\text{C}$), algo importante nos sistemas de reação onde ambos MW e fontes de UV podem aquecer a solução de um modo descontrolado, produzindo efeitos negativos sobre os resultados analíticos [10]. O processo de MW/UV levou à conversão quantitativa de *p*HMB e tiol-*p*HMB complexos para $\text{Hg}(\text{II})$, com um rendimento entre 91% e 98%, sem o uso de reagentes químicos oxidantes. Nesse caso, os autores não utilizaram a interface MW/UV com o objetivo de gerar as espécies voláteis de Hg^0 diretamente e foi necessária a utilização de NaBH_4 para realizar a CVG. Essa reação foi seguida pela redução do Hg^{2+} a Hg^0 realizada em bobina de reação em espiral com uma solução de NaBH_4 e a detecção foi realizada em um AFS em chama Ar/H_2 miniaturizada [10].

Campanella *et al.* [70] também utilizaram o sistema de Ferrari e colaboradores [69], mas com a proposta de desenvolver uma metodologia para a determinação de timerosal por injeção em fluxo (FI) com base no sistema fotoquímico MW/UV, seguido de geração de vapor frio com detecção em espectrometria de fluorescência atômica (CVG-AFS). O timerosal foi convertido quantitativamente pelo sistema MW/UV para $\text{Hg}(\text{II})$, com um rendimento de $97 \pm 3\%$. Essa reação foi seguida por redução do $\text{Hg}(\text{II})$ para Hg^0 realizada em uma bobina de reação com uma solução de NaBH_4 e detecção por AFS em uma chama miniaturizada de argônio/ H_2 . A faixa linear do método foi de 0,01 a 2 mg L^{-1} , com um LOD de $0,003\text{ mg L}^{-1}$ [70]. Apesar da utilização da técnica MW/UV para fotodegradação e conversão das espécies orgânicas à Hg^{2+} , nenhuma das aplicações desse sistema teve o propósito da geração fotoquímica de vapor para a conversão direta de espécies organometálicas em Hg^0 .

Uma nova e relativamente simples técnica de geração de vapor utilizando irradiação com micro-ondas acoplada à AFS foi desenvolvida por Wu *et al.* [11] para a análise de especiação de Hg em amostras biológicas e geológicas. Na presença de ácido fórmico, o Hg inorgânico (Hg^{2+}) e o Hg total (Hg^{2+} e MeHg) podem ser convertidos em vapor frio de mercúrio (Hg^0) por irradiação de micro-ondas, sem e com a presença de H_2O_2 , respectivamente. O vapor frio foi subsequentemente libertado a partir da fase líquida e rapidamente transportado para um espectrômetro de fluorescência atômica para a detecção de mercúrio. As condições ótimas para a geração de vapor, bem como interferências de íons concomitantes foram cuidadosamente investigados, mostrando que as interferências significativas decorrente da maioria dos elementos alcalinos e alcalinos terrosos típicos da CVG não foi encontrado. No entanto, Sn^{2+} causou uma grave interferência, provavelmente porque Hg^{2+} é reduzido para Hg^0 por SnCl_2 e libertado da fase aquosa antes da PVG. Um limite de detecção de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ para o mercúrio total ou mercúrio inorgânico foi obtido. Uma precisão menor que 3% (RSD) para uma solução de $2 \mu\text{g de L}^{-1}$ de mercúrio foi obtido. A exatidão do método foi validada por determinação de mercúrio em materiais de referência certificados geológicos e biológicos. Essa foi a primeira aplicação da técnica de MW para a geração fotoquímica de vapor [11].

2.4. Sistemas alternativos para geração de vapor

2.4.1. Geração de Vapor por Ultrassom

A geração de vapor com aplicações na química analítica também pode ser conduzida por meio da produção de radicais por ondas de ultrassom (US). Essa técnica enquadra-se no contexto da química verde e tem sido descrita para a determinação de mercúrio em amostras líquidas após contato com ultrassom de alta intensidade. Segundo Gil *et al.* [71], o Hg volátil pôde ser convertido através de um sonorreator sem o uso de um agente redutor químico, sendo transportado para uma célula de quartzo mantido à temperatura ambiente e analisado por AAS. O mecanismo envolve a redução do Hg^{2+} para Hg^0 por redução dos gases formados após irradiação com US e subsequente volatilização do Hg^0 , devido ao efeito de desgaseificação causado pelo fenômeno de cavitação. A adição de um ácido orgânico de baixa massa molar, tal como ácido fórmico, favoreceu o processo, mas também ocorreu a geração de vapor de Hg a partir de soluções em água ultrapura. O limite

de detecção obtido para o método foi de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e a precisão, expressa como o desvio padrão relativo, foi de 4,4%, mostrando que o processo é comparável à CVG convencional [71].

Ribeiro *et al.* [8] desenvolveram uma metodologia para a redução de ambos Hg^{2+} e CH_3Hg^+ através de banhos de US aplicados à amostra de água. Segundo os autores, o US produz áreas de densidade suficiente para alcançar tanto o aquecimento localizado na amostra como gerar radicais a partir das soluções de amostra preparadas com solventes como o ácido fórmico, ácido acético e TMAH. Segundo os autores, esse fato decorre dos efeitos químicos associados com a absorção de US em meio aquoso, atribuído a fenômenos de cavitação, em que o colapso de bolhas microscópicas violentas no líquido irradiado produz temperaturas e pressões locais dentro dessas cavidades de gás da ordem de 4000 K e 200 bar, respectivamente. Sob tais condições, pode ocorrer a dissociação das moléculas de água para se obter radicais H^\cdot e $\cdot\text{OH}$ que, na presença de oxigênio dissolvido, podem se recombinar novamente para formar H_2O e H_2O_2 . No entanto, na presença de outras espécies químicas, como os ácidos orgânicos, esses radicais primários podem ser eliminados para produzir radicais secundários. Assim, essas reações provocadas pelo US podem ser úteis como ferramenta analítica. Os autores otimizaram um reator para análise em batelada utilizando uma sonda de US como fonte de energia e um sistema de fluxo contínuo com base em um banho de US. A redução de CH_3Hg^+ para Hg^0 ocorreu apenas com um banho US de energia relativamente elevada e, portanto, não foi observada quando um banho de US convencional foi usado para a geração de vapor frio [8].

É possível realizar análises de especiação de Hg através da técnica de geração de vapor frio por irradiação de ultrassom variando apenas a intensidade da sonda de US e os ácidos orgânicos utilizados. Porém, o efeito de memória e a presença de concomitantes (NaCl , KCl , MgCl_2 , and Na_2CO_3) podem comprometer a eficiência da técnica [8, 71].

2.4.2. Geração de Vapor por Descarga de Barreira Dielétrica

A descarga de barreira dielétrica (*dielectric barrier discharge* – DBD) é uma técnica antiga para a geração de plasma não térmico [72]. Os elétrons de alta energia gerados pela descarga podem colidir com moléculas gasosas como, por exemplo, o oxigênio, para produzir

diversos íons e radicais. Portanto, o processo pode ser altamente eficaz para as reações de oxidação ou redução, aumentando a dissociação molecular, tanto na produção de radicais livres como para simular as reações químicas [72, 73]. Em contraste com outras técnicas de plasma, o DBD oferece várias vantagens únicas, como excelente capacidade de dissociação de espécies moleculares, a simplicidade da técnica, a baixa temperatura do gás (600 K), baixo custo de instrumentação e operação à pressão atmosférica [74].

O DBD tem sido utilizado há décadas para o tratamento de águas residuais, aplicado com sucesso na produção e comercialização de ozônio e [75] para a limpeza e esterilização do ar [73]. Atualmente, o DBD é também empregado em técnicas relacionadas à química analítica, incluindo aplicações como atomizador para a AAS [73, 76] ou AFS [77], como fonte de excitação para a espectrometria de emissão óptica (OES) [78] e como fonte de ionização para a espectrometria de massa (MS) [79].

Recentemente, Zheng *et al* [74] descreveram uma nova abordagem para a geração de Hg^0 com alto rendimento, utilizando um mini-DBD construído em laboratório. O vapor de Hg foi facilmente gerado em DBD a partir da própria solução de amostra em meio de ácido fórmico, mesmo sem a adição de qualquer agente redutor. O efeito das condições de reação sobre a eficiência da geração de vapor foi investigado em detalhes. O trabalho foi desenvolvido em um ICP OES e o método proposto foi usado com sucesso para a quantificação de mercúrio em nível ultra-traço em uma amostra de referência certificada de água e em amostras de água mineral [74].

2.4.3. Geração Eletroquímica de Vapor

A geração de vapor de metais voláteis e não-voláteis pode ser conduzida a partir de diferentes estratégias analíticas que ofereceram suporte para a introdução de amostras em espectrometria atômica e de massa. Zhang *et al.* [80], por exemplo, desenvolveram um novo sistema de geração de vapor frio eletrolítico (ECVG) para a determinação de Hg em um cátodo de Pt/Ti, na presença de ácido orgânico. Os autores compararam o uso de ácidos inorgânicos (HNO_3 , HCl e H_2SO_4) com ácido fórmico e esse último aumentou significativamente a intensidade do sinal para Hg a partir da geração eletroquímica de vapor no cátodo de Pt. Observou-se, ainda, redução nos efeitos da erosão do cátodo sobre a estabilidade da intensidade do sinal para Hg. Os autores construíram

uma célula eletrolítica de politetrafluoretileno (PTFE), que consistia em compartimentos catódicos e anódicos. O cátodo e o ânodo foram incorporados na mesma célula, porém, separados por duas fendas de PTFE vedadas com uma membrana de permuta iônica entre os dois. Um ânodo de haste de Pt foi fixado no fundo do canal do ânodo da célula. Alguns materiais, tais como Pb, Ti, grafite e Pt foram estudados como cátodo e a área de superfície do cátodo era de cerca de 5 cm². O fornecimento de energia para a célula eletrolítica ocorreu através de uma corrente constante e unidade de tensão constante. Os vapores de Hg e de hidrogênio foram gerados na superfície do cátodo e, em seguida, os produtos da reação foram misturados com Ar e conduzidos por um tubo transversal. O vapor, em seguida, passou por um separador gás-líquido, onde o gás contendo vapor de Hg foi dirigido para o atomizador e determinado por AFS [80].

Outros grupos investigaram a ECVG para a determinação de Hg. Cerveny *et al.* [81] desenvolveram uma técnica para a determinação de Hg inorgânico em amostras de água por geração eletroquímica de vapor de mercúrio a frio com aprisionamento *in situ* em um forno de grafite comercial recoberto com uma folha de ouro. Pt e HCl foram usados como cátodo e solução catódica, respectivamente, e o LOD obtido foi 0,33 ng mL⁻¹ [81].

Arbab-Zavar *et al.* [82] descreveram o uso da técnica de ECVG para a determinação de Hg, baseado na redução eletrolítica de Hg(II) sobre um cátodo de grafite, o aprisionamento *in situ* de vapor de mercúrio e a sua volatilização em um tubo de quartzo alinhado no percurso óptico de um espectrômetro de absorção atômica. O LOD obtido foi de 2 ng mL⁻¹ [82]. A geração eletroquímica de vapor é um dos métodos bem sucedidos para a determinação de mercúrio utilizando elétrons como uma alternativa adequada para substituir os agentes SnCl₂ ou THB na redução de Hg²⁺, mas requer uma seleção cuidadosa do material do cátodo [80] e apresenta efeitos de memória significativos, resultantes da presença de metais reduzidos depositados sobre a superfície do cátodo.

PARTE I – Determinação de elementos traço por PVG-ICP-MS

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Desenvolver uma configuração simples e rápida para a determinação elementar em amostras de bebidas alcoólicas e água de mar por PVG-ICP-MS, utilizando apenas a diluição como preparo de amostra e determinação dos analitos.

3.2. *Objetivos específicos*

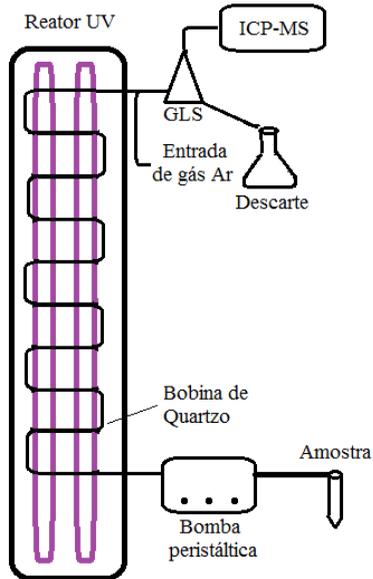
- Construir um reator para a técnica de geração fotoquímica de vapor acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, utilizando uma lâmpada UV e bobinas de reação em quartzo;
- Otimizar a natureza e a concentração de ácidos orgânicos de baixa massa molar na geração fotoquímica de vapor;
- Avaliar o tempo de irradiação UV necessário para a geração fotoquímica de vapor de Ni, Co e Te em bebidas alcoólicas e Fe, Sc, Hg e V em amostras de água do mar;
- Otimizar os parâmetros instrumentais ICP-MS para maximizar o sinal obtido para Ni, Co, Te, Fe, Sc, Hg e V por PVG-ICP-MS;
- Investigar potenciais espécies interferentes inerentes ao procedimento analítico e na geração fotoquímica de vapor;
- Avaliar diferentes estratégias de calibração e definir a mais adequada às determinações;
- Verificar a exatidão do método proposto através de comparação de resultados com metodologias distintas;
- Determinar Ni, Co e Te em amostras de bebidas alcoólicas proveniente de diferentes matérias primas;
- Determinar Fe, Sc, Hg e V em amostras de água do mar da região de Florianópolis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

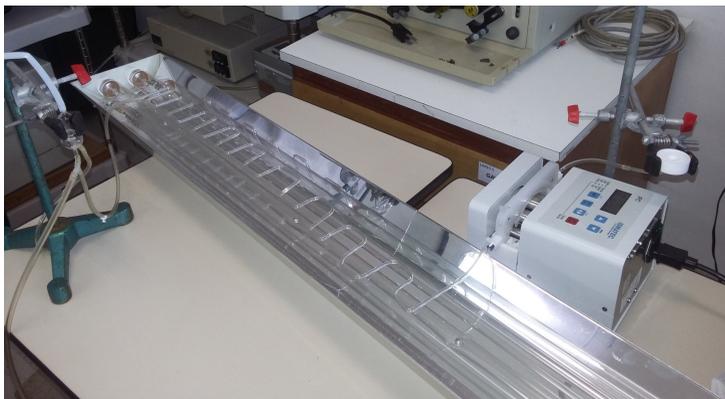
O reator para a PVG foi construído utilizando duas lâmpadas UV de 40 W, 220 V, 1 m de comprimento e operando num comprimento de onda de 254 nm (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). As amostras foram introduzidas com o auxílio de uma bomba peristáltica e conduzidas para um capilar de quartzo que foi disposto sobre as lâmpadas UV. O volume interno total do reator no qual a amostra é exposta à radiação UV é de 6,5 mL, 0,4 cm de diâmetro interno e 1 m de comprimento. As amostras irradiadas foram conduzidas a um separador gás-líquido de três cavidades e os analitos foram introduzidos no ICP-MS por uma vazão constante de argônio com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil). As vazões de introdução de amostras para bebidas alcoólicas no reator foi de 3,8 mL min⁻¹ e para as amostras de água do mar foi de 2,7 mL min⁻¹, ambas foram introduzidas com o auxílio de um funil constituído de teflon. A matriz da amostra separada pelo separador gás-líquido foi conduzida para o descarte com o auxílio de uma bomba peristáltica. A Figura 1 mostra um esquema do sistema de reator utilizado neste trabalho e a Figura 2 mostra uma foto ilustrativa do sistema de PVG construído no laboratório.

Figura 1. Representação esquemática do reator de PVG acoplado ao ICP-MS. GLS representa o separador de gás-líquido.



Fonte: Acervo pessoal, 2014.

Figura 2. Imagem ilustrativa do sistema de PVG e reator UV construído em laboratório.



Fonte: Acervo pessoal, 2014.

Para o desenvolvimento do trabalho foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado Perkin Elmer-SCIEX ELAN 6000 (Thornhill, ON, Canadá). As medidas foram realizadas através do monitoramento dos isótopos ^{60}Ni , ^{59}Co , ^{130}Te , ^{57}Fe , ^{45}Sc , ^{202}Hg e ^{51}V , e os sinais obtidos representam as intensidades integradas dos analitos (área de pico). O gás argônio com uma pureza de 99,996% foi utilizado como o gás principal, auxiliar e gás de transporte

(White Martins) no ICP-MS. As condições de operação do ICP-MS estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros operacionais do ICP-MS para a determinação de elementos-traço usando a PVG.

Potência RF (W)		1200 ^a /1300 ^b
Vazão de gás (L min ⁻¹):	Principal	15,0
	Secundário	1,0
	Carreador	0,75
Cones	Amostrador/ <i>skimmer</i>	Pt
Medida do sinal		Área de pico
Replicatas/leituras		300
Replicatas		3
<i>Dwell Time</i>		50 ms
Modo <i>Auto lens</i>		On
	Pulso	1250 V
Voltagem do detector:	Analógico	-2287 V
	Modo de operação do detector	Dual

^a Para determinação de Co, Ni e Te em bebidas alcoólicas por PVG-ICP-MS;

^b Para determinação de Fe, Sc, Hg e V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS;

4.2. Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau analítico. Água com uma resistividade de 18,2 M Ω cm foi deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (Merck) foram purificados pela destilação dupla em destilador de quartzo (Küner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha), com aquecimento abaixo do ponto de ebulição. As soluções de calibração de Co, Ni, Te, Fe, Sc, Hg e V foram preparadas a partir de soluções estoque individuais de 1000 mg L⁻¹ (Specsol, São Paulo, Brasil). Ácidos acético e fórmico foram usados como diluentes para as amostras. Frascos de polipropileno (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram utilizados para preparar todas as soluções.

Ácido nítrico (Merck) purificado pela destilação dupla em destilador de quartzo (Küner Analysetechnik) foi utilizado para a digestão das amostras de bebidas alcoólicas e água do mar e na preparação de padrões para as curvas de calibração para a análise utilizando a técnica de introdução de amostra por nebulização pneumática em ICP-MS (PN-ICP-MS) e posterior comparação com a técnica de PVG.

Para a análise de bebidas alcoólicas, um total de cinco bebidas alcoólicas adquiridas no mercado local do município de Florianópolis foi analisado, sendo três amostras de cachaça, uma amostra de vodka e uma amostra de vermute doce.

Para a análise de água do mar foram coletadas quatro amostras na cidade de Florianópolis, das praias de Jurerê, Santo Antônio de Lisboa, Beira-Mar e Armação, foram armazenadas em frascos de polipropileno e conservadas sob refrigeração à temperatura inferior a 7 °C.

4.3. Procedimento experimental

As amostras e padrões de calibração foram inseridos em fluxo com o auxílio de uma bomba peristáltica eletrônica e foram conduzidos para um reator fotoquímico composto por uma lâmpada de emissão UV 254 nm sobre a qual foi disposto um capilar de quartzo (diâmetro interno de 0,4 cm) de modo a formar sobre a superfície da lâmpada uma “bobina” de reação. O líquido resultante da passagem da solução na câmara de reação fotoquímica foi, então, conduzido a um separador gás-líquido e o gás formado no espaço livre entre o líquido e as paredes do separador foi arrastado por um fluxo de argônio até o instrumento onde foi realizada a detecção por ICP-MS. Para a otimização da PVG, foram investigados parâmetros como tipo e concentração de ácido orgânico de baixa massa molar, tempo de irradiação UV e vazões de amostra e de gás de arraste.

Para a análise de bebidas alcoólicas por PGV-ICP-MS alíquotas contendo até 7,0 mL da amostra foram utilizadas. A estas alíquotas foram adicionados 1,05 mL de ácido acético concentrado e 1,05 mL de ácido fórmico concentrado (que corresponde a 7,5% v/v de cada solvente) e o volume final foi completado para 14,0 mL com água deionizada.

Para a análise de água do mar por PGV-ICP-MS, alíquotas contendo até 9,0 mL de cada amostra foram utilizadas. A estas alíquotas

foram adicionados 0,5 mL de ácido acético concentrado e 0,5 mL de ácido fórmico concentrado (que corresponde a 5% v/v de cada reagente), completando um volume final de 10,0 mL.

Todos os procedimentos de preparo de amostra e os testes de recuperação foram realizados, no mínimo, em triplicata e as determinações foram conduzidas com calibração por adição do analito para a quantificação. Soluções de “branco” foram analisadas em paralelo a cada amostra e condição avaliadas neste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de Ni, Co e Te em amostras de bebidas alcoólicas

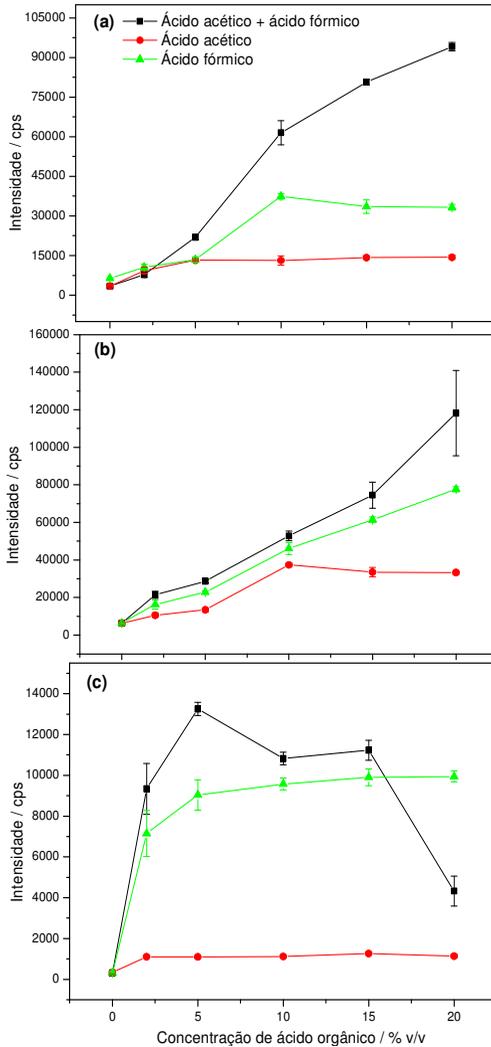
5.1.1. Avaliação da concentração de ácidos orgânicos

O desenvolvimento do método teve início com as otimizações e testes para o preparo de amostra de bebidas alcoólicas, de modo a selecionar o ácido orgânico de baixa massa molar mais adequado para o processo de PVG. Testes iniciais foram realizados usando ácido acético, ácido fórmico e a mistura de quantidades iguais destas substâncias.

Os resultados mostrados na Figura 3 demonstram que a utilização exclusiva de ácido acético resultou na menor sensibilidade para todos os elementos. Considerando-se que a eficiência da PVG deriva da produção de radicais reativos que se combinam com o analito para formar espécies voláteis [83], pode-se supor que o ácido acético sozinho não produza uma concentração suficiente de radicais para promover uma reação fotoquímica eficiente. No entanto, quando o ácido acético e ácido fórmico foram combinados foi possível observar uma melhoria significativa da intensidade do sinal para todos os elementos. Essa observação pode ser devida ao fato de que as ligações de hidrogênio entre as moléculas de ácido acético levam à formação de dímeros [84], que neste caso podem ser formados mesmo no estado de vapor. Essa reação paralela reduziria a população de radicais reativos, algo que, em última análise, resultaria em baixa eficiência no processo de PVG.

Outra possibilidade para explicar a maior sensibilidade para os sinais obtidos com a mistura dos ácidos fórmico ($pK_a = 3,77$) e acético ($pK_a = 4,76$) pode ser compreendida com base na protonação do ácido fórmico, já que este possui características mais ácidas que o ácido acético. Quando os dois ácidos orgânicos estão misturados pode ocorrer o deslocamento do equilíbrio para a protonação do ácido fórmico e a formação de um grupo de saída H_2O estável pode ser favorecida a partir da molécula de ácido fórmico, facilitando, assim, a clivagem da ligação e a formação de radicais livres também em solução.

Figura 3. Efeito da concentração dos ácidos orgânicos no sinal obtido após PVG para (a) ^{59}Co , (b) ^{60}Ni e (c) ^{130}Te em amostra de vodca diluída. Condições: Potência de RF 1200 W, $0,80\text{ L min}^{-1}$ para vazão do gás carreador, 105 s de tempo de exposição à radiação UV. As concentrações nominais para a mistura entre o ácido acético e ácido fórmico são expressas como a soma das concentrações individuais; n=3.

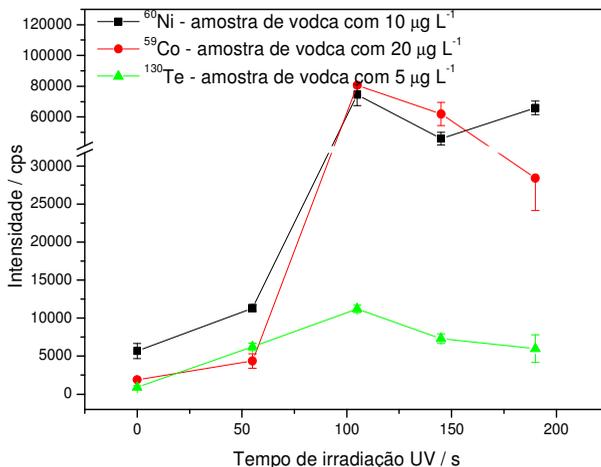


O ácido fórmico também pode formar dímeros através de ligações de hidrogênio [84]. No entanto, quando os ácidos acético e fórmico são misturados, assume-se que possa ocorrer uma perturbação no sistema e o aumento da sensibilidade pode ser atribuído à interação entre as moléculas de ácido acético e de ácido fórmico, levando a uma redução na formação de dímeros e a um aumento na produção de espécies reativas radicalares. Como esperado, o resultado obtido corrobora com o fato de que a eficiência do processo é também mais elevada com o aumento da concentração de ácidos orgânicos, já que este parâmetro deve estar associado ao aumento da concentração de radicais após exposição à fonte de radiação UV. Para Te, no entanto, uma redução no sinal analítico foi observada para concentrações superiores a 15% v/v de LMWA (para a mistura de ácidos acético e fórmico). Embora não existam estudos sobre o mecanismo de formação fotoquímica de espécies voláteis de Te, pode-se inferir que o comportamento peculiar observado para este elemento resulta de reações paralelas quando da produção de quantidades elevadas de radicais livres em solução, o que desestabilizaria as espécies voláteis já instáveis de Te. Assim, como uma condição de compromisso foi selecionada a mistura dos ácidos acético e fórmico 15% v/v para os experimentos subsequentes.

5.1.2. Influência do tempo de exposição à radiação UV

O efeito do tempo de irradiação foi avaliado por exposição de soluções de amostra à lâmpada de UV, no intervalo de zero a 190 s. As amostras foram adicionadas de uma solução contendo ácido acético e ácido fórmico em concentrações de 7,5% v/v (cada). Um mesmo volume, de 2,00 mL, foi utilizado para realizar todos os testes do tempo de irradiação UV. A Figura 4 mostra os resultados obtidos a partir de uma amostra de vodca enriquecida com Ni, Co e Te.

Figura 4. Efeito do tempo de irradiação UV sobre os sinais analíticos obtidos para os isótopos ^{59}Co , ^{60}Ni e ^{130}Te em amostra de vodca diluída e preparada em 7,5% v/v de ácido acético e 7,5% v/v de ácido fórmico; n=3.



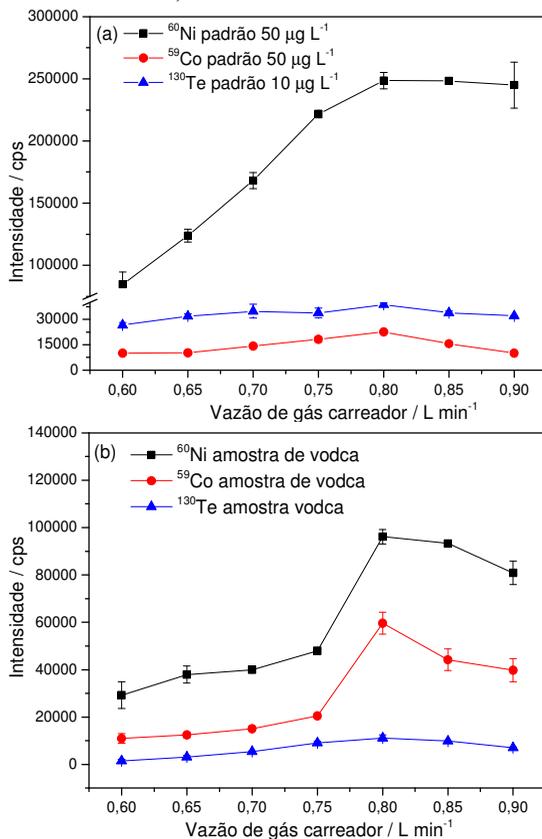
Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram que a formação de espécies voláteis por PVG aumenta significativamente para períodos superiores a 55 s de exposição da amostra à radiação UV e diminui com o tempo de irradiação superior a 105 s. Esse fato sugere que as espécies voláteis formadas por PVG são degradadas quando expostas à radiação UV durante períodos mais longos, o que pode ser um efeito do aumento da temperatura do sistema, ou ainda pode ser provocado pela instabilidade das espécies formadas. Como uma condição de compromisso, um tempo de irradiação de 105 s foi adotado para os experimentos subsequentes.

5.1.3. Avaliação da vazão de gás carreador e da potência de radiofrequência

A otimização dos parâmetros operacionais do ICP-MS, incluindo vazão de gás carreador e potência de radiofrequência (RF), foi realizada utilizando a amostra de vodca para os analitos Co, Ni e Te. O gás carreador do ICP-MS, usualmente empregado para formação de aerossol em nebulizadores pneumáticos, foi desviado para o separador

gás-líquido com o objetivo de transportar os vapores produzidos a partir das reações de PVG para o ICP-MS. A influência da vazão de gás carreador sobre o sinal analítico foi investigada na faixa de 0,60-0,90 L min⁻¹, uma vez que vazões superiores a 0,90 L min⁻¹ provocavam instabilidade no plasma. A Figura 5 mostra a influência da vazão de gás carreador para os analitos presentes na amostra e em uma solução padrão, ambas preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.

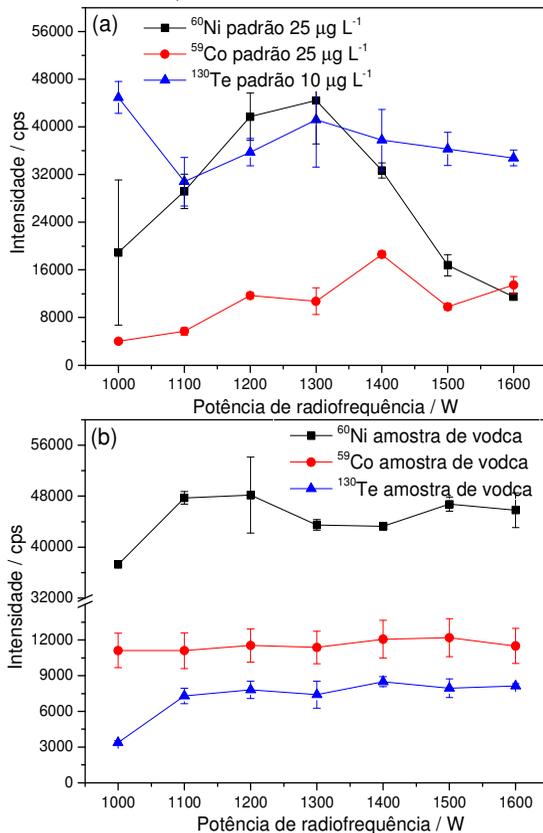
Figura 5. Influência da vazão do gás carreador nos sinais obtidos para os isótopos ⁶⁰Ni, ⁵⁹Co e ¹³⁰Te presentes em (a) padrão aquoso e em (b) amostra de vodca diluída, utilizando RF de 1200 W, tempo de exposição à radiação UV de 105 s e preparo das soluções em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.



Na Figura 5 é possível observar que em baixas vazões de gás (0,60 a 0,70 L min⁻¹) o transporte das espécies voláteis para o ICP-MS é prejudicado, produzindo assim um baixo sinal integrado para as espécies de Ni e Co, principalmente. Entretanto, quando utilizadas vazões superiores a 0,80 L min⁻¹ os sinais para todos os analitos foram amplificados. Vazões de gás carreador superiores a 0,85 L min⁻¹ não resultaram em melhora no transporte das espécies voláteis, em parte devido à formação de gotículas no canal que conduz as espécies ao ICP-MS, o que sugere que vazões elevadas reduzem a eficiência do processo de separação gás-líquido. Com adoção de vazões superiores a 0,95 L min⁻¹, o plasma indutivamente acoplado foi extinto. Assim, todas as experiências foram conduzidas com uma vazão de gás carreador de 0,80 L min⁻¹.

O efeito da potência de radiofrequência foi avaliado na faixa de 1000-1600 W; os resultados podem ser observados na Figura 6.

Figura 6. Efeito da potência de RF nos sinais obtidos para os isótopos ^{60}Ni , ^{59}Co e ^{130}Te em (a) padrão aquoso e em (b) amostra de vodca diluída, utilizando vazão de gás carreador $0,80\text{ L min}^{-1}$, tempo de radiação UV de 105 s e preparo das soluções em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.

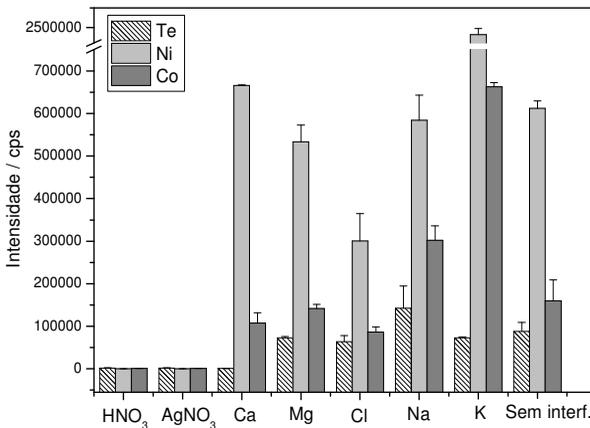


Como observado na Figura 6, a potência de RF exerce pouca influência sobre a resposta analítica para Ni, Co e Te. Esses resultados são, até certo ponto, esperados, pois a separação entre o analito e a matriz da amostra ocorre de forma eficiente no separador gás-líquido, ou seja, um aerossol “seco” é introduzido no plasma. Dessa forma, o ICP torna-se unicamente responsável pela dissociação e ionização das espécies dos analitos. Assim, a potência de RF escolhida foi de 1200 W.

5.1.4. Avaliação de potenciais espécies interferentes

Um estudo foi realizado para verificar o possível efeito de matriz causado por algumas espécies comumente encontradas nas amostras analisadas. As soluções aquosas dos analitos foram preparadas para conter 10 mg L^{-1} de cada uma das espécies, sendo elas: NO_3^- (a partir do HNO_3), NO_3^- (a partir do AgNO_3), Ca^{2+} (a partir do óxido de CaO), Mg^{2+} , NH_4Cl , NaOH e KOH , individualmente. Os sinais obtidos para os analitos na presença de cada espécie adicionada foram medidos e avaliados. A Figura 7 mostra o gráfico obtido para o padrão de Ni e Co $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e Te $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em meio de soluções de NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ e K^+ 10 mg L^{-1} cada espécie.

Figura 7. Sinais analíticos obtidos para Co, Ni e Te por PVG-ICP-MS na presença de diferentes concomitantes simulando as interferências por espécies adicionadas de NO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ e K^+ com concentração individual de 10 mg L^{-1} . Sinais obtidos a partir de soluções aquosas contendo $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni e Co (individualmente) e $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Te em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.



O resultado mais surpreendente deriva da presença de nitrato na solução. Observou-se que o sinal analítico para todos os elementos foi completamente suprimido pela adição de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. A fim de atestar que este efeito era decorrente da espécie nitrato e não associado a uma simples alteração no pH da solução, o experimento foi repetido

utilizando-se AgNO_3 como fonte de íons NO_3^- , a uma concentração de 10 mg L^{-1} . Sob estas condições, a mesma supressão de sinais foi observada, sendo as contagens reduzidas a valores de branco para todos os elementos. Pode-se supor que as propriedades oxidantes dos íons altamente oxigenados, tais como NO_3^- , podem levar à formação de radicais altamente reativos derivados do oxigênio, que podem ligar-se aos íons do analito ou desencadear reações paralelas entre o NO_3^- e os radicais formados a partir do processo de PVG. Os produtos das reações seriam espécies altamente solúveis na solução da amostra, o que reduziria a eficiência do processo de PVG. Resultados semelhantes foram observados por Guo e colaboradores [83], que identificaram que a adição de NO_3^- ou H_2O_2 produziam um aumento de três vezes no rendimento da reação de formação de SeCO , mas inibiam completamente a formação de SeH_2 e, possivelmente, de outros hidretos metálicos. Outros autores têm relatado a baixa eficiência do processo associado à PVG na presença de ácidos inorgânicos frequentemente utilizados para a conservação e preparação das amostras (HCl , HNO_3 , H_2SO_4 e H_3PO_4) [27, 85, 86], um fato atribuído à redução na população de radicais reativos na presença destas espécies. Isto implica, obviamente, no fato que as amostras não podem ser acidificadas com HNO_3 para aplicação desse procedimento analítico, o que requer processos de preparo de amostras diferenciados, particularmente para análise de materiais sólidos e por essa razão há dificuldades em utilizar materiais de referência certificados preservados em meio de HNO_3 .

Soluções contendo Cl^- e Mg^{2+} em concentrações individuais de 10 mg L^{-1} não promoveram variações significativas no sinal analítico, exceto para Ni, cujo sinal foi ligeiramente suprimido em uma solução contendo 10 mg L^{-1} de Cl^- . Atribui-se a este fato o potencial consumo de alguns produtos da reação fotoquímica por íons Cl^- [86]. Um efeito oposto foi observado em uma solução contendo 10 mg L^{-1} de Na^+ e K^+ . Para a adição de K^+ os sinais analíticos de Ni e Co foram acrescidos por um fator de aproximadamente dois, e para Na^+ um ligeiro aumento nos sinais analíticos foi observado para Co e Te. Por outro lado, uma supressão de sinal foi observada para Te em soluções contendo 10 mg L^{-1} de Ca^{2+} , o que sugere que a determinação desse elemento por PVG-ICP-MS estaria condicionada à presença de baixas concentrações do elemento alcalino-terroso na amostra.

Visto que a concentração de Ca^{2+} nas amostras poderia ser potencialmente elevada, a concentração deste elemento foi determinada por ICP-MS com nebulização pneumática convencional. As

concentrações de Ca nas amostras de cachaça e vodca foram inferiores a 3 mg L^{-1} . Entretanto, a concentração de Ca encontrada na amostra de vermute doce foi superior a 10 mg L^{-1} , sugerindo que a supressão de sinal para Te nesta amostra poderia potencialmente impedir a determinação do elemento por PVG-ICP-MS.

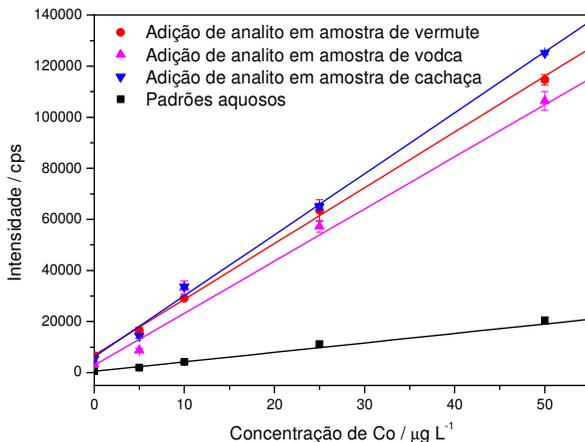
5.1.5. Avaliação de estratégias de calibração para a determinação de Co, Ni e Te em bebidas alcoólicas

Três abordagens de calibração distintas foram avaliadas quanto à capacidade de fornecer resultados exatos para os três analitos nas amostras, que incluem calibração com padrões aquosos, calibração com soluções em meio de etanol simulando a matriz da amostra e calibração por adição de analito, realizada utilizando cada uma das diferentes amostras. Em todos os casos, o ácido acético e o ácido fórmico foram adicionados até uma concentração da mistura de ambos a 15% v/v e as soluções de calibração resultantes foram submetidas ao mesmo protocolo de PVG ao qual as amostras foram submetidas.

A calibração por simulação de matriz, conduzida com padrões de calibração preparados na presença de etanol, levou à instabilidade do plasma, o que afetou severamente a precisão das medidas. Aparentemente, o transporte de etanol a partir do separador gás-líquido é facilitado se o solvente orgânico encontra-se em meio aquoso, o que resultou na injeção de quantidades significativas do solvente no ICP. Desta forma, a calibração por simulação de matriz foi descartada, e os demais estudos envolveram apenas a calibração por adição de analito e a calibração externa com padrões aquosos.

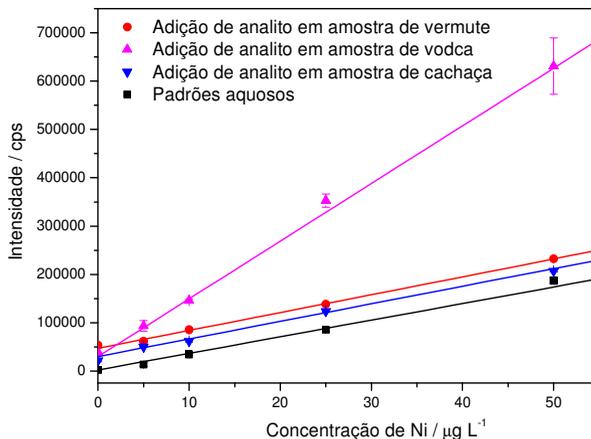
Os estudos de calibração envolvendo Co mostraram que a sensibilidade obtida usando calibração por adição de analito para três amostras diferentes resultaram em sensibilidades semelhantes para todas as amostras. Todavia, as inclinações obtidas para as curvas de calibração por adição de analito foram significativamente maiores (cerca de seis vezes) do que as obtidas a partir da calibração com soluções aquosas submetidas ao procedimento de PVG. Neste caso, assume-se que um efeito de matriz é responsável pelas discrepâncias observadas, possivelmente advindo da matriz alcoólica, e a calibração por adição de analito é a técnica de calibração mais viável. As curvas de calibração obtidas para Co por PVG-ICP-MS são mostradas na Figura 8.

Figura 8. Curvas de calibração para Co obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermute doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.



Para Ni, a curva obtida usando padrões aquosos em meio de ácido acético e fórmico forneceu a mesma sensibilidade que as obtidas a partir da calibração por adição de analito para as amostras de vermute doce e cachaça. No entanto, o mesmo efeito não foi observado para a amostra de vodca, uma vez que a sensibilidade da curva por adição de analito foi cerca de 30% maior, demonstrando um efeito de matriz substancial associado a esta amostra. Apesar da calibração com padrões aquosos poder ser utilizada para a análise de cachaça e vermute doce, a calibração por adição de analito corrigiu eficientemente os efeitos de matriz e foi adotada para a quantificação de Ni em todas as amostras. As curvas de calibração para Ni obtidas por PVG-ICP-MS são mostradas na Figura 9.

Figura 9. Curvas de calibração para Ni obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermute doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.



Segundo Guo e colaboradores [87], os compostos de Ni gerados em reações fotoquímicas já são conhecidos e foram produzidos ainda no século XIX. Porém, o gás monóxido de carbono de alta toxicidade era utilizado para a produção de $\text{Ni}(\text{CO})_4$. Entretanto, com a utilização da PVG é possível obter esse mesmo composto utilizando apenas solventes de baixa toxicidade e sem riscos imediatos à saúde ou ao meio ambiente. Os compostos identificados por Guo *et al* [87] para a geração fotoquímica de vapor de Ni são NiCO , $\text{Ni}(\text{CO})_2$, $\text{Ni}(\text{CO})_3$ e $\text{Ni}(\text{CO})_4$.

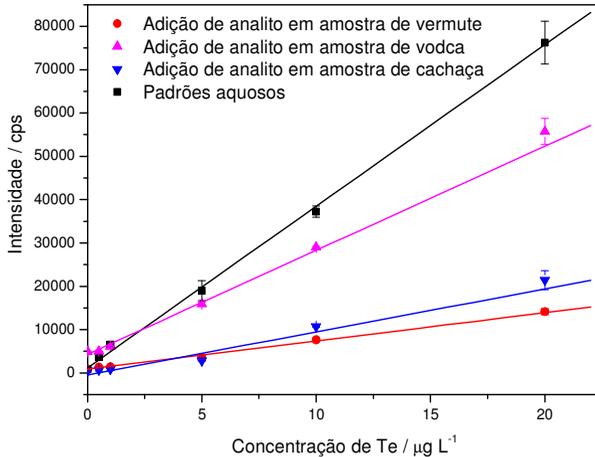
O comportamento da geração fotoquímica de vapor para o Co não segue exatamente o mesmo comportamento do Ni observado por Guo *et al.* [87] devido às diferenças de espécies geradas pela PVG. Não há uma definição sobre quais espécies de Co são produzidas, mas Grinberg e colaboradores [88] fizeram uma tentativa de identificação das espécies de Co que são produzidas por PVG e identificaram $\text{Co}(\text{CO})_4\text{H}$ e $\text{Co}(\text{CO})_4\text{H}_2$ como possíveis produtos da reação.

A matriz alcoólica da amostra pode exercer influência significativa, já que também pode intervir na produção de radicais livres e, conseqüentemente, nas espécies geradas pela PVG. Por isso, uma possível explicação para a alta sensibilidade obtida para a curva de calibração por adição de analito utilizando a amostra de vodca está na

concentração alcoólica desta amostra, que possui cerca de 45% de etanol, enquanto que as amostras de vermute doce e cachaça apresentavam 20% e 38%, respectivamente.

Para Te, as sensibilidades obtidas a partir das curvas de calibração por adição de analito para vermute doce e cachaça foram diferentes em cerca de 30%. A curva de calibração por adição de analito obtida para a amostra de vodca resultou em sensibilidade significativamente maior quando comparada com as outras duas amostras. Todavia, para este elemento a maior sensibilidade foi obtida a partir da calibração com padrões aquosos. Uma vez que foi demonstrado que a eficiência do processo de PVG para Te é significativamente dependente da presença de Ca^{2+} nas amostras e este elemento está presente em níveis de mg L^{-1} em todas as amostras, a obtenção de uma menor sensibilidade para a calibração obtida a partir da calibração por adição de analito já era esperada. A dependência da sensibilidade para Te da concentração de Ca é de tal modo que a ordem de sensibilidade obtida a partir da calibração por adição de analito segue a mesma ordem de concentração de Ca nas amostras, ou seja, a amostra com uma concentração de cálcio superior (vermute doce) resultou na menor sensibilidade frente às outras amostras analisadas, ao passo que a amostra com uma menor concentração de Ca (vodca) resultou em curva de calibração com maior sensibilidade. Isto leva a crer que a calibração por adição de analito é obrigatória para a quantificação de Te, principalmente quando a concentração de Ca nas amostras é elevada. As curvas de calibração obtidas para o Te por PVG-ICP-MS são mostradas na Figura 10.

Figura 10. Curvas de calibração para Te obtidas por PVG-ICP-MS utilizando padrões inorgânicos em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v, e curvas por adição de analito em amostras de vermute doce, vodca e cachaça preparadas em meio de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v.



5.1.6. Parâmetros de desempenho analítico e aplicação analítica

Os valores de parâmetros de desempenho para o método são mostrados na Tabela 2. O limite de quantificação (LOQ) é dez vezes o desvio padrão obtido de 10 leituras consecutivas do branco da amostra, dividido pela inclinação da curva de calibração e considerando a diluição das amostras, para ambos os métodos.

Tabela 2. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Ni, Co e Te em bebidas alcoólicas por PVG-ICP-MS; calibração com adição de analito.

Parâmetro	Ni	Co	Te
Sensibilidade / $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$	$3,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$
R^2	0,9990	0,9990	0,9932
LOQ PVG / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,1	0,5	0,4
*LOQ nebulizador / $\mu\text{g L}^{-1}$	3,5	4,5	1,2
RSD / %	4 - 12	5 - 15	6 - 14

* Calibração aquosa.

A fim de verificar a exatidão do método proposto por PVG-ICP-MS, todas as amostras foram analisadas em paralelo por ICP-MS utilizando a nebulização pneumática convencional, após digestão assistida por micro-ondas das amostras em uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 . Os dados da Tabela 2 mostram que os limites de quantificação obtidos por PVG-ICP-MS são 3 a 35 vezes menores do que os obtidos por digestão de amostras e análise convencional utilizando um nebulizador pneumático, algo que é em grande parte devido ao fato de que em PVG-ICP-MS as amostras são analisadas sem diluições significativas, uma vez que a matriz pode ser separada dos analitos em um separador gás-líquido, após a reação fotoquímica.

Um total de cinco amostras de bebidas alcoólicas comerciais foi analisado e os resultados são apresentados na Tabela 3. Como pode ser observado, obteve-se uma boa concordância entre os resultados provenientes do processo de PVG-ICP-MS e as análises por ICP-MS convencional, o que atesta a boa exatidão do procedimento, também confirmado por um teste t pareado com nível de confiança de 95%. A quantificação de Te só foi possível em uma das amostras, o que era esperado considerando a baixa abundância deste elemento. Em geral, a concentração de elementos-traço na amostra de "cachaça 3", que é oriunda de um produtor artesanal, é maior do que para as outras amostras de cachaça, que são de grandes produtores no Brasil. Porém, a amostra de vermute doce apresentou os maiores valores de concentrações de Ni e Co.

Tabela 3. Resultados obtidos para a determinação de Ni, Co e Te em amostras de bebidas alcoólicas por PVG-ICP-MS e ICP-MS com nebulização pneumática (digestão de amostra); (média \pm intervalo de confiança de 95%; n = 3)

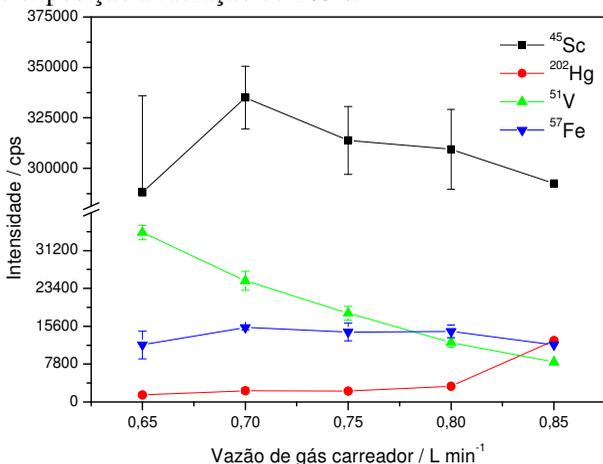
Amostras	Ni / $\mu\text{g L}^{-1}$		Co / $\mu\text{g L}^{-1}$		Te / $\mu\text{g L}^{-1}$	
	PVG	Nebulizador	PVG	Nebulizador	PVG	Nebulizador
Cachaça 1	< 0,1	< 3,5	< 0,5	< 4,5	< 0,5	< 1,2
Cachaça 2	< 0,1	< 3,5	< 0,5	< 4,5	< 0,5	< 1,2
Cachaça 3	24,0 \pm 1,2	22,0 \pm 5,0	7,7 \pm 1,5	5,6 \pm 0,6	< 0,5	< 1,2
Vermute doce	40,1 \pm 1,1	44,5 \pm 7,7	14,8 \pm 1,8	13,6 \pm 4,5	< 0,5	< 1,2
Vodca	3,8 \pm 0,5	< 3,5	0,70 \pm 0,01	< 4,5	1,5 \pm 0,05	1,4 \pm 0,1

5.2 Determinação de Fe, Sc, Hg e V em amostras de água do mar

5.2.1 Avaliação da vazão do gás carreador e potência de radiofrequência

Inicialmente foram conduzidas as otimizações da vazão de gás carreador e da potência de RF do instrumento de ICP-MS a fim de ajustar a melhor condição para a determinação dos elementos-traço. Os resultados obtidos para a otimização da vazão de gás carreador são mostrados na Figura 11.

Figura 11. Efeito da vazão de gás carreador no sinal obtido por PVG-ICP-MS para ^{57}Fe , ^{45}Sc e ^{51}V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e ^{202}Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. RF= 1200 W; tempo de exposição à radiação de 105 s.



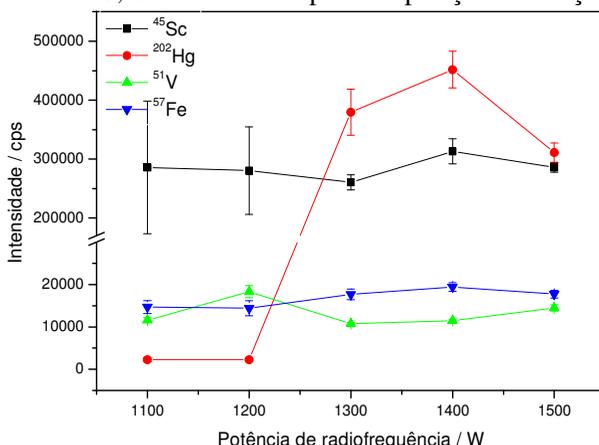
A variação na vazão de gás carreador não proporcionou alterações significativas na intensidade de sinal medida para Fe. Porém, para Hg as contagens aumentaram por um fator de aproximadamente três com o aumento da vazão de gás de $0,80 \text{ L min}^{-1}$ e para $0,85 \text{ L min}^{-1}$. Todavia, a adoção de uma vazão de $0,85 \text{ L min}^{-1}$ resultou em instabilidade no plasma, e em casos extremos, como a adoção de uma vazão de $0,90 \text{ L min}^{-1}$, o plasma era extinto. Isso não ocorre comumente quando se utiliza a nebulização pneumática como técnica de introdução

de amostra, mas nestes casos a vazão efetiva é ligeiramente inferior à nominal, em função da dispersão do gás no grande volume da câmara de nebulização, em contraste com o pequeno volume da câmara do separador gás-líquido. Além disso, assume-se que com a adoção de vazões elevadas a eficiência do processo de separação gás-líquido é reduzida, o que resulta na introdução de quantidades significativas de água e de ácidos orgânicos no plasma.

Baixas vazões de gás carreador favoreceram as contagens para o sinal de V e bons desvios padrão entre as medidas foram obtidos com 0,65 e 0,70 L min⁻¹. Para Sc, os desvios padrão entre as medidas foram elevados e a adoção de vazão de gás entre 0,70 e 0,75 L min⁻¹ resultou em melhor precisão. Essa diferença de resposta para cada analito pode estar associada à estabilidade das espécies voláteis geradas ou ainda à influência no tempo de residência das espécies no plasma. Assim, a vazão de gás de arraste adotada como condição de compromisso para todas as espécies foi de 0,75 L min⁻¹.

A potência de RF também foi avaliada, e os resultados estão expostos na Figura 12.

Figura 12. Efeito da variação na potência de RF sobre o sinal obtido por PVG-ICP-MS para ⁵⁷Fe, ⁴⁵Sc e ⁵¹V (100 µg L⁻¹) e ²⁰²Hg (5 µg L⁻¹) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v. Vazão de gás carreador de 0,75 L min⁻¹ e tempo de exposição à radiação de 105 s.

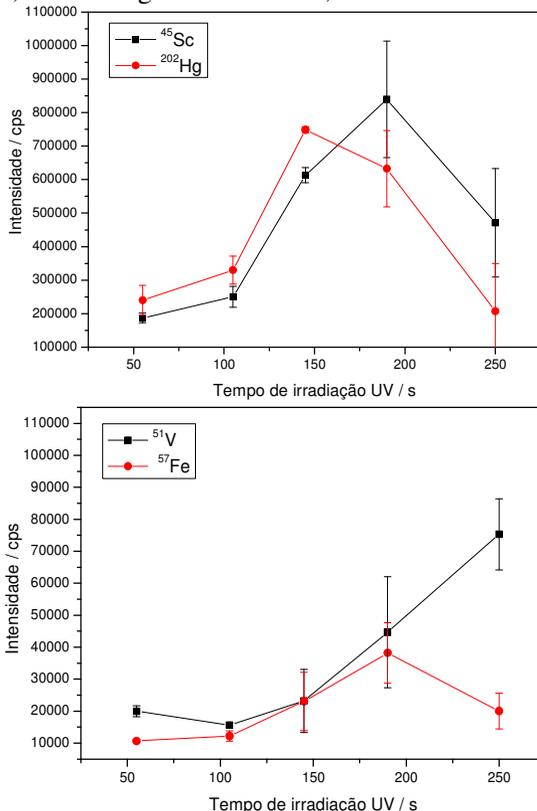


A variação da potência de radiofrequência não exerceu influência significativa, em termos de sensibilidade, para Fe, Sc e V, mas a sensibilidade para Hg foi significativamente melhor com a adoção de potências RF superiores a 1300 W. Este efeito é atribuído ao fato de o Hg, dentre os analitos mencionados, ser o elemento com maior potencial de ionização, requerendo condições de maior energia no plasma para a produção de populações significativas de íons monoatômicos. Desta forma, a potência de RF selecionada foi de 1300 W.

5.2.2. Influência do tempo de exposição à radiação UV

Para realizar a determinação de Fe, Sc, Hg e V por PVG-ICP-MS foi necessário utilizar uma lâmpada de radiação UV emitindo no comprimento de onda 254 nm e a otimização do tempo de exposição da solução da amostra contendo os analitos à radiação UV é fundamental. Na Figura 13 é possível observar a influência do tempo de exposição à lâmpada de UV sobre o sinal observado para os analitos.

Figura 13. Influência do tempo de exposição à radiação UV para os isótopos ^{57}Fe , ^{45}Sc e ^{51}V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e ^{202}Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em solução de ácido acético 7,5% v/v e ácido fórmico 7,5% v/v por PVG-ICP-MS. RF= 1300 W; Vazão de gás carreador= $0,75 \text{ L min}^{-1}$.



O tempo de irradiação UV na amostra e de reação entre os radicais orgânicos e os analitos é uma etapa importante para que seja produzida a quantidade de radicais necessários para a geração, com máxima eficácia, das espécies voláteis. Todavia, considerando a instabilidade de algumas espécies resultantes dos processos fotoquímico, a exposição prolongada pode desencadear reações paralelas, que incluem a decomposição das espécies voláteis e a consequente perda de sensibilidade. Na Figura 13 é possível verificar que um tempo de irradiação UV de até 150 s seria indicado para Sc e

Hg, pois períodos maiores de exposição resultaram em perda de precisão e de sensibilidade para os sinais analíticos desses elementos. Em contraste, o sinal para V apresentou-se mais elevado em períodos de irradiação UV superiores a 200 s, o que sugere que as espécies voláteis de V são estáveis e dependem diretamente do aumento na concentração de radicais produzidos no processo de PVG. A sensibilidade para Fe foi também superior com irradiação UV por 200 s. Trabalhos semelhantes na literatura [58, 59] relataram que é necessário um tempo de irradiação de cerca de 250 s para uma geração fotoquímica eficiente de compostos voláteis de ferro na presença de ácidos orgânicos de baixa massa molar. A eficiência de geração de cerca de 60% poderia ser atingida, como relatado por Zheng *et al.* [58], em que a temperatura, pH e concentração de ácido fórmico foram tomados como sendo os fatores mais importantes para a PVG para Fe.

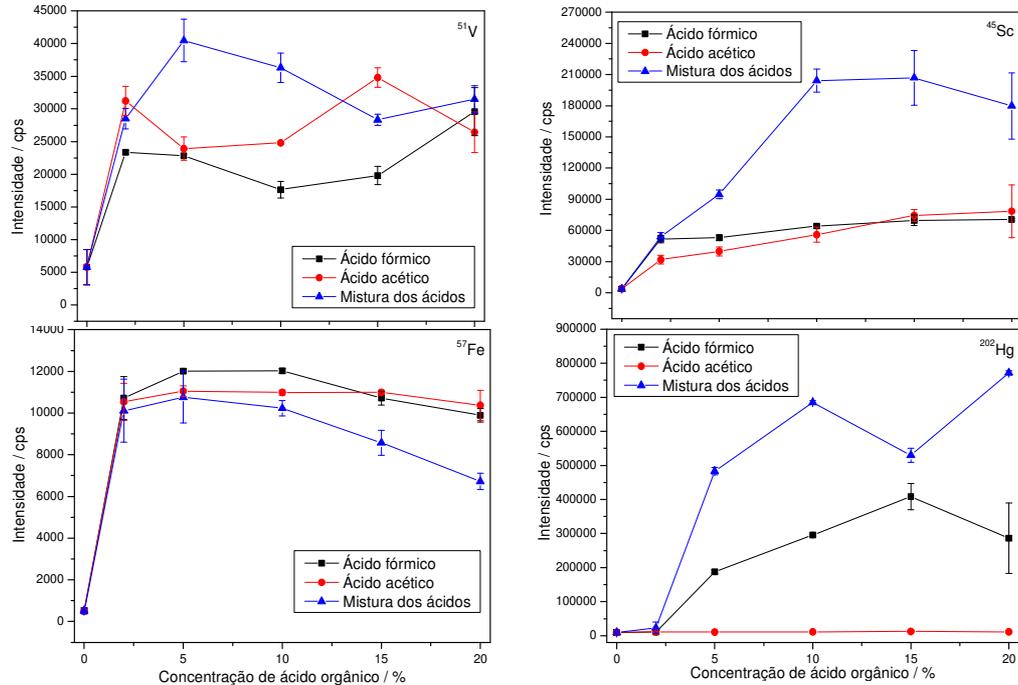
Entretanto, o longo tempo de exposição à radiação UV resultou na formação de inúmeras bolhas no fotoreator, provavelmente devido à formação de produtos gasosos originados por fotólise, tais como H₂, CO e CO₂, além das espécies de analitos voláteis. Esse fato poderia implicar na perda de repetitividade entre as medidas e, conseqüentemente, maiores desvios padrão relativos.

Com base na discussão prévia, a condição assumida como compromisso para o tempo de exposição à radiação UV foi de 145 s, utilizando uma potência de RF de 1300 W e vazão de gás de arraste de 0,75 L min⁻¹ que foram otimizadas previamente.

5.2.3. *Otimização das concentrações de solvente orgânico para a geração fotoquímica de espécies voláteis de Fe, Sc, Hg e V*

O ácido orgânico de baixa massa molar ideal para a produção fotoquímica de espécies voláteis de Fe, Sc, Hg e V foi avaliado utilizando os ácidos fórmico, acético e suas misturas em diferentes concentrações. O resultado dessas otimizações realizadas com um tempo de exposição à radiação UV de 145 s pode ser observado na Figura 14.

Figura 14. Avaliação da concentração e tipo de ácido orgânico utilizado para a geração fotoquímica de vapor para os elementos Fe, Sc e V ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) e Hg ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Potência RF= 1300 W; vazão de gás carreador= $0,75 \text{ L min}^{-1}$.



De acordo com a Figura 14, baixas concentrações de ácidos orgânicos LMW não favorecem significativamente a formação das espécies voláteis dos analitos selecionados, com exceção do Fe, para o qual a intensidade de sinal é máxima com concentração de ácidos orgânicos de 2% v/v. Altas concentrações de ácidos orgânicos favoreceram a sensibilidade para todos os analitos, o que corrobora com a hipótese de que o aumento na concentração dos ácidos orgânicos resulta na formação de populações maiores de espécies radicalares quando a solução é irradiada no UV.

O Fe também apresentou comportamento distinto em relação ao tipo de ácido que mais favorece a formação das espécies voláteis, pois foi o único elemento que apresentou a maior sensibilidade utilizando apenas ácido fórmico para a geração dos radicais. Para Sc, Hg e V, a mistura entre ácido acético e ácido fórmico favoreceu a formação de espécies voláteis, a exemplo do que havia sido observado para a determinação de Co, Te e Ni.

Para Hg, a utilização de ácido acético para a geração fotoquímica de espécies voláteis não resultou em boa sensibilidade. Esse fenômeno também foi identificado no desenvolvimento de uma metodologia para determinação e especiação de mercúrio por HPLC-MW/UV-AFS (relatado no Capítulo II). O mecanismo de formação das espécies de Hg ainda é desconhecido, mas acredita-se que por PVG com irradiação UV também sejam formadas espécies de Hg^0 elementar, assim como com MW/UV. Tal como os dados apresentados neste trabalho, estudos realizados por Vieira *et al.* [16] também demonstraram que concentrações de ácido acético abaixo de 20% v/v não permitem gerar espécies voláteis a partir do Hg^{2+} . Contudo, para algumas espécies organomercuriais, como MeHg, é possível obter um excelente sinal com 5% v/v de ácido acético, possibilitando a especiação química direta a partir da variação na identidade e concentrações dos ácidos orgânicos em solução. Sem uma clara compreensão do mecanismo da reação não é possível fazer mais comentários sobre esta observação empírica. Entretanto, com base nessas observações, é possível que os resultados apresentados por Bendl *et al.* [89] possam não corresponder às medidas de mercúrio total nos tecidos dos peixes por eles investigados, mas apenas ao metilmercúrio, o que provavelmente não resultaria em um erro, pois a maior fração do mercúrio presente em tecidos de peixe é o próprio metilmercúrio. Uma possível explicação para os resultados encontrados por eles provém do tipo de lâmpada utilizada para a redução de mercúrio em Hg^0 conhecida por *UV pen lamp* 254 nm

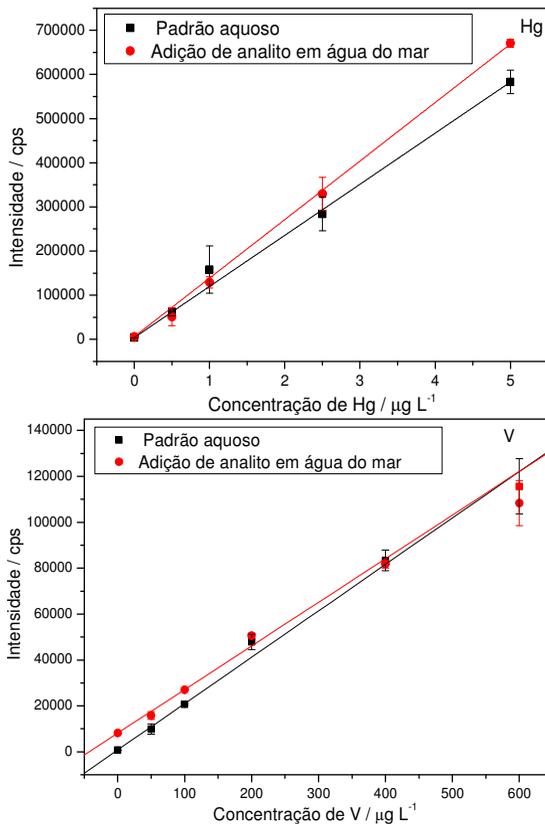
(modelo 90-0012-01, UVP, Inc., Upland, CA), que é menos intensa e diferente dos modelos de lâmpadas UV utilizados nesse trabalho e no trabalho publicado por Vieira *et al.* [16].

Sendo assim, como a condição de compromisso para os ácidos orgânicos utilizados tem que propiciar a determinação da maioria dos analitos, foram empregadas as misturas de ácido acético 5% v/v + ácido fórmico 5% v/v para todos os elementos.

5.2.4. Avaliação de estratégias de calibração para a determinação de Fe, Sc, Hg e V em água do mar

Após o estudo das condições ótimas de todos os parâmetros para os diferentes analitos, avaliaram-se as estratégias de calibração com padrões aquosos em meio de ácido fórmico 5% + acético 5% v/v e a calibração por adição de analito, utilizando água de mar (amostra Praia da Armação), visando identificar o procedimento mais adequado para a quantificação de Fe, Sc, Hg e V em amostra de água de mar. A Figura 15 mostra as curvas de calibrações obtidas para Hg e V.

Figura 15. Curvas de calibração para os elementos Hg e V. RF= 1300 W; Vazão de gás carreador= 0,75 L min⁻¹; tempo de exposição à radiação UV de 145 s.



As curvas de calibração foram realizadas todas no mesmo dia e sob as mesmas condições de análise. Os resultados obtidos para a curva de calibração por adição de analito comparadas com a curva de calibração obtida por meio de padrões aquosos em meio de ácido orgânico para Hg e V evidenciaram que a diferença de sensibilidade foi inferior a 10%, o que sugere que a calibração com padrões aquosos é viável para a quantificação desses elementos.

Para V, foi monitorada a razão massa/carga (m/z) 51, que pode apresentar interferências isobáricas pelo íon poliatômico ³⁵Cl¹⁶O⁺.

Assim, para evitar a interferência do íon poliatômico $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ na determinação da concentração de vanádio em amostras que contêm cloro em sua matriz, uma alternativa seria monitorar o isótopo ^{50}V de abundância natural 0,25%, em vez de monitorar o isótopo principal do vanádio (^{51}V), de abundância 99,75%. Isso porque a interferência espectral é específica para uma determinada razão m/z e não para o elemento em si. Porém, quando se opta por monitorar um isótopo alternativo, há prejuízo à sensibilidade da análise e, por consequência, aos limites de detecção (LOD).

Para viabilizar a quantificação de V, foi empregada uma equação de correção para a razão m/z 51, com monitoramento concomitante do sinal obtido na razão m/z 53, proveniente da formação da espécie $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$. Esta abordagem, em conjunto com a calibração com soluções aquosas, foi utilizada para a quantificação de V em amostras de água do mar. Sendo assim, a equação aplicada segue o modelo:

$$^{51}\text{V} = I(51) - I(53) \times \frac{\text{Abundância } ^{35}\text{Cl}}{\text{Abundância } ^{37}\text{Cl}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde,

$I(51)$ = é a intensidade medida na razão m/z 51;

$I(53)$ = é a intensidade medida na razão m/z 53;

Abundância ^{35}Cl = é a abundância natural do isótopo ^{35}Cl (75,78%)

Abundância ^{37}Cl = é a abundância natural do isótopo ^{37}Cl (24,22%)

Deve-se ressaltar que a sensibilidade obtida através de calibração por adição de analito é semelhante à sensibilidade obtida utilizando-se calibração com padrões aquosos, indicando que essa última poderia ser utilizada para uma determinação livre de interferências. Portanto, a curva de calibração utilizando padrões aquosos em meio de ácidos fórmicos 5% e acético 5% v/v foi empregada para as determinações de Hg e V em amostras de água do mar sem comprometer a exatidão das determinações.

As tentativas de quantificação de Sc e Fe foram frustradas, já que as curvas de calibração não seguiram um comportamento linear. Este fato impossibilitou realizar a determinação dos elementos Sc e Fe nas amostras.

Para Fe, a correlação entre sinal e concentração mostrou-se válida apenas em uma faixa estreita de concentrações, o que tornou o processo de calibração inviável. Para Sc, a sensibilidade observada foi

insuficiente para permitir a quantificação nas amostras. Dessa forma, estudos adicionais são requeridos para a quantificação desses elementos nas amostras de água do mar, incluindo otimizações dos parâmetros utilizando as próprias amostras.

A Tabela 4 sumariza os parâmetros de desempenho analítico obtidos para Hg e V por PVG-ICP-MS.

Tabela 4. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Hg e V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS.

Parâmetro	Hg	V
Faixa de trabalho / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,2 – 5,0	50 - 400
Inclinação / $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$	$1,2 \times 10^6$	$2,02 \times 10^2$
R^2	0,9995	0,9991
LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,02	2
LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$	0,07	6
RSD / %	1 - 13	1 - 23

O limite de detecção foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão obtido de 10 leituras consecutivas do branco da amostra, dividido pela inclinação da curva de calibração (coeficiente angular) e o limite de quantificação (LOQ) é dez vezes o desvio padrão obtido de 10 leituras consecutivas do branco da amostra, dividido pela inclinação da curva de calibração. O LOD e LOQ do método foram apresentados em $\mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade para a calibração para ambos os elementos foi satisfatória ($R > 0,999$), e LOD inferiores a $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e uma precisão com RSD menores que 13% foram adequados para as determinações de Hg e V em amostras de água do mar.

Para realizar a avaliação da exatidão do método proposto para os analitos investigados foi realizada a comparação dos valores determinados por PVG-ICP-MS e pelo método tradicional por ICP-MS com introdução de amostra por nebulização pneumática. As amostras de água do mar foram digeridas com o auxílio de um micro-ondas em meio de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e foram significativamente diluídas antes da análise por ICP-MS com nebulização pneumática.

A verificação entre o valor determinado por PVG-ICP-MS e o valor determinado utilizando nebulização pneumática foi realizada aplicando o teste-t de significância para a comparação de duas médias experimentais.

A aplicação do teste t mostrou que as concentrações obtidas para V por PVG-ICP-MS estão concordantes estatisticamente com os valores obtidos por PN-ICP-MS para um nível de confiança de 95%. Esses valores são aceitáveis, mas os altos RSDs demonstram que o método deve ser verificado e ajustado para adequar-se à determinação de V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS. Para o Hg, não foi possível realizar o teste estatístico, pois as concentrações de Hg presentes nas amostras eram menores que o limite de quantificação do método PN-ICP-MS. Os valores detalhados para as determinações de Hg e V pelos dois métodos supracitados são apresentados nas Tabelas 5. Deve-se ressaltar que o LOQ obtido particularmente para Hg é notavelmente baixo e permite a quantificação deste elemento em níveis de concentração inalcançáveis por PN-ICP-MS [90, 91]. Além disso, o método mostrou-se adequado à determinação simultânea de Hg e V por meio da adoção de condições de compromisso, algo raramente relatado em análises que envolvem PVG, já que as condições reacionais são frequentemente dependentes do analito em questão. Testes de adição/recuperação para Hg não foram realizados, mas a semelhança de sensibilidade para as curvas de calibração por adição de analito em relação à calibração externa convencional sugere que a recuperação seria adequada.

Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de Hg e V em amostras de água do mar por PVG-ICP-MS comparado com a determinação por nebulização pneumática em ICP-MS (média \pm intervalo de confiança de 95%; n = 3).

Amostras	Hg / $\mu\text{g L}^{-1}$		V / $\mu\text{g L}^{-1}$		Valor de t *
	Nebulização	PVG	Nebulização	PVG	
Armação	< LOQ	0,31 \pm 0,04	75,2 \pm 5,7	95 \pm 22	1,53
Jurerê	< LOQ	0,29 \pm 0,01	59,6 \pm 11,1	61 \pm 11	0,12
Santo Antônio	< LOQ	0,3 \pm 0,1	77,3 \pm 12,7	100 \pm 12	2,26
Beira Mar	< LOQ	0,39 \pm 0,10	91,6 \pm 14,5	113 \pm 16	1,74

* O valor crítico de |t| para as condições do experimento é 3,18.

6. CONCLUSÕES PARCIAIS

A geração fotoquímica de vapor acoplada à técnica de ICP-MS provou ser adequada para a determinação de Co, Ni e Te em amostras de bebidas alcoólicas e para determinação de Hg e V em amostras de água do mar, as quais são consideradas matrizes extremamente complexas para análise direta em ICP-MS. Para as determinações de Fe e Sc, algumas adequações devem ser feitas e/ou otimizadas especificamente para estes analitos para que as determinações sejam realizadas. Um mínimo preparo de amostra é requerido, restringindo-se à mistura de alíquotas das amostras com quantidades adequadas dos ácidos orgânicos. Com isto, o procedimento adquire alta frequência analítica e elimina o uso de equipamentos sofisticados e reagentes dispendiosos para preparo das amostras. Os limites de detecção foram significativamente menores do que os obtidos através da análise por ICP-MS após digestão da amostra, algo em grande parte devido à ausência de diluição significativa que caracteriza o processo de PVG-ICP-MS, uma vez que a separação entre o analito e a matriz da amostra pode ser realizada por esta técnica. A calibração para determinação de Hg e V em água de mar pôde ser conduzida com padrões aquosos, ao passo que soluções de calibração por adição de analito são necessárias para a determinação de Co, Ni e Te em mostras de bebidas alcoólicas devido ao fato que a matriz das bebidas alcoólicas também pode gerar radicais e influenciar na sensibilidade da curva de calibração. O uso combinado de ácido fórmico e ácido acético mostrou propiciar melhor sensibilidade do que o uso de ácidos individuais para todos os elementos investigados, algo ainda não relatado na literatura. A possibilidade de expandir a aplicação desta técnica para outros elementos de transição e possivelmente aplicações para especiação podem representar uma contribuição significativa para os procedimentos tradicionalmente adotados para a determinação de elementos-traço com detecção por ICP-MS.

PARTE 2 – Especificação de Hg por HPLC-AFS usando uma interface MW/UV integrada

7. OBJETIVOS

7.1. *Objetivo geral*

Desenvolver uma configuração simples e rápida para a especificação de Hg inorgânico, metilmercúrio (MeHg) e etilmercúrio (EtHg) e determinação das espécies em amostras biológicas utilizando a técnica de HPLC para a separação e uma interface MW/UV para a PVG acopladas à espectrometria de fluorescência atômica.

7.2. *Objetivos específicos*

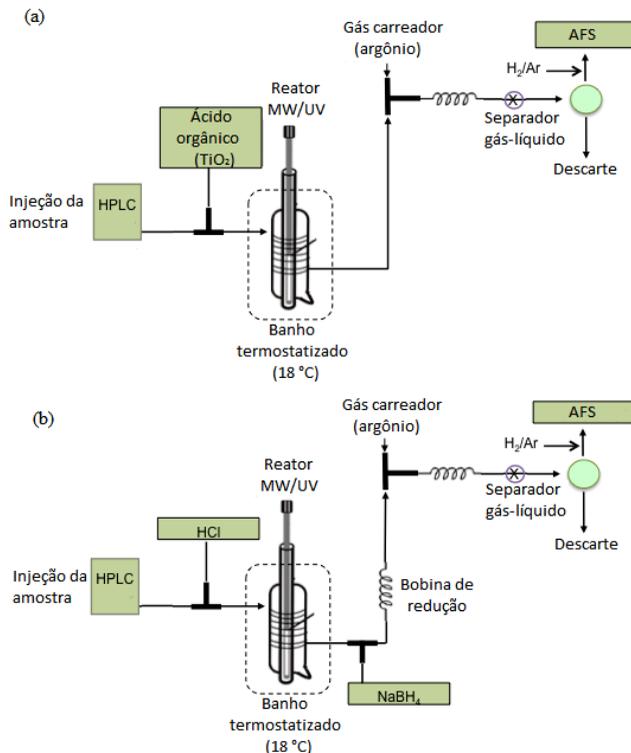
- Avaliar a influência dos ácidos orgânicos de LMW, tais como ácidos fórmico, acético, malônico e cítrico, para a geração fotoquímica de vapor por MW/UV e otimizar suas concentrações;
- Avaliar a influência da potência de radiação micro-ondas que está associada à radiação UV necessária para a geração fotoquímica de vapor de diferentes espécies organometálicas de mercúrio;
- Otimizar os componentes da fase móvel para a separação dos analitos através da técnica de HPLC, bem como, vazão da amostra, solventes e sais dissolvidos;
- Identificar as espécies voláteis que estão sendo formadas através da foto-irradiação proveniente da interface MW/UV por GC-MS;
- Investigar a ação catalítica de nanopartículas de TiO_2 no processo de geração fotoquímica de vapor para as espécies Hg(II), MeHg e EtHg;
- Verificar a exatidão do método proposto através de testes de adição e recuperação e comparação de resultados com valores certificados para as amostras;
- Conduzir a análise de especificação química e determinar Hg(II), MeHg e EtHg em amostras biológicas de diferentes origens.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Instrumentação

Um reator MW/UV combinado a um sistema de detecção por AFS foi utilizado tanto para a injeção em fluxo (FI) quanto para os experimentos com a cromatografia de fase reversa (RPC), e foi empregado para as medidas realizadas por PVG e CVG. Uma representação esquemática do aparelho é mostrada na Figura 16a (para experimentos por PVG) e Figura 16b (para experimentos por CVG).

Figura 16. Diagrama esquemático do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com PVG (a) e do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com tetraidroborato de sódio para a CVG (b).

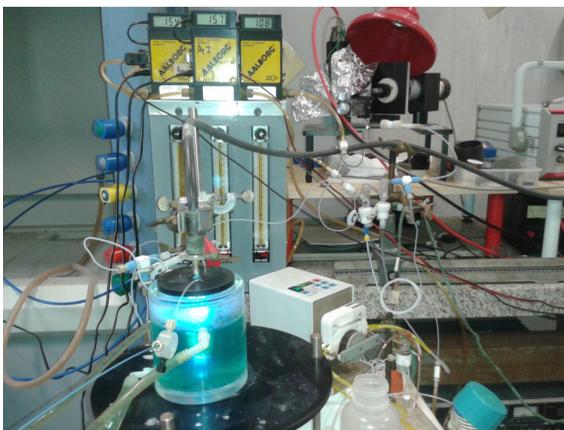


Fonte: Acervo pessoal, 2014.

Uma bomba de gradiente HPLC (P4000, ThermoQuest) equipada com um sistema mecânico de degaseificação (SC1000, ThermoQuest) e um injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA) foram empregados. Alças de amostra (loops de injeção) de 50 e 200 μL foram utilizados para os experimentos de FI e RPC, respectivamente. Os experimentos com FI e com RPC foram realizados com uma vazão de amostra de 3 mL min^{-1} e 2 mL min^{-1} na bomba de HPLC, respectivamente. Quando o sistema foi hifenado com HPLC, uma bomba peristáltica adicional a uma vazão de 1 mL min^{-1} (Dionex model DQP-1) foi utilizada na saída da coluna para se obter uma velocidade total de vazão de amostra de 3 mL min^{-1} e a concentração final otimizada de ácido fórmico (10% v/v) foi ajustada na entrada do reator MW/UV. Para os experimentos com FI, a saída da bomba do HPLC foi ligada com a entrada do reator MW/UV. Porém, na configuração com RPC, uma coluna cromatográfica foi interposta entre a bomba do HPLC e a bomba peristáltica adicional, e a saída desta segunda bomba foi ligada com a entrada do reator MW/UV.

O reator de MW/UV é constituído de uma antena de micro-ondas inserida dentro de um bulbo de lâmpada de mercúrio. Quando é aplicada a potência de micro-ondas através da antena, o mercúrio que está presente dentro da lâmpada é excitado e, então, é gerada a radiação UV. O reator MW/UV foi colocado em um banho termostatizado, de modo a funcionar em condição de temperatura controlada ($18 \text{ }^\circ\text{C}$). Uma potência de micro-ondas de 30 W foi empregada. Na Figura 17 é mostrado um foto do sistema HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com PVG-MW/UV-AFS.

Figura 17. Imagens ilustrativas do sistema de HPLC-MW/UV empregado para os experimentos com PVG-MW/UV-AFS.



Fonte: Acervo pessoal, 2014.

O valor da vazão das soluções e concentração de ácido fórmico foram determinados a partir dos experimentos de otimização descritos na seção 9.1.

O vapor de mercúrio gerado foi separado num duplo separador gás-líquido de vidro e carreado por uma vazão de gás composto por Ar/H₂ e o vapor de mercúrio foi conduzido ao atomizador composto por uma microchama de difusão de Ar/H₂ suportado num tubo de quartzo simples (diâmetro interno de 4 mm). O separador gás-líquido foi

construído em vidro borossilicato (comprimento de 60 mm, diâmetro interno de 10 mm, entrada e saída de 6 mm de diâmetro externo e 2 mm de diâmetro interno). Uma bomba peristáltica foi utilizada para bombear as soluções líquidas de resíduos. Um espectrômetro de fluorescência atômica montado no laboratório equipado com uma lâmpada de mercúrio de descarga sem eletrodos (EDL) (Perkin Elmer, Monza, Itália) foi empregado. Um detector fotomultiplicador *solar-blind* (Hamamatsu, 431S) foi empregado para a detecção da radiação de fluorescência atômica. O sinal do fotomultiplicador foi monitorado continuamente por um amplificador de saída *lock-in* (EGG Princeton Applied Research, Modelo 5209) sintonizado na frequência da onda de modulação da EDL.

As separações por RPC foram conduzidas usando uma coluna de separação Dionex Omnipac PAX-500 (60 Å, 250 × 4 mm, 8,5 µm) e uma pré-coluna de 50 × 4 mm. As amostras foram eluídas em modo isocrático com 10% v/v metanol, 1% v/v ácido fórmico, 5 mmol L⁻¹ L-cisteína, 0,15 mol L⁻¹ NaClO₄ na coluna cromatográfica e com 1% v/v metanol, 1% v/v ácido fórmico, 5 mmol L⁻¹ L-cisteína e 0,15 mol L⁻¹ NaClO₄ quando somente a pré-coluna foi empregada.

Os dados do amplificador de saída *lock-in* foram coletados com um computador equipado com uma interface cromatográfica Dionex AI-450 e seu *software* (Dionex PeakNet).

A identificação das espécies voláteis foi realizada coletando uma solução de amostra após a foto-reação no sistema de MW/UV (modo FI, soluções separadas de 5 mg L⁻¹ de Hg (II), MeHg e EtHg) e análise por *headspace* utilizando a cromatografia em fase gasosa (GC) (Agilent 6850), acoplado ao espectrômetro de massa (MS) (GC-MS, Agilent 5975, Agilent Technologies, Milão, Itália) equipado com uma coluna de 60 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno GC DB624 (1,4 µm de espessura do filme, Agilent Technologies, Milão, Itália). O programa de temperatura aplicado para a detecção por GC-MS consistiu em uma etapa de 80 °C durante 5 min e após esse período a temperatura subiu 20 °C min⁻¹ até 260 °C, sendo mantida durante 10 min. O detector MS foi operado tanto no modo de monitoramento seletivo de íons (198, 200 e 202) quanto no modo de varredura completa (intervalo 50-500).

8.2. Reagentes e amostras

Reagentes de grau analítico foram utilizados sem purificação adicional. O *p*HMB [4-hydroximercúrio benzoato de sódio (HOHgC₆H₄CO₂Na)] foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Milão, Itália). Uma solução estoque de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de *p*HMB foi preparada por diluição em NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de melhorar a sua solubilidade, armazenado a 4 °C e diluído imediatamente antes da utilização. A verificação da concentração das soluções de *p*HMB foi determinada a partir da absorvidade em 232 nm ($\epsilon^{232} = 1.69 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por espectrometria de absorção molecular na região UV-Vis.

Uma solução estoque de $1000 \pm 5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de Hg(II) inorgânico na forma de Hg(NO₃)₂ foi fornecido pela Merck (Poole, Dorset, UK). Cloreto de metilmercúrio (CH₃HgCl) da Strem Chemicals Inc. (Newburyport, MA, EUA) e cloreto de etilmercúrio (C₂H₅HgCl) de Alfa Division (Danvers, MA, EUA) foram usados para a preparação das soluções padrão estoque de MeHg $1,02 \text{ mmol L}^{-1}$ e EtHg $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$.

Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) para cromatografia de fase reversa (RPC) foram fornecidos por Sigma–Aldrich–Fluka.

Ácido fórmico $\geq 88,0\%$ (HCOOH) e ácido malônico 99% (CH₂(COOH)₂) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Ácido acético 99% (C₂H₄O₂), ácido cítrico 99% (C₆H₈O₇), cloreto de potássio (KCl) e perclorato de sódio (NaClO₄.H₂O) foram adquiridos de Carlo Erba (Rodano, Milão, Itália). Cloreto de sódio (NaCl) e *L*-cisteína $99,5\%$ (C₃H₇NO₂S) foram fornecidos pela Fluka (Milão, Itália) e usados para preparar as soluções para a fase móvel para análise por RPC.

Soluções de NaBH₄ $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por dissolução do reagente sólido (Merck, NJ, EUA) em meio de NaOH $0,3\%$ (m/v) (TraceSELECT, Sigma–Aldrich–Fluka). As soluções foram microfiltradas através de uma membrana de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ e armazenadas sob refrigeração. Soluções diluídas de NaBH₄ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente por diluição apropriada das soluções estoque, sendo mantidas em solução de NaOH $0,3\%$ (m/v). Soluções diluídas de HCl foram preparadas a partir de HCl 37% concentrado (Carlo Erbay).

Três materiais de referência certificados biológicos (DORM-1, DOLT-1, TORT-1) foram fornecidos pelo *National Research Council Canada* (NRCC, Ottawa, Canadá) e analisados para a avaliação da exatidão do método.

Água ultrapura foi obtida através de um sistema Purelab-UV Elga (Veolia Environnement, Paris, França) e usada para o preparo de todas as soluções.

8.3. Procedimento experimental

Uma massa de, aproximadamente, 500 mg de materiais de referência certificados foram pesados em frascos de vidro de 25 mL e 10 mL de ácido fórmico $\geq 88,0\%$ foram adicionados. Os frascos foram colocados em banho de ultrassom a 50 °C durante 6 h para completar a solubilização dos tecidos, baseado no procedimento desenvolvido por Vieira *et al.* [16]. Após resfriamento, as amostras foram diluídas com água deionizada até uma concentração final de ácido fórmico de 40% v/v e foram centrifugados a 5000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi filtrado duplamente antes da injeção por filtros de celulose regenerados de 0,45 μm e 0,20 μm (Agilent Captiva Premium Syringe Filters). Como citado anteriormente, uma alíquota de 200 μL de amostra foi utilizada para realizar a análise.

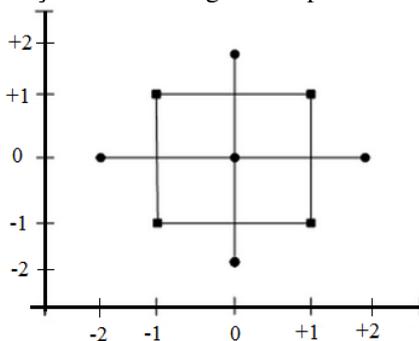
Para realizar o planejamento experimental foi utilizado um planejamento de segunda ordem de delineamento de composto central. As superfícies de resposta para Hg (II), MeHg, EtHg e pHMB foram obtidas traçando o sinal de FI específico em função da concentração de ácidos orgânicos LMW e potência de MW. As superfícies de resposta foram obtidas com o *software Origin*, convertendo os dados brutos em uma matriz de 100 x 100 utilizando um método *Random grinding* (Renka Cline).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Experimentos com FI-PVG-AFS

O desenvolvimento do método teve início com o experimento utilizando FI, sem utilização da coluna cromatográfica. Os experimentos conduzidos por FI foram realizados com o objetivo de selecionar o ácido orgânico de baixa massa molar mais eficaz para o processo de PVG, utilizando os ácidos fórmico, acético, malônico e cítrico. Foi realizado um delineamento de composto central, que é um dos mais utilizados dentre os planejamentos de experimentos de segunda ordem. Os dois fatores avaliados foram concentração de ácidos orgânicos (%) e potência de radiação micro-ondas (W) em cinco níveis para um número total de nove experimentos. A Figura 18 mostra o esquema para o planejamento com ponto central.

Figura 18. Ilustração do experimento com ponto central, no qual cada ponto representa uma condição experimental aplicada para a otimização, variando a concentração de ácido orgânico e potência de micro-ondas.

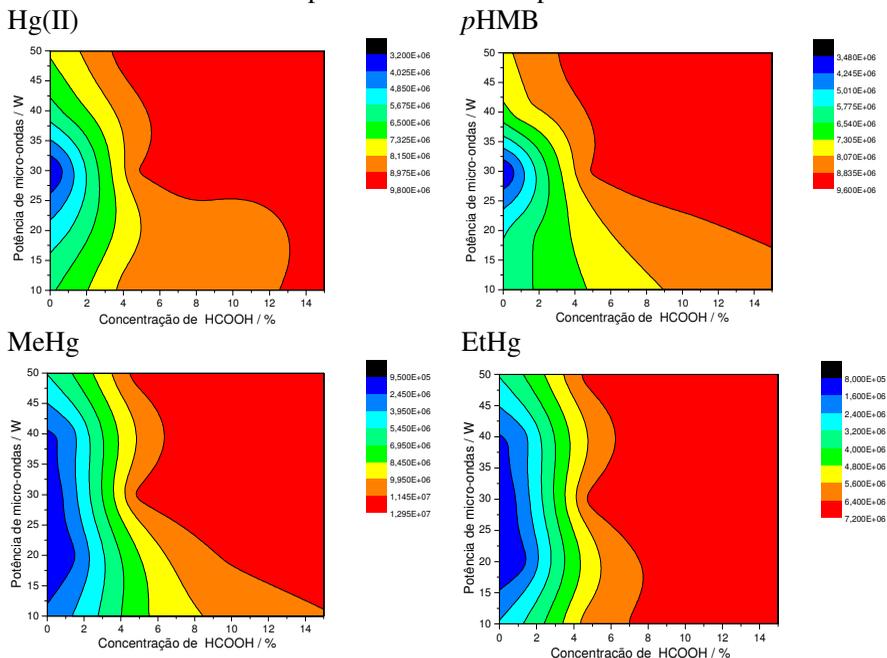


O planejamento fatorial aplicado para o método mostrou-se eficiente e satisfatório, pois as superfícies de resposta obtidas através do planejamento de ponto central estavam dentro das faixas desejadas e atendeu o objetivo de encontrar as condições ótimas do método proposto.

As Figuras 19 a 22 mostram as superfícies de resposta obtidas para Hg(II), MeHg, EtHg e pHMB plotando o sinal específico para mercúrio em função da concentração de ácidos orgânicos de LMW e da potência de micro-ondas. As superfícies de resposta foram obtidas com o *software* Origin, convertendo os dados brutos em uma matriz de 100 x 100 utilizando o método *Random gridding* (Renka Cline).

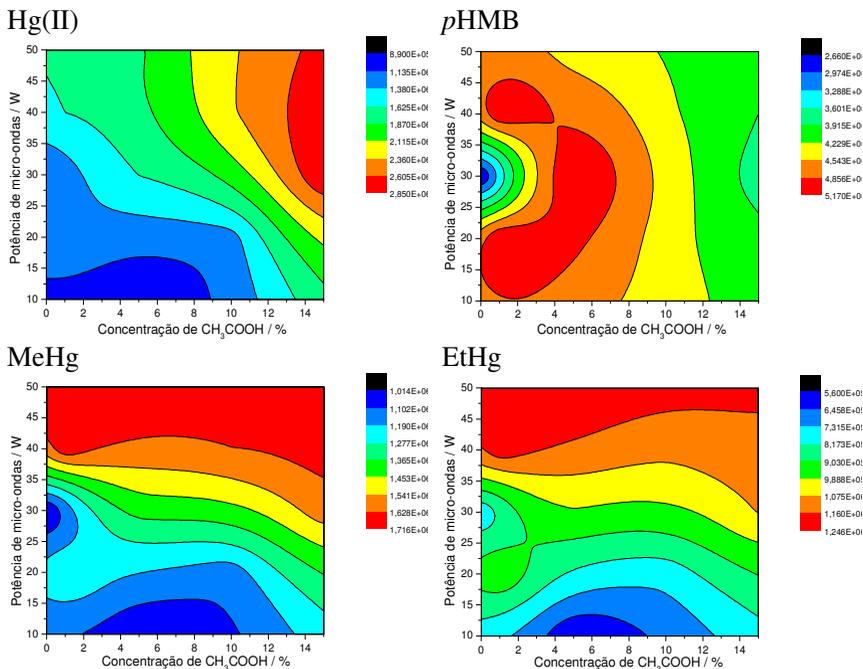
Em geral, observou-se que os sinais de fluorescência atômica para todas as espécies de mercúrio aumentaram com a adição de concentrações maiores de ácidos orgânicos e com o aumento da potência de micro-ondas. Esse resultado já era esperado, tendo em vista que, com o aumento da concentração dos ácidos orgânicos há também um aumento da população de radicais formados pela radiação UV e, certamente, a possibilidade de provocarem a foto-oxidação das espécies organometálicas de mercúrio e a formação de Hg⁰ é amplificada.

Figura 19. Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido fórmico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de pHMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido fórmico 5% v/v. Foram plotadas as áreas de picos dos sinais de FI.



A Figura 19 mostrou que a concentração de ácido fórmico acima de 6% v/v é satisfatória para a geração fotoquímica de vapor das espécies de Hg. Porém, os desvios padrões obtidos para as medidas com concentrações de 6% v/v de ácido fórmico foi maior que 10%. Por isso, optou-se por utilizar a concentração de 10% v/v para o ácido fórmico onde valores de desvios padrões inferiores a 3% foram obtidos.

Figura 20. Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido acético ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *p*HMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido acético 5% v/v.

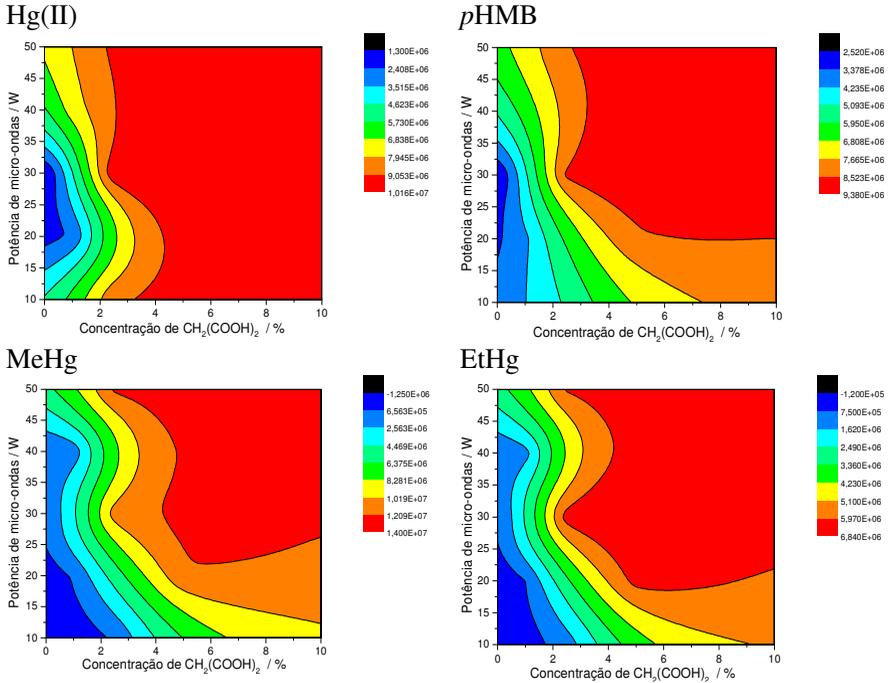


A investigação quanto ao uso de ácido acético, cujos resultados são mostrados na Figura 20, permitiu observar que neste meio foi obtida a menor sensibilidade para todas as espécies dentre os ácidos orgânicos testados. A baixa sensibilidade obtida utilizando o ácido acético pode ser devida a uma quantidade insuficiente de radicais produzidos durante o processo de PVG, que não conseguem promover uma geração fotoquímica eficiente para as espécies de mercúrio. Com isto, os sinais foram mais pronunciados com a adoção de potências de MW maiores, que auxiliariam na degradação dos compostos organometálicos de Hg, com subsequente formação de átomos livres em fase gasosa. É importante lembrar que as medidas estão baseadas em Hg livre, ou seja, é necessário romper as ligações Hg-C sob as condições reacionais de

PVG [10]. Portanto, a baixa eficiência de um determinado ácido orgânico pode ser decorrente da quebra ineficiente do composto em fase condensada.

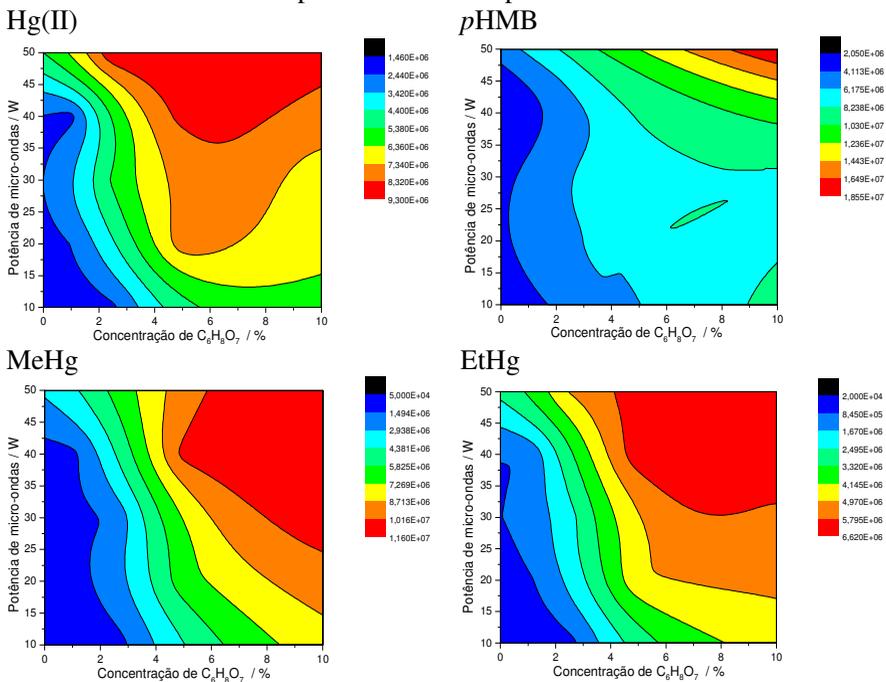
A Figura 21 mostra os resultados da otimização da concentração do ácido malônico combinada à potência de micro-ondas. Assim como para os demais ácidos, a concentração de ácido malônico e o aumento da potência de micro-ondas também foram parâmetros importantes. Concentrações superiores a 4% v/v favoreceram a formação das espécies de Hg^0 e potências de micro-ondas acima de 20 W são desejáveis para uma geração fotoquímica de Hg^0 eficiente. Por isso, para as etapas subsequentes foram utilizados 30 W de potência de micro-ondas e concentração de 5% v/v de ácido malônico. A concentração de ácido orgânico continua sendo o parâmetro mais importante, mesmo para potências de micro-ondas de 50 W.

Figura 21. Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido malônico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *p*HMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido malônico 5% m/v. Foram plotadas a área de picos dos sinais de FI.



Na Figura 22 é apresentado o comportamento do sinal analítico obtido por FI-AFS para a otimização da concentração de ácido cítrico e potência de micro-ondas.

Figura 22. Superfícies de resposta relacionando a potência de MW e a concentração de ácido cítrico ao sinal obtido por FI-AFS (volume injetado 50 μL) para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hg(II), 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *p*HMB, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EtHg preparados em ácido cítrico 5% m/v. Foram plotadas a área de picos dos sinais de FI.

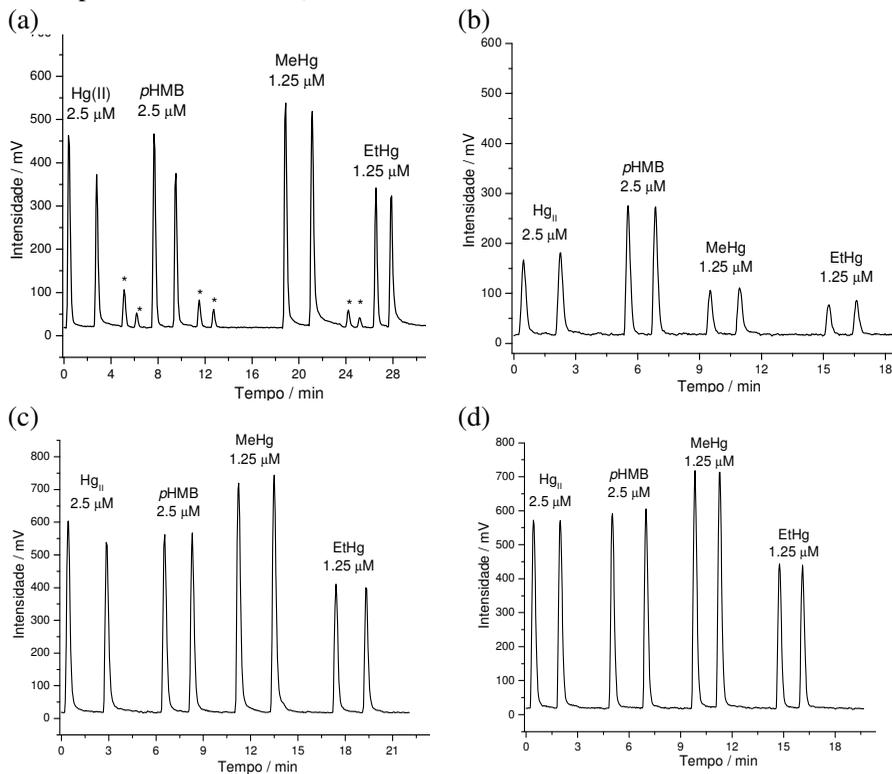


Assim como para os demais ácidos, uma tendência observada nessas otimizações foi o aumento dos sinais de fluorescência atômica para praticamente todas as espécies de mercúrio com a adição de concentrações maiores de ácidos orgânicos e com o aumento da potência de micro-ondas. A única exceção é apresentada pela espécie *p*HMB, tal qual observado com uso de ácido acético. Os mecanismos para a foto-oxidação e foto-geração das espécies voláteis do mercúrio ainda são desconhecidos, sendo assim, há apenas suposições de que esse efeito anômalo para a espécie *p*HMB em ácido acético e cítrico seja devido à diferença de estrutura dos substratos que contêm mercúrio na molécula e às interações com os dois ácidos supracitados. De fato, na molécula de

*p*HMB o Hg liga-se covalentemente ao carbono pertencente ao núcleo aromático e a um grupo hidroxila, o que lhe confere estabilidade adicional.

A Figura 23 mostra os sinais específicos de mercúrio obtidos por FI-AFS com adoção das condições otimizadas (concentração de ácido orgânico e potência de micro-ondas) para os quatro ácidos orgânicos de LMW. Os sinais específicos de mercúrio mais elevados foram obtidos para os ácidos fórmico (10% v/v), cítrico (5% v/v) e malônico (5% v/v), enquanto que as áreas de pico de fluorescência atômica obtidas na presença de ácido acético apresentaram as mais baixas intensidades.

Figura 23. Sinais para as espécies de mercúrio obtidas por FI nas condições otimizadas para cada ácido LMW (volume de injeção 50 μ L): (a) ácido fórmico a 10% v/v e 30 W (b) de ácido acético a 10% v/v e 40 W (c), ácido malônico 5% m/v e 30 W (d), ácido cítrico 5% m/v e 40 W (picos com asteriscos correspondem a sinais obtidos na etapa de limpeza com *L*-cisteína).

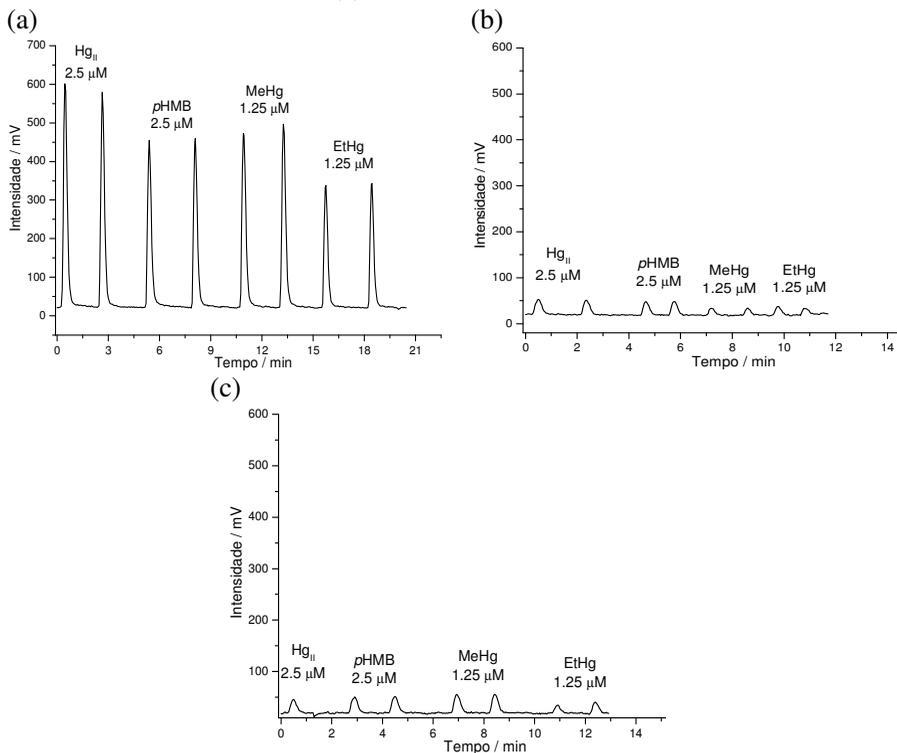


Os resultados até aqui descritos referem-se somente à utilização de ácidos orgânicos a 3 mL min⁻¹ por injeção em fluxo. No entanto, como o objetivo final do estudo era a especiação de Hg utilizando a técnica de HPLC para a separação das espécies, uma fase móvel foi adicionada ao sistema de FI para avaliar a influência da interação do ácido orgânico com a fase móvel de HPLC sobre os sinais de fluorescência atômica. Foi identificado que, embora com ácidos

malônico e cítrico a intensidade do sinal para todas as espécies tenha sido elevada, como observa-se na Figura 23, quando eles foram adicionados a uma fase móvel que simula uma análise por HPLC (1% metanol, 5 mmol L⁻¹ de *L*-cisteína, 0,15 mol L⁻¹ de NaClO₄ à 2 mL min⁻¹) os sinais de fluorescência atômica decresceram para todas as espécies conforme mostrado na Figura 24. Portanto, para os experimentos seguintes foram adotadas as seguintes condições de compromisso: 10% v/v ácido fórmico, 30 W para a potência de microondas e 3 mL min⁻¹ para vazão de amostra.

Observou-se que um tempo de irradiação de 20 s no reator MW/UV era suficiente para obter sinais satisfatórios para todas as espécies de mercúrio sem desperdício de reagentes e o tempo para a análise (aproximadamente 13 min) foi principalmente limitado pelo tempo necessário para a separação cromatográfica.

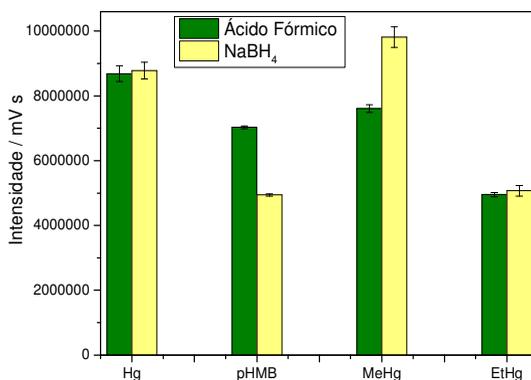
Figura 24. Sinais obtidos por FI-AFS (volume de injeção 50 μL) para Hg(II) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $p\text{HMB}$ 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MeHg 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e EtHg 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparados em ácido fórmico 10% v/v (a), ácido malônico 5% m/v (b) e ácido cítrico 5% m/v (c), injetado na fase móvel: metanol 1%, ácido fórmico 1%, 5 mmol L^{-1} de L -cisteína, 0,15 mol L^{-1} de NaClO_4 a 2 mL min^{-1} ; adicionado com (a) ácido fórmico 30% v/v, (b) ácido malônico 15% m/v, (c) ácido cítrico 15% m/v em 1 mL min^{-1} .



Períodos de irradiação inferiores a 20 s não conduziram a melhorias significativas na intensidade do sinal. O efeito do tempo de irradiação não foi avaliado além de 20 s, porque a adoção de vazões inferiores a 3 mL min^{-1} resultou em um aquecimento da solução de amostra no reator de MW/UV e sinais alargados foram observados e longo tempo de análise foi necessários. A Figura 25 mostra a comparação dos sinais de FI-AFS obtidos para as espécies de mercúrio,

analisados usando ácido fórmico a 10% para PVG (método proposto) e CVG com THB (método de referência).

Figura 25. Comparação do sinal em área de pico por FI-AFS (volume de injeção 50 μL) das espécies de mercúrio analisadas utilizando ácido fórmico por PVG (antes das condições otimizadas) e o sinal obtido por CVG com NaBH_4 , para 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II) , 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $p\text{HMB}$, 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MeHg e 1,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EtHg preparados em ácido fórmico 15% v/v. Fase eluente: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, L-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 0,15 mol L^{-1} .



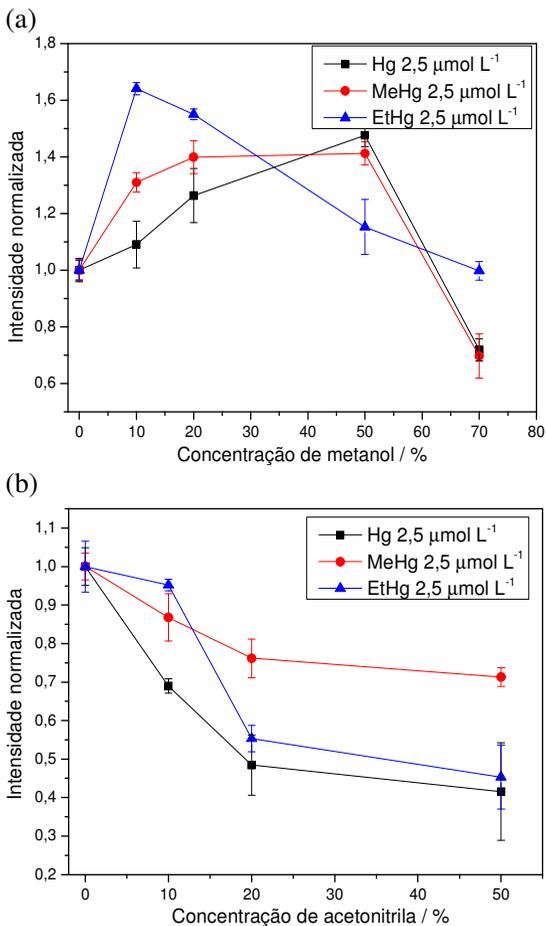
Como o uso direto de ácido fórmico a 10% v/v na coluna cromatográfica deve ser evitado, foi mantida uma vazão de 2 mL min^{-1} para a fase eluente e para a injeção da amostra na coluna cromatográfica. Foi adicionada, então, uma segunda bomba peristáltica antes do reator MW/UV que injetava ácido fórmico a 30% v/v com vazão de 1 mL min^{-1} . Assim, com o uso combinado da bomba de HPLC e bomba peristáltica foi obtida uma vazão global de aproximadamente 3 mL min^{-1} de ácido fórmico a 10% v/v na entrada do reator.

9.2. Avaliação da fase móvel em HPLC

Foram conduzidos testes para a composição da fase móvel para a análise por HPLC utilizando os solventes acetonitrila e metanol como eluentes na pré-coluna cromatográfica de fase reversa. A Figura 26 mostra os resultados das otimizações da concentração de metanol e

acetonitrila adicionadas na fase móvel utilizando a pré-coluna e injeção em fluxo.

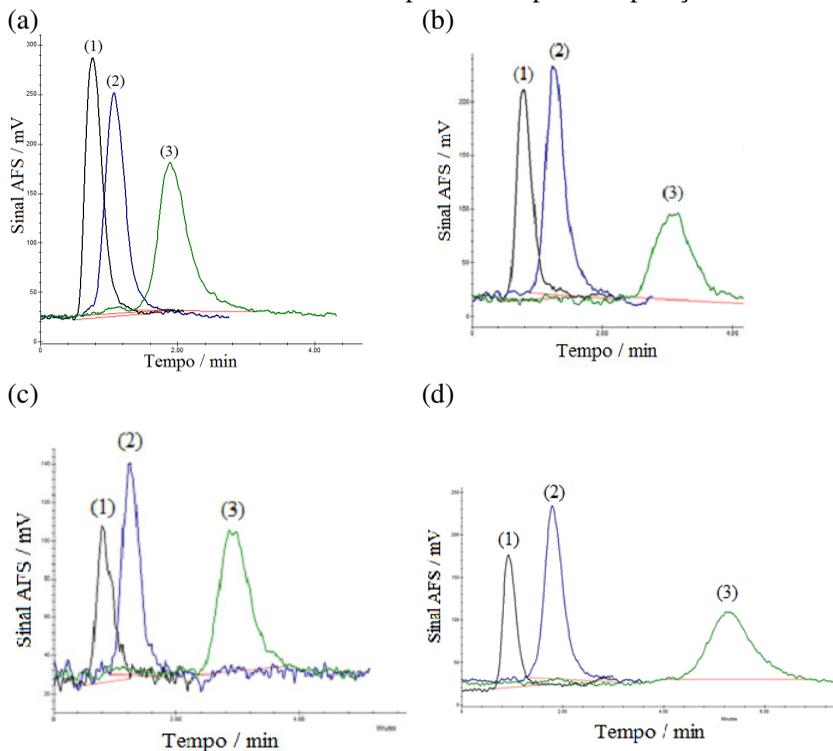
Figura 26. Comparação do sinal em área de pico normalizada (volume de injeção 50 μL) para Hg(II) 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MeHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e EtHg 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparados em ácido fórmico 10% v/v, utilizando ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} e fase eluente: metanol (a) e acetonitrila (b) em ácido fórmico 1% v/v e *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} .



Comparado com a acetonitrila, o metanol proporcionou uma melhoria na intensidade do sinal e uma melhor separação de todas as espécies de mercúrio. Assim, para os estudos preliminares, as separações foram conduzidas utilizando uma pré-coluna e apenas 1% v/v de MeOH como fase móvel era suficiente para se obter a separação.

Uma vez que a coluna utilizada neste trabalho é uma coluna de modo misto, a qual exibe ambas as características de fase reversa e troca aniônica, testaram-se os efeitos de três sais ($0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$) na separação dos analitos. A Figura 27 mostra a separação obtida com os diferentes sais utilizando somente a pré-coluna para a separação.

Figura 27. Comparação do sinal de FI com uma microchama Ar/H₂ (volume de injeção 50 μ L) para (1) Hg(II) 2,5 μ mol L⁻¹, (2) MeHg 2,5 μ mol L⁻¹ e (3) EtHg 2,5 μ mol L⁻¹, preparados em ácido fórmico 10% v/v, utilizando ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min⁻¹ e fase eluente no HPLC: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, *L*-cisteína 5 mmol L⁻¹ sem adição de sal (a), com 0,15 mol L⁻¹ NaCl (b), com 0,15 mol L⁻¹ KCl (c) e com 0,15 mol L⁻¹ NaClO₄ (d) adicionados na fase eluente e utilizando somente a pré-coluna para a separação.

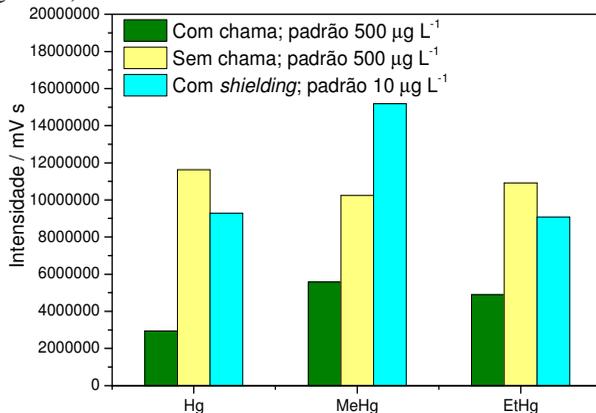


Com 0,15 mol L⁻¹ de NaCl e 0,15 mol L⁻¹ de KCl os sinais de fluorescência atômica decresceram para todas as espécies, o que pode ser atribuído a ação oxidante do cloreto. Enquanto com 0,15 mol L⁻¹ de NaClO₄ as intensidades dos sinais de fluorescência atômica para as espécies não mudaram significativamente, mas uma melhor separação

foi obtida. Dessa forma, a fase móvel foi preparada com 1% v/v de metanol, ácido fórmico a 1% v/v, 5 mmol L⁻¹ de *L*-cisteína, 0,15 mol L⁻¹ de NaClO₄ quando utilizado somente a pré-coluna. Para as soluções contendo os padrões de mercúrio utilizando a pré-coluna foi observado uma excelente separação das espécies, porém, quando foram adicionadas as soluções de amostras na pré-coluna não foi observado uma boa separação das espécies. Assim, foi realizada a remoção da pré-coluna e o emprego da coluna cromatográfica fez-se necessário. Nesse caso, 10% v/v de MeOH como fase móvel foi imprescindível para a separação de Hg(II), MeHg e EtHg na coluna cromatográfica e para se alcançar um tempo razoável de separação das espécies (13 min). A fase eluente utilizada para a separação através da coluna cromatográfica foi 10% v/v de metanol, ácido fórmico a 1% v/v, 5 mmol L⁻¹ de *L*-cisteína, 0,15 mol L⁻¹ de NaClO₄ para aplicação do método utilizando somente a coluna. A *L*-cisteína é necessária para obter picos cromatográficos estreitos e para evitar a adsorção de mercúrio na fase estacionária cromatográfica, evitando o efeito de memória.

Experimentos adicionais foram realizados por FI-AFS na ausência da microchama de Ar/H₂, e os sinais de fluorescência atômica aumentaram para todas as espécies. A área do pico com a microchama foi cerca de 50% menor em relação à área do pico obtido sem chama (o mesmo atomizador, porém sem chama). Acredita-se que este fato é decorrente do efeito de *quenching* das espécies moleculares presentes na microchama. O efeito de *quenching* é a transferência de energia, por processo não-radiativo, do analito no estado excitado para outras espécies moleculares. Assim, para aumentar a sensibilidade do método foi extinta a atomização em chama e substituída por uma vazão de argônio (*shielding*) de 850 mL min⁻¹ de modo a blindar a célula e para evitar o efeito de *quenching* sobre o sinal de fluorescência atômica para o mercúrio provocado pelos gases atmosféricos, tais como H₂, O₂ e N₂, na zona da célula de fluorescência atômica. Os resultados indicaram que as melhorias de sensibilidade estão na faixa de 40 a 70 vezes para as espécies de Hg avaliadas, como pode ser observado na Figura 28. Uma vez que com a presença do *shielding* os sinais de fluorescência atômica aumentaram para os analitos, as experiências subsequentes foram conduzidas sem chama e com 850 mL min⁻¹ de vazão de *shielding*.

Figura 28. Comparação do sinal em área de pico por FI-AFS (volume de injeção 200 μL) para as espécies de mercúrio obtidas utilizando HPLC-MW/UV com e sem a microchama Ar/H_2 (500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) , 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ EtHg) e com um fluxo de argônio 850 mL min^{-1} no *shielding* (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) , 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ MeHg e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ EtHg). Fase eluente: metanol 1%, ácido fórmico 1%, *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 0,15 mol L^{-1} (utilizando a pré-coluna) a 1 mL min^{-1} e 30% ácido fórmico à 1 mL min^{-1} (utilizando a bomba após a pré-coluna cromatográfica).



9.3. Identificação das espécies voláteis por GC-MS

A natureza das espécies voláteis formadas na presença de ácidos fórmico, acético, malônico e cítrico após processamento no sistema MW/UV foi investigada por GC-MS. Soluções contendo 5 mg L^{-1} de Hg(II) , MeHg e EtHg foram introduzidas por injeção em fluxo no reator e alíquotas de 4 mL foram recolhidas em um frasco imerso em banho de gelo na saída do reator MW/UV e analisadas por HS-GC-MS.

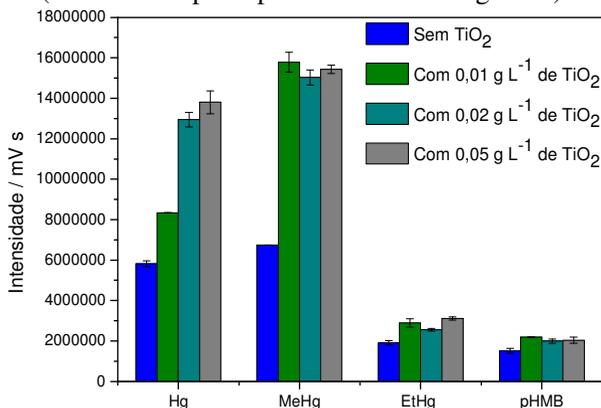
A análise por HS-GC-MS revelou que para todos os tipos de ácidos orgânicos há apenas uma espécie de mercúrio volátil no *headspace*, o que corresponde a Hg^0 . Isto ocorre, provavelmente, devido à capacidade da interface MW/UV em romper ligações Hg-C , o que resulta na ausência de espécies de mercúrio metilados ou alquilados nos produtos de reação da MW/UV-PVG.

9.4. Ação catalítica de nanopartículas de TiO_2

Alguns trabalhos na literatura relataram o uso de nanopartículas de TiO_2 como catalisadoras no processo de fotorredução de selênio e mercúrio [29, 43, 85, 92]. Neste trabalho verificou-se que a intensidade do sinal de fluorescência atômica para Hg é significativamente maior com o uso de TiO_2 , tanto para a análise de Hg(II), como para MeHg como compostos de partida.

Usando-se HPLC-MW/UV-PVG-AFS foram investigadas as mudanças no sinal de fluorescência atômica para Hg quando diferentes concentrações (0,01, 0,02 e 0,05 g L⁻¹ em água deionizada) de nano- TiO_2 foram adicionadas entre a saída da coluna de HPLC e a entrada do reator MW/UV utilizando uma segunda bomba peristáltica. A Figura 29 mostra a otimização das concentrações de TiO_2 para as espécies Hg(II), pHMB, MeHg e EtHg utilizando o sistema HPLC-MW/UV-AFS com *shielding* com uma vazão de argônio de 850 mL min⁻¹.

Figura 29. Efeito da concentração de TiO_2 no sinal obtido por HPLC-MW/UV-AFS para espécies de Hg usando *shielding* de 850 mL min^{-1} . Condições: $200 \mu\text{L}$ de Hg(II), MeHg, EtHg e *pHMB* todas espécies com concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ injetadas na fase eluente: metanol 1%, ácido fórmico 1%, L-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ à 2 mL min^{-1} (utilizando a pré-coluna) e ácido fórmico 30% à 1 mL min^{-1} (adicionado após a pré-coluna cromatográfica).



Observou-se que as intensidade dos sinais aumentaram significativamente com a adição de nano- TiO_2 para Hg(II) e MeHg (cerca de duas vezes), enquanto que apenas um aumento discreto na intensidade do sinal foi observado para EtHg e *pHMB*. Não há relatos deste efeito diferencial de ação de nano- TiO_2 para espécies de Hg submetidas à PVG.

Embora o uso de nano- TiO_2 tenha se mostrado vantajoso do ponto de vista da sensibilidade, as nanopartículas formam precipitados que resultam em depósitos na parede dos tubos que ligam a bomba com o reator de MW-UV, o que inibe, do ponto de vista prático, sua utilização. Soma-se a isto o fato que não houve melhorias significativas para as espécies menos sensíveis à detecção, como EtHg e *pHMB*, com o emprego de nano- TiO_2 . Assim, optou-se por não utilizar nano- TiO_2 para a determinação de mercúrio no presente trabalho.

9.5. Parâmetros de desempenho analítico

A Figura 30 mostra os cromatogramas de fase reversa obtidos para as espécies de Hg sob as condições otimizadas para soluções padrão de Hg(II), MeHg e EtHg e para materiais certificados de referência com e sem a adição de EtHg. Observa-se pela Figura 30 que o método proposto é apropriado para a separação e determinação de Hg(II), MeHg e EtHg nas amostras biológicas avaliadas.

Sob as condições experimentais otimizadas, o desempenho do método proposto foi avaliado e os parâmetros associados a esta avaliação estão expostos na Tabela 6.

As curvas de calibração foram obtidas através da análise em triplicata de soluções de Hg(II), MeHg e EtHg em ácido fórmico a 10% v/v no intervalo de 1-30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Hg(II) e MeHg e 3-30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EtHg.

Figura 30. Cromatogramas para 200 μL de solução contendo (a) Hg(II) $10 \mu\text{g L}^{-1}$, MeHg $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e EtHg $10 \mu\text{g L}^{-1}$, (b) 200 μL de solução da amostra DOLT-1 com adição de EtHg $3 \mu\text{g L}^{-1}$, (c) 200 μL de solução da amostra TORT-1 com adição de EtHg $3 \mu\text{g L}^{-1}$ e injetados na fase eluente: metanol 1% v/v, ácido fórmico 1% v/v, *L*-cisteína 5 mmol L^{-1} , NaClO_4 $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ a 2 mL min^{-1} (utilizando a coluna cromatográfica) e ácido fórmico 30% v/v a 1 mL min^{-1} (adicionado após a coluna cromatográfica).

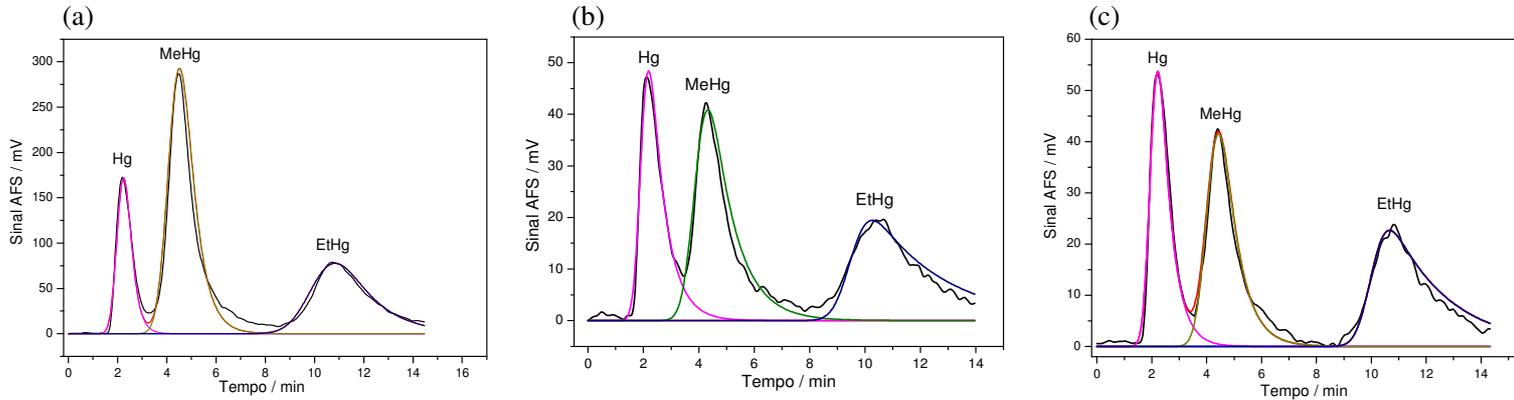


Tabela 6. Parâmetros de desempenho analítico obtidos para a determinação de Hg(II), MeHg e EtHg por HPLC-MW/UV-PVG-AFS.

	Hg(II)	MeHg	EtHg
Faixa de calibração / $\mu\text{g L}^{-1}$	1 - 30	1 - 30	3 - 30
Inclinação / $\text{mV s L } \mu\text{g}^{-1}$	$4,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$
R^2	0,9992	0,9991	0,9989
LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$ (ng g^{-1}) ^(*)	0,15 (7,5)	0,15 (7,5)	0,35 (17)
LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$ (ng g^{-1}) ^(*)	0,50 (25)	0,50 (25)	1,2 (58)
RSD / %			
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	3,8	3,6	7,7
5 $\mu\text{g L}^{-1}$	5,1	11	8,9

(*) LOD = 3 vezes a razão sinal-ruído (S/N) e LOQ = 10 vezes S/N, considerando a diluição da amostra.

0,5 g de amostra extraída, 25 mL volume final da solução de amostra, 200 μL volume injetado.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) referem-se à amostra sólida e foram calculados como a concentração correspondente a três e dez vezes a razão sinal-ruído (S/N) e considerando a diluição da amostra, respectivamente. O desempenho do método, em termos de LOD, pode ser comparado com trabalhos anteriores que utilizaram uma configuração experimental semelhante à utilizada neste trabalho [10]. Os valores de LOD obtidos neste estudo são cerca de duas a três vezes melhores que os obtidos com o CVG tradicional [93] e comparáveis com os obtidos com o procedimento MW/UV-CVG [10].

A precisão do método proposto foi calculada como o desvio-padrão relativo (RSD) de seis medidas a dois níveis de concentração, 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores obtidos variaram entre 3,6 e 11%, sendo considerados excelentes resultados considerando a complexidade do método.

A exatidão do método foi avaliada através dos valores certificados para Hg(II) e MeHg presentes em três materiais de referência, TORT-1, DORM-1 e DOLT-1, comparando os resultados obtidos e os valores certificados através de teste estatístico t-student com um limite de confiança de 95%. Os resultados são apresentados na Tabela 7 e mostram uma boa concordância com os valores certificados

de MeHg. As demais comparações são apenas informativas, pois na amostra certificada utilizada há apenas valores informados para Hg total e MeHg. Portanto, o mercúrio inorgânico não está certificado nos materiais de referência selecionados e a concentração de Hg(II) certificada é obtida por diferença entre Hg total e MeHg. O Hg total é certificado nos materiais de referência selecionados, mas não foi determinado neste trabalho por um procedimento independente; a comparação foi feita com a soma de Hg(II) e MeHg encontradas através do método proposto, e assumindo que a variância é igual à soma de Hg(II) e MeHg. O material de referência DORM-1 foi analisado utilizando apenas a pré-coluna de separação, pois devido a matriz da amostra e a alta pressão produzida dentro da coluna de separação não foi possível analisar utilizando a coluna de separação cromatográfica. Assim, foi obtida uma separação pouco adequada para essa amostra e, por isso, erros maiores obtidos para essa análise foram atribuídos a esse fator.

Os testes de recuperação foram realizados em duas amostras certificadas, TORT-1 e DOLT-1, analisadas antes e depois da adição de analito com concentrações conhecidas de Hg(II), MeHg e EtHg. Como a adição de analito foi realizada antes do preparo de amostra, foi possível verificar que tanto a matriz da amostra como o próprio preparo da amostra não alterou a identidade das espécies adicionadas. A Tabela 8 mostra as recuperações alcançadas, que estão no intervalo entre 87 e 110%.

Tabela 7. Resultados obtidos para a determinação de Hg(II) e MeHg em materiais de referência certificados (média \pm intervalo de confiança de 95%; n = 3).

	Espécie	Valor certificado / $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor determinado / $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor de t ^e
TORT-1 ^a	Hg	0,202 ^c	0,220 \pm 0,02	0,22
	MeHg	0,128 \pm 0,014	0,122 \pm 0,01	0,09
	Total	0,33 \pm 0,06	0,342 ^d	0,08
DOLT-1 ^a	Hg	0,145 ^c	0,150 \pm 0,07	0,03
	MeHg	0,080 \pm 0,011	0,085 \pm 0,03	0,05
	Total	0,225 \pm 0,037	0,235 ^d	0,09
DORM-1 ^b	Hg	0,067 ^c	0,097 \pm 0,03	0,30
	MeHg	0,731 \pm 0,06	0,619 \pm 0,09	0,79
	Total	0,798 \pm 0,074	0,716 ^d	0,52

^a Resultados obtidos com a coluna cromatográfica;

^b Resultados obtidos com a pré-coluna cromatográfica;

^c Diferença entre o Hg total e MeHg. Inorgânico Hg(II) não é certificado;

^d Soma das concentração de Hg(II) e MeHg determinadas por HPLC-MW/UV-PVG-AFS;

^e O valor crítico de |t| para as condições adotadas é 3,18.

Tabela 8. Resultados obtidos a partir dos testes de recuperação para a determinação de Hg(II), MeHg e EtHg em materiais de referência certificados (média \pm intervalo de confiança para 95%; n=3)

Amostras	Espécies	Valor Determinado $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor Recuperado	
			$\mu\text{g g}^{-1}$	%
TORT-1 ^a	Hg(II)	$0,49 \pm 0,03$	0,29	97
	MeHg	$0,39 \pm 0,01$	0,26	87
	EtHg	$0,33 \pm 0,04$	0,33	110
DOLT-1 ^b	Hg(II)	$0,65 \pm 0,07$	0,51	102
	MeHg	$0,57 \pm 0,01$	0,49	98
	EtHg	$0,52 \pm 0,09$	0,52	104

^a Valor adicionado na amostra para todas as espécies: $0,30 \mu\text{g g}^{-1}$

^b Valor adicionado na amostra para cada espécie: $0,50 \mu\text{g g}^{-1}$

10. CONCLUSÕES PARCIAIS

Foi desenvolvido um procedimento simples para a análise de especiação de mercúrio com base na hifenação da técnica de HPLC com a AFS através de uma interface MW-UV simples para a geração fotoquímica de vapor de mercúrio mostrou-se eficaz e bastante inovador frente as novas linhas de pesquisas que vem sendo desenvolvidas. A utilização do ácido fórmico aliado a radiação proveniente da interface MW/UV para a geração fotoquímica de Hg^0 mostraram-se essenciais e as condições ótimas foram alcançadas através de um planejamento fatorial e ponto central. Compostos organometálicos de mercúrio e mercúrio na forma inorgânica foram separados eficientemente por HPLC e foram convertidos para Hg^0 sob a ação combinada de MW e irradiação UV, e na presença de ácido fórmico. A ação catalítica de nanopartículas de TiO_2 no processo de geração fotoquímica de vapor para as espécies Hg e MeHg forneceram maiores sinais de intensidade, no entanto, para as espécies EtHg e $p\text{HMB}$ não gerou aumento nos sinais de fluorescência atômica. Problemas de deposição das nanopartículas de TiO_2 prejudicou a análise e por esse fator foi evitado o uso do mesmo. A *L*-cisteína na fase móvel foi importante para evitar o efeito de memória, formando complexos com o Hg remanescente no sistema. Assim, o reator MW/UV substitui eficazmente o sistema de tetrahidroborato convencional e representa uma alternativa interessante em termos de custo-benefício e ambientalmente correta para a determinação e especiação de mercúrio orgânico.

11. CONCLUSÕES GERAIS

As metodologias desenvolvidas para a determinação de elementos-traço em amostras complexas utilizando diferentes técnicas acopladas à PVG mostraram ser adequadas, apresentando excelentes limites de detecção e boa exatidão. O procedimento de preparo de amostras proposto, exigindo apenas a diluição da amostra com ácidos orgânicos, é de fácil execução e possui uma abordagem ambientalmente correta quando comparado à digestão ácida, por exemplo. O preparo de amostras não exige nenhum equipamento extra, além de um sistema para sonicação para amostras biológicas, permitindo elevada frequência analítica dependendo apenas do tamanho do sistema de ultrassom. O procedimento proposto resulta em menor consumo de reagente, que pode ser obtido em elevado grau de pureza, reduzindo as possibilidades de perdas e contaminação da amostra. Em suma, pode-se afirmar que a PVG é uma técnica potencialmente promissora, não somente para a determinação dos elementos tipicamente investigados por CVG convencional, como para a determinação de metais de transição, podendo ser expandida para outros elementos de transição.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHASTEEN, T.G.; BENTLEY, R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* 2003, 103, 1–25.
- [2] WU, P.; HE, L.; ZHENG, C.; HOU, X.; STURGEON, R.E. Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25, 1217–1246.
- [3] STURGEON, R.E.; MESTER, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives. *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 202A–213A.
- [4] FENG, Y.L.; STURGEON, R.E.; LAM, J.W. Chemical vapor generation characteristics of transition and noble metals reacting with tetrahydroborate(III). *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18, 1435–1442.
- [5] LU, Y.K.; SUN, H.W.; YUAN, C.G.; YAN, X.P. Simultaneous Determination of Trace Cadmium and Arsenic in Biological Samples by Hydride Generation-Double Channel Atomic Fluorescence Spectrometry. *Anal. Chem.* 2002, 74, 1525–1529.
- [6] QIU, D.R. Recent advances in fundamental studies of hydride generation. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1995, 14, 76–82.
- [7] SILVA, C.S.; ORESTE, E.Q.; NUNES, A.M.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S. Determination of mercury in ethanol biofuel by photochemical vapor generation, *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27, 689–694.
- [8] RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; WILLIE, S.; STURGEON, R. E. Ultrasound-assisted vapor generation of mercury. *Anal Bioanal Chem.* 2007, 388, 849–857.
- [9] GIL, S.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-promoted cold vapor generation in the presence of formic acid for determination of mercury by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6260–6264.

[10] ANGELI, V.; FERRARI, C.; LONGO, I.; ONOR, M.; D'ULIVO, A.; BRAMANTI, E. Microwave-assisted photochemical reactor for the online oxidative decomposition and determination of p-hydroxymercurybenzoate and Its thiolic complexes by cold vapor generation atomic fluorescence detection. *Anal. Chem.* 2011, 83, 338–343.

[11] WU, L.; LONG, Z.; LIU, L.; ZHOU, Q.; LEE, Y.; ZHENG, C. Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 2012, 94, 146–151.

[12] DONARD, O.F.X.; RITSEMA, R.; LAANE. R.W.P.M. Butyltins in marine waters of the netherlands in 1988 and 1989: concentrations and effects. *Mar. Environ. Res.* 1991, 32, 243–260.

[13] MICHALKE, K.; WICKENHEISER, E.B.; MEHRING, M.; HIRNER, A.V.; HENSEL, R. Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2791.

[14] BENTLEY, R.; CHASTEEN. T.G. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2002, 66, 250–271.

[15] YIN, Y.; QIU, J.; YANG, L.; WANG, Q. A new vapor generation system for mercury species based on the UV irradiation of mercaptoethanol used in the determination of total and methyl mercury in environmental and biological samples by atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 831–836.

[16] VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S.; CURTIUS, A.J.; STURGEON, R.E. Determination of total Mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation, *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 837–847.

- [17] LABORDA, F.; BOLEA, E.; BRANGUAN, M.T.; CASTILLO, J.R. Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over? *Spectrochim. Acta B*. 2002, 57, 797-802.
- [18] ROBBINS, W.B.; CARUSO, J.A. Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis. *Anal. Chem.* 1979, 51, A889.
- [19] D'ULIVO, A.; ONOR, M.; PITZALIS, E. Role of hydroboron intermediates in the mechanism of chemical vapor generation in strongly acidic media. *Anal. Chem.* 2004, 76, 6342-6352.
- [20] D'ULIVO, A. Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media. A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochim. Acta B*. 2004, 59, 793– 825.
- [21] D'ULIVO, A.; MESTER, Z.; STURGEON, R.E. The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. *Spectrochim. Acta B*, 2005, 60, 423 – 438.
- [22] STURGEON, R.E.; GUO, X.; MESTER, Z. Chemical vapor generation: are further advances yet possible? *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 4, 881-883.
- [23] MILLS, A.; HUNTE, S.L. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photoch. Photobio. A*. 1997, 108, 1–35.
- [24] Frank, S.N.; Bard, A.J. Heterogeneous photocatalytic oxidation of cyanide and sulfite in aqueous solutions at semiconductor powders. *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 1484–1488.

- [25] AKAGI, H.; FUJITA, Y.; TAKABATAKE, E. Photochemical transformation of mercuric sulfide into methylmercury in aqueous solution. *Chem. Lett.* 1976, 5, 1-4.
- [26] CANÁRIO, J.; VALE, C. Rapid release of mercury from intertidal sediments exposed to solar radiation: a field experiment. *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 14, 3901–3907.
- [27] ZHENG, C.; MA, Q.; WU, L.; HOU, X.; STURGEON, R.E. UV photochemical vapor generation–atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation element. *Microchem. J.* 2010, 95, 32–37.
- [28] GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOSWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Anal. Chem. Acta*, 1996, 325, 111-133.
- [29] GUO, X.M.; STURGEON, R.E.; MESTER, Z.; GARDNER, G.J. UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 2003, 75, 2092-2099.
- [30] GUO, X.M.; STURGEON, R.E.; MESTER, Z.; GARDENER, G.K. Photochemical alkylation of inorganic selenium in the presence of low molecular weight organic acids. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 5645–5650.
- [31] STURGEON, R.E.; GRINBERG, P. Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation. *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27, 22–231.
- [32] ZHANG, H. Photochemical redox reactions of mercury. *Struct. Bond.* 2006, 120, 37-79.
- [33] TRUESDALE, V.W. On the feasibility of some photochemical reactions of iodide in seawater. *Mar. Chem.* 2007, 104, 266–281.

- [34] SANTOS, E.J. DOS; HERRMANN, A.B.; SANTOS, A.B. DOS; BAIKA, L.M.; SATO, C.S.; TORMEN, L.; STURGEON, R.E.; CURTIUS, A.J. Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 1627-1632.
- [35] ZHENG, C.B.; STURGEON, R.E.; BROPHY, C.; HOU, X.D. Versatile thin-film reactor for photochemical vapor generation. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 3086-3093.
- [36] NÓBREGA, J.A.; STURGEON, R.E.; GRINBERG, P.; GARDNER, G.J.; BROPHY, C.S.; GARCIA, E.E. UV photochemical generation of volatile cadmium species. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 2519-2523.
- [37] ZHENG, C.; YANG, L.; STURGEON, R.E.; HOU, X. UV photochemical vapor generation sample introduction for determination of Ni, Fe, and Se in biological tissue by isotope dilution ICP-MS. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 3899-3904.
- [38] GRINBERG, P.; STURGEON, R. E. Ultra-trace determination of iodine in sediments and biological material using UV photochemical generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 2009, 64, 235-241.
- [39] DENG, H.; ZHENG, C.; LIU, L.; WU, L.; HOU, X.; LV, Y. Photochemical vapor generation of carbonyl for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of cobalt. *Microchem. J.*, 2010, 96, 277-282.
- [40] LIANG, J.; WANG, Q.; HUANG, B. Electrochemical vapor generation of selenium species after online photolysis and reduction by UV-irradiation under nano TiO₂ photocatalysis and its application to selenium speciation by HPLC coupled with atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 366-372.

- [41] EBDON, L.; EVANS, E.H.; FISHER, A.S.; HILL, S.J. An introduction to analytical atomic spectrometry. John Wiley & Sons. 1998, 137-141.
- [42] THOMAS, R. Practical guide to ICP-MS. New York, Marcel Dekker Inc., 2004.
- [43] SUN, Y.C.; CHANG, Y.C.; SU, C.K. On-Line HPLC-UV/Nano-TiO₂-ICPMS system for the determination of inorganic selenium species. *Anal. Chem.* 2006, 78, 2640–2645.
- [44] GRINBERG, P.; STURGEON, R.E. Photochemical vapor generation of iodine for detection by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2009, 24, 508–514.
- [45] GAO, Y.; SHI, Z.; ZONG, Q.; WU, P.; SU, J.; LIU, R. Direct determination of mercury in cosmetic samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after dissolution with formic acid. *Anal. Chim. Acta.* 2014, 812, 6–11.
- [46] GREENFIELD, S. Atomic fluorescence spectrometry: progress and future prospects, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 1995, 14, 435-442.
- [47] GREENFIELD, S. Inductively coupled plasma in atomic fluorescence spectrometry - A Review. *J. Anal. Atomic Spectrom.* 1994, 9, 565-592.
- [48] BRATZEL JR., M.P.; DAGNALL, R.M.; WINEFORDNER, J.D. Evaluation of premixed flames produced using a total consumption nebulizer burner in atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chem.* 1969, 41, 1527–1535.
- [49] MONTASER, A.; FASSEL, V.A. Inductively coupled plasmas as atomization cells for atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chem.* 1976, 48, 1490–1499.

[50] STURGEON, R.E.; MESTER, Z. Analytical applications of volatile metal derivatives, *Appl. Spectrosc.* 2002, 56, 202A–213A.

[51] ZHENG, C.; MA, Q.; WU, L.; HOU, X. R.E. Sturgeon. UV photochemical vapor generation–atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation element. *Microchem. J.* 2010, 95, 32–37.

[52] HAN, C.; ZHENG, C.; WANG, J.; CHENG, G.; LV, Y.; HOU, X. Photo-induced cold vapor generation with low molecular weight alcohol, aldehyde, or carboxylic acid for atomic fluorescence spectrometric determination of mercury. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 825–830.

[53] LIU, Q. Direct determination of mercury in white vinegar by matrix assisted photochemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry detection. *Spectrochim. Acta B*, 2010, 65, 587–590.

[54] ZHENG, C.; LI, Y.; HE, Y.; MA, Q; HOU, X. Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water. *J. Anal. At. Spectrom.* 2005, 20, 746-750.

[55] GUO, X.; STURGEON, R.E.; MESTER, Z.; GARDNER, G.J. Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry. *Anal. Chem.* 2004, 76, 2401-2405.

[56] ZENG, Y.; ZHENG, C.; HOU, X.; WANG, S. Photochemical vapor generation for removing nickel impurities from carbon nanotubes and its real-time monitoring by atomic fluorescence spectrometry. *Microchem. J.* 2014, 117, 83–88.

[57] HE, Y.; HOU, X.; ZHENG, C.; STURGEON, R.E. Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 769-774.

- [58] ZHENG, C.; STURGEON, R.E.; BROPHY, C.S.; HE, S.; HOU, X. High-yield UV-photochemical vapor generation of iron for sample introduction with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82, 2996–3001.
- [59] GRINBERG, P.; STURGEON, R.E.; GARDNER, G. Identification of volatile iron species generated by UV photolysis. *Microchem. J.* 2012, 105, 44–47.
- [60] MADDEN, J.T.; FITZGERALD, N. Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. *Spectrochim. Acta B.* 2009, 64, 925–927.
- [61] JESUS, A.; STURGEON, R.E.; LIU, J.; SILVA, M.M. Determination of mercury in gasoline by photochemical vapor generation coupled to graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* 117, 100–105.
- [62] JESUS, A.; ZMOZINSKI, A.V.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S.; SILVA, M.M. Determination of mercury in naphtha and petroleum condensate by photochemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* 2013, 110, 227–232.
- [63] MILLOS, J.; RODRÍGUEZ, M.C.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, 2009, 77, 1490-1496.
- [64] MAZZARINO, M.; RIGGI, S.; TORRE, X.; BOTRÈ, F. Speeding up the process urine sample pre-treatment: Some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping Field. *Talanta*, 2010, 81, 1264-1272.

- [65] ZACHARIADIS, G.A.; ROSENBERG, E. Determination of butyl- and phenyltin compounds in human urine by HS-SPME after derivatization with tetraethylborate and subsequent determination by capillary GC with microwave-induced plasma atomic emission and mass spectrometric detection. *Talanta*, 2009, 78, 570-576.
- [66] BARIN, J.S.; PEREIRA, J.S.F.; MELLO, P.A.; KNORR, C.L.; MORAES, D.P.; MESKO, M.F.; NÓBREGA, J.A.; KORN, M.G.A.; FLORES, E.M.M. Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. *Talanta*, 2012, 94, 308-314.
- [67] GRINDLAY, G.; GRAS, L.; MONTIEL, J.; HERNANDIS, V.; MORA, J. Design and evaluation of a new fully microwave-assisted liquid sample introduction device for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, 25, 519–525.
- [68] BANIK, B.K.; BARAKAT, K.J.; WAGLE, D.R.; MANHAS, M.S.; BOSE, A.K. Microwave-assisted rapid and simplified hydrogenation. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 5746–5753.
- [69] FERRARI, C.; LONGO, I.; TOMBARI, E.; BRAMANTI, E. A novel microwave photochemical reactor for the oxidative decomposition of Acid Orange 7 azo dye by MW/UV/H₂O₂ process. *J. Photoch. Photobio. A.* 2009, 204, 115–121.
- [70] CAMPANELLA, B.; ONOR, M.; MASCHERPA, M.C.; D'ULIVO, A.; FERRARI, C.; BRAMANTI, E. Determination of thiomersal by flow injection coupled with microwave-assisted photochemical online oxidative decomposition of organic mercury and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 804, 66-69.
- [71] GIL, S.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-promoted cold vapor generation in the presence of formic acid for determination of mercury by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 2006, 78, 6260-6264.

- [72] SNYDER, H.R.; ANDERSON, G.K. Effect of air and oxygen content on the dielectric barrier discharge decomposition of chlorobenzene. *IEEE T. Plasma Sci.* 1998, 26, 1695–1699.
- [73] ZHU, Z.; ZHANG, S.; XUE, J.; ZHANG, X. Application of atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma for the determination of Se, Sb and Sn with atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta B.* 2006, 61, 916–92.
- [74] WU, X.; YANG, W.; LIU, M.; HOU, X.; ZHENG, C. Vapor generation in dielectric barrier discharge for sensitive detection of mercury by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26, 1204-1209.
- [75] HAVERKAMP, R.G.; MILLER, B.B. Ozone production in a high frequency dielectric barrier discharge generator Ozone: *Sci. Eng.* 2002, 24, 321–328.
- [76] ZHU, Z.L.; ZHANG, S.C.; LV, Y.; ZHANG, X.R. Atomization of hydride with a low-temperature, atmospheric pressure dielectric barrier discharge and its application to arsenic speciation with atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 2006, 78, 865–872.
- [77] YU, Y.L.; DU, Z.; CHEN, M.L.; WANG, J.H. A miniature lab-on-valve atomic fluorescence spectrometer integrating a dielectric barrier discharge atomizer demonstrated for arsenic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23, 493-499.
- [78] HE, H.; ZHU, Z.; ZHENG, H.; XIAO, Q.; JIN, L.; HU, S. Dielectric barrier discharge micro-plasma emission source for the determination of thimerosal in vaccines by photochemical vapor generation. *Microchem. J.* 2012, 104, 7–11.
- [79] NA, N.; ZHAO, M.X.; ZHANG, S.C.; YANG, C.D.; ZHANG, X.R. Development of a dielectric barrier discharge ion source for

ambient mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 1859–1862.

[80] ZHANG, W.; SU, Z.; CHU, X.; YANG, X. Evaluation of a new electrolytic cold vapor generation system for mercury determination by AFS. *Talanta.* 2010, 80, 2106-2112.

[81] CERVENY, V.; RYCHLOVSKY, P.; NETOLICKA, J.; SIMA, J. Electrochemical generation of mercury cold vapour and its in-situ trapping in gold-covered graphite tube atomizers. *Spectrochim. Acta B.* 2007, 62, 317–323.

[82] ZAVAR, M.H.A.; ROUNAGHI, G.H.; CHAMSAZ, M.; MASROURNIA, M. Determination of mercury(II) ion by electrochemical cold vapor generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Sci.* 2003, 19, 743–746.

[83] GUO, X.; STURGEON, R.E.; MESTER, Z.; GARDNER, G.J. UV light-mediated alkylation of inorganic selenium, *Appl. Organometal. Chem.* 2003, 17, 575–579.

[84] SUZUKI, K.; TANIGUCHI, Y.; WATANABE, T. The effect of pressure on the dimerization of carboxylic acids in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A.* 1973, 77, 1918-1922.

[85] ZHENG, C.; WU, L.; MA, Q.; LV, Y.; HOU, X. Temperature and nano-TiO₂ controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation, *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23, 514–520.

[86] ZHENG, C.; STURGEON, R. E.; HOU, X. UV photochemical vapor generation and in situ preconcentration for determination of ultra-trace nickel by flow injection graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 2009, 24, 1452–1458.

- [87] GUO, X.; STURGEON, R. E.; MESTER, Z.; GARDNER, G. UV photosynthesis of nickel carbonyl. *Appl. Organometal. Chem.* 2004, 18, 205–211
- [88] GRINBERG, P.; MESTER, Z.; STURGEON, R. E.; FERRETTI, A. Generation of volatile cobalt species by UV photoreduction and their tentative identification. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23, 583–587.
- [89] RYAN F.; BENDL, J. T.; MADDEN, A. L.; REGAN, N. F. Mercury determination by cold vapor atomic absorption spectrometry utilizing UV photoreduction. *Talanta.* 2006, 68, 1366–1370.
- [90] GOIS, J.S. DE; MARANHÃO, T.A.; OLIVEIRA, F.J.S.; FRESCURA, V.L.A.; CURTIUS, A.J.; BORGES, D.L.G. Analytical evaluation of nebulizers for the introduction of acetic acid extracts aiming at the determination of trace elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B.* 2012, 77, 35–43.
- [91] CHEN, C.S.; JIANG, S.J. Determination of As, Sb, Bi and Hg in water samples by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry with an in-situ nebulizer/hydride generator. *Spectrochim. Acta B.* 1996, 51, 1813–1821.
- [92] YIN, Y.G.; LIU, J.F.; HE, B.; GAO, E.L.; JIANG, G.B. Photo-induced chemical vapour generation with formic acid: novel interface for high performance liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry hyphenated system and application in speciation of mercury. *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 822–826.
- [93] YIN, Y.G.; WANG, Z.H.; PENG, J.F.; LIU, J.F.; HE, B.; JIANG, G.B. Direct chemical vapour generation-flame atomization as interface of high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry for speciation of mercury without using post-column digestion. *J. Anal. At. Spectrom.* 2009, 24, 1575–1578.

13. ANEXOS



Mercury speciation by high-performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry using an integrated microwave/UV interface. Optimization of a single step procedure for the simultaneous photo-oxidation of mercury species and photo-generation of Hg⁰☆

Daiane P.C. de Quadros^b, Beatrice Campanella^a, Massimo Onor^a, Emilia Bramanti^a, Daniel L.G. Borges^b, Alessandro D'Ulivo^{a,*}

^a National Research Council of Italy, C.N.R., Istituto di Chimica dei Composti Organo Metallici – ICCOM – UOS Pisa, Area della Ricerca, Via G. Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italy

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2014

Accepted 17 September 2014

Available online 28 September 2014

Keywords:

Photochemical vapor generation

Mercury

Microwave photochemical reactor

Speciation

High performance liquid chromatography

ABSTRACT

We described the hyphenation of photo-induced chemical vapor generation with high performance liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry (HPLC–AFS) for the quantification of inorganic mercury, methylmercury (MeHg) and ethylmercury (EtHg). In the developed procedure, formic acid in mobile phase was used for the photodecomposition of organomercury compounds and reduction of Hg²⁺ to mercury vapor under microwave/ultraviolet (MW/UV) irradiation. We optimized the proposed method studying the influence of several operating parameters, including the type of organic acid and its concentration, MW power, composition of HPLC mobile phase and catalytic action of TiO₂ nanoparticles. Under the optimized conditions, the limits of detection were 0.15, 0.15 and 0.35 μg L⁻¹ for inorganic mercury, MeHg and EtHg, respectively. The developed method was validated by determination of the main analytical figures of merit and applied to the analysis of three certified reference materials. The online interfacing of liquid chromatography with photochemical-vapor generation–atomic fluorescence for mercury determination is simple, environmentally friendly, and represents an attractive alternative to the conventional tetrahydroborate (THB) system.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury cycle in the environment is a result of natural and human activities. Mercury emissions from human activities move by weather and wildlife throughout the environment, and natural processes can convert mercury into organic methylmercury. This organomercuric species is disposed to biomagnification, the sequence of processes in an ecosystem by which higher concentrations of a particular chemical are reached in organisms higher up the food chain through a series of prey–predator relationships. The gastrointestinal tract readily absorbs ingested methylmercury, and it is mostly found complexed with free cysteine and with proteins and peptides containing that amino acid. The methylmercuric–cysteinyll complex is recognized by amino acid transporting proteins in the body as methionine, another essential amino acid and, because of this mimicry, it is transported freely across the blood–brain barrier and the placenta [1].

Therefore, the development of sensitive and specific methods for the speciation of mercury is of great importance for environmental and biological studies.

Numerous methods based on high performance liquid chromatography (HPLC) on-line hyphenation with element-specific detection methods, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), anodic stripping voltammetry (ASV) and atomic spectrometry, have been developed for the speciation of mercury in recent years. Several reviews summarize the recent progress in this field [2–5].

Among the cited detection techniques, atomic fluorescence spectrometry (AFS) is one of the most sensitive, selective and low-cost methods for the determination of mercury [5]. As with other instrumental methods of analysis, sample introduction remains an important issue in AFS because the sensitivity and limits of detection (LODs) are dependent on the sampling efficiency. Vapor/hydride generation is a widely adopted sample introduction method for atomic spectroscopy, yielding the advantages of efficient matrix separation, high analyte transport efficiency, high selectivity, simple instrumentation and ease of automation. Vapor generation using tetrahydroborate (THB) is considered to be the most widespread and successful one for the determination of trace and ultra trace amounts of elements belonging to groups IV–VI and mercury [6].

☆ Selected papers presented at European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2014, Prague, Czech Republic, March 16 – 21, 2014.

* Corresponding author. Tel.: +39 050 3152293; fax: +39 050 315 2555.
E-mail address: dulivo@pi.iccom.cnr.it (A. D'Ulivo).

A common problem of chemical vapor generation (CVG) using THB is the interference from transition metals, which usually decreases sensitivity and reproducibility, and may lead to incorrect analytical results. Furthermore, THB is unstable in solution and is a potential source of contamination. Additionally, the large amount of hydrogen generated by the THB-acid system may reduce the stability of a plasma or flame source or even extinguish it [7].

Today an excellent competitor to the CVG is the photochemical vapor generation (PVG), a newly emerging research field in analytical chemistry owing to its simplicity, versatility and cost-effectiveness. Sturgeon and coworkers [8–11] pioneered the research area of PVG as an effective sample introduction method for analytical atomic spectrometry. In the last years, several works have been published concerning the determination of mercury with PVG [12–28]. The basic principle of PVG relies on the generation of reducing radicals from low molecular weight organic alcohols, aldehydes, or carboxylic acids upon irradiation by UV sources [29,30]. The PVG has recently opened a new door for broadening the scope of CVG, in which radicals play a role in the reduction of metal species to volatile compounds. It is expected that other energy donors, such as microwave and laser irradiation, may also be effective in promoting generation of free radicals for similar application [7]. Similar to CVG, PVG can be hyphenated to sample preparation techniques, such as liquid chromatography and flow injection (FI), as well as many analytical atomic detection techniques, including AFS.

In our laboratories we have developed a photochemical on-line oxidation method that combines microwave (MW) and ultraviolet (UV) irradiation in a unique photochemical reactor for the online digestion of organic mercury to obtain Hg(II). Hg(II) was reduced to Hg⁰ in a knotted reaction coil with THB solution, and detected by AFS [31,32].

Further development of the system described above is reported in the present paper and it consists of the elimination of chemical reduction step with THB. In consideration of the fact that the integrated MW/UV interface is able to perform both the breakdown of organomercuric species to inorganic Hg(II) and the reduction of Hg(II) to volatile Hg⁰, we found conditions under which all mercury species, after HPLC separation, could be converted in to volatile Hg⁰ and detected by AFS. The proposed method is based on a post-column mix and reaction with formic acid followed by on-line MW/UV irradiation and the decomposition of organic mercury species (MeHg, EtHg, pHMB) and reduction of Hg(II) could be completed in one step. Optimum conditions for the PVG procedure were investigated, and the developed method was successfully employed in the determination of Hg(II) and MeHg in marine organisms certified reference materials.

2. Experimental

2.1. Instrumentation and chromatographic conditions

AMW/UV combined reactor with AFS detection system was used for both FI and reversed phase chromatography (RPC) experiments. It has been employed for both PVG and CVG measurements. A schematic representation of the apparatus is reported in Fig. 1a (for PVG experiments) and Fig. 1b (for CVG experiments).

A HPLC gradient pump (P4000, ThermoQuest) equipped with a mechanical degassing system (SC1000, ThermoQuest) and a Rheodyne 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CA) was employed. 50 μ L and 200 μ L injection loops were used for FI and RPC experiments, respectively. The FI and the RPC experiments were carried out respectively with a 3 mL min⁻¹ and a 1 mL min⁻¹ pump flow rate. When the system was hyphenated with HPLC, an additional pump (Dionex model DQP-1) was used at the column outlet to obtain an overall flow rate of 3 mL min⁻¹ and the optimized concentration of formic acid (10%) at the entrance of the MW/UV reactor. For FI experiments, the outlet of the HPLC pump was connected with the inlet of the MW/UV reactor. In the HPLC setup, a chromatographic column was interposed between

HPLC pump and the additional pump that sent to the system the organic acid, and the outlet of this second pump was connected with the inlet of the MW/UV reactor.

The MW/UV reactor was placed in a thermostatic bath in order to work under controlled temperature conditions (18 °C) and microwave power of 30 W was employed. More details of the MW/UV reactor can be found in a previous paper [33].

The final flow rate value and formic acid concentration were found from the optimization experiments described in Section 3.1.

The mercury vapor generated was separated in a gas-liquid separator by Ar/H₂ gas and the mercury vapor coming out was delivered into the atomizer, which was a miniature Ar/H₂ diffusion flame supported on a simple quartz tube (i.d. 4 mm). The gas-liquid separator was in borosilicate glass (60 mm long, 10 mm i.d., inlet and outlet tubing 6 mm o.d. and 2 mm i.d.). A peristaltic pump was used to pump off the waste liquid solutions. A laboratory assembled non-dispersive atomic fluorescence (NDAF) detector equipped with an EDLII mercury lamp (Perkin Elmer, Monza, Italy) was employed. More details of the AFS system can be found in a previous paper [34].

Separations by RPC were carried out using a Dionex Omnipac PAX-500 (60 Å, 250 × 4 mm, 8.5 μ m) equipped with a 50 × 4 mm guard-column. Samples were eluted in isocratic mode with 10% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L⁻¹ Cys, 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄ in the column and with 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L⁻¹ Cys, 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄ when only the guard-column was employed.

The output data from the lock-in amplifier were collected with a personal computer equipped with a Dionex AI-450 chromatography interface and its acquisition software (Dionex PeakNet).

The identification of volatile species was performed by collecting the sample solution after the photo-reaction in the MW-UV device (FI mode, separate solutions of 5 mg L⁻¹ Hg(II), MeHg and EtHg) and analyzing the head space using a gas chromatography (GC) (Agilent 6850) coupled with mass spectrometer (MS) detector (Agilent 5975) (Agilent Technologies, Milan, Italy) fitted with a 60 m × 0.25 mm id DB624 GC column (1.4 μ m film thickness, Agilent Technologies, Milan, Italy). Temperature program 80 °C for 5 min, 20 °C/min up to 260 °C, hold for 10 min. MS detector was operated both in selected ion-monitoring (SIM) mode (198, 200 and 202 amu) and in full scan mode (range 50–500 amu).

2.2. Reagents and samples

Analytical reagent-grade chemicals were used without further purification. pHMB [4-hydroxymercuric benzoic acid, sodium salt (CAS no. 138-85-2, HOHgC₆H₄CO₂Na)] was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). A 1 × 10⁻² mol L⁻¹ stock solution of pHMB was prepared by dissolving the sodium salt in 0.01 mol L⁻¹ NaOH in order to improve its solubility, stored at 4 °C and diluted freshly, just before use. The precise concentrations of pHMB solutions were determined from the absorbance at 232 nm ($\epsilon^{232} = 1.69 \times 10^4$ cm⁻¹ M⁻¹).

Stock solution of 1000 ± 5 μ g mL⁻¹ of inorganic Hg(II) in the form of Hg(NO₃)₂ was purchased from Merck Laboratory Supplies (Poole, Dorset, UK). Methylmercury chloride (CH₃HgCl, CAS no. 80-2250) from Strem Chemicals, Inc (Newburyport, MA, USA) and ethylmercury chloride (C₂H₅HgCl, CAS no. 37114) from Alfa Division (Danvers, MA, EUA) were used to prepare the standard stock solution of MeHg 1.02 mmol L⁻¹ and EtHg 1.27 mmol L⁻¹.

Methanol (MeOH, CAS no. 67-56-1) and acetonitrile (ACN, CAS no. 75-05-8) for reversed-phase chromatography (RPC) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Milan, Italy).

Formic acid ≥ 88.0% (HCOOH, CAS no. 64-18-6) and malonic acid 99% (CH₂(COOH)₂, Cat.:M129-6) were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Acetic acid 99% (C₂H₄O₂, CAS no. 64-19-7) and citric acid 99% (C₆H₈O₇, CAS no. 5949-29-1) were acquired from Carlo Erba (Rodano, Milan, Italy).

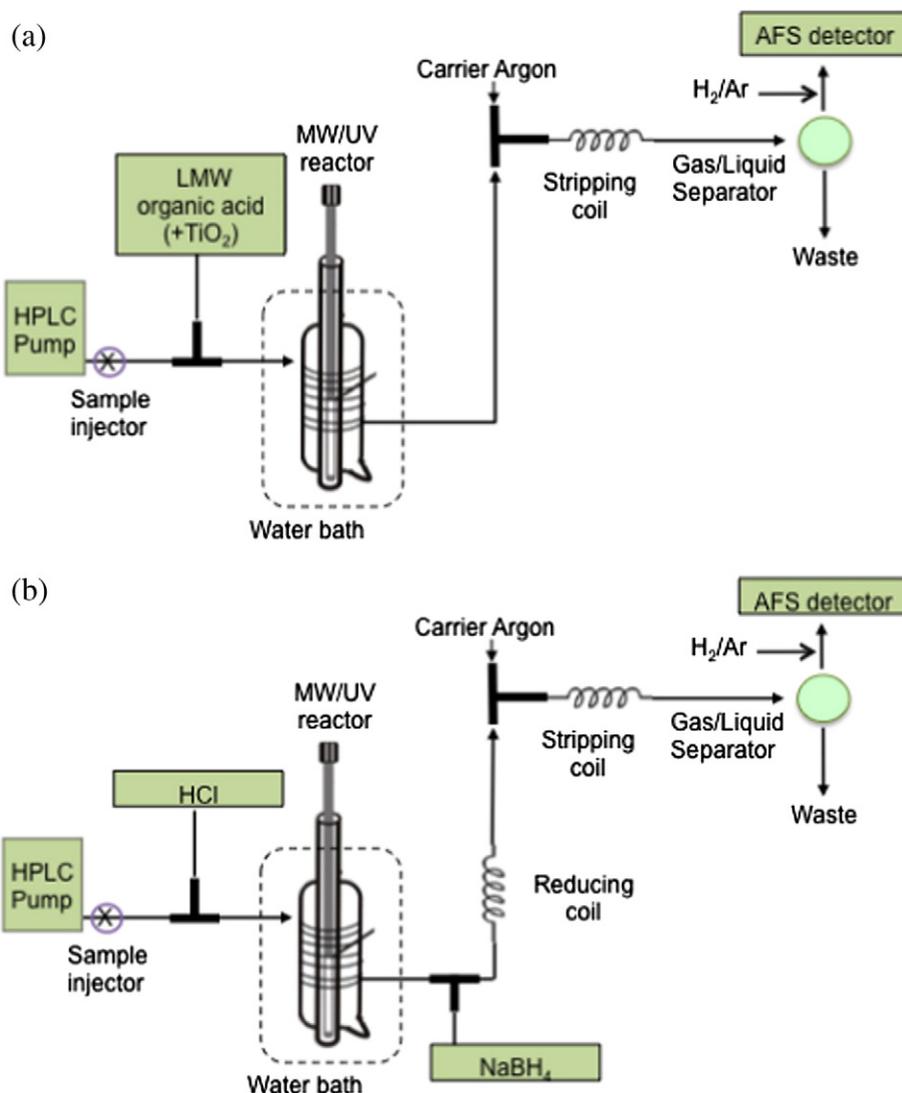


Fig. 1. Schematic diagram of the HPLC–MW/UV system employed for PVG experiments (a) and schematic diagram of the HPLC–MW/UV system employed for CVG with tetrahydroborate experiments (b).

Potassium chloride (KCl, CAS no. 7447-40-7) and sodium perchlorate (NaClO₄·H₂O, CAS no. 7791-07-3) purchased from Carlo Erba (Rodano, Milan, Italy), sodium chloride (NaCl, CAS no. 7647-14-5) and L-cysteine 99.5% (C₃H₇NO₂S, CAS no. 52-90-4) purchased from Fluka (Milan, Italy) were used to prepare the solution for RPC mobile phase.

2.5 mol L⁻¹ solutions of THB were prepared by dissolving the solid reagent (Merck & Co., Inc., N.J. USA, pellets, reagent for AAS, minimum assay >96%) into 0.3% (m/v) NaOH solution (TraceSELECT, Sigma-Aldrich–Fluka, Milan, Italy). The solutions were microfiltered through a 0.45 μm membrane and stored in a refrigerator. Diluted solutions of NaBH₄ (0.05 mol L⁻¹) were prepared daily by appropriate dilution of the stock solutions, the total NaOH concentration being kept at 0.3% (m/v). HCl diluted solutions were prepared from 37 wt.% HCl (Carlo Erba, Rodano, Milan, Italy).

Three biological reference materials (DORM-1, DOLT-1 and TORT-1) purchased from the National Research Council of Canada (NRCC, Ottawa, Ontario, Canada) were analyzed for the method accuracy assessment.

Ultrapure water prepared with an Elga Purelab-UV system (Veolia Environnement, Paris, France) was used throughout.

2.3. Sample preparation

Approximately 500 mg of certified samples were weighed into 25 mL glass flasks and 10 mL of formic acid ≥88.0% was added. The flasks were placed in an ultrasonic bath at 50 °C for 6 h to complete solubilization of the tissues, as described by Vieira et al. [13]. After cooling, the samples were diluted with deionized water to a final concentration of 40% formic acid and were centrifuged at 5000 rpm for 20 min. The supernatant was filtered doubly before injection by a 0.45 μm and 0.20 μm regenerated cellulose filters (Agilent Captiva Premium Syringe Filters). Unless otherwise specified 200 μL of sample was employed for analysis.

3. Results and discussion

3.1. FI–PVG–AFS experiments

In order to choose the low-molecular weight (LMW) organic acid more effective for the PVG process, several experiments were conducted testing acetic, formic, malonic and citric acid. We performed a central

composite design with two factors (LMW organic acid concentration and MW power) at five levels for a total number of 13 experiments.

Figs. S2 A–D (Supplementary Data) show the response surfaces for Hg(II), MeHg, EtHg and pHMB obtained by plotting the mercury specific FI signal as a function of LMW organic acid concentration and MW power. The response surfaces were obtained with Origin software by converting the raw data into a 100×100 matrix using a Random (Renka Cline) gridding method.

In general, it was observed that the atomic fluorescence signals for all mercury species increase with increasing concentrations of the organic acids and the microwave power. The only exception is represented by pHMB, and this is probably due to the difference structure of the substrates containing mercury (see Supplementary Data). This may be related to a proportional increase of the radicals' concentration upon exposure to the MW/UV radiation source.

Acetic acid (Fig. S2 B) provided the lowest sensitivity for all species. The mechanism of the PVG is related to the production of reactive radical that combine with the analyte to form volatile species [30]. The low sensitivity obtained with acetic acid may be due to an insufficient concentration of radicals, which cannot promote an efficient photochemical generation of volatile mercury species.

Fig. S3 shows the mercury specific FI signals obtained in the best conditions (acid concentration and MW power) for the four LMW organic acids. The highest mercury specific AF signals were obtained with formic (10%), citric (10%) and malonic (10%), while AF peak areas obtained in the presence of acetic acid were the lowest intense.

The results described so far relate to the use of acids alone. However, as the final aim of the study was mercury speciation, a model eluent phase was added to the FI system to evaluate the influence of acid interaction with the HPLC mobile phase on the AF signals. We found that, even though with malonic and citric acids the signal intensity for all species was high (see Fig. S2, Supplementary Data) when they were added to a mobile phase which mimics that used in chromatography (1% methanol, 5 mmol L^{-1} Cys, 0.15 mol L^{-1} NaClO_4 at 1 mL min^{-1}) AF signals decreased for all species (see Fig. 2). Therefore, for further experiments we adopted the following conditions: 10% formic acid, 30 W for microwave power and 3 mL min^{-1} flow rate.

We found that an irradiation time of 20 s in the MW/UV reactor was sufficient to obtain satisfactory signals for all mercury species without an excessive waste of reagents. Residence times less than 20 s did not lead to significant improvements in signal intensity. The effect of the irradiation time was not further evaluated, because flow rate values lower than 3 mL min^{-1} caused a heating of the sample solution in the MW/UV reactor, broad signals and long analysis time. Fig. 3 shows the comparison of the mercury specific FI signals obtained for mercury species, analyzed using 10% formic acid, for PVG (the proposed method) and CVG with THB (reference method).

As the direct use of 10% formic acid in the chromatographic column should be avoided, we use a second pump before the MW/UV reactor that sent 30% formic acid at 2 mL min^{-1} . With the HPLC pump sending 1% formic acid at 1 mL min^{-1} , we obtained an overall flow rate of 3 mL min^{-1} and 10% formic acid at the entrance of the reactor.

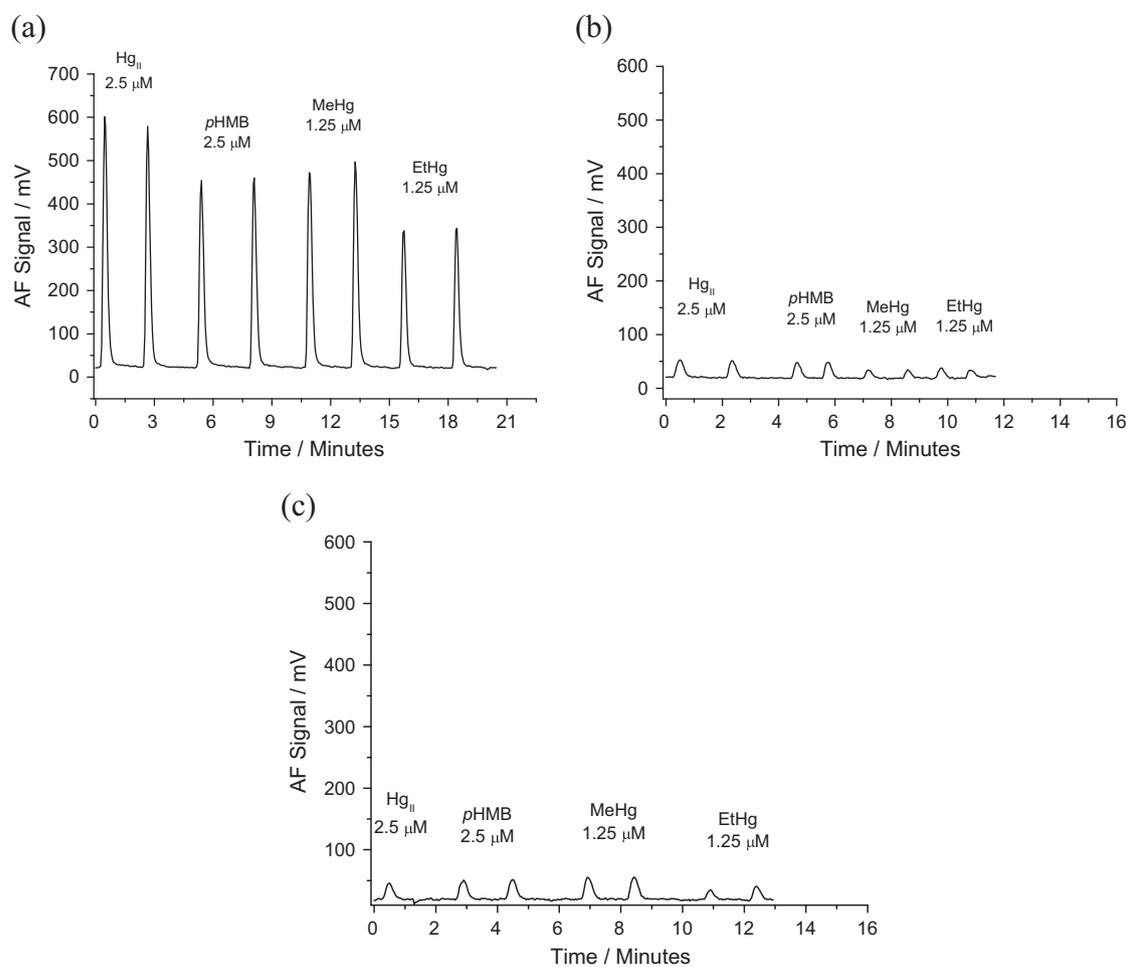


Fig. 2. FI signals ($50\text{ }\mu\text{L}$ injection) for $2.5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ Hg(II), $2.5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ pHMB, $1.25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ MeHg and $1.25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ EtHg prepared in 5% malonic acid (a), 5% citric acid (b) and 10% formic acid (c), injected in the following mobile phase: 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L^{-1} Cys, 0.15 mol L^{-1} NaClO_4 at 1 mL min^{-1} ; added with 15% malonic acid (a), 15% citric acid (b) and 30% formic acid (c) at 2 mL min^{-1} (post-column pump).

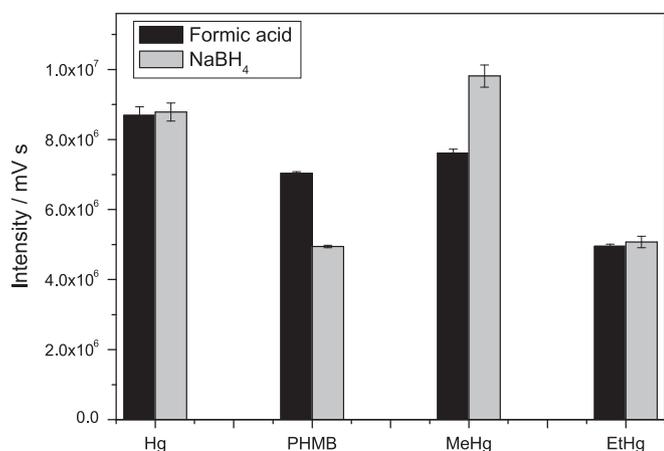


Fig. 3. Comparison of FI (50 µL injection) peak area of mercury species analyzed using formic acid for PVG (, under PVG optimized conditions) and CVG with NaBH₄ for 2.5 µmol L⁻¹ Hg(II), 2.5 µmol L⁻¹ pHMB, 1.25 µmol L⁻¹ MeHg and 1.25 µmol L⁻¹ EtHg prepared in 5% formic acid. Eluent phase: 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L⁻¹ Cys, 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄.

3.2. Evaluation of HPLC mobile phase

As the final aim of the study was mercury speciation, we optimized the HPLC mobile phase testing acetonitrile and methanol as eluent. Compared with acetonitrile, methanol provided an improvement in the signal intensity and a better separation for all mercury species. With 10% MeOH as mobile phase the separation of Hg(II), MeHg and EtHg was reached in a reasonable time (13 min). For preliminary studies the separations were conducted on the guard-column, and only 1% MeOH as mobile phase was sufficient.

Since the column employed in this work is a mixed mode column, which exhibits both reversed phase and anion exchange characteristics, we tested the effect of three salts (0.15 mol L⁻¹ NaCl, 0.15 mol L⁻¹ KCl and 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄) on the separation of the analytes.

With 0.15 mol L⁻¹ NaCl and 0.15 mol L⁻¹ KCl the AF signal decreased for all the species, whereas with 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄ the intensity of the AF signals did not change significantly, but an improved separation of the analytes was observed.

The final composition of the mobile phase is 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L⁻¹ Cys, 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄. Cysteine is necessary to obtain narrow chromatographic peaks and to avoid the mercury adsorption on the chromatographic stationary phase.

Subsequently, additional FI experiments performed in the absence of an Ar/H₂ microflame showed that the AF signal increased for all species. The AF peak area with the microflame was about 50% with respect to the peak area obtained with no flame (same atomizer without H₂). This was likely due to the quenching effect of the molecular species present in the microflame, on atomic fluorescence of Hg, because no molecular species of mercury was found in the headspace of reaction vials by GC–MS experiments (Section 3.3). To increase the sensitivity obtained with no flame atomization an argon shielding flow (850 mL min⁻¹) was used to prevent the quenching of AF of mercury by atmospheric gases such as N₂ and O₂, in the observation zone of the atomic cell. The results indicated that sensitivity improvements are in the range from 40 to 70-fold for the tested mercury species (see Fig. S3 Supplementary Data). Since with the presence of the shielding AF signals increased for the analytes, subsequent experiments were conducted without flame and with 850 mL min⁻¹ shielding flow.

3.3. Identification of volatile species by GC–MS

We investigated by GC–MS analysis the nature of the volatile species formed in the presence of formic, acetic, malonic and citric acids.

Solutions containing 5 mg L⁻¹ of Hg(II), MeHg and EtHg were introduced by FI and 4 mL aliquots were collected in a vial immersed in an ice bath at the outlet of the MW/UV reactor and analyzed by head space–GC–MS.

Head space–GC–MS analysis revealed that for all types of organic acid there is only one volatile mercury species in the head space, which corresponds to Hg⁰. This is likely due to the capability of the MW/UV interface to break Hg–C bonds, which results in the absence of methylated or alkylated mercury species in the reaction products.

3.4. Catalytic action of TiO₂ nanoparticles

Some papers report the use of TiO₂ nanoparticles as catalyst of the photo-reduction process for selenium, whereas for mercury it was found that there is equally high efficiency without titanium for both Hg(II) as well as MeHg [9,23,28,35,36].

Using HPLC–PVG–AFS we investigated the changes in the mercury specific AF signal when different concentrations (0.01, 0.02 and 0.05 g L⁻¹ in deionized water) of nano-TiO₂ were added between the outlet of the HPLC column and the inlet of the MW/UV reactor using a second pump. We found that the intensity of the AF signal markedly increased with the nano-TiO₂ concentration for Hg(II) and MeHg, (about twofold increase) whereas only a moderate increase in the signal intensity was observed for EtHg and pHMB (see Fig. 4). This effect doesn't seem to be reported before for the PVG of mercury by using UV irradiation.

The problem associated with the use of these nanoparticles is that they precipitated and form deposits on the wall of the tubings connecting the pump with the MW–UV reactor.

Since no decisive improvements were obtained on the less sensitively detected species EtHg and pHMB with nano-TiO₂ employment, it has been decided not to use them for mercury determination reported in the present work.

3.5. Analytical figures of merit

Fig. 5 shows the mercury specific RP chromatograms obtained under the optimized conditions for (a) Hg(II), MeHg and EtHg single species, (b) a sample solution of DOLT-1 and EtHg mixture and (c) a sample solution of TORT-1 and EtHg mixture. Fig. 7 shows that the presented method is suitable for the separation and determination of Hg(II), MeHg and EtHg in biological samples.

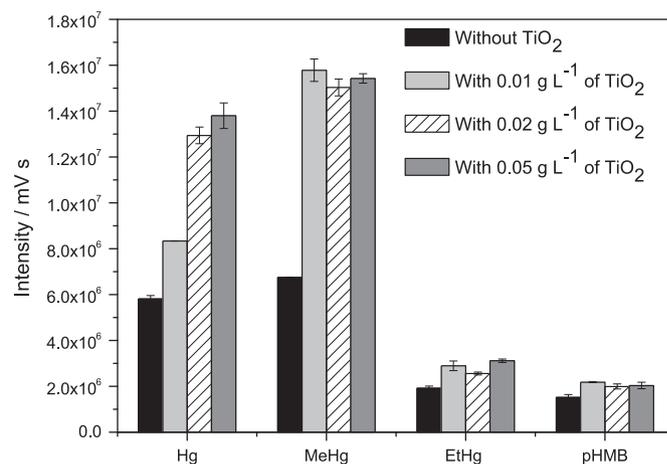


Fig. 4. Optimization of concentration TiO₂ for HPLC–MW/UV apparatus using shielded no-flame atomization. Conditions: 200 µL of 10 µg L⁻¹ Hg(II), MeHg, EtHg and pHMB solution injected in eluent phase: 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L⁻¹ Cys, 0.15 mol L⁻¹ NaClO₄ at 2 mL min⁻¹ (guard-column) and 30% formic acid at 1 mL min⁻¹ (post-column pump).

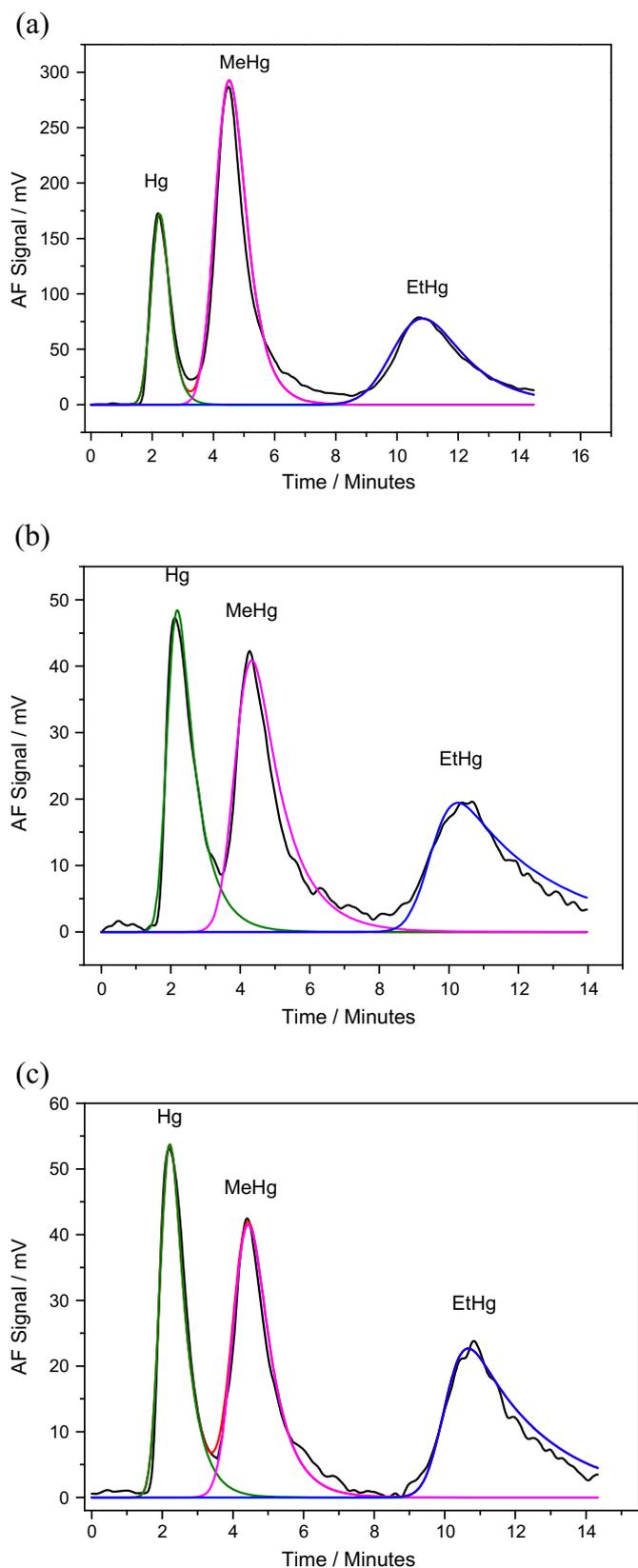


Fig. 5. Mercury specific RP chromatograms for 200 μL of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ MeHg and $10 \mu\text{g L}^{-1}$ EtHg single species (a), 200 μL of sample solution of DOLT-1 and $3 \mu\text{g L}^{-1}$ EtHg mixture (b) and 200 μL of sample solution of TORT-1 and $3 \mu\text{g L}^{-1}$ EtHg mixture (c) without flame and injected in eluent phase: 1% methanol, 1% formic acid, 5 mmol L^{-1} Cys, 0.15 mol L^{-1} NaClO_4 at 2 mL min^{-1} (analytical column) and 30% formic acid at 1 mL min^{-1} (post-column pump).

Table 1

Analytical figures of merit for HPLC–MWUV–AFS determination of Hg(II), MeHg and EtHg (§).

	Hg(II)	MeHg	EtHg
Calibration graph			
Slope/ $\text{mV} \times \text{s} \times \text{L} \times \mu\text{g}^{-1}$	4.3×10^5 (§)	5.6×10^5 (§)	2.8×10^5 (+)
R^2	0.9992	0.9991	0.9989
LOD/ $\mu\text{g L}^{-1}$ (ng g^{-1}) (*)	0.15 (7.5)	0.15 (7.5)	0.35 (17)
LOQ/ $\mu\text{g L}^{-1}$ (ng g^{-1}) (*)	0.5 (25)	0.5 (25)	1.15 (58)
RSD/%			
$1 \mu\text{g L}^{-1}$	3.8	3.6	7.7
$5 \mu\text{g L}^{-1}$	5.1	11	8.9

(§) 0.5 g of sample extracted, 25 mL final solution volume, 200 μL injected.

(§) Tested range $1\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$; (+) Tested range $3\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$.

(*) LOD = 3 times signal to noise ratio (S/N); LOQ = 10 times S/N.

Under the optimized experimental conditions, the performance of the proposed method was evaluated obtaining the main figures of merit: linear range, sensitivity, detection and quantification limits, precision and accuracy. Table 1 shows the analytical features of the method.

Calibration graphs were tested by analyzing 3 replicates of Hg(II), MeHg and EtHg solutions in 10% formic acid in the $1\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$ range for Hg(II) and MeHg and $3\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$ range for EtHg.

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) refer to the solid sample and were calculated as the concentration corresponding to three and ten times the signal-to-noise ratio (S/N) and taking into account the dilution of the sample, respectively. The performance of the method in terms of LOD can be compared with previous works based on similar experimental setup. LOD values obtained in this study are respectively twice that obtained with the CVG (digestion with KBr/KBrO_3 and reduction with THB) [37] and comparable with that obtained with the MW/UV–CVG procedure [31].

The precision of the proposed method was calculated as the relative standard deviation (RSD) of six measures at two levels of concentration (1 and $5 \mu\text{g L}^{-1}$). The values obtained ranged between 3.8 and 11%.

The accuracy of the method was evaluated by analyzing the Hg(II) and MeHg content in three certified reference materials, TORT-1, DORM-1 and DOLT-1. The accuracy was assessed by comparing via statistical *T*-test at 95% the obtained results and the certified values. The only comparable value is MeHg because it is certified. The results are shown in Table 2, and they show a good agreement with certified values of MeHg. The other comparisons are only informative. Inorganic Hg(II) is not certified in the selected reference materials and in Table 2 the difference between total Hg and MeHg has been reported, certified values. The total Hg is certified in the selected reference materials, but it has not been determined here by an independent procedure; the

Table 2

Determination of Hg(II), MeHg and EtHg in certified reference materials. The significance test *T*-test for comparison of an experimental mean with a known value, according to the equation: $t = |(x - \mu) \sqrt{n/s}|$ was applied.

	Hg species	Certified ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Determined ($\mu\text{g g}^{-1}$) (§)	<i>T</i> -test
TORT-1*	Hg(II)	[0.202] (§)	0.220 ± 0.02	$ t (=0.22) < 3.18$
	MeHg	0.128 ± 0.014	0.122 ± 0.01	$ t (=0.09) < 3.18$
	Total	0.33 ± 0.06	[0.342] (#)	$ t (=0.08) < 3.18$
DOLT-1*	Hg(II)	[0.145] (§)	0.150 ± 0.07	$ t (=0.03) < 3.18$
	MeHg	0.080 ± 0.011	0.085 ± 0.03	$ t (=0.05) < 3.18$
	Total	0.225 ± 0.037	[0.235] (#)	$ t (=0.09) < 3.18$
DORM-1**	Hg(II)	[0.067] (§)	0.097 ± 0.03	$ t (=0.30) < 3.18$
	MeHg	0.731 ± 0.06	0.619 ± 0.09	$ t (=0.79) < 3.18$
	Total	0.798 ± 0.074	[0.716] (#)	$ t (=0.52) < 3.18$

(§) (average \pm confidence interval at a 95% statistical level; $n = 3$).

(#) Sum of Hg(II) and MeHg concentration.

(§) Difference between Total Hg and MeHg. Inorganic Hg(II) not certified.

* Results obtained with the chromatographic column.

** Results obtained with the chromatographic guard-column.

Table 3
Results from recovery tests for the determination of Hg(II), MeHg and EtHg in certified reference materials.

		Determined ($\mu\text{g g}^{-1}$)(§)	Recovery(§)	
			$\mu\text{g g}^{-1}$	%
TORT-1*	Hg	0.49 ± 0.03	0.29 ± 0.03	97 ± 10
	MeHg	0.39 ± 0.01	0.26 ± 0.01	87 ± 3
	EtHg	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.04	110 ± 13
DOLT-1**	Hg	0.65 ± 0.07	0.50 ± 0.07	100 ± 14
	MeHg	0.57 ± 0.01	0.49 ± 0.01	98 ± 2
	EtHg	0.52 ± 0.09	0.52 ± 0.09	104 ± 18

* Sample spiked with 0.30 $\mu\text{g g}^{-1}$ of each compound.

** Sample spiked with 0.50 $\mu\text{g g}^{-1}$ of each compound.

(§) average ± confidence interval at a 95% statistical level; n = 3. For the sake of simplicity the uncertainty on recovery was considered identical to that on determination.

comparison has been made with the sum of Hg(II) and MeHg found, and assuming that the variance is the sum of those of Hg(II) and MeHg.

Recovery tests were performed in two certified samples, TORT-1 and DOLT-1, analyzed before and after spike with known concentrations of Hg(II), MeHg and EtHg. Table 3 shows the achieved recoveries and the relevant uncertainties, which are in the range between 87 and 110%.

4. Conclusions

We developed a simple procedure for the speciation analysis of mercury based on the hyphenation of HPLC with AFS through a simple MW–UV interface. Organomercury and inorganic mercury compounds were converted to Hg⁰ under the combined action of MW and UV irradiation, and in the presence of formic acid and cysteine in the mobile phase. By this way the MW/UV reactor effectively replaces the conventional tetrahydroborate system, and represents a cost-effective and environmentally friendly alternative for the determination of organic mercury.

Acknowledgments

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant N. 140563/2011-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) (Grant N.8224-13-7) for the financial support to Daiane P. C. de Quadros with a scholarship from CAPES (PDSE program) and to Daniel L. G. Borges with a research scholarship from CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.019>.

References

- [1] L.E. Kerper, N. Ballatori, T.W. Clarkson, Methylmercury transport across the blood-brain-barrier by an amino-acid carrier, *Am. J. Physiol.* 262 (1992) 761–765.
- [2] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold, Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review, *Anal. Chim. Acta.* 663 (2010) 127–138.
- [3] D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, Electrochemical determination of mercury: a review, *Talanta* 116 (2013) 1091–1104.
- [4] C. Gao, X.-J. Huang, Voltammetric determination of mercury(II), *TrAC Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 1–12.
- [5] Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng, X. Hou, Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry, *Microchem. J.* 103 (2012) 1–14.
- [6] P. Pohl, B. Prusisz, Chemical vapor generation of noble metals for analytical spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 753–762.
- [7] P. Wu, L. He, C. Zheng, X. Hou, R.E. Sturgeon, Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1217–1246.
- [8] X.M. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G.J. Gardner, UV light-mediated alkylation of inorganic selenium, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 575–579.
- [9] X.M. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G.J. Gardner, UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2092–2099.
- [10] X.M. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G. Gardner, UV photosynthesis of nickel carbonyl, *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 205–211.
- [11] X.M. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G.J. Gardner, Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2401–2405.
- [12] H. Xia, X. Liu, K. Huang, Y. Gao, L. Gan, C. He, X.D. Hou, Matrix-assisted UV-photochemical vapor generation for AFS determination of trace mercury in natural water samples: a green analytical method, *Spectrosc. Lett.* 43 (2010) 550–554.
- [13] M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, R.E. Sturgeon, Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 837–847.
- [14] R. Liu, M. Xu, Z. Shi, J. Zhang, Y. Gao, L. Yang, Determination of total mercury in biological tissue by isotope dilution ICPMS after UV photochemical vapor generation, *Talanta* 117 (2013) 371–375.
- [15] Q. Liu, Direct determination of mercury in white vinegar by matrix assisted photochemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry detection, *Spectrochim. Acta Part B* 65 (2010) 587–590.
- [16] L. Liu, H. Zheng, C. Yang, L. Xiao, Y. Zhangluo, J. Ma, Matrix-assisted photochemical vapor generation for the direct determination of mercury in domestic wastewater by atomic fluorescence spectrometry, *Spectrosc. Lett.* 47 (2014) 604–610.
- [17] X. Hou, X. Ai, X. Jiang, P. Deng, C. Zheng, Y. Lv, UV light-emitting-diode photochemical mercury vapor generation for atomic fluorescence spectrometry, *Analyst* 137 (2012) 686–690.
- [18] Y. Gao, W. Yang, C. Zheng, X. Hou, L. Wu, On-line preconcentration and in situ photochemical vapor generation in coiled reactor for speciation analysis of mercury and methylmercury by atomic fluorescence spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 126–132.
- [19] Y. Gao, X. Peng, Z. Shi, R. Zhang, X. Xia, F. Yue, R. Liu, Determination of mercury in alcoholic drinks by ICP-MS after matrix-assisted photochemical vapor generation, *At. Spectrosc.* 33 (2012) 73–77.
- [20] A. de Jesus, A.V. Zmozinski, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, M.M. da Silva, Determination of mercury in naphtha and petroleum condensate by photochemical vapor generation atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 227–232.
- [21] C.S. Da Silva, E.Q. Oreste, A.M. Nunes, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, Determination of mercury in ethanol biofuel by photochemical vapor generation, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 689–694.
- [22] C. Zheng, Y. Li, Y. He, Q. Ma, X. Hou, Photo-induced chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 746–750.
- [23] Y.G. Yin, J.F. Liu, B. He, E.L. Gao, G.B. Jiang, Photo-induced chemical vapour generation with formic acid: novel interface for high performance liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry hyphenated system and application in speciation of mercury, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 822–826.
- [24] Y. Yin, J. Liu, B. He, J. Shi, G. Jiang, Mercury speciation by a high performance liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry hyphenated system with photo-induced chemical vapour generation reagent in the mobile phase, *Microchim. Acta* 167 (2009) 289–295.
- [25] Y. Yin, J. Liu, B. He, J. Shi, G. Jiang, Simple interface of high-performance liquid chromatography–atomic fluorescence spectrometry hyphenated system for speciation of mercury based on photo-induced chemical vapour generation with formic acid in mobile phase as reaction reagent, *J. Chromatogr. A* 1181 (2008) 77–82.
- [26] Q. Liu, Determination of mercury and methylmercury in seafood by ion chromatography using photo-induced chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometric detection, *Microchem. J.* 95 (2010) 255–258.
- [27] Y. Li, C. Zheng, Q. Ma, L. Wu, C. Hu, X. Hou, Sample matrix-assisted photo-induced chemical vapor generation: a reagent free green analytical method for ultrasensitive detection of mercury in wine or liquor samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 82–85.
- [28] C. Han, C. Zheng, J. Wang, G. Cheng, Y. Lv, X. Hou, Photo-induced cold vapor generation with low molecular weight alcohol, aldehyde, or carboxylic acid for atomic fluorescence spectrometric determination of mercury, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 825–830.
- [29] Y. Yin, J. Liu, G. Jiang, Photo-induced chemical–vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1672–1684.
- [30] R.E. Sturgeon, P. Grinberg, Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 222–231.
- [31] V. Angeli, S. Biagi, S. Ghimenti, M. Onor, A. D'Ulivo, E. Bramanti, Flow injection-chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry hyphenated system for organic mercury determination: a step forward, *Spectrochim. Acta Part B* 66 (2011) 799–804.
- [32] V. Angeli, C. Ferrari, I. Longo, M. Onor, A. D'Ulivo, E. Bramanti, Microwave-assisted photochemical reactor for the online oxidative decomposition and determination of p-hydroxymercurybenzoate and its thiolic complexes by cold vapor generation atomic fluorescence detection, *Anal. Chem.* 83 (2011) 338–343.
- [33] C. Ferrari, I. Longo, E. Tombari, E. Bramanti, A novel microwave photochemical reactor for the oxidative decomposition of Acid Orange 7 azo dye by MW/UV/H₂O₂ process, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 204 (2009) 115–121.
- [34] E. Bramanti, S. Lucchesini, A. D'Ulivo, L. Lampugnani, R. Zamboni, M.C. Spinetti, G. Raspi, Selective determination of thiolic proteins by hydrophobic interaction chromatography coupled with on-line cold vapour atomic fluorescence spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 166–171.

- [35] E. Kikuchi, H. Sakamoto, Kinetics of the reduction reaction of selenate ions by TiO_2 photocatalyst, *J. Electrochem. Soc.* 147 (2000) 4589–4593.
- [36] Q.Q. Wang, J. Liang, J.H. Qiu, B.L. Huang, Online pre-reduction of selenium(VI) with a newly designed UV/ TiO_2 photocatalysis reduction device, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 715–716.
- [37] E. Bramanti, C. Lomonte, M. Onor, R. Zamboni, A. D'Ulivo, G. Raspi, Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS), *Talanta* 66 (2005) 762–768.



Direct analysis of alcoholic beverages for the determination of cobalt, nickel and tellurium by inductively coupled plasma mass spectrometry following photochemical vapor generation [☆]



Daiane P.C. de Quadros ^a, Daniel L.G. Borges ^{a,b,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^b INCT de Energia e Ambiente do CNPq Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2013

Received in revised form 11 April 2014

Accepted 25 April 2014

Available online 14 May 2014

Keywords:

Photochemical vapor generation

Beverage analysis

Trace elements

ABSTRACT

A novel and sensitive method is described for the determination of Co, Ni and Te in alcoholic beverages by photochemical vapor generation combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. Volatile species of Co, Ni and Te were liberated from mixed formic acid and acetic acid media following exposure to a UV source. Limits of quantification of 0.5, 0.1, and 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Co, Ni and Te, respectively, were obtained, which correspond to improvements 9, 35, and 3 times more over those obtained with conventional pneumatic nebulization. Method accuracy was demonstrated by comparison of the determined Co, Ni and Te concentrations with those obtained following sample digestion and determination using conventional solution nebulization for sample introduction, resulting in good agreement at a 95% confidence level.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sample introduction in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is a matter of great importance, since the technique is sensitive to matrix components and even to fairly low amounts of dissolved solids [1]. The analysis of alcoholic beverages by ICP-MS usually requires the application of digestion procedures [2] in order to eliminate the well-known issues associated to the analysis of samples containing organic compounds. However, sample digestion can often be considered as a time-consuming procedure that can be characterized by excessive use of acids and risk of contamination. Hence, photochemical vapor generation (PVG) appears as an interesting alternative for the analysis of complex samples using ICP-MS.

Photochemical vapor generation associated to spectrometric determination consists in a very sensitive approach, which aims at the conversion of inorganic analytes into volatile chemical species upon sample exposure to UV radiation [3]. Organic and inorganic compounds, when exposed to UV radiation, tend to decompose and form radicals such as OH•, O•, CO• and some smaller organic radicals, which may reduce the analyte to its elemental state or lead to the formation of volatile species containing the analyte. The efficiency of radical production is typically higher when low molecular weight organic acids, such as formic acid, acetic acid or propionic acid, are added in an aqueous medium [4,5]. The accurate mechanism that leads to the formation of

reduced or volatile metallic or semimetallic species remains unknown, although some insights have been recently given in the literature [6,7].

Volatilization of the analyte using PVG allows it to be fairly easily separated from a complex matrix, which ultimately leads to enhanced selectivity and allows for preconcentration to be carried out, with consequently lower detection limits [8]. Another advantage of PVG, in addition to facilitated sample introduction, is the absence of reducing agents, thereby reducing the costs associated to typical chemical vapor generation (CVG) setups and eliminating a source of contamination, with the possibility of adaptation to a number of spectrometric techniques [9].

Besides allowing the determination of elements for which conventional CVG is traditionally used, PVG is also applicable to the determination of non-metals and some transition metals [10]. The radiation-induced reaction in the UV region has been used for a wide range of analytes, including Hg [3,11], As, Sb and Cd [4], Ni, Fe and Se [12], I [13] and Co [14]. Several instrumental techniques have been used with PVG, including ICP-MS [12], atomic fluorescence spectrometry [14], inductively coupled plasma optical emission spectrometry [11], atomic absorption spectrometry [3] and also gas chromatography and high performance liquid chromatography [15,16]. Photochemical vapor generation can also be applied to simplified speciation analysis protocols [3].

The association of PVG with ICP-MS is noteworthy; it provides excellent detection power, with high selectivity and minimum interference. Significant improvements in detection limits are often reported for the investigated elements using such approach [12].

In essence, it can be summarized that photochemical vapor generation is extremely promising for the determination of elements typically

[☆] Paper presented at the Brazilian Congress on Analytical Chemistry.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 3611.

E-mail address: daniel.borges@ufsc.br (D.L.G. Borges).

investigated by conventional CVG as well as for the determination of transition metals in general [17]. However, despite the notorious potential of the technique of photo-CVG, the number of publications on this subject remains relatively small, especially when compared to the number of publications using conventional CVG, which indicates that the technique still requires more incisive investigation. Hence, the goal of this work was to develop a simple and fast setup for the determination of two transition metals and one non-metal in alcoholic beverages using PVG-ICP-MS with no need for sample digestion, demonstrating the potential of the PVG method in providing analyte separation and direct determination from complex samples.

2. Material and methods

2.1. Instrumentation

The PVG setup was carried out using a two-set 40 W UV lamps, operating at 254 nm (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). The samples were introduced with the aid of a peristaltic pump into a quartz capillary that was arranged on top of the UV lamps, and the irradiated sample was conducted to a gas–liquid separator prior to analyte introduction by a constant Ar flow into the ICP-MS. The sample introduction flow rate was set at 3.8 mL min⁻¹ and the internal capacity of the reactor that is exposed to the UV source is 6.6 mL. Fig. 1 shows a scheme of the reactor system used this work.

All measurements were carried out using a Perkin Elmer-SCIEX ELAN 6000 ICP-MS (Thornhill, Canada). Argon gas with a purity of 99.996% was used as the main, auxiliary and carrier gas (White Martins, São Paulo, Brazil). The ICP-MS operating conditions are summarized in Table 1.

2.2. Reagents and samples

All reagents used were at least of analytical grade. Water with a resistivity of 18.2 MΩ cm was deionized in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and formic acid (Merck) were purified by double sub-boiling distillation in a quartz still (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Germany). Aqueous 1000 mg L⁻¹ stock standard solutions of Co, Ni and Te (Specsol, São Paulo, Brazil) were used. Acetic acid and formic acid were used as diluents for the samples. Polypropylene flasks (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA)

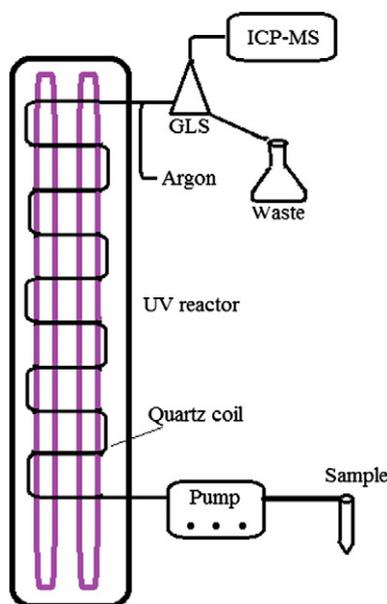


Fig. 1. Schematic representation of the PVG reactor. GLS represents the gas–liquid separator.

Table 1
Operating parameters of ICP-MS for the determination of trace elements using PVG.

RF power	1200 W
Gas flow rate (L min ⁻¹)	
Main	15.0
Secondary	1.0
Carrier	0.8
Cones	
Sampler/skimmer	Pt
Signal measurement	Peak area
Replicates/reading	300
Replicates	3
Dwell Time	50 ms
Auto lens mode	On
Detector voltages	
Pulse	1250 V
Analog	–2287 V
Detector operation mode	Dual

were used to prepare all solutions. A total of five commercially-available alcoholic beverages were analyzed, consisting of three cachaça samples, one vodka sample and one sweet vermouth sample.

2.3. Analytical procedure

Aliquots containing 7.0 mL of the sample were added with 1.05 mL acetic acid and 1.05 mL formic acid. The final volume was made up to 14.0 mL using deionized water.

All samples were prepared at least in triplicate. Analyte addition calibration was carried out for quantification.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of organic acid concentration

In order to choose the best low-molecular weight organic acid (LMWA) for the PVG process, initial tests were conducted using acetic acid, formic acid and the mixture of equal quantities of these substances. The results are shown in Fig. 2.

The results in Fig. 2 demonstrate that the sole use of acetic acid provided the lowest sensitivity for all elements. Considering that the efficiency of the PVG derives from the production of reactive radicals that combine with the analyte to form volatile species [18], it can be assumed that acetic acid alone does not produce a sufficient concentration of radicals to promote an efficient photochemical reaction. However, when acetic acid and formic acid were combined, it was possible to observe a significant improvement in signal intensity for all elements. This observation may be due to the fact that the hydrogen bonds between acetic acid molecules lead to the formation of dimers [19], which in this case can be formed even in the vapor state, therefore hindering the formation of reactive radicals which ultimately results in low efficiency in the PVG process. Formic acid can also form dimers through hydrogen bonds [19]. However, when these two acids are mixed, some disturbance possibly occurs in the system and the increase in sensitivity can be attributed to the interaction between acetic acid and formic acid molecules, leading to a reduction in dimer formation and an increase in the production of reactive radical species. Additional effects, such as pH changes in the solution upon the mixture of both acids, may also be responsible for the responses that are shown in Fig. 2. As expected, the efficiency of the process is also higher with increasing concentrations of the organic acids, which is likely to be accompanied by a proportional increase in the concentration of radicals upon exposure to the UV radiation source. For Te, however, a decrease in the analytical signal was observed for LMWA concentrations above 15% v/v (for the combined LMWA) and, as a compromise condition, this condition was chosen for further experiments.

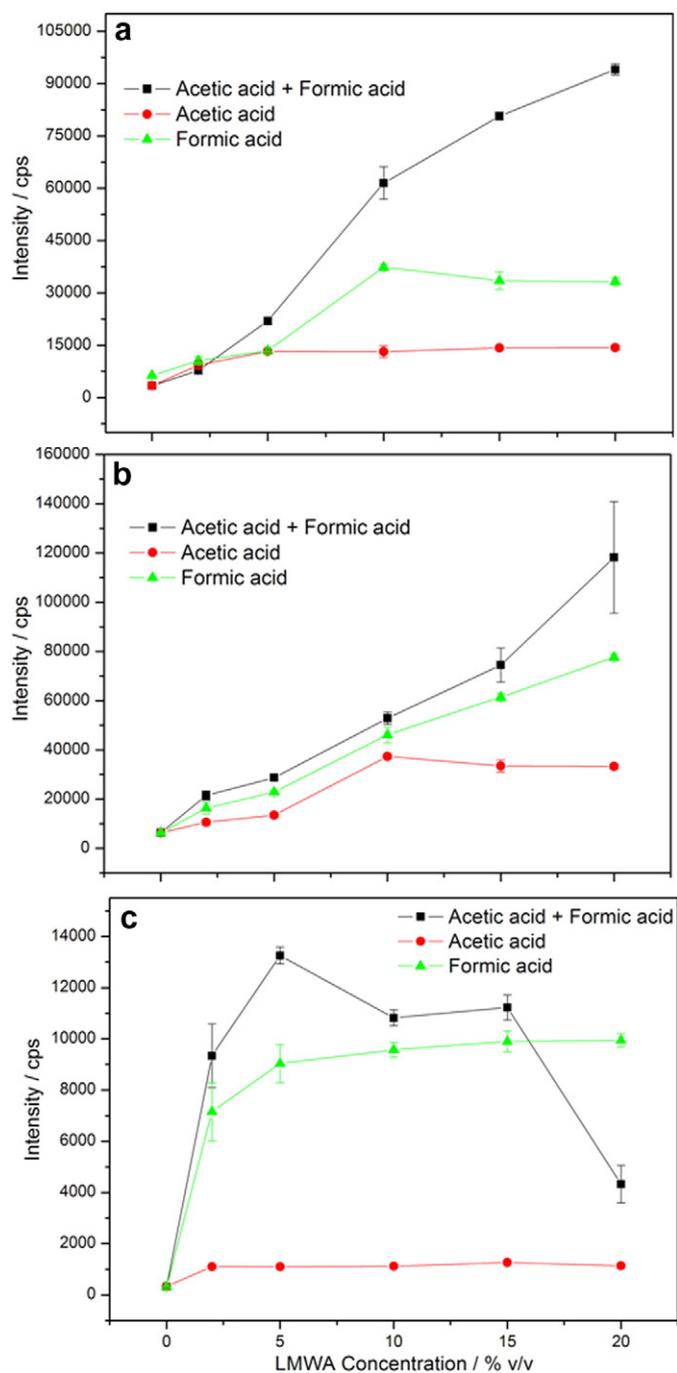


Fig. 2. Effect of the concentration of organic acids on the PVG efficiency for (a) Co (spiked at $20 \mu\text{g L}^{-1}$), (b) Ni (spiked at $10 \mu\text{g L}^{-1}$) and (c) Te (spiked at $5 \mu\text{g L}^{-1}$) in a vodka sample. Conditions: 1200 W RF power, 0.80 L min^{-1} carrier gas flow rate, UV radiation exposition time of 105 s. Error bars represent the standard deviation based on triplicate measurements. The nominal concentrations for the mixture between acetic acid and formic acid are expressed as the sum of the individual concentrations.

3.2. Influence of sample irradiation time

The effect of the irradiation time of the sample solution was evaluated by exposing the sample solution to the UV-lamps from zero to 190 s, using a solution containing acetic and formic acids at concentrations of 7.5% v/v (each). Discrete sample volumes (2.00 mL aliquots) were used to optimize the UV irradiation time, and the exposure period to the UV lamp was controlled by the sample flow rate. Fig. 3 shows the results obtained from a vodka sample spiked with Ni, Co and Te.

The results in Fig. 3 demonstrate that the formation of volatile species by PVG increases dramatically above 55 s of sample exposure to the UV radiation, and decreases with sample irradiation times longer than 145 s. This fact suggests that the volatile species formed by PVG are degraded when exposed to UV radiation for longer periods, which may either be an effect of the increased temperature of the system or a consequence of the instability of the formed species. As a compromise condition, an irradiation time of 105 s was chosen for further experiments.

3.3. Evaluation of carrier gas flow rate and RF power

Optimization of ICP-MS operating parameters included gas flow rate and RF power. The carrier gas flow was deviated to the gas-liquid separator, and was responsible for carrying the analyte vapors to the ICP. The influence of the carrier gas flow rate on the analytical signal was investigated from 0.60 to 0.9 L min^{-1} , since at higher flow rates the plasma was extinguished. Generally, the analytical signal for all elements improved at a carrier gas flow rate of 0.8 L min^{-1} , and remained essentially constant at higher flow rate adjustments. Hence, all experiments were carried out adopting a carrier gas flow rate of 0.8 L min^{-1} .

The effect of the RF power was evaluated within the range 1000–1600 W, with little influence on the analytical response. This was somewhat expected, considering that analyte-matrix separation takes place efficiently at the gas-liquid separator, leaving the ICP with the sole function of dissociating and ionizing analyte species. The RF power was chosen at 1200 W, in order to maintain a manageable temperature inside the interface chamber.

3.4. Evaluation of potential interfering species

An investigation was conducted to check for possible matrix effect caused by some commonly found species in the analyzed samples. Aqueous solutions of the analytes were prepared to contain 10 mg L^{-1} each of HNO_3 , AgNO_3 , Ca^{2+} (from CaO), NH_4Cl , NaOH and KOH , individually, and the analyte signal in the presence of each foreign species was recorded and evaluated.

The most striking result was derived from the presence of nitrate in the sample solution. It could be noticed that the analytical signal for all elements was completely suppressed by the addition of 0.14 mol L^{-1} HNO_3 . In order to attest that this effect was deriving from nitrate instead of a simple pH change in the solution, AgNO_3 was added to a standard solution at a concentration of 10 mg L^{-1} , and the same signal

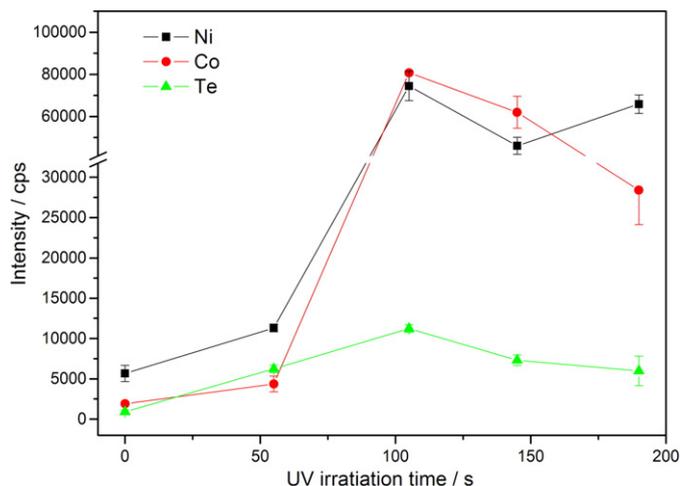


Fig. 3. Effect of UV irradiation time on the analytical signals obtained for Co (spiked at $20 \mu\text{g L}^{-1}$), Ni (spiked at $10 \mu\text{g L}^{-1}$) and Te (spiked at $5 \mu\text{g L}^{-1}$) in a vodka sample containing 7.5% acetic acid + 7.5% formic acid. Error bars represent the standard deviation based on triplicate measurements.

suppression was observed for all analytes. It can be assumed that the oxidizing properties of highly oxygenated ions such as NO_3^- may lead to the formation of highly reactive oxygen-derived radicals, which may bond to the analyte ions and form species that are readily soluble in the sample solution, hence reducing the efficiency of the PVG process. In addition, nitrate ions may act as radical quenchers, inhibiting the formation of volatile species of the analytes. This effect has been reported by other authors, and it was also associated to acids such as HCl, H_2SO_4 and H_3PO_4 [4,7,20,21]. A direct consequence is the fact that samples cannot be acidified with HNO_3 prior to the analytical procedure.

Solutions containing Na, Cl and Mg at individual concentrations of 10 mg L^{-1} did not lead to significant variation in the analytical signal, as expected. The only exception was noticed for Ni, for which the response was slightly suppressed in a solution containing $10 \text{ mg L}^{-1} \text{Cl}^-$, possibly due to radical quenching [21]. An opposite effect was noticed in a solution containing $10 \text{ mg L}^{-1} \text{K}$, as the analytical signal for Ni and Co increased by a factor of approximately two. Signal suppression, on the other hand, was readily noticed for Te from solutions containing $10 \text{ mg L}^{-1} \text{Ca}$, suggesting that the determination of this element would be conditioned to low concentrations of the alkaline-earth element in the sample. Since the concentration of Ca in the samples could be potentially high, this element was determined by ICP-MS with conventional pneumatic nebulization. Whereas the cachaça and vodka samples were proven to have Ca below 3 mg L^{-1} , the concentration of Ca in sweet vermouth was found to be higher than 12 mg L^{-1} , suggesting that signal suppression for Te in this sample would potentially hinder the determination of the referred analyte.

3.5. Determination of Co, Ni and Te in alcoholic beverages

Three distinct calibration approaches were evaluated as to their ability to provide accurate results for the three analytes in the samples, which include calibration against aqueous standards, calibration against ethanol solutions and analyte addition calibration, performed using each of the samples. In all cases, acetic acid and formic acid were added up to a combined concentration of 15% v/v and the resulting calibration solutions were submitted to the same PVG protocol as the samples.

The first observation was derived from the matrix-matched calibration solutions, using ethanol as a major component. Surprisingly, this combination has led to plasma instability, which severely affected the precision of the measurements. Hence, matrix-matching calibration was ruled out, and the remaining studies involved analyte addition calibration and external calibration against aqueous standards.

The calibration studies involving Co have shown that the sensitivity obtained using analyte addition calibration was very similar for all samples, although they all were significantly higher (about a factor of six) than the sensitivity obtained from calibration against aqueous standards submitted to the PVG procedure. In this case, it is clear that a general matrix effect is responsible for the discrepancies observed, which may arise from the ethanolic matrix itself, and analyte addition is the most adequate calibration approach.

For Ni, calibration curves obtained using aqueous standards submitted to PVG provided the same sensitivity as those obtained from analyte addition calibration for sweet vermouth and cachaça samples. However, the same effect was not observed for the vodka sample, since the sensitivity was approximately 30% higher using analyte addition calibration, demonstrating substantial matrix effect deriving from this sample. Although calibration against aqueous standards could have been used for the analysis of cachaça and sweet vermouth, analyte addition calibration provided adequate accuracy for all samples, and was adopted for the quantification of Ni.

For Te, the sensitivities obtained from analyte addition calibration curves for sweet vermouth and cachaça were different by approximately 30%. Analyte addition calibration curve obtained for the vodka sample resulted in significant sensitivity gain when compared to the other two

samples. The highest sensitivity was obtained with calibration against aqueous standards. Since the efficiency of the PVG process for Te was demonstrated to be significantly dependent on the presence of Ca and this element is present in mg L^{-1} levels in all samples, the lower sensitivity obtained from analyte addition calibration was already expected. The dependence of the sensitivity for Te on Ca concentration is such that the order of sensitivity obtained from analyte addition calibration followed the exact same order of Ca concentration in the samples, i.e., the sample with a higher Ca concentration (sweet vermouth) provided the lowest sensitivity amongst the other analyzed samples, whereas the sample with a lower Ca content (vodka) provided the highest sensitivity. This leads to the assumption that analyte addition calibration is mandatory for the quantification of Te.

3.6. Figures of merit and analytical application

The figures of merit obtained for the determination of Co, Ni and Te are shown in Table 2. Considering a relative sample introduction efficiency of 2% for pneumatic nebulization (PN), direct comparison of the detection limits obtained using PN and CVG suggests that the relative efficiencies of PVG are approximately 70% for Ni, 18% for Co and 5% for Te, i.e., superior to those obtained using a conventional nebulization setup, which directly impacts on the LOD achieved upon adoption of the PVG procedure.

In order to verify the accuracy of the PVG procedure, all samples were analyzed in parallel by ICP-MS with conventional pneumatic nebulization, following microwave-assisted sample digestion in a mixture of HNO_3 and H_2O_2 . Data in Table 3 show that the limits of quantification obtained by PVG-ICP-MS (calculated as 10 times the standard deviation of 10 blank measurements) are 3 to 35 times lower than those obtained using sample digestion and conventional analysis using a pneumatic nebulizer, which is largely due to the fact that in PVG-ICP-MS samples are analyzed without significant dilutions, since the matrix is readily separated from the analytes in a gas-liquid separator, following the photochemical reaction.

A total of five samples of varied alcoholic beverages were analyzed, and the results are shown in Table 3. As can be observed, good agreement was obtained between the results deriving from the PVG-ICP-MS procedure and those from conventional ICP-MS analysis, which attests the good accuracy of the procedure, also verified by a paired t-test at a 95% confidence level. The quantification of Te was only possible in one of the samples, which was expected considering the low abundance of this element. It is noteworthy that the presence of Te in alcoholic beverages such as cachaça and vodka may derive from the preparation of these beverages in copper appliances. Trace levels of Se and Te are usually present in copper materials, and it can be assumed that Te may be co-extracted with copper to the alcoholic medium. The trace elemental concentration in sample "cachaça 3", which originates from an artisanal producer, is higher than for the other cachaça samples, which are from major producers in Brazil.

4. Conclusions

Photochemical vapor generation coupled to ICP-MS has proven suitable for the determination of Co, Ni and Te in alcoholic beverages. The procedure is fast and relatively simple, considering that it requires no

Table 2
Figures of merit obtained for the determination of Ni, Co and Te in alcoholic drinks by PVG-ICP-MS.

	Ni	Co	Te
Slope/ μg^{-1}	3.4×10^3	2.2×10^3	2.4×10^3
R^2	0.9990	0.9990	0.9932
LOQ photo-CVG/ $\mu\text{g L}^{-1}$	0.1	0.5	0.4
LOQ pneumatic nebulizer/ $\mu\text{g L}^{-1}$	3.5	4.5	1.2
RSD/%	4–12	5–15	6–14

Table 3

Results obtained for the determination of Co, Ni and Te in alcoholic beverages by PVG-ICP-MS (direct analysis) or ICP-MS with pneumatic nebulization (digested sample); n = 3.

Samples	Ni/ $\mu\text{g L}^{-1}$		Co/ $\mu\text{g L}^{-1}$		Te/ $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Photo-CVG	Nebulizer	Photo-CVG	Nebulizer	Photo-CVG	Nebulizer
Cachaça 1	<0.1	<3.5	<0.5	<4.5	<0.5	<1.2
Cachaça 2	<0.1	<3.5	<0.5	<4.5	<0.5	<1.2
Cachaça 3	24.0 \pm 1.2	22.0 \pm 5.0	7.7 \pm 1.5	5.6 \pm 0.6	<0.5	<1.2
Sweet vermouth	40.1 \pm 1.1	44.5 \pm 7.7	14.8 \pm 1.8	13.6 \pm 4.5	<0.5	<1.2
Vodka	3.8 \pm 0.5	<3.5	0.7 \pm 0.01	<4.5	1.5 \pm 0.05	1.4 \pm 0.1

sample treatment and, hence, no expensive equipment for photochemical vapor generation. Detection limits were significantly lower than those obtained using conventional ICP-MS analysis following sample digestion, which is largely due to the absence of significant dilution that characterizes the PVG-ICP-MS procedure, since separation between the analyte and the sample matrix can be accomplished by the latter technique. In addition, estimated sample introduction efficiencies as high as 70% could be achieved, which are significantly better than the sample introduction efficiencies typically achieved using pneumatic nebulizers. The possibility of expanding the application of this technique to many transition elements may represent a significant contribution to the traditionally adopted procedures for the determination of trace elements with detection by ICP-MS.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, project 4779913/2011-0), for financial support. D.P.C.Q. has a scholarship and D.L.G.B. has a research scholarship from CNPq.

References

- [1] E.S. Chaves, F.G. Lepri, J.S.A. Silva, D.P.C. Quadros, T.D. Saint-Pierre, A.J. Curtius, Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 1211–1216.
- [2] L. Husáková, I. Urbanová, J. Šrámková, T. Černohorský, A. Krejčová, M. Bednaříková, E. Frýdová, I. Nedělková, L. Pilařová, Analytical capabilities of inductively coupled plasma orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry (ICP-oo-TOF-MS) for multi-element analysis of food and beverages, *Food Chemistry* 129 (2011) 1287–1296.
- [3] M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, R.E. Sturgeon, Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 837–847.
- [4] C. Zheng, Q. Ma, L. Wu, X. Hou, R.E. Sturgeon, UV photochemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation element, *Microchem. J.* 95 (2010) 32–37.
- [5] J. Golimowski, K. Golimoswska, UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 111–133.
- [6] R.E. Sturgeon, P. Grinberg, Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 222–231.
- [7] X. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G.J. Gardner, UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2092–2099.
- [8] C.S. da Silva, E.Q. Oreste, A.M. Nunes, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, Determination of mercury in ethanol biofuel by photochemical vapor generation, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 689–694.
- [9] A. de Jesus, A.V. Zmozinski, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, M.M. da Silva, Determination of mercury in naphtha and petroleum condensate by photochemical vapor generation atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 227–232.
- [10] P. Wu, L. He, C. Zheng, X. Hou, R.E. Sturgeon, Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1217–1246.
- [11] E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, A.B. dos Santos, L.M. Baika, C.S. Sato, L. Tormen, R.E. Sturgeon, A.J. Curtius, Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1627–1632.
- [12] C. Zheng, L. Yang, R.E. Sturgeon, X. Hou, UV photochemical vapor generation sample introduction for determination of Ni, Fe, and Se in biological tissue by isotope dilution ICPMS, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3899–3904.
- [13] P. Grinberg, R.E. Sturgeon, Ultra-trace determination of iodine in sediments and biological material using UV photochemical generation-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B.* 64 (2009) 235–241.
- [14] H. Deng, C. Zheng, L. Liu, L. Wub, X. Hou, Y. Lv, Photochemical vapor generation of carbonyl for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of cobalt, *Microchem. J.* 96 (2010) 277–282.
- [15] J. Liang, Q. Wang, B. Huang, Electrochemical vapor generation of selenium species after online photolysis and reduction by UV-irradiation under nano TiO₂ photocatalysis and its application to selenium speciation by HPLC coupled with atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 366–372.
- [16] P. Grinberg, R.E. Sturgeon, G. Gardner, Identification of volatile iron species generated by UV photolysis, *Microchem. J.* 105 (2012) 44–47.
- [17] Y. He, X. Hou, C. Zheng, R.E. Sturgeon, Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 769–774.
- [18] X. Guo, R.E. Sturgeon, Z. Mester, G.J. Gardner, UV light-mediated alkylation of inorganic selenium, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 575–579.
- [19] K. Suzuki, Y. Taniguchi, T. Watanabe, The effect of pressure on the dimerization of carboxylic acids in aqueous solution, *J. Phys. Chem. A* 77 (15) (1973) 1918–1922.
- [20] C. Zheng, L. Wu, Q. Ma, Y. Lva, X. Hou, Temperature and nano-TiO₂ controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 514–520.
- [21] C. Zheng, R.E. Sturgeon, X. Hou, UV photochemical vapor generation and in situ preconcentration for determination of ultra-trace nickel by flow injection graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1452–1458.