

Estudos para Validação de Métodos para Determinação de Mercúrio em Peixes

Priscila da Silva Marques

Bolsista de Iniciação Científica, Farmácia, UFRJ

Allegra Viviane Yallouz

Orientadora, Farmacêutica, Dr. Sc.

RESUMO

Neste trabalho estão descritos estudos objetivando a validação de dois métodos para determinação de mercúrio em peixes, um quantitativo e outro semiquantitativo para futuro credenciamento dos mesmos pelo INMETRO. Foi implementada a determinação quantitativa de mercúrio utilizando a técnica de fluorescência atômica. Foram avaliados os parâmetros instrumentais mais críticos

na determinação de mercúrio utilizando esta técnica; o método foi aplicado à amostras certificadas, e participou-se de exercícios interlaboratoriais. Com referência ao método semiquantitativo, estudos complementares referentes ao mínimo detectável, avaliação por diferentes operadores e comparações com o método quantitativo foram realizados.

1. INTRODUÇÃO

A exposição humana à intoxicação por mercúrio através da ingestão de peixe contaminado por este metal já foi exaustivamente estudada e está sintetizada na revisão publicada por Harada, sobre a chamada doença de Minamata^[1]. A intoxicação por metilmercúrio danifica células do sistema nervoso central, provocando descontrole dos membros, redução da visão, da fala, do olfato e da audição, além de distúrbios mentais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde^[2], peixes contendo até 300 ng/g podem ser consumidos diariamente, enquanto peixes contendo entre 300 e 500 ng/g deverão ser consumidos eventualmente, enquanto que peixes contendo acima do limite de 500 ng/g não deverão ser consumidos.

No Brasil, devido à atividades garimpeiras de extração de ouro com mercúrio, várias populações, principalmente na Amazônia estão vulneráveis à

intoxicação por este metal. Idealmente, uma avaliação contínua do teor de mercúrio no pescado deveria ser realizada como medida preventiva. O método analítico mais usual para a determinação de mercúrio em amostras biológicas é a técnica de vapor frio acoplada a um espectrômetro de absorção atômica^[3]. Apesar de simples, necessita de técnicos qualificados e infra-estrutura não compatível com a realidade da maioria das localidades, devido à enorme extensão por onde se espalham, a dificuldade de acesso e a baixa renda. Estes fatos inspiraram o desenvolvimento de um método de fácil operação, baixo custo e que atende às recomendações da OMS^[4]. Aprimoramentos e simplificações visando a diminuição do custo já foram anteriormente realizadas^[5] e neste momento esta é a base do ***Programa de Avaliação Semiquantitativa de Mercúrio em Peixes***^[5].

A validação de métodos é recomendada sempre que um novo método é desenvolvido, adequado a um novo problema ou simplificado^[6]. E recomenda-se o estudo de parâmetros relacionados ao desempenho do método que garantam ao usuário a confiabilidade dos resultados analíticos. Por outro lado, a técnica de Espectrometria por Fluorescência Atômica acoplado ao gerador de Vapor Frio (EFA-GVF), apresenta maior sensibilidade quando comparada com a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica acoplada ao mesmo sistema, anteriormente adotada na Coordenação de Química Analítica do CETEM (COA-CETEM). Recomenda-se^[6] também, estudos colaborativos envolvendo um grupo de laboratórios (Programas Interlaboratoriais), para aumentar o número de dados a serem avaliados. Ao final são definidos o nível de tolerância das medidas realizadas, conhece-se as interferências esperadas e a forma de contorná-las que são documentadas de forma clara. Sendo assim, os estudos realizados neste trabalho são de fundamental importância para que os dois métodos sejam credenciados pelo INMETRO.

2. OBJETIVOS

? Implementar metodologia analítica para determinação de mercúrio utilizando a técnica de fluorescência atômica acoplada a gerador de vapor frio? Estudar as variáveis relacionadas com o desempenho da técnica.
? Introduzir práticas do sistema da qualidade através da participação em Programa Interlaboratorial e aplicação a amostras certificadas.? Definir o limite de determinação do método semiquantitativo.? Aumentar o número de dados comparativos entre o método semiquantitativo e quantitativo de teores

de mercúrio em peixe.? Comparar a resposta de diferentes observadores visuais para uma mesma amostra.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Implementação do sistema de determinação de mercúrio pela técnica Espectrometria de Fluorescência Atômica

3.1.1 Equipamentos e infra-estrutura utilizada

? Espectrômetro de Fluorescência Atômica modelo: CVAFS-2, Brooks Rand Ltd? Gerador de vapor de mercúrio artesanal ? Balanças Analíticas Sartorius e OHAUS Plus e balança de topo Micronal ? Placa de aquecimento e banho de areia para a etapa de solubilização das amostras.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1. Solubilização e lixiviação das amostras

Os procedimentos de preparo das soluções são os mesmos anteriormente padronizados^[8]: Todos os reagentes utilizados foram com grau de pureza P.A. (para análise).

3.1.2.2 Determinação do mercúrio em solução

Para todas as determinações em soluções aquosas ou provenientes de lixiviação ou solubilização, utilizou-se o procedimento ilustrados no esquema da figura 1:

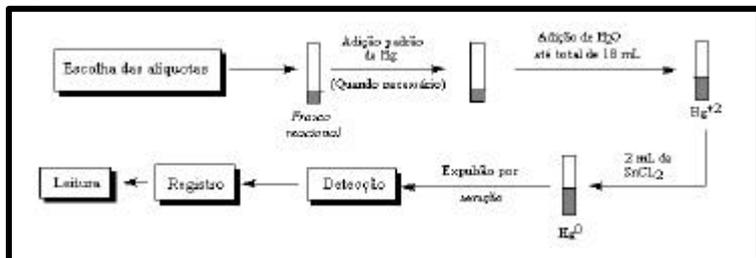


Figura 1 - Esquema do procedimento para as determinações quantitativas

3.1.2.3 Estudos dos parâmetros instrumentais do equipamento

Foram avaliados a variabilidade da linha base e a vazão ideal do gás de arraste.

Para a avaliação da variação da linha base ao longo do tempo, procedeu-se a leituras consecutivas do sinal, medidas em mV, em intervalos de 10 min, mantendo-se a posição do controlador de fluxo ajustado na posição 50 (corresponde a vazão de 940 mL/min) e o ganho da fotomultiplicadora fixado na posição 8. Por recomendação da literatura e do fabricante utilizou-se gás argônio para usufruir da melhor sensibilidade decorrente do uso deste gás. Para cada determinação, a medida de sinal é realizada anotando-se a linha base e o sinal máximo durante a expulsão do vapor. O valor do sinal é a diferença entre estas leituras.

Para a avaliação do melhor fluxo do gás de arraste, variou-se as posições da escala arbitrária do controlador de fluxo na seguinte ordem: 60, 50, 40, 30 e 20, que correspondem às vazões de 1030, 940, 756, 533 e 293 mL/min, respectivamente. Foram realizadas 2 a 3 medidas para cada fluxo, utilizando 250 µL de solução de 100 ng/g de mercúrio e 1,0 mL de solução de SnCl₂.

3.1.2.4 Variabilidade do sinal para soluções de mesma concentração

3.1.2.4.1 Soluções aquosas

Diferentes alíquotas (100, 250 e 500 µL), medidas com micropipetas calibradas semanalmente, de uma solução acidificada contendo 100 ng/mL de mercúrio foram utilizadas para este estudo nas condições previamente padronizadas e a variabilidade medida ao longo do mesmo dia e em diferentes dias.

3.1.2.4.2 Soluções provenientes da lixiviação de sedimentos

Esta avaliação foi realizada utilizando-se amostras de sedimentos de diversas concentrações (50000, 930, 90 e 60 ng/g). As determinações foram executadas com calibrações distintas e a precisão dos resultados finais de concentração.

3.1.2.4.3 Soluções provenientes da digestão de peixe

Esta avaliação foi realizada utilizando-se soluções provenientes da solubilização de amostras de peixe de duas concentrações distintas (~200 ng/g e ~2000ng/g). Foram realizadas 6 determinações alternadas das mesmas soluções num mesmo dia de trabalho, utilizando calibração externa com soluções aquosas e o método de adição padrão, para posterior comparação, já que estudos anteriores demonstraram que a solubilização de amostras de peixe geram soluções com efeito de matriz. Os resultados obtidos foram comparados e avaliados estatisticamente.

3.1.2.5 Faixa linear de trabalho para definição das concentrações da curva de calibração

Diferentes alíquotas (50, 100, 250, 500 e 1000 µL), medidas com micropipetas calibradas semanalmente, de uma solução acidificada contendo 100 µg/L de mercúrio em solução foram utilizadas para este estudo. A determinação foi feita em blocos de ordem crescente de massa de mercúrio (5-100 ng), perfazendo um total de 3 leituras para cada concentração. Para o cálculo da equação da reta e do coeficiente de correlação foram utilizadas planilhas de cálculo desenvolvidas na COA com este fim, onde médias das leituras e o coeficiente de correlação são calculados utilizando regressão linear.

3.1.2.6 Garantia da qualidade

3.1.2.6.1 Amostra controle, amostras de referência e amostras certificadas

Foi utilizada como amostra controle à cada nova calibração uma solução de concentração conhecida, para avaliação do desempenho diário. Amostras certificadas de músculo e fígado de peixe identificado como Dogfish (*Squalus acanthias*) produzidas e distribuídas pelo National Research Council Canadá (NRC-CNRC), com os nomes comerciais DORM-1 e DOLT-2 serviram para a avaliação de desempenho do método de determinação de mercúrio em peixes utilizado na COA. Foram realizadas 7 determinações da amostra DORM-1 e 3 da amostra DOLT-2, utilizando o procedimento de solubilização padronizado^[8].

3.1.2.6.2 Participação em exercícios interlaboratoriais

Desde dezembro de 1999, a CQA participa de avaliações de desempenho, no Programa Interlaboratorial coordenado pela Canadian Food Inspection Agency, Fish Inspection Program, Canadá. Periodicamente são enviadas 4 amostras de peixe enlatado com diferentes teores de mercúrio (~200 a 1500 ng/g) para determinação pela técnica normalmente utilizada nas análises de rotina. Os laboratórios participantes analisam cada amostra em triplicata e em 2 dias diferentes, perfazendo um total de 24 determinações. Os resultados são enviados à Coordenação do Programa e posteriormente avaliados estatisticamente. Durante o período deste trabalho, participou-se de 2 rodadas, sendo a primeira já se recebeu o relatório.

3.1.2.7 Estudos com o método semiquantitativo

As determinações semiquantitativas de mercúrio foram realizadas utilizando sistema similar ao da figura 2a, e ilustrado no esquema da Figura 2b, descritos anteriormente por Calixto e Yallouz^[8].

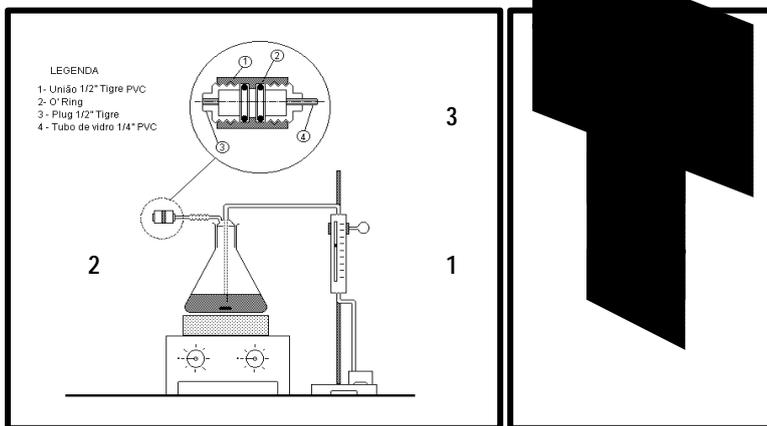


Figura 2 - Sistema para determinação semiquantitativa :a1- controlador de fluxo; a2- sistema rescional; a3 - suporte com papel detector; b1-cloridrato de hidroxilamina;b2 cloreto estânico; b3 - ar comprimido

3.1.4.7.1 Percepção da menor concentração detectável

O procedimento adotado está de acordo com as recomendações da Guia para validação de métodos editado pela União Européia^[6], para avaliação da presença ou não de analitos. Soluções aquosas contendo massas decrescentes de mercúrio, correspondentes a concentrações no peixe de 150, 100, 75 e 50 ng/g foram determinadas n vezes (n=5 ou 7) e anotados os resultados da observação. A detectabilidade foi definida como sendo a percepção ou não da cor característica do complexo HgI_4^- formada no papel detetor.

3.1.4.7.2 Comparação do desempenho da determinação semiquantitativa em relação ao método quantitativo, avaliado por diferentes observadores

Amostras de peixe de água doce adquiridas no mercado carioca foram submetidas em paralelo à determinação quantitativa e semiquantitativa. Foram realizadas 3 determinações utilizando cada uma das técnicas. A determinação quantitativa foi feita de acordo com o procedimento da figura 2 e a semiquantitativa de acordo com o procedimento da figura 4. Diferentes observadores foram convocados para avaliar a cor gerada nos papéis detectores para posterior comparação dos resultados. Os valores obtidos foram tabelados e avaliados criticamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método quantitativo

4.1.2 Estudos dos parâmetros instrumentais do equipamento

Os resultados demonstraram que a flutuação média natural da linha base é da ordem de 3 unidades, ficando em 5 unidades a diferença máxima. Estabeleceu-se que o menor sinal a ser utilizado nas calibrações deveria corresponder a aproximadamente 10 vezes este valor. Sendo assim, ao se estudar a faixa de trabalho, optou-se pelo uso da solução que fornecesse este sinal.

Já para a determinação da vazão ideal, a média das leituras foi lançada em gráfico, onde observou-se que a maior sensibilidade é alcançada na posição correspondente ao fluxo de 533 mL/min. No entanto, o tempo necessário

1 b

2

3

Papel
detetor

para a "limpeza" do sistema de geração de vapor é maior neste caso. Sendo assim, optou-se por trabalhar com fluxo correspondente à posição 50 (940mL/min), onde apesar da sensibilidade ser um pouco menor, temos uma volta à linha base bem mais rápida. É importante ressaltar que a sensibilidade é afetada pela geometria do frasco reacional.

4.1.3 Variabilidade do sinal para soluções de mesma concentração

A variabilidade dos resultados foi quantificada através da medida do coeficiente de variação, que representa a relação entre o desvio padrão e a média de n determinações.

4.1.3.1 Soluções aquosas

A variabilidade apresentada em avaliações realizadas no mesmo dia (n=16) e em dias diferentes (n=18) foram similares e ficaram na faixa de 1 a 8%.

4.1.3.2 Soluções provenientes da lixiviação de sedimentos

A variabilidade dos resultados para as diferentes concentrações na solução (60, 90, 930 e 1350 µg/L e 50 mg/L), demonstrou ser dependente da concentração na amostra original, o que pode ser devido a homogeneidade da amostra sólida. Para as amostras contendo 60 e 90 ng/g, a faixa do coeficiente de variação dos resultados foi de 7-14%, enquanto para as mais concentradas (930 e 50000 ng/g) observou-se coeficientes entre 1-6%.

4.1.3.3 Soluções provenientes da solubilização de amostras de peixe

A precisão dos resultados obtidos utilizando a técnica de adição padrão foi comparada, com os resultados calculados através de calibração externa com soluções aquosas (tabela 1).

Tabela 1 - Variabilidade do sinal de soluções com matriz de peixe

	Média ± desvio padrão (com adição padrão)	Média ± desvio padrão (sem adição padrão)
	2240 ± 162	1881 ± 56
	251 ± 6	220 ± 4

Observou-se que os resultados são mais precisos, quando do uso da calibração externa. No entanto, estudos anteriores demonstraram que há um efeito da matriz não controlado, que ocorre eventualmente, mesmo quando a solução está totalmente límpida.

4.1.4 Faixa linear de trabalho para definição das concentrações da curva de calibração

Foram avaliadas todas as possibilidades de combinações dos pontos de calibração, observando-se que o melhor coeficiente de correlação (0,9999) foi obtido quando foram correlacionadas as massas de 5, 10, 25 e 100 ng de mercúrio com o sinal gerado. A segunda melhor correlação (0,9992) foi obtida utilizando as massas de 5, 10, 25 e 50 ng. Dependendo do nível de concentração nas amostras poderão ser utilizadas quaisquer uma das duas opções.

4.1.5 Garantia da qualidade

4.1.5.1 Amostra controle, amostras de referência e amostras certificadas

Uma solução proveniente da lixiviação de uma amostra certificada de sedimento é utilizada diariamente como amostra controle. Para o controle de qualidade da curva de calibração, a cada 6 determinações da solução teste, a determinação de uma alíquota correspondente a 10 ou 25 ng, seguida de uma alíquota da amostra controle, são realizadas. Os sinais (medidos em mV) decorrentes desta prática e as massas de mercúrio correspondentes foram incluídos na planilha de cálculo padronizada.

Os resultados obtidos pela análise de amostras certificadas foram utilizados para avaliar a exatidão do método implementado e se encontram na tabela 2. Esta avaliação foi feita utilizando o conceito de hipótese nula⁽⁹⁾ que compara a diferença entre a média experimental e o valor hipotético que seria obtido, considerando os erros aleatórios, através da fórmula:

$$\frac{\bar{X}_m - X_t}{s} \sqrt{n}$$

n

Onde, \bar{X}_m é o valor médio de n determinações, X_t é o valor teórico ou certificado, t é um valor tabelado e s o desvio padrão para n determinações.

É considerado exato o método onde a afirmativa acima é confirmada, ou seja a diferença $X_m - X_t$ é menor do que o módulo da direita.

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos valores utilizados para amostras certificadas

	Média \pm desvio padrão (com adição padrão)		
	2146 \pm 168	1990 \pm 100	Exato
	753 \pm 49	798 \pm 74	Exato

4.1.5.2 Participação em exercícios interlaboratoriais

Os resultados da primeira rodada utilizando o método implementado foram considerados satisfatórios, conforme os critérios utilizados pela coordenação do Programa, ou seja os resultados de cada laboratório devem se encontrar no intervalo de média ± 2 vezes o desvio padrão. Estamos no aguardo dos resultados da II rodada.

4.2 Estudos com o método semiquantitativo

4.2.1 Definição da menor concentração detectável

O critério para definir o mínimo detectável é aquele que consegue ser percebido em 100% das observações. Neste estudo e para estas condições, foi observado que este limite fica na concentração correspondente a 100 ng de mercúrio por grama de peixe (tabela 3).

Tabela 3 - Determinação do mínimo detectável para o método semiquantitativo

		Resultados positivos/negativos
600	3	3/0
150	5	5/0
100	7	7/0
75	7	5/2
50	7	0/7

4.2.2 Comparação do desempenho da determinação semiquantitativa em relação ao método quantitativo, avaliado por diferentes observadores

Para a definição da faixa esperada de concentração utilizamos como critério a definição do intervalo de confiança descrita por SKOOG^[9] para 95% de confiança, representado pela fórmula:

$$X_t = X_m \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n

onde X_m é a média, t é um parâmetro estatístico tabelado que representa o afastamento da média em unidades de desvio padrão e n , é o número de determinações.

Tabela 4 - Determinação do mínimo detectável para o método semiquantitativo

	Resultado do quantitativo: Média ? ? (n)		Resultado do semiquantitativo (n), N
	364 ? 23 (n =3)	322-368	? 300(5), 6
	757 ? 106 (n =2)	433-1080	300-600(7), 3
	389 ? 60 (n = 3)	279-499	? 300(2), 3
	1945 ? 50 (n = 3)	1853-2037	? 1000,(3), 3
	626 ? 47 (n = 3)	543-709	300-600/ 600 (2), 3

Notas: n = número de determinações; N= número de observadores; Suru 01 = surubim, Doura = dourada, Tucu = tucunaré e Goru = gurojuba

Observou-se que para a mesma amostra os resultados apresentados foram idênticos e a resposta dos diferentes observadores foi unânime. A única exceção foi observada na avaliação da amostra GORU 01: a determinação da solução resultante da primeira solubilização apresentou resultado equivalente a faixa de 300 a 600, enquanto o produto da segunda solubilização forneceu o resultado similar de 600ng. Observou-se uma tendência a ficar somente na menor faixa de concentração prevista. Estudos para avaliar o poder de discriminação entre as concentrações mais próximas estão em andamento. Alternativas para uma melhor definição poderão ser obtidas utilizando papéis de diâmetro menor^[7].

4.3 Produtos

4.3.1 Tradução do manual do aparelho de fluorescência atômica

A tradução do manual do aparelho de fluorescência atômica foi realizada em paralelo ao processo de implementação, que ficará na biblioteca do CETEM, juntamente com o relatório de implementação.

ts

4.3.2 Método analítico padronizado pela CQA e guias práticos para o uso na rotina diária

Está em fase final de elaboração o documento descritivo do método analítico padronizado no formato da CQA. Além do método completo, o procedimento diário e um guia prático para otimização do tempo foi elaborado para auxiliar os futuros operadores na rotina diária.

4.4 Trabalhos em andamento e trabalhos futuros

Testes para avaliar o poder de discriminação entre concentrações próximas estão em andamento, assim como, as avaliações interlaboratoriais do método semiquantitativo, com outro grupo de usuários, formado por equipe do Centro Federal de Educação Tecnológica de Química do Maracanã (CEFETEQ), onde o método semiquantitativo foi recentemente implementado. Avaliações da aplicabilidade deste método com outros tipos de pescado serão realizadas em futuro próximo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o método de determinação de mercúrio em peixes, utilizando a técnica de fluorescência atômica acoplada a sistema de vapor frio é exato, mas estudos objetivando a melhoria da precisão deverão ser feitos. O acompanhamento a longo prazo dos resultados poderá demonstrar a não necessidade da prática de adição padrão, objetivando diminuir o custo e o tempo de análise. A participação em programa Interlaboratorial evidenciou ser uma prática imprescindível à garantia da qualidade, e sua continuidade é recomendada. O método semiquantitativo demonstrou atender aos seus objetivos, e caso se confirme o seu bom

desempenho nas avaliações interlaboratoriais com outros usuários, poderá ser feito o pedido de seu credenciamento pelo INMETRO.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Harada, M. (1995). "Minamata Disease - Methyl mercury poisoning in Japan caused by environmental pollution", *Critical Reviews in Toxicology*, v.25, n.1, p.1-24.
- 2- World Health Organization (WHO),(1990). "Environmental health criteria for methyl mercury". Geneva, International Programme on Chemical Safety, 144p.
- 3- Herber, R.F.M. e Stoeppler,M. (1994). *Trace Element Analysis in Biological Specimens*. Elsevier, Amsterda, 570p.
- 4- Yallouz, A .Y., Campos, R.R.C. e Paciornik.(2000). "A Low-Cost Non instrumental method for semiquantitative determination of mercury in fish. Fresenius". *Journal of Analytical Chemistry*. 366(5):461-465.
- 5 - Yallouz, A.V. , Calixto, T M. P. Programa de Avaliação Semiquantitativa de Mercúrio em Peixes . Home page : www.cetem.gov.br/mercurio/semiquanti
- 6 - EURACHEM.(1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. Eurachem Guide, 1st Internet Version, 61 p.
- 7 - Yallouz, A . Y. (1997) "Estudo de parâmetros experimentais visando a construção de um sistema simples para determinação semi-quantitativa de mercúrio em peixes". Tese de Doutorado. PUC-Rio.
- 8 - Yallouz, A.V. , Calixto, T M. P. (2000). "Estudos para a Consolidação Metodológica e elaboração de Material Didático e de Divulgação do Programa de Avaliação Semiquantitativa Mercúrio em Peixes", VIII Jornada Interna Científica, CETEM// MCT, RJ.
- 9 - SKOOG, D.A., WEST, D.M. e HOLLER, J.H. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th Ed., Saunders College Publishing, Fort Worth, 870p.