

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE METIL-MERCÚRIO (MeHg) EM PEIXE POR MEIO DA TÉCNICA FIA-CV-AAS

João Cristiano Ulrich ¹, Marcos Antonio Hortellani ¹, Jorge Eduardo de Souza Sarkis ¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN / SP, São Paulo, Brazil
jculrich@ipen.br, mahortel@ipen.br, jesarkis@ipen.br

Resumo

O desenvolvimento de um método analítico para a determinação de metil-mercúrio (MeHg) em peixe por meio da técnica de FIA-CV-AAS foi realizado no laboratório. Com o objetivo de confirmar que o método desenvolvido é apropriado para uso pretendido o mesmo foi validado, empregando-se linearidade, repetitividade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição, como características de desempenho do método.

Palavras-chave: metil-mercúrio; validação; FIA-CV-AAS.

1. INTRODUÇÃO

A determinação analítica de metil-mercúrio com alta qualidade nos resultados é uma ferramenta indispensável nos dias atuais para a avaliação dos efeitos ambientais e toxicológicos dessa forma do mercúrio. O metil-mercúrio (MeHg) é uma das formas mais tóxicas do elemento. Uma vez formado, entra na cadeia alimentar pela rápida difusão e forte ligação a proteínas na biota aquática, atingindo suas concentrações mais altas nos tecidos de peixes no topo da cadeia alimentar, devido à biomagnificação através de níveis tróficos. Para peixes comestíveis a concentração de Hg total não deve exceder 0,5 mg kg⁻¹ [1], sendo que, em média, 85% do Hg total se encontra na forma de MeHg [2]. O consumo de pequenas quantidades de peixe contaminado pode afetar acentuadamente a ingestão de MeHg em seres humanos e as preocupações referentes ao mercúrio estão baseadas em seus efeitos em ambos, o ecossistema e a saúde humana [3-4].

Várias técnicas analíticas tem sido utilizadas para obter resultados satisfatórios de especiação de mercúrio [5-7]. A técnica de espectrofotometria de absorção atômica com sistema de injeção em fluxo e geração de vapor frio (FIA-CV-AAS) vem sendo utilizada há vários anos apresentando resultados precisos e satisfatórios [8-9].

O aumento da demanda para determinações de ultratraços implica que a técnica utilizada deve ser cuidadosamente examinada quando se aplica um sistema que não foi previamente estudado pelo laboratório ou ainda faz parte de pesquisa pelo grupo responsável pelas determinações. Dessa forma, um processo de medida precisa ser bem avaliado e executado com todos os cuidados possíveis para ser implementado e utilizado rotineiramente.

Com o objetivo de confirmar que o método desenvolvido é apropriado para uso pretendido o mesmo deve ser validado. O termo “Validação de um método”, segundo texto da ANVISA [10], é definido como “aquele que estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico”.

As características de desempenho selecionadas, neste trabalho, foram linearidade, repetitividade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição.

2. MÉTODOS E MATERIAIS

2.1. Materiais e reagentes

As medidas da absorbância foram efetuadas em um instrumento espectrofotômetro de absorção atômica modelo AA220-FS, fabricado pela Varian.

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas amostras de material de referência certificado (MRC) denominado “Dorm-2 Dogfish Muscle Certified Reference Materials for trace Metals”, proveniente do National Research Council Canadá – NRCC.

Todas as amostras foram preparadas com reagentes de grau analítico, isentos de mercúrio (Merck p.a.) e diluições foram efetuadas com água desmineralizada obtida com desmineralizador modelo DPL 10000-FB (Deion, Equipamentos e Processos Ltda.). A preparação das amostras e diluições foram realizadas em base massa. As soluções padrão estoque e soluções padrão diluídas foram preparadas por procedimentos operacionais padronizados pelo Sistema de Gestão da Qualidade implantado no laboratório.

2.2. Preparação de amostra

Amostras e material de referência foram lixiviados com HCl 6 mol L⁻¹. O ácido utilizado extrai quantitativamente o MeHg da amostra biológica e uma coluna de troca iônica é usada para separar o MeHgCl não iônico do complexo HgCl⁻⁴. Uma vez separado, o MeHg é decomposto, com radiação ultravioleta (UV), para Hg²⁺. Seguido pela determinação por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste de linearidade

A calibração analítica é um dos principais estágios da análise independente da técnica instrumental aplicada. Esse fato requer que essa calibração seja considerada como uma característica de desempenho do método analítico, pois, caso os dados medidos, das soluções padrões, não apresentem uma calibração satisfatória, os resultados finais provenientes da metodologia apresentarão resultados errôneos.

A linearidade da função calibração é claramente uma questão muito importante. O coeficiente de correlação, *r*, tem frequentemente sido usado como um teste crucial para a linearidade. Entretanto, o coeficiente de correlação próximo da unidade não implica em uma função calibração linear. Relações aparentes empíricas podem ser confirmadas por várias aproximações com o objetivo de checar a linearidade da função calibração. Plotar resíduos ($R = Y_{\text{observado}} - Y_{\text{calculado}}$) com respeito a variáveis independentes não devem mostrar comportamento sistemático e os pontos devem ser randomicamente distribuídos em torno do valor zero.

3.2. Estabilidade de calibração e gráficos de controle

Um dos importantes aspectos da calibração é a determinação do intervalo de calibração. A estabilidade da calibração envolve dois aspectos:

1. A extensão dos parâmetros experimentais a serem otimizados
2. O controle que um destes parâmetros tem para manter as condições experimentais constantes.

A técnica FIA-CV-AAS requer o ajuste de muitos parâmetros tais como, posição da lâmpada, posição da célula de quartzo, fluxo de gás, fluxo da amostra, entre outros. Embora modernos equipamentos podem controlar estes parâmetros nossa experiência indica que calibrações frequentes são necessárias. Isto pode ser melhor avaliado com a ajuda de gráficos de controle de qualidade (QC), os quais são maneiras simples e poderosas de monitorar a estabilidade de um procedimento analítico.

Na Figura 1 foram mostrados os valores de inclinação (slope) dos gráficos de calibração obtidos em diferentes dias de análise [11]. Os dados obtidos indicam que os ensaios realizados apresentaram resultados satisfatórios, os parâmetros estabelecidos e o desempenho do equipamento estão corretos. Dessa forma, os resultados obtidos da determinação de MeHg nos períodos de calibração são válidos. Caso, os resultados apresentassem uma variação muito grande, no período avaliado, os parâmetros estabelecidos e os resultados obtidos nas determinações deveriam ser reavaliados.

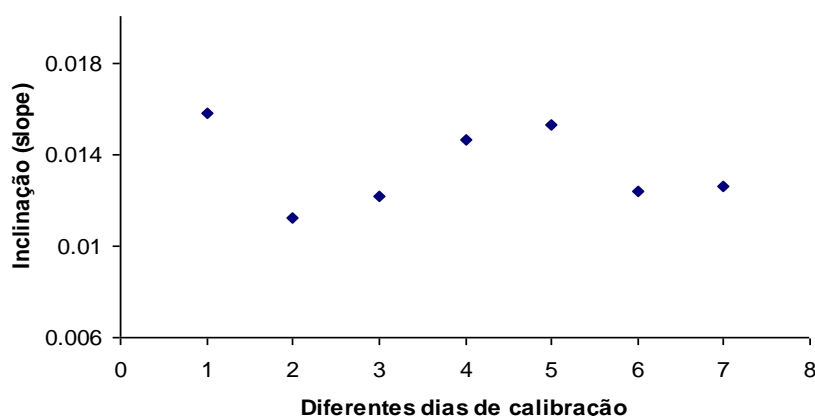


Fig.1. Gráfico de controle com valores de inclinação da reta analítica versus data de calibração

3.3. Repetitividade

Segundo o VIM [12], repetitividade de resultados de medições é definida como o “grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição”. As condições de repetitividade incluem mesmo procedimento, mesmo observador, mesmo instrumento de medição utilizando as mesmas condições, mesmo local e finalmente, que a repetição seja realizada em curto período de tempo.

Analisando-se soluções de diferentes concentrações, a faixa de repetitividade obtida neste trabalho foi de 3-9%.

3.4. Exatidão

Um dos modos mais comuns para controle de exatidão de um método analítico é a análise de um material de referência.

Conforme documento do INMETRO [13], caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (X_v) deve estar dentro do intervalo $X_{lab} \pm$ incerteza expandida. Quando isso não acontece, esse intervalo pode estar subestimado. Nesses casos é empregado o conceito de erro normalizado (E_n):

$$E_n = \frac{|X_{lab} - X_v|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1)$$

Onde: U_{ref} = incerteza associada ao valor verdadeiro.

Na Tabela 1, são apresentados os valores obtidos para o material de referência certificado Dorm-2. Nesta tabela, verifica-se o resultado obtido no laboratório com a incerteza associada e o valor certificado do material, ainda na mesma tabela encontram-se os valores de U_{lab} , U_{ref} e E_n .

Data	X_{lab}	X_v	U_{lab}	U_{ref}	E_n
06/12/2007	4,04	4,47	0,86	0,32	0,5
27/02/2008	3,85		0,82		0,7
26/03/2008	4,02		0,85		0,5
10/04/2008	3,84		0,64		0,9
19/05/2008	4,00		0,67		0,6
28/04/2008	3,70		0,78		0,9

Tabela 1. Resultados obtidos das análises do material de referência certificado Dorm-2

Por definição, se $|E_n| \leq 1$, os resultados obtidos estão adequados.

3.5. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção do método (LD) é definido, segundo documento do INMETRO [13], como “a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero”. Ainda segundo o documento, para a validação de um método analítico, é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, “branco + 3s” e “0 + 3s”, considerando análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente.

O limite de Quantificação, também definido no documento do INMETRO [13], é “a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão”.

Após análises realizadas os valores obtidos para Limite de Detecção e Limite de Quantificação foram de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (para 10 desvios-padrão), respectivamente.

3.6. Incerteza de medição

O resultado de uma medição é apenas uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. Sendo assim, a representação completa desse mensurando deve incluir a incerteza de medição.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o VIM [12] é

“parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos ao mensurando”.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

Com o objetivo de identificar e analisar as possíveis fontes de incerteza na metodologia proposta, os procedimentos adotados, para cada etapa, foram detalhados e estruturados de forma a garantir a abrangência necessária para o entendimento e conhecimento do processo de medição e evitar a duplicidade de fontes de incerteza.

Para facilitar o entendimento utilizou-se o diagrama de causa-e-efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe. O uso do diagrama facilita a resolução de problemas, associando os sintomas e suas causas, até a solução. Na figura 2, é mostrado o diagrama causa-e-efeito, para a metodologia de determinação de metil-mercúrio.

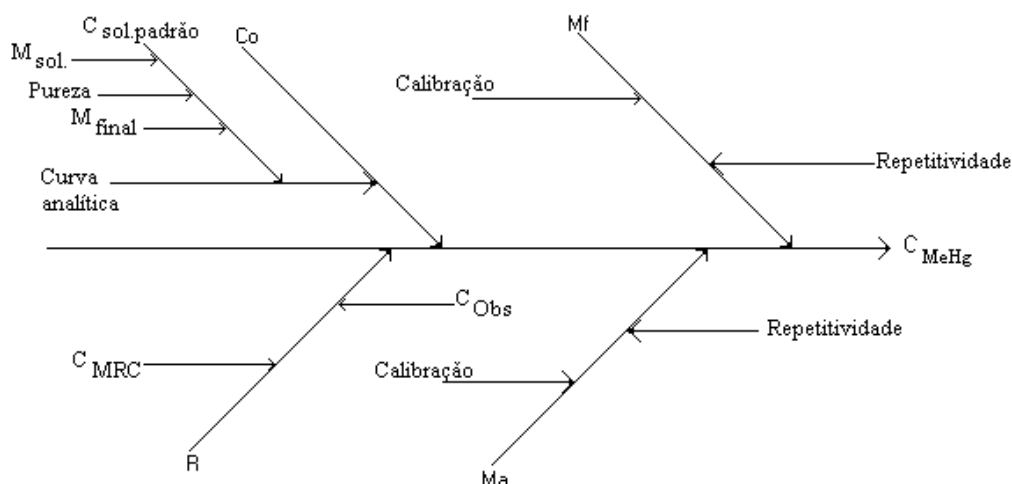


Figura 2. Diagrama causa-e-efeito para a determinação de MeHg

As ramificações da linha principal são as causas que controlam o resultado C_{MeHg} . Essas causas estão identificadas também na equação utilizada para o cálculo da concentração de metil-mercúrio na amostra.

$$C_{MeHg} = \frac{C_o \times m_f}{R \times m_a} / 1000 \quad (2)$$

Onde:

C_{Hg} = Concentração de Hg na amostra (em $\mu\text{g g}^{-1}$)

C_o = concentração de Hg encontrada na alíquota analisada (em $\mu\text{g kg}^{-1}$). O MeHg é convertido a Hg durante o processo de preparação das amostras.

m_f = massa final de amostra (diluição final) (em g)

R = taxa de recuperação obtida pela análise do Material de Referência Certificado

m_a = massa de amostra utilizada (em g)

Portanto, cada causa foi extensivamente estudada e verificada sua abrangência na contribuição da incerteza global do método, chamada de incerteza combinada.

A estimativa da incerteza associada ao resultado da medição foi obtida para várias alíquotas do material de referência. O valor médio obtido na incerteza expandida, com $k=2$ e 95% de confiança, corresponde a um valor de 21% no resultado da medição.

3.7. Determinação em amostras reais

Uma outra característica de desempenho do método que foi avaliada foi a aplicação do método em amostras reais. Cinco amostras, de peixe liofilizado e “in natura”, de diferentes frascos, foram analisadas, e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 3.

AMOSTRA	RESULTADO MeHg \pm incerteza ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	0,665 \pm 0,141
2	0,241 \pm 0,051
3	0,291 \pm 0,062
4	0,245 \pm 0,052
5	0,192 \pm 0,041

Tabela 3. Concentrações de MeHg ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidas neste trabalho em amostras reais.

4. CONCLUSÕES

A execução da validação somente é iniciada após um planejamento de todas as etapas e definidos os experimentos a serem realizados. A descrição de cada etapa e registro dos resultados obtidos constituem uma estratégia para a validação, como um todo, do método analítico. Dessa forma, após cada etapa concluída, é fundamental documentar o procedimento realizado e elaborar análise crítica com conclusão, aprovando ou indicando a necessidade de ação corretiva. Isto é importante porque assume-se que uma vez implantado o método conforme descrito, será sempre executado da mesma maneira. Caso contrário, o desempenho real do método não irá corresponder ao previsto nos experimentos da validação.

O relatório final de validação, assim como o procedimento documentado são registros importantes do sistema da qualidade do laboratório e devem estar inseridos no controle de documentos.

REFERÊNCIAS

- [1] WHO; Methylmercury in Environmental Health Criteria 101, Geneva: World Health Organization, 1990, vol. 118, p. 144..
- [2] Bisinoti, M. C.; Jardim, W. F.; Quim. Nova 2004, 27, 593.
- [3] Geier MR; Geier DA. Thimerosal in childhood Vaccines, Neurodevelopmental Disorders, and Heart Disease in the United States. Journal of American Physicians and Surgeons, 8(1): 6-11, 2003.
- [4] Gilbertson, M. Male Cerebral palsy hospitalization as a potencial indicator of neurological effects of methylmercury exposure in Great Lakes Communities. Environmental Research, volume 95, Issue 3, 375-384, 2004.
- [5] Huang, CW; Jiang, SJ. Speciation of mercury by reversed-phase liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, vol. 8, 681-686, august 1993.
- [6] Chau, YK. Chromatographic techniques in metal speciation. Analyst, vol. 117, 571-575, march 1992.
- [7] Quevauviller, P.; Filippelli, M.; Horvat, M. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. Trends in analytical chemistry, vol. 19, nos. 2+3, 2000.
- [8] Davies, IM. Determination of methylmercury in the muscle of marine fish by cold-vapor atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta, 102, 189-194, 1978.
- [9] Ubillús, F.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Lagarda, MJ. Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. Food Chemistry, 71, 529-533, 2000.
- [10] Guia para qualidade em química analítica: Uma assistência a Acreditação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1. ed., Brasília, 2004.
- [11] Carril, M.P.; Corbillón, M.S.; Madariaga, J.M. Validation of an analytical method to determine trace metal impurities in fluoride compounds by flame atomic absorption spectroscopy. Accreditation Qual. Assur. 2, 301-308, 1997.
- [12] Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia: portaria INMETRO n. 029 de 1995, INMETRO, SENAI – Departamento Nacional, 5. ed., Rio de Janeiro, 2007.
- [13] DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 02, Junho 2007.