

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DE MERCÚRIO EM PEIXE: DIFUSÃO, CONTROLE DE QUALIDADE E ESTUDO DE NOVA APLICAÇÃO

Débora Maia Pereira

Bolsista de Iniciação Científica, Engenharia Química, UFRJ

Allegra Viviane Yallouz

Orientador, Farmacêutica, D. Sc.

Silvia Egler

Co-orientador, Bióloga, M. Sc.

RESUMO

Neste trabalho são apresentados e discutidos os resultados referentes ao trabalho de monitoria de método de determinação semiquantitativa de mercúrio em peixes, visando a sua difusão na sociedade, controle de qualidade dos resultados analíticos através da participação em

exercícios interlaboratoriais, coordenados pela Canadian Food Inspection Agency, e estudos da aplicabilidade do método semiquantitativo à determinação de mercúrio em urina, visando o seu uso em diagnóstico de exposição ocupacional.

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio e seus derivados têm sido usados em atividades industriais cujos resíduos vêm sendo apontados como fonte preocupante de poluição, principalmente devido à sua persistência e a possibilidade de se converter em outras espécies. Muitas vezes esta conversão gera a formação de compostos mais tóxicos do que o originalmente depositado. A preocupação maior a respeito da poluição mercurial é decorrente dos efeitos à saúde relacionados à exposição ao mercúrio elementar e ao metilado que afetam, principalmente o sistema nervoso central. Estudos comprovaram que a principal via de exposição ao metil mercúrio é o peixe contaminado, sendo este fato relevante para populações ribeirinhas que têm como principal fonte de proteína o peixe. Já a exposição ao mercúrio elementar ocorre, principalmente, com trabalhadores expostos a atmosferas com alta

concentração de mercúrio. Para avaliar o nível de intoxicação desses trabalhadores o bioindicador mais apropriado é a urina. Os métodos mais comuns utilizados na determinação de mercúrio tanto em peixe como em urina se baseiam na técnica de Absorção Atômica e Fluorescência Atômica. O investimento e a mão-de-obra necessários a operação destes equipamentos inviabilizam o seu uso em grande escala, o que seria desejável tanto para a prevenção de intoxicação por peixe contaminado como para o diagnóstico precoce no caso de trabalhadores expostos. Inicialmente foram realizados estudos visando a busca de solução compatível com a realidade dos consumidores de pescado em regiões com histórico de poluição, ou seja, regiões longínquas e de difícil acesso. Com este objetivo, foi desenvolvido um método semiquantitativo de baixo custo e de fácil operação, onde agentes comunitários, devidamente treinados, poderiam utilizá-lo (Yallouz, AV *et al.* 2000). Posteriormente foi aprimorado e simplificado (Yallouz, AV & Calixto, T.M.P 2000).

O método semiquantitativo de mercúrio em peixe enquadra as amostras em faixas de concentração, de acordo com os pontos escolhidos para a calibração. Este método vem sendo usado, na classificação das amostras, de acordo com os critérios para consumo seguro do pescado estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Legislação Brasileira. Este método envolve uma etapa de solubilização (fig.1a) da amostra com uma solução ácida oxidante, seguida da determinação em um sistema (fig.1b) no qual à solução contendo mercúrio é adicionada uma solução redutora. O mercúrio metálico formado nesta etapa é expulso da solução por borbulhamento com ar comprimido, e conduzido ao sistema detector. Neste, encontra-se um papel recoberto com uma emulsão contendo iodeto cuproso que forma um complexo colorido ao reagir com o mercúrio. A intensidade desta coloração varia com a concentração de mercúrio na amostra.

O método de determinação semiquantitativa pode ser utilizado em diferentes aplicações, dentre elas a avaliação da qualidade do ar, gás natural, pescado, efluentes, solos e sedimentos. Neste trabalho, são apresentados experiências de difusão do método de avaliação da qualidade do pescado de acordo com a Tabela 1, do controle de qualidade dos resultados analíticos através da participação em exercícios interlaboratoriais, coordenados pelo Canadian Food Inspection Agency, assim como no estudo da aplicabilidade do método semiquantitativo de determinação de mercúrio na avaliação da exposição de trabalhadores da indústria, de acordo com a Tabela 2.

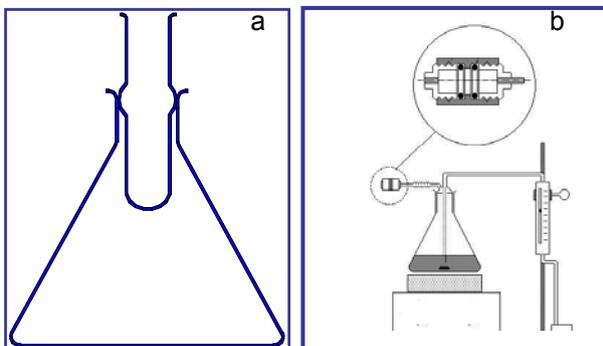


Figura 1: a- sistema de digestão; b- sistema de determinação

Tabela 1: Recomendação da OMS para consumo seguro de pescado de acordo com o teor de mercúrio

Concentração (ng/g)	Frequência de consumo
Até 300	Eventual
300 a 600	Diário
600 a 1000	Impróprio

Tabela 2: Nível de exposição de trabalhadores ao vapor de mercúrio e sua relação com os teores na urina

Concentração (ng/mL)	Nível de Intoxicação
Até 5	Sadio
5 a 50	Exposto não intoxicado
acima de 50	Exposto intoxicado

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a difusão do método semiquantitativo com a formação de novos usuários, a garantia da qualidade dos resultados analíticos pela participação em exercícios interlaboratoriais e a avaliação da aplicabilidade do método semiquantitativo de determinação de mercúrio em urina, na avaliação da exposição de trabalhadores expostos a vapores de mercúrio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Monitoria no projeto de difusão

O treinamento do futuro usuário é realizado em diferentes etapas, na primeira é feita uma apresentação (na forma de palestra, apresentação de vídeo e entrega de artigos descrevendo a problemática). A segunda etapa consiste em uma demonstração prática do método nas instalações do laboratório de mercúrio, Serviço de Gestão Ambiental (SGAM), onde o monitor demonstra passo-a-passo desde a técnica do corte do peixe à visualização das cores. Antes da demonstração são fornecidas as instruções de trabalho ao usuário, ao qual é solicitado o acompanhamento para esclarecimento de eventuais dúvidas. Em seguida é feita uma visita às instalações onde o trabalho será implementado, para a adequação do espaço e montagem dos sistemas (figuras 1a e 1b), previamente adquiridos. O monitor auxilia o futuro operador na instalação dos sistemas e no preparo das soluções. A terceira etapa do treinamento consiste na repetição dos procedimentos pelo futuro operador, com o acompanhamento do monitor. Durante o treinamento são utilizadas amostras de peixes fresco e processado. Para a consolidação do treinamento é prevista a participação do novo usuário em exercícios interlaboratoriais entre usuários do método, para avaliação do seu desempenho. Durante o período de janeiro de 2002 a maio de 2003 foram realizados trabalhos de difusão no Laboratório de Análise de Alimentos e Bebidas do Ministério de Agricultura (LAAB), Instituto de Química (IQ) da UFRJ e está em andamento a implantação de um segundo núcleo no Centro de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis-Unidade Rio (CEFETEQ).

3.2 - Controle da qualidade do método semiquantitativo de determinação de mercúrio em peixes

A garantia da qualidade do método semiquantitativo vem sendo feita pela comparação dos seus resultados com os obtidos com a técnica de Vapor-frio acoplada à Fluorescência Atômica (TVF-FA). Este último, por sua vez, é rastreado utilizando amostras certificadas fornecidas pelo National Bureau of Standard e pela participação em programas interlaboratoriais (PI), coordenados pela Canadian Food Inspection Agency (CFIA). Este PI é um programa específico para a determinação de mercúrio em peixes: o “Mercury Quality Assurance Program” no qual o CETEM vem participando desde do início de 2000. São realizadas quatro rodadas anuais onde quatro amostras de peixe processado, com diferentes teores de mercúrio, são enviadas para cada participante. Estes são solicitados a proceder à determinação do teor de mercúrio em dois dias diferentes e em triplicatas em cada dia, sendo enviados para a avaliação os seis resultados em data pré-definida. Os resultados finais são tabelados na forma de média e desvio padrão para cada participante. O CETEM passou a participar destes PI também com o método semiquantitativo a partir de março de 2002. Os resultados da determinação semiquantitativa são emitidos dentro de quatro faixas de concentração: < 300; 300-600; 600-1000 e > 1000 ng/g de mercúrio.

3.3 - Aplicação do método de determinação semiquantitativa de mercúrio para análise em urina

Os testes exploratórios usando urina “in natura”, para a determinação semiquantitativa de mercúrio, demonstraram a necessidade de um pré-tratamento para eliminação da matéria orgânica. Com este objetivo utilizou-se aquecimento à ebulição da amostra com 10% em volume de ácido nítrico concentrado, baseados na técnica recomendada por Jungreis, E. (1984). A vidraria utilizada é similar a da determinação de mercúrio em peixes (Figura 1a), sendo o volume do frasco digestor de 250 mL.

Para estudar a eficácia do método para determinação semiquantitativa de mercúrio em urina, em diferentes concentrações, optou-se por trabalhar com uma amostra de urina homogênea, a qual foram acrescentadas quantidades conhecidas de mercúrio. As concentrações finais esperadas para estas amostras seriam equivalentes a 0, 5, 10, 25 e 50 ng de Hg/mL de urina, gerando as sub-amostras U-0, U-5, U-10, U-25 e U-50, respectivamente. A conservação da amostra foi feita acidificando-a com ácido nítrico concentrado

a 10% em volume e manutenção em freezer até o momento de determinação. As amostras foram analisadas em triplicatas, para os cinco níveis de concentração, paralelamente por dois métodos: pelo método semiquantitativo abaixo descrito e pelo método quantitativo rotineiramente utilizado e previamente validado pelo Laboratório de Especificação de Mercúrio (LEM), da Coordenação de Análises Minerais, COAM, no CETEM. O procedimento utilizado para determinação semiquantitativa de mercúrio em urina consistiu no aquecimento, a 95°C por 15 minutos, de 110 mL de amostra, previamente acidificada para amostras contendo concentração superior ao equivalente a 10 ng de Hg/mL de urina. Para as amostras com concentração inferior utilizou-se 220 mL de urina, que tiveram seu volume diminuído a proximadamente 100 mL. Após resfriamento a solução foi transferida para o frasco de determinação (figura 1b), ao qual foram adicionadas 10 mL de soluções redutoras (50% de cloreto de estanho em ácido clorídrico 50%), e ligado o sistema de aeração. Simultaneamente ao procedimento acima descrito, foram realizadas determinações de mercúrio em soluções aquosas com concentrações similares às esperadas na amostra de urina analisada (0, 5, 10, 25 e 50 ng de Hg/mL). Ao final, procedeu-se à comparação visual das cores geradas nos discos de papel de cada um dos sistemas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Monitoria no projeto de difusão

Até o momento foram realizados cinco treinamentos, todos individuais. Nesta etapa observou-se que os pontos críticos para o bom andamento do trabalho, em ordem crescente de dificuldade, são: preparo das soluções, visualização da limpidez da solução da amostra digerida, dificuldade de entendimento nas instruções originais e manuseio do sistema detector (incluindo o corte do papel).

Visando a superação destas dificuldades, intensificou-se o treinamento nestes pontos. Para os dois primeiros, após a demonstração inicial, passou-se a acompanhar o novo usuário no seu local de trabalho, de modo a sanar eventuais dúvidas de procedimento. Quanto às instruções de trabalho, passou-se a utilizar como complemento uma folha única contendo o procedimento simplificado, para o acompanhamento da determinação e da

padronização na bancada. Devido à importância da etapa de detecção, e aproveitando as informações relacionadas às dificuldades no manuseio do sistema detector original, neste último foram feitas modificações técnicas. Vale ressaltar que o novo modelo apresenta maior facilidade no manuseio, propiciando uma maior agilidade no treinamento de novos usuários, além de maior segurança na determinação.

O método foi implementado no IQ da UFRJ e no LAAB, onde monitores foram treinados participando de todas as etapas do treinamento. No caso do IQ da UFRJ, após o treinamento foi feita uma avaliação do desempenho através da participação em exercício interlaboratorial (tabela 3). Os resultados foram satisfatórios demonstrando que o treinamento foi eficiente.

Tabela 3 - Resultados obtidos no exercício interlaboratorial IQ-UFRJ e CETEM

Amostra	Resultados em ng de Hg /g de peixe		
	Método Quantitativo	CETEM	IQ-UFRJ
A	----	600-1000	600-1000
B	----	300-600	300-450
C	431	300-600	450-600
D	610	300-600	450-600

No caso do LAAB, ainda não recebemos os resultados referentes a esta última etapa do treinamento.

4.2 - Controle da qualidade do método semiquantitativo de determinação de mercúrio em peixes

Os resultados obtidos pela participação em exercícios interlaboratoriais, coordenados pela Canadian Food Inspection Agency, estão apresentados na tabela 4

Tabela 4 - Comparação dos resultados (em ng/g) obtidos pelo método semiquantitativo de determinação de mercúrio em peixes, com o intervalo de confiança calculado a partir dos resultados de N participantes

Amostra	Resultado semiquantitativo	Média ± desvio padrão	Intervalo de confiança ng/g (N)
MQAP 308	300-600	282 ± 46	190 - 374 (43)
MQAP 309	300-600	390 ± 52	286 - 494 (42)
MQAP 310	> 1000	2204 ± 385,5	1433 - 2975 (43)
MQAP 311	300-600	289 ± 46	197 - 381 (42)
MQAP 312	300-600	391 ± 45	301 - 481 (42)
MQAP 313	600-1000	611 ± 73	465 - 757 (42)
MQAP 314	300-600	390 ± 42	306 - 474 (42)
MQAP 315	> 1000	1101 ± 197	707 - 1495 (43)
MQAP 316	300-600	477 ± 64	349 - 605 (42)
MQAP 317	300-600	380 ± 49	282 - 478 (42)
MQAP 318	600-1000	1116 ± 161	794 - 1438 (42)
MQAP 319	< 300	202 ± 41,5	199 - 365 (42)
MQAP 320	< 300	215 ± 34	147 - 283 (40)
MQAP 321	< 300	405 ± 61	283 - 527 (39)
MQAP 322	300-600	438 ± 75	288 - 588 (39)
MQAP 323	300-600	630 ± 94	442 - 818 (40)
MQAP 324	300-600	525 ± 73	379 - 671 (49)
MQAP 325	600-1000	603 ± 81	441 - 765 (49)
MQAP 326	300-600	305 ± 40	225 - 385 (49)
MQAP 327	> 1000	1236 ± 190	856 - 1616 (49)

Nossos resultados vêm sendo avaliados através da sua comparação com a faixa de concentração, obtida pelo cálculo do intervalo de confiança, a partir da média e desvio padrão de todos os resultados emitidos pelos participantes do ciclo. Observa-se que na maioria das amostras houve uma grande superposição das faixas de concentração, calculadas pelo intervalo de confiança, e das emitidas pelo método semiquantitativo. Observou-se que no caso das amostras MQAP 308, 311, 323, 325 e 326 este fato não é tão evidente, o que pode ser explicado pelo fato da média dos resultados ser muito próxima das concentrações limítrofes (300, 600 e 1000), utilizadas pelo método semiquantitativo. No caso da amostra MQAP 321 que não se enquadra em nenhuma das duas situações, podemos supor que tenha ocorrido uma falha operacional fora de controle. Até o momento, os

resultados vêm sendo considerados satisfatórios, já que não apresentam nenhuma discrepância. Estudos anteriores (Yallouz, AV & Marques, P 2001), demonstraram que o intervalo mínimo entre duas concentrações deverá ser de 150 ng de Hg por grama de peixe, para uma melhor discriminação das cores. Sendo assim, caso necessário, as concentrações utilizadas nos sistemas de padronização poderão ser de 150, 300, 450 e etc, ou qualquer outra combinação que se faça necessário de acordo com os interesses do cliente. Sempre que possível, partes das amostras submetidas aos exercícios devem ser reservadas para servirem de amostras controles para futuros trabalhos.

4.3 - Aplicação do método de determinação semiquantitativa de mercúrio para análise em urina

Os resultados obtidos nos testes preliminares se encontram na tabela 5.

Tabela 5 – Comparação dos resultados de três determinações pelos métodos quantitativo (MQ) e semiquantitativo (MSQ) de mercúrio em urina

Amostra	Teor esperado (ng/mL)	Teor encontrado (ng/mL)	
		MSQ – cor desenvolvida	MQ
U- 0	0	Similar a de 0 ng/mL	1,93 ± 0,63
U- 5	5	Similar a de 5 ng/mL	5,33 ± 0,55
U-10	10	Similar a de 10ng/mL	13,3 ± 0,28
U-25	25	Similar a de 25ng/mL	22,93 ± 1,48
U-50	50	Similar a de 50ng/mL	49,43 ± 3,46

Os resultados obtidos neste primeiro estudo foram considerados satisfatórios, já que quando comparados aos obtidos pelo LEM, podem ser considerados similares. A próxima etapa será a aplicação deste método para amostras reais de trabalhadores expostos ao vapor de mercúrio. Para tanto, estamos em entendimentos com uma fábrica de cloro soda e com um grupo de recicladores de lâmpadas fluorescentes que fornecerão a urina. Estas amostras serão analisadas pelos dois métodos, e conforme os resultados, deverão servir de base para a orientação dos trabalhadores no manuseio ideal dos equipamentos de proteção individual (EPI). Em paralelo, será estudado o período de validade da amostra e a possibilidade em participar

em programas de avaliação de desempenho, similares ao coordenado pelo CFIA para mercúrio em peixe.

5. CONCLUSÕES

O trabalho de monitoria foi fundamental para difusão do trabalho, mesmo não tendo sido realizado em regiões que apresentam problemas de poluição mercurial, pois possibilitou o aperfeiçoamento do método de treinamento, facilitando futuros trabalhos em regiões de difícil acesso. Neste mês de junho esta se iniciando o primeiro curso de formação de multiplicadores, em turma de aproximadamente 20 alunos no CEFETEQ. As participações em exercícios interlaboratoriais para avaliação de desempenho permitiram o aumento da credibilidade no método semiquantitativo de determinação de mercúrio em peixes. Pretende-se submeter o mesmo ao credenciamento pelo INMETRO, num futuro próximo, e estas participações deverão ser utilizadas como prova de bom desempenho. Os resultados obtidos na aplicação do método semiquantitativo para a determinação de mercúrio em urina são promissores e espera-se que em breve possa ser utilizado para diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

- JUNGREIS, E. 1984. Spot-Test – Clinical Environmental, Forensic, and Geochemical Applications. John Wiley & Sons.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.). 1990. Environmental health criteria for methyl mercury. Geneve, International Program on Chemical Safety. 144p
- YALLOUZ, AV, de CAMPOS RC & PACIORNIK S. 2000. A low-cost non instrumental method for semiquantitative determination of mercury in fish. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 366: 461-465.
- YALLOUZ, AV & CALIXTO, T M P 2000. "Estudos para a Consolidação Metodológica e Elaboração de Material Didático e de Divulgação do Programa de Avaliação Semiquantitativa de Mercúrio em Peixes", VIII Jornada Interna Científica, CETEM/MCT, RJ.
- YALLOUZ, AV & MARQUES, P 2001. "Estudos para Validação de Métodos para Determinação de Mercúrio em Peixes", XIX Jornada Interna Científica, CETEM/MCT, RJ.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do LEM Patrícia Araújo e Ricardo Melamed pela realização das análises quantitativas de mercúrio em urina

Ao BIC Ricardo Gonçalves Cesar pela colaboração