

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA ANALÍTICA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM VAPOR FRIO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SANGUE HUMANO

Elvis J. de França; Alberto P. Neto; Jayanne M. B. de Farias; Rafael L. B. A. Silva; Brígida G. A. Schirmer

Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), Recife, Brasil.

Palavras-Chave: Mercúrio; CVAAS; Biomarcador

Introdução

Mercúrio (Hg) é um componente natural da crosta terrestre, mas processos naturais associados às atividades humanas nas últimas décadas o mobilizaram e tornaram presente no ambiente (Streets et al., 2019). Infelizmente, nos tempos modernos, as emissões diretas de Hg antropogênico têm sido maior do que as emissões naturais (UNEP, 2013). Devido a sua natureza líquida e sensibilidade às variações de temperatura é utilizado em termômetros, barômetros, e outros instrumentos de medição. Além disto, é empregado também em processos de extração de ouro e prata, bem como na fabricação de lâmpadas fluorescentes e produtos à base de cloro, em alguns tipos de baterias, o que favoreceu o aumento de contaminação humana (Streets et al., 2019).

Mercúrio (Hg) é altamente tóxico para a saúde, com sua toxicidade variando conforme a forma química (metálica, inorgânica ou orgânica). A exposição pode ocorrer por inalação, ingestão ou contato com a pele, causando danos ao sistema nervoso, como tremores, irritabilidade, perda de memória e, em casos graves, paralisia. Exposições crônicas, comuns em ambientes industriais, podem levar a envenenamento com tremores e disfunções motoras. Altos níveis de mercúrio também estão associados a doenças cardiovasculares e imunossupressão. O metilmercúrio é especialmente perigoso para gestantes, pois pode atravessar a placenta e causar danos neurológicos irreversíveis ao feto. A quantificação de Hg em cabelo e sangue é fundamental para monitorar e tratar a exposição precoce, prevenindo sintomas graves (Shirkhanloo et al., 2014; Castaño et al., 2019).

A Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (CVAAS) é uma técnica analítica que utiliza a espectrometria de absorção atômica (AAS) para determinar a presença de mercúrio em amostras. A AAS é uma técnica espectro analítica que se baseia na absorção de radiação por átomos livres no estado gasoso. A CVAAS é o método mais comum para a análise de mercúrio, pois é específica para este elemento, que é o único metal cuja forma atômica está presente na forma de vapor à temperatura ambiente, esta técnica tem a habilidade de quantificação de Hg em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$. Baseia-se na redução do mercúrio na forma iônica Hg^{2+} para a forma atômica Hg^0 , que é arrastada para a célula de absorção por um gás inerte. Como o mercúrio já chega à célula de absorção na forma atômica, não é necessário aquecê-la, o que justifica o nome "vapor frio". Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo padronizar a técnica analítica de CVAAS (Guilhen, 2010) para a biomonitoração de mercúrio total em sangue humano.

Material e Métodos

Descontaminação da vidraria

As amostras foram processadas no Laboratório Emergencial de Combate à COVID-19 (LECC/CRCN-NE) seguindo o protocolo de biomonitoração humana de Portugal (2022). As vidrarias usadas no acondicionamento das amostras de sangue passaram por rigorosa descontaminação, incluindo imersão em detergente Extran® neutro a 5%, lavagem com água

Ultrapura, imersão em ácido nítrico a 10%, e tratamento com dicromato de potássio aquecido e permanganato de potássio, tornando-as aptas para uso com reagentes e soluções de Hg.

Preparação de brancos analíticos e análise no CVAAS

Os brancos analíticos foram preparados com todos os reagentes utilizados na análise, a partir da adição de 4 mL de HNO₃ destilado em tubos de centrifuga estéreis de 50 mL. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 24 h no interior de uma capela de fluxo laminar, em seguida submetidos a um processo de digestão química com auxílio de banho ultrassônico (3 ciclos de 1 hora à temperatura de 80°C, sob frequência de 37 kHz) (Portugal; 2022). Após o resfriamento, uma alíquota com 1,2 mL de hidroxilamina 30% (v/v) foi adicionada a 2 mL da amostra em tubos estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 12 mol L⁻¹ e avolumada a solução com água ultrapura à volume final de 8,0 mL. As soluções foram diretamente encaminhadas para análise por CVAAS (EspectrAA 220 FS da VARIAN® com Geração de Vapor VGA 77 da Agilent®).

O equipamento foi calibrado com soluções de concentrações conhecidas do elemento de interesse – padrões analíticos internos para a construção da curva analítica 0,2 – 10 mg L⁻¹ (Taylor, 2016). Argônio (Ar) foi utilizado como gás de arraste com pureza de 99,999% e uma célula de absorção de quartzo. O volume de aspiração dos reagentes foi ajustado em 2 mL por minuto, enquanto o das soluções das amostras foi aproximadamente 8 mL por minuto. Os resultados obtidos foram dispostos em planilha para o cálculo das concentrações e avaliação de desempenho metodológico.

Ensaio de recuperação e estudo de caso

Devido à falta de material de referência para quantificação de mercúrio no LECC/CRCN-NE, o estudo desenvolveu um método alternativo para garantir exatidão e precisão. O procedimento consistiu na dopagem de amostras de sangue humano com concentrações conhecidas de Hg (Vicentini, 2020). Dez amostras foram analisadas para verificar a repetitividade e recuperação do método (NOP-INEA-003, 2018). O sangue foi coletado de um participante, misturado com ácido nítrico e fortificado com solução padrão de Hg. As amostras foram tratadas seguindo o mesmo protocolo dos brancos analíticos, com valores confiáveis definidos pelos níveis do analito (AOAC, 2016). Para a avaliação da aplicabilidade do método, soluções de amostras foram gentilmente cedidas pelo LECC/CRCN-NE. Lira (2021) realizou a coleta de sangue em indivíduos no Hospital Otávio de Freitas (HOF) – Órgão da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco (SES-PE), cuja pesquisa científica foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (CAAE 36784520.5.0000.5200 e Parecer nº 4.306.921). Toda a pesquisa foi executada dentro das normas a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS Nº 466.12. Os dados e materiais do estudo permaneceram sob responsabilidade do coordenador da pesquisa. A coleta das amostras seguiu todos os protocolos de segurança estabelecidos por Portugal (2022). Detalhes do procedimento analítico podem ser consultados por Pereira Neto (2023).

Avaliação estatística

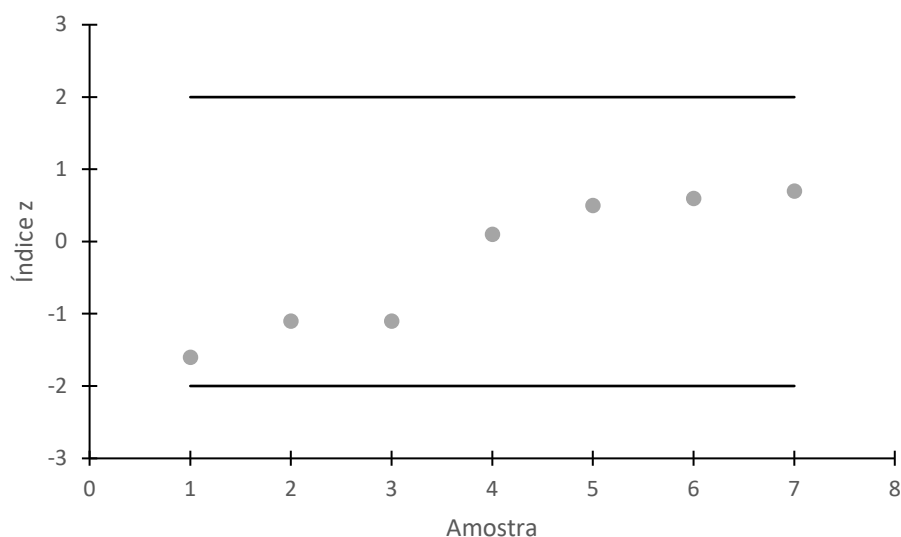
Para o tratamento dos dados observados pelo presente trabalho, teste z garantiu a concordância entre os valores obtidos e o valor de referência com 95% de confiança. Equação: $Z = \frac{X - U}{Su}$. Em que, X é o valor quantificado, U é o valor de referência e o Su é o desvio padrão do valor de referência. Neste trabalho, devido à falta de materiais de referência com concentrações de Hg, o valor utilizado foi o médio das amostras da recuperação e a estimativa de incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança.

Resultados e Discussão

Os valores detectados de Hg nos brancos indicam que ocorreram falhas no condicionamento químico das amostras, desta forma, estudos futuros dos níveis de Hg disponíveis na atmosfera e nos reagentes utilizados devem ser feitos. Os parâmetros empregados para a validação do método demonstram eficaz. Seguindo ao procedimento avaliativo dos brancos, foi determinado o mínimo valor detectável ao método foi de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e quantificável igual a $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$, os valores obtidos neste estudo foram coerentes, apresentando desvio padrão relativos inferiores a 5% e destaca a qualidade do método. A faixa de concentração do Hg foi definida observando valores médios no meio ambiente e em seres humanos. O teste avaliou 4 diferentes curvas com concentrações entre $0,2$ e $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$, contudo a faixa de trabalho adequada foi entre $0,3$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados estiveram de acordo com o recomendado pela ANVISA (2003), indicando coerência à leitura, excluindo erros associados ao método com relação à linearidade.

A seletividade foi testada com intuito de garantir que não houvesse comprometimento nas análises decorrente do efeito de matriz. O procedimento avaliou a capacidade da recuperação da técnica analítica, a qual adicionou mercúrio ($\mu\text{g L}^{-1}$) para absorvância em amostras de sangue na concentração estimada em $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Para os valores observados, foram calculados os valores de índice z (Figura 1) para constatar se o procedimento alcançou condições satisfatórias e tem capacidade de gerar resultados exatos e precisos. Os valores calculados ficaram entre -2 e 2 que, combinado ao resultado de recuperação entre 60-115%, indicaram a qualidade na determinação de Hg segundo a AOAC (2016).

Figura 1. Índice z calculado para as amostras de sangue dopadas com Hg para a avaliação de recuperação.

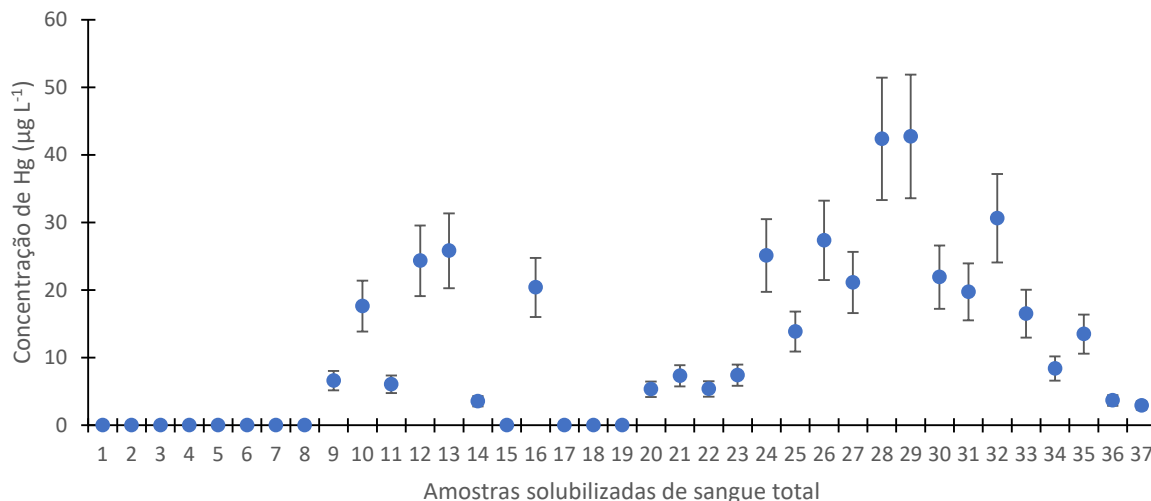


Fonte: Adaptado de Pereira Neto (2022).

Como a qualidade do procedimento analítico foi demonstrada, CVAAS foi aplicada para a determinação de Hg, após o acondicionamento químico, em amostras disponíveis no CRCN-NE. A média da concentração de Hg nas soluções das amostras de sangue foi $14,1 \mu\text{g L}^{-1}$ conforme mostra a Figura 2. Algumas amostras apresentaram concentrações inferiores ao mínimo valor quantificável de $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$, porém foram evidenciados valores superiores na ordem de $42,8 \mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações de mercúrio no sangue indicam a magnitude da exposição a este elemento químico tóxico aos seres vivos. Considerando fator de diluição médio ($FD = 7$) típico para as análises de sangue total no LECC/CRCN-NE, a máxima concentração

obtida seria $286 \mu\text{g L}^{-1}$, o que se tornaria cerca de 29 vezes maior que o valor proposto por Mahaffey et al. (2008) de 0 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 2. Concentrações obtidas de Hg nas soluções das amostras cedidas pelo LECC/CNEN



Barras de erro indicam incerteza analítica expandida em nível de 95% de confiança

Fonte: Adaptado de Pereira Neto (2022).

Conclusões

A partir dos resultados deste trabalho, conclui-se que o estudo desenvolveu um método adequado para a quantificação de Hg no sangue humano a partir da utilização de CVAAS com sensibilidade, acurácia e precisão.

Referências

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaithersburg: AOAC, 2016.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária - ANVISA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos por meio da revogação da RE n. 475 publicada no DOU em 19 de março de 2002, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 2003.

CASTAÑO, A., PEDRAZA-DIAZ, S., CAÑAS, A. I., PEREZ-GOMEZ, B., RAMOS, J. J., BARTOLOME, M., ... & ESTEBAN, M. Mercury levels in blood, urine and hair in a nationwide sample of Spanish adults. *Science of the total environment*, 670, 262-270, 2019.

DA PRESIDENTE, A. T. O. et al. Secretaria de estado do ambiente conselho estadual de meio ambiente do Rio de Janeiro, 2019.

GUILHEN, S.N.; PIRES, M. A. F.; DANTAS, E. S. K.; XAVIER, F.V. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS): estudo de caso. *Química Nova*, 33, 6, 1285–1290, 2010.



INEA – Instituto Estadual do Ambiente <<https://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/01/NOP-INEA-03.R-2-1.pdf>>. Acessado em: 20 de set. de 2024.

MAHAFFEY, K.R.; CLICKNER, R.P.; JEFFRIES, R. A. Methylmercury and omega-3 fatty acids: co-occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. *Environ Res.* 8, 20-28, 2008.

MOURA, I. A. Confiabilidade da técnica do contador proporcional de fluxo gasoso para a quantificação de Ra-226 e Ra-228 em água no CRCN-NE. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

NETO, A. P. Implementação da Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio para a determinação de mercúrio total em sangue humano. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 2023.

PORTUGAL, W. M. Biomonitorização de oligoelementos e elementos traços em sangue de pacientes infectados por covid-19 internados em unidade de terapia intensiva. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 38-45, 2022.

SHIRKHANLOO, H., GOLBABAEI, F., HASSANI, H., EFTEKHAR, F., & KIAN, M. J. Occupational exposure to mercury: air exposure assessment and biological monitoring based on dispersive ionic liquid-liquid microextraction. *Iranian Journal of Public Health*, 43(6), 793, 2014.

STREETS, D. G. et al. Five hundred years of anthropogenic mercury: spatial and temporal release profiles. *Environmental Research Letters*, 14, 8, 084004, 2019.

TAYLOR E.W.; RUZICKA, J.A.; PREMADASA, L.; ZHAO, L. Cellular selenoprotein mRNA tethering via antisense interactions with Ebola and HIV-1 mRNAs may impact host selenium biochemistry, *Curr. Top. Med. Chem*, 16(13), 1530–1535, 2016.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP. *Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport* (Geneva:UNEPChemicals Branch), 2013.

VICENTINI, N.S.A. Uso da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado na biomonitorização humana de As, Cd, Pb e Hg. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 122-130, 2020.