

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**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)**

SABINE NEUSATZ GUILHEN

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientadora:
Dra. Elizabeth Sonoda Keiko Dantas

SÃO PAULO
2009

**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)**

Este exemplar corresponde à redação final, devidamente corrigida,
da dissertação defendida por Sabine Neusatz Guilhen em 30 de
julho de 2009 e aprovada pela Comissão Julgadora.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Elizabeth Sonoda Keiko Dantas (orientadora) - IPEN-USP

Profa. Dra. Maria Aparecida Faustino Pires - IPEN-USP

Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira - IQ-USP

Agradecimentos

Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo durante a realização deste projeto, em especial ao meu irmão, Stefan, pela ajuda no programa L^AT_EX, utilizado na redação deste trabalho. Aos meus amigos, pelo companheirismo e compreensão, e aos colegas e funcionários do Centro de Química e Meio Ambiente, pelo convívio e prestabilidade.

Também devo agradecimentos a todos os pesquisadores com os quais me correspondi, em especial ao Dr. William W. Johnson da Universidade Nebraska, por sua solicitude e boa vontade, à Dra. Christina Rose Bush do Departamento de Saúde Comunitária de Michigan, ao Dr. Valter Poester Albuquerque da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, à Dra. Diana H. Fishbein da Universidade de Baltimore, à Dra. Helen E. Longino da Universidade de Stanford, aos Drs. Jose Luis Lopez Colon e Rafael Lozano da Universidade Complutense de Madrid e, finalmente, ao Dr. Carlos José Souza Passos da Universidade de São Paulo.

Expresso aqui também a minha gratidão à minha orientadora, a Professora Dra. Elizabeth Sonoda Keiko Dantas, pelo grande aprendizado que me proporcionou durante todo o curso deste projeto, e à Professora Dra. Maria Aparecida Faustino Pires, pela confiança que depositou em mim e pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Além disso, gostaria de agradecer à Fernanda Villibor Xavier e à Fundação de Medicina Tropical do Tocantins pela parceria e envio das amostras.

Agradeço também aos professores Hélio Akira Furusawa e Sonia Baldochi por terem participado da banca de meu Seminário de Área. Suas opiniões e sugestões foram valiosas e contribuíram muito para o aprimoramento deste trabalho.

À professora Elisabeth de Oliveira do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por ter participado da Banca Examinadora da defesa de minha dissertação.

Finalmente, agradeço à Comissão de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela orientação e suporte, e à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelo apoio financeiro, que possibilitou a minha dedicação exclusiva a este trabalho.

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)

Sabine Neusatz Guilhen

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico empregado em uma variedade de produtos e processos, representando um risco à saúde dos indivíduos expostos ocupacional ou acidentalmente a este metal. O amálgama dental é um material restaurador que contém Hg metálico e cujo uso tem sido bastante debatido nas últimas duas décadas. Em vista da dubiedade dos estudos científicos acerca do amálgama dental, muitos esforços têm sido direcionados à esta questão. Recentemente, a Fundação de Medicina Tropical do Tocantins iniciou um estudo para avaliar os níveis de exposição ambiental e ocupacional ao mercúrio no atendimento odontológico de consultórios públicos da cidade de Araguaína em Tocantins (TO). Em colaboração com este estudo, as amostras de urina dos indivíduos expostos foram analisadas quanto ao teor de mercúrio total por espectrometria de absorção atômica nas dependências do laboratório de análises químicas do Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN). Para isso, foi preciso selecionar uma metodologia analítica capaz de gerar resultados confiáveis e validá-la antes de sua efetiva implantação. A validação analítica comprova, por meio de ensaios práticos, que o laboratório tem condições de atender aos requisitos necessários para a aplicação adequada do método. O desempenho do método foi avaliado quanto aos seguintes parâmetros: *limite de detecção* e *limite de quantificação*, *seletividade*, *sensibilidade*, *linearidade*, *exatidão* e *precisão*. Os ensaios foram realizados com material de referência certificado, o que assegura a rastreabilidade dos resultados. Os resultados obtidos comprovaram a adequabilidade do método ao propósito supracitado. A concentração de Hg encontrada para o material de referência foi de $(95,12 \pm 11,70)\mu\text{g.L}^{-1}$ com uma recuperação de 97%. A metodologia também foi aplicada à amostras de urina de 39 indivíduos, seis das quais (15%) apresentaram níveis de mercúrio urinário superiores ao limite considerado normal ($10\mu\text{g.L}^{-1}$). Os resultados obtidos encontram-se em uma faixa de concentração de 1,02 a $23,36\mu\text{g.L}^{-1}$.

Validation of an analytical method for the determination of total mercury in urine samples using cold vapor atomic absorption spectrometry (CV-AAS)

Sabine Neusatz Guilhen

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a toxic metal applied to a variety of products and processes, representing a risk to the health of occupationally or accidentally exposed subjects. Dental amalgam is a restorative material composed of metallic mercury, which use has been widely debated in the last decades. Due to the dubiety of the studies concerning dental amalgam, many efforts concerning this issue have been conducted. The Tropical Medicine Foundation (Tocantins, Brazil) has recently initiated a study to evaluate the environmental and occupational levels of exposure to mercury in dentistry attendants at public consulting rooms in the city of Araguaína (TO). In collaboration with this study, the laboratory of analysis at IPEN's Chemistry and Environment Center is undertaking the analysis of mercury levels in exposed subjects' urine samples using cold vapor atomic absorption spectrometry. This analysis requires the definition of a methodology capable of generating reliable results. Such methodology can only be implemented after a rigorous validation procedure. As part of this work, a series of tests were conducted in order to confirm the suitability of the selected methodology and to assert that the laboratory addresses all requirements needed for a successful implementation of the methodology. The following parameters were considered in order to test the method's performance: *detection* and *quantitation limits*, *selectivity*, *sensitivity*, *linearity*, *accuracy* and *precision*. The assays were carried out with certified reference material, which assures the traceability of the results. Taking into account the estimated parameters, the method can be considered suitable for the afore mentioned purpose. The mercury concentration found for the reference material was of $(95,12 \pm 11,70)\mu\text{g.L}^{-1}$ with a recovery rate of 97%. The method was also applied to 39 urine samples, six of which (15%) showing urinary mercury levels above the normal limit of $10\mu\text{g.L}^{-1}$. The obtained results fall into a range of concentration from 1,02 to $23,36\mu\text{g.L}^{-1}$.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Características gerais	1
1.2. História do mercúrio	3
1.3. Intoxicação por mercúrio	5
1.3.1. Doença de Minamata	5
1.3.2. Mercúrio elementar e mercúrio inorgânico	6
1.3.2.1. Metabolismo e efeitos tóxicos	6
1.3.2.2. Absorção, distribuição e eliminação do mercúrio elementar	8
1.3.2.3. Intoxicação causada pela exposição a vapor de mercúrio	10
1.3.2.4. Intoxicação causada pela exposição a mercúrio inorgânico	12
1.3.3. Vigilância da intoxicação por exposição ocupacional	13
1.4. Amálgama dental	17
2. Objetivo do estudo	21
3. Metodologia analítica	22
3.1. A espectroscopia atômica	23
3.2. Processo de absorção atômica	25
3.3. Instrumentação – componentes básicos	27
3.4. A técnica de geração de vapor frio	30
4. Materiais e métodos	32
4.1. Reagentes e materiais	32
4.1.1. Reagentes	32
4.1.2. Soluções	33
4.1.3. Materiais	33
4.2. Indicador Biológico de Exposição: Urina	34
4.2.1. Coleta, armazenamento e transporte de urina	35
4.2.1.1. Liofilização das amostras de urina	36
4.3. Parte Experimental	37
4.3.1. Instrumentação	37
4.3.2. Procedimento analítico	37
4.3.2.1. Digestão da amostra de urina	37
4.3.2.2. Oxidação com KMnO_4	38
4.3.2.3. Redução com NaBH_4	38
4.3.2.4. Quantificação do Hg^0	38
4.3.3. Procedimento de liofilização	39
4.3.3.1. Biossegurança na análise de urina liofilizada	40
4.3.4. Descarte das soluções de mercúrio	40

5. Validação da metodologia analítica	41
5.1. Curva analítica	42
5.2. Faixa de Trabalho, Faixa Linear e Faixa Linear de Trabalho	44
5.3. Linearidade	44
5.4. Seletividade	46
5.4.1. Teste de hipóteses	47
5.4.2. Estudo do comportamento da Curva Analítica	48
5.5. Sensibilidade	49
5.6. Limite de detecção e Limite de quantificação	49
5.6.1. Limite de Detecção	49
5.6.2. Limite de Quantificação	50
5.7. Exatidão	51
5.7.1. Materiais de referência certificados	51
5.7.1.1. Erro relativo	52
5.7.1.2. Teste de hipóteses	52
5.7.1.3. Índice Z	52
5.7.1.4. Erro normalizado	53
5.7.2. Recuperação	53
5.8. Precisão	55
5.8.1. Repetitividade	55
6. Resultados e discussão	57
6.1. Curva Analítica	57
6.2. Seletividade	58
6.2.1. Estudo do comportamento da Curva Analítica	60
6.3. Limite de Quantificação	61
6.4. Limite de Detecção	61
6.5. Exatidão	62
6.5.1. Erro relativo e Índice Z	62
6.5.2. Erro normalizado	63
6.5.3. Recuperação	64
6.6. Precisão	64
6.6.1. Repetitividade	65
6.7. Resultados Gerais da Validação	65
6.8. Avaliação da recuperação do analito em urina liofilizada	66
6.9. Análise das amostras de Tocantins	67
7. Cálculos das incertezas	69
7.1. Cálculo das incertezas associadas	73
7.1.1. Incerteza padrão associada à massa m_a ($u_c(m_a)$)	73
7.1.2. Incerteza padrão associada ao volume V_f ($u_c(V_f)$)	75
7.1.3. Incerteza padrão associada à concentração ($u_c(C)$)	76
7.1.4. Incerteza padrão associada à taxa de recuperação ($u(R)$)	78
7.2. Cálculo da incerteza combinada	79
7.3. Cálculo da incerteza expandida	80

Sumário

8. Conclusões	82
A. Aprovação do Comitê de Ética	83
B. Certificados dos Materiais de Referência	85
C. Resultados	92
C.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	92
C.2. Teste de Seletividade	93
C.3. Teste de Exatidão e Precisão	94
C.4. Teste de Recuperação do analito em urina liofilizada	95

Lista de Abreviaturas

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ADA	<i>American Dental Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAM	<i>Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CESUPA	Centro de Ensino Superior do Estado do Pará
CV-AAS	<i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i>
EMEA	<i>EMEA: European Medicine Agency</i>
EPA	Environmental Protection Agency
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
GC-ECD	Gas Chromatography With Electron Capture Detection
GGTES	Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde
GTOSS	Gerência de Tecnologia da Organização em Serviços de Saúde
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
IBE	Indicador Biológico de Exposição
IBMP	Indicador Biológico Máximo Permitido
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ICOH	<i>International Commission on Occupational Health</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
IUPAC	<i>IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LEO	<i>Limite de Exposição Ocupacional</i>
LGC	<i>Laboratory of the Government Chemist</i>
LTB	Limite de Tolerância Biológica
MHLW	<i>Ministry of Health, Labour and Welfare</i>
MRC	Material de Referência Certificado
NAA	Neutron Activation Analysis
NBL	<i>New Brunswick Laboratory</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standards Technology</i>
NR	Norma Regulamentadora
RSD	Relative Standard Deviation
USPHS	<i>United States Public Health Service</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de Figuras

3.1. Representação da Curva Analítica de acordo com a Lei de Lambert-Beer.	27
3.2. Espectrômetro de absorção atômica básico	27
4.1. Representação fotográfica do espectrômetro de absorção atômica AAAnalyst 800 e sistema FIAS 400 da PerkinElmer®	37
4.2. Liofilizador Terroni LS 3000	39
6.1. Curva Analítica	58
7.1. Fluxograma das etapas do procedimento que contribuem para a incerteza na determinação de Hg em urina.	71
7.2. Diagrama de Causa e Efeito do procedimento analítico para determinação de Hg total em urina	72
7.3. Contribuição de cada componente para a incerteza global	80

Lista de Tabelas

3.1. Técnicas analíticas para determinação de mercúrio	23
5.1. Correlação entre as variáveis x e y de acordo com r	46
5.2. Valores estimados de recuperação em função da concentração do analito.	54
5.3. Relação entre a concentração do analito e a precisão esperada.	55
6.1. Valores de concentração e absorvância utilizados para construir a curva analítica.	57
6.2. Valores da concentração nominal e da concentração adicionada de analito em cada grupo de amostra (com e sem matriz)	59
6.3. Médias dos resultados obtidos e variâncias calculadas para cada grupo de amostras e valores de F e t de Student	59
6.4. Valores de concentração obtidos por aplicação das absorvâncias nas equações das retas para $b=0$ e $b\neq 0$ e valores de F e de t de Student.	60
6.5. Desvio Padrão Relativo (DPR%) obtido para cada concentração do analito.	61
6.6. Valores das concentrações adicionadas e das concentrações recuperadas do analito, erro relativo (ER%) e índice Z.	63
6.7. Índice Z	63
6.8. Taxa de recuperação do analito e valores de t de Student.	64
6.9. Desvio padrão de repetitividade (s_r), limite de repetitividade (r) e desvio padrão relativo (DPR%) calculados para os resultados obtidos.	64
6.10. Resumo dos resultados obtidos com a validação do método.	65
6.11. Recuperação do analito em urina liofilizada	66
6.12. Concentração de Hg Total em amostras de urina de 39 indivíduos	68
7.1. Valores de absorvância obtidos para cada padrão analítico	77
7.2. Valores das variáveis m_a , V_f , C e R e de suas respectivas incertezas.	79
C.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	92
C.2. Teste de Seletividade com Material de Referência da NIST - CRM1641d	93
C.3. Teste com Material de Referência da NIST - SRM2670a	94
C.4. Recuperação do analito em urina liofilizada	95

1. Introdução

1.1. Características gerais

O mercúrio ocorre naturalmente no ambiente e existe sob diversas formas, as quais podem ser organizadas em três grupos: mercúrio metálico ou elementar, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. O símbolo químico do mercúrio metálico, Hg, vem do latim *hydrargyrum*, que significa prata líquida. Seu nome homenageia o deus romano Mercúrio e apresenta algumas variações em outros idiomas: *hydrargyrum* ou *argentum vivum* em latim, *mercury* ou *quicksilver* em inglês, *kwik* ou *quecksilber* em alemão, *mercure* em francês e *mercurio* em espanhol e italiano.

A forma elementar ou pura do mercúrio é o mercúrio metálico, um metal líquido à temperatura ambiente, inodoro, de cor prateada e aparência brilhante. Com a exceção dos gases nobres, é o único elemento cujo vapor é monoatômico à temperatura ambiente. No estado sólido, é mole e dúctil. Seu número atômico é 80 e, juntamente com o cádmio e o zinco, encontra-se no grupo II B da Tabela Periódica de classificação dos elementos químicos. Os isótopos naturais do mercúrio e suas respectivas abundâncias são: 202 (29,8%), 200 (23,13%), 199 (16,84%), 201 (13,22%), 198 (10,02%), 204 (6,85%) e 196 (0,14%) [37].

O mercúrio é um líquido muito denso, pesando cerca de 13,6 vezes mais que a mesma unidade de volume de água à 20°C (13,5456g.cm⁻³ à 20°C e 13,3522g.cm⁻³ à 100°C). Em 1643, Torricelli aproveitou-se desta característica e inventou o barômetro. A faixa de temperatura na qual o mercúrio se mantém líquido é bastante ampla (de -38,87°C, seu ponto de fusão, até 356,72°C, seu ponto de ebulição). Além disso, o mercúrio apresenta uma expansão térmica praticamente uniforme, o que explica o seu uso em termômetros. Absorve luz ultravioleta a 253,7nm e é um bom condutor de eletricidade. O mercúrio metálico é relativamente volátil. Sua pressão de vapor à temperatura ambiente é de 0,002mmHg (0,0012mmHg à 20°C e 0,2729mmHg à 100°C [66]). Uma atmosfera padrão saturada com mercúrio contém aproximadamente 18mgHg.m⁻³ de ar [109].

O mercúrio pode existir em três estados de oxidação diferentes: 0 ou estado elementar (mercúrio metálico, Hg⁰) e as duas formas oxidadas 1+ (íon mercurioso, Hg(I) ou Hg₂²⁺) e 2+ (íon mercúrico, Hg(II) ou Hg²⁺), nas quais o átomo perdeu um e dois elétrons, respectivamente. Como citado anteriormente, o mercúrio pode ser classificado como mercúrio elementar, mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. As espécies de mercúrio inorgânico e orgânico se originam do mercúrio elementar, íons Hg₂²⁺ e Hg²⁺ em um fenômeno conhecido como especiação [123].

1. Introdução

Os sais de mercúrio mais importantes são: cloreto de mercúrio (HgCl_2 , sublimado corrosivo muito tóxico), cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2 , calomelano ocasionalmente usado na medicina), fulminato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{CNO})_2$, detonador usado em explosivos) e sulfeto de mercúrio (HgS , usado como pigmento em tintas).

Do ponto de vista toxicológico, os derivados de mercúrio que causam maior preocupação são o vapor de mercúrio metálico e os compostos organomercuriais, especialmente aqueles ligados a grupamentos alquila de cadeia curta como o metilmercúrio e o dimetilmercúrio. O termo “metilmercúrio” é usado para designar os compostos monometilmercuriais. Na verdade, trata-se de um cátion metilmercúrio, CH_3Hg^+ , associado a ânions, como o cloreto, ou a moléculas de alto peso molecular, como proteínas.

Os organomercuriais foram empregados como praguicidas (acetato de etilmercúrio, cloreto de fenilmercúrico, cloreto de metilmercúrio), diuréticos (Neoidrina, Mercuridrina, Tiomerin) e anti-sépticos como mercúrio-cromo e timerosal (Merthiolate®).

O timerosal é um conservante que contém etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) adicionado a algumas vacinas e imunoglobulinas. Nos últimos anos, surgiram alegações de que esta substância poderia induzir um agravamento do autismo em indivíduos com predisposição genética a esta doença. Estas alegações foram rebatidas pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA [39], argumentando não existir evidências científicas convincentes dos danos causados por baixas doses de timerosal nas vacinas, exceto por reações mínimas tais como vermelhidão e inchaço no local da injeção. Em julho de 1999, as agências americanas de Serviço de Saúde Pública, a Academia Americana de Pediatria e os fabricantes de vacina concordaram em reduzir e, em alguns casos, eliminar esta substância das vacinas como uma medida preventiva. A partir de 2001, o timerosal deixou de ser usado como conservante em vacinas rotineiramente recomendadas na infância. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinou a retirada do timerosal do mercado em 2001 [6].

A toxicidade atribuída ao mercúrio metálico tem sido bastante discutida nas últimas décadas. O uso de mercúrio em amálgamas dentais é, sem dúvida, uma das aplicações mais polêmicas deste metal. Na literatura, é possível distinguir duas vertentes, aqueles que condenam o uso de amálgama dental e aqueles que, contrariamente, defendem o seu uso. Esta controvérsia será posteriormente abordada na Seção 1.4.

1.2. História do mercúrio

O mercúrio e seu principal minério, cinábrio, são conhecidos há milênios. O nome mercúrio é uma homenagem ao planeta Mercúrio. Na mitologia romana, Mercúrio é o mensageiro dos deuses. Os gregos o chamavam de *hidrargiro* (hydros: água; árgyros: prata), palavra introduzida por Aristóteles (384-322 a.C.) e transcrita para o latim pelos romanos como *hidrargyrum* (símbolo: Hg). A denominação *azougue* surgiu posteriormente com os árabes e ainda é empregada popularmente [31].

O homem pré-histórico fazia uso de uma pedra vermelha, o cinábrio (sulfeto de mercúrio, HgS), para executar seus desenhos nas paredes das cavernas que habitava. Na antiguidade, o cinábrio foi utilizado pelos hindus e chineses e foi encontrado em tumbas do Egito datadas de antes de 1.500 a.C. Admite-se que este minério começou a ser explorado há mais de 2.300 anos [52], sendo muito apreciado devido a sua cor vermelho-dourada.

O primeiro uso prático do cinábrio pode ser atribuído à sua cor. Grandes quantidades deste minério foram transportadas para Roma após as Guerras Púnicas (264 - 146 a.C.). O pigmento vermelho, também chamado de *vermilion*, extraído do cinábrio, foi usado para decorar vilas romanas e fabricar produtos cosméticos como o *rouge*. O uso do vermilion como pigmento perdurou até o século XX. No século I a.C. o processo para obtenção de mercúrio metálico a partir de seu minério já era bem conhecido. O primeiro uso prático não decorativo do mercúrio remonta a esta era com Vitruvius, famoso arquiteto romano que descreveu o processo de amalgamação. Vitruvius observou que o mercúrio dissolvia prontamente o ouro e descreveu um método para recuperação do ouro usado em vestimentas [40]. Cem anos depois, Plínio descreveu um aperfeiçoamento desta técnica.

Na Antiguidade, o mercúrio tinha aplicação terapêutica e seus efeitos tóxicos eram desconhecidos. Os antigos chineses acreditavam que o mercúrio e o cinábrio pudessem prolongar a vida. A convicção de que a imortalidade seria assegurada pela ingestão de mercúrio causou a morte de muitos imperadores. Os antigos hindus atribuíam ao mercúrio propriedades afrodisíacas.

No século I d.C., Dioscórides (50 – 70 d.C.), médico militar grego do exército de Nero (37 – 68 d.C.), e Plínio o Velho (23 – 79 d.C.), empregaram o mercúrio como unguento medicinal. Rhazes (865 – 925 d.C.), médico e filósofo persa, Avicena (980 – 1037 d.C.), filósofo e médico persa, e Arnaldo de Vilanova (1235 – 1313 d.C.), médico e alquimista de Valência, recomendaram unguentos e pomadas contendo bicloreto de mercúrio (cloreto de mercúrio II; HgCl₂) e mercúrio para o tratamento de diversas doenças de pele. Por volta de 1530, Paracelsus (1493 – 1541 d.C.), médico, alquimista, físico e astrólogo suíço, introduziu o uso medicinal mais atípico do mercúrio - no tratamento da sífilis. Quatro séculos depois, em 1909, Paul Ehrlich (1854 – 1915 d.C.), pesquisador alemão, introduziu o famoso Salvarsan, um composto mercurial e primeiro agente quimioterapêutico moderno usado para tratar a sífilis [40]. O mercurocromo, anti-séptico organomercurial, continua em uso em algumas partes do planeta.

1. Introdução

Durante a Idade Média, o mercúrio era utilizado em processos de amalgamação, mas seu uso mais comum foi na alquimia. Os alquimistas acreditavam ser possível produzir ouro a partir de chumbo. Na alquimia, o enxofre representava o sol e o mercúrio a lua. Paracelsus acreditava que o ouro era simplesmente mercúrio que havia perdido sua natureza mercurial pela coagulação e despendeu, sem sucesso, inúmeras tentativas de coagular o mercúrio a ponto de convertê-lo a ouro.

Até meados do século XVIII, o mercúrio, por sua natureza líquida, ainda não era classificado como metal. Até então, as propriedades físico-químicas deste elemento eram obscuras. No entanto, a natureza tóxica do mercúrio não era totalmente desconhecida. Na Roma antiga, por exemplo, os trabalhadores das minas de extração de mercúrio eram escravos condenados.

Em 1533, Paracelsus escreveu um livro sobre doenças ocupacionais, dentre as quais a intoxicação de mineradores por mercúrio. Em 1557, o médico francês, Jean Fernel, descreveu os sintomas da intoxicação por mercúrio. Naquela época, o calomelano (cloreto mercurioso, Hg_2Cl_2) era muito utilizado como diurético.

O mercúrio foi o primeiro metal a ser objeto de legislação para controle de doenças ocupacionais. Em meados do século XVII, a carga horária diária de trabalho foi legalmente reduzida de 14 para 6 horas nas minas de mercúrio em Idrija, Iugoslávia (Eslovênia). O hidrargirismo ou mercurialismo (intoxicação crônica por mercúrio) é a mais antiga das doenças ocupacionais conhecidas. Foi descrita por Pope em 1665, embora Paracelsus já a tivesse mencionado em 1567. Dentre os casos de mercurialismo historicamente importantes, destaca-se o ocorrido na Inglaterra, onde fabricantes de chapéus de feltro expostos ao mercúrio desenvolveram tremores e distúrbios psiquiátricos conhecidos como a “loucura dos chapeleiros”. O *chapeleiro maluco*, personagem da obra consagrada de *C.L. Dogson* “As Aventuras de Alice no País das Maravilhas”, é um bom exemplo de intoxicação por mercúrio [37].

O século XX foi um marco na história da toxicologia do mercúrio e de seus compostos orgânicos. Dentre os principais episódios de intoxicação em massa por compostos organomercúriais destaca-se o ocorrido em Minamata, Japão (ver Seção 1.3.1). Estes eventos contribuíram para a substituição e posterior eliminação do mercúrio e seus compostos de diversos processos industriais.

Dentre os critérios que justificam a inclusão do mercúrio em programas de vigilância com o respaldo da Organização Mundial de Saúde, destacam-se: sua ubiquidade, sua abundância e persistência no ambiente, sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação, além da gravidade de seus efeitos à saúde [30].

1.3. Intoxicação por mercúrio

A exposição ao mercúrio e a seus compostos pode ser do tipo aguda (a curto prazo) ou crônica (a longo prazo) e os sintomas variam significativamente de acordo com a forma na qual o mercúrio se apresenta. A afinidade do mercúrio com grupos sulfidríla de proteínas e enzimas favorece a manifestação de sua toxicidade nos órgãos dos sistemas nervoso, renal, respiratório, imunológico, digestivo, reprodutivo, cardíaco, entre outros.

O aparecimento dos sintomas de intoxicação aguda por mercúrio pode variar de uma a várias semanas após a exposição, dependendo da dose ou da concentração dos compostos mercuriais. Quanto maior a dose ou concentração, mais rápida será a manifestação dos efeitos. Atualmente, são raros os casos envolvendo intoxicação aguda.

A intoxicação crônica por mercúrio (mercurialismo ou hidrargirismo) resulta da exposição permanente e por períodos prolongados a pequenas quantidades de mercúrio. As manifestações deste tipo de intoxicação são mais comumente encontradas em pessoas cujas atividades diárias envolvam contato com mercúrio e seus compostos (exposição ocupacional) ou que façam uso de medicamentos mercuriais [37].

Cerca de metade dos casos de intoxicação por mercúrio pode ser atribuída aos organomercuriais [40]. Além disso, a grande maioria das intoxicações por organomercuriais deve-se aos alquilmercuriais como o metilmercúrio e o etilmercúrio. A relevância destes alquilmercuriais como agentes tóxicos foi constatada após os desastres ocorridos em Minamata (1953 – 1959) e Niigata (1964 – 1965) no Japão, Iraque (1956 e 1960), Paquistão (1961), Guatemala (1964 – 1965), e nos Estados Unidos (1969 – 1970).

1.3.1. Doença de Minamata

Os efeitos da intoxicação por mercúrio orgânico foram revelados ao mundo pela primeira vez, em grande escala, em Minamata, Japão. Uma misteriosa doença neurológica afligiu dezenas de pessoas desta região em meados dos anos 50 do século XX. Na época, a principal atividade industrial e a base econômica dos habitantes de Minamata era uma fábrica de fertilizantes, a Corporação Shin-Nihon Chisso Hiryo. Em 1949, esta fábrica começou a produzir cloreto de vinila e acetaldeído por meio da conversão catalítica de acetileno. Sais de mercúrio foram empregados neste processo com função catalisadora. Inicialmente, o efluente era descartado diretamente no mar de Shiranui. Em 1950, o mercúrio, incluindo metilmercúrio e óxido de mercúrio, começou a ser lançado nas águas da baía de Minamata como resíduo presente no efluente resultante do processo industrial [37].

A poluição das águas da baía de Minamata, juntamente com a ação das bactérias meta-nogênicas, que convertem mercúrio inorgânico em metilmercúrio e dimetilmercúrio, resultou em uma séria contaminação de organismos aquáticos e, posteriormente, dos habitantes locais, cuja dieta alimentar consistia, essencialmente, de peixes e frutos do mar da baía [56].

1. Introdução

No final do ano de 1953, uma doença neurológica um tanto incomum começou a afligir os habitantes da região. Em 1956, já eram numerosos os casos desta doença. Em agosto de 1956, a doença de Minamata foi inicialmente atribuída à intoxicação por metais pesados oriundos de efluentes industriais. Muitos metais foram investigados durante os anos de 1957 e 1958. Em 1959, as causas da doença foram finalmente atribuídas à intoxicação por mercúrio em sua forma orgânica e sua procedência foi imputada à fábrica de fertilizantes, que foi então pressionada a modificar seus métodos de descarte [40].

Apenas em 1964, 11 anos depois do diagnóstico do primeiro caso da doença de Minamata, descobriu-se que, durante a conversão catalítica do acetileno a cloreto de vinila, uma parcela do catalisador (cloreto de mercúrio) fora convertida em uma reação secundária a cloreto de metilmercúrio, altamente tóxico. Descarregado junto ao efluente industrial na baía de Minamata, o metilmercúrio foi acumulado nos tecidos dos peixes e frutos do mar posteriormente consumidos pela população local.

Fato semelhante ocorreu em 1965 em Niigata, norte do Japão. Como em Minamata, os habitantes da região alimentavam-se de peixes e frutos do mar contaminados com metilmercúrio advindos do Rio Agano.

1.3.2. Mercúrio elementar e mercúrio inorgânico

1.3.2.1. Metabolismo e efeitos tóxicos

O metabolismo do vapor de mercúrio metálico (Hg^0) difere consideravelmente do metabolismo do íon Hg^{2+} . O vapor de mercúrio é facilmente absorvido pelo corpo devido a sua lipossolubilidade, mas seu tempo de vida é bastante limitado por ser rapidamente oxidado de Hg^0 a Hg^{2+} . Este último, por sua vez, também é reduzido no corpo. O íon Hg^{2+} liga-se a grupos sulfidríla (-SH) e selenohidríla (-SeH) de proteínas e sua mobilidade é limitada no corpo. O efeito tóxico observado após a exposição a vapor de mercúrio pode ser atribuído ao íon de mercúrio divalente formado pela oxidação no tecido. Alguns complexos Hg-SH são capazes de mimetizar moléculas endógenas dos sítios de ligação de proteínas na membrana plasmática. Estes complexos também podem mimetizar moléculas dos sítios de ligação de proteínas e enzimas intracelulares.

Como a Cys-S-Hg-S-Cys mimetiza a cistina (Cys-S-S-Cys) no sítio de um transportador de aminoácido na membrana plasmática [26], é compreensível que este conjugado também atue como um mimetizador deste aminoácido em sítios de ligação de moléculas intracelulares que usam a cistina como substrato, como a enzima γ -cistationina. Esta enzima é normalmente ativada pela ligação com a cistina ou a cistationina. Entretanto, a ligação com a Cys-S-Hg-S-Cys inativa esta enzima. Este conjugado não se comporta como um mimetizador funcional e sim estrutural da cistina e da cistationina, elucidando a seriedade dos efeitos sobre os processos intracelulares provocados por espécies moleculares de metais que mimetizam moléculas endógenas.

1. Introdução

A citotoxicidade do Hg^{2+} é conhecida há tempos e está relacionada aos grupos sulfidril, -SH (ou tiol, ou mercaptana - de *mercurium captans*) de proteínas, de enzimas e de substâncias de baixo peso molecular (como a coenzima A, a cisteína e a glutatona), com as quais tem forte afinidade. A interação entre o mercúrio e o enxofre (S do grupo -SH) se estabelece por meio de ligação covalente. O Hg^{2+} substitui o átomo de hidrogênio nas sulfidrilas, formando mercaptídeos do tipo X-Hg-S-R, $\text{Hg}(\text{SR})_2$ e R'S-Hg-SR, em que X é um grupamento eletronegativo e R e R' são proteínas. Portanto, o mercúrio e os compostos mercuriais, mesmo em baixas concentrações, são capazes de inativar enzimas sulfidriladas, interferindo no metabolismo e nas funções celulares, podendo, por exemplo, bloquear o transporte de glicose ou alterar a permeabilidade da membrana celular. Igualmente ao mercúrio inorgânico, qualquer enzima com um grupo essencial -SH é alvo potencial para a toxicidade do metilmercúrio.

A ligação de mercúrio a estes grupos pode produzir uma mudança na estrutura terciária e quaternária de proteínas, alterar as condições de ligação em grupos prostéticos de enzimas [100], e bloquear ou modificar o ligante receptor [9] e o fluxo dos íons Na^+ e K^+ nos poros e canais iônicos das membranas celulares [13]. A alteração do fluxo dos íons Na^+ e K^+ pode afetar os potenciais da membrana celular. O transporte ativo de íons Na^+ e K^+ através da membrana celular depende da chamada bomba de sódio e potássio (bomba Na-K), a qual obtém sua energia do ATP produzido pela fosforilação oxidativa. O mercúrio, mesmo em quantidades traço, pode afetar o metabolismo energético celular ou inibir a Na-K-ATPase, a qual desempenha um importante papel no funcionamento da bomba Na-K. As ATPases contém diversos grupamentos sulfidril, cuja complexação por íons Hg^{2+} altera a estereo-especificidade da enzima, diminuindo, portanto, o acesso do ATP ao centro catalítico.

A liberação de neurotransmissores pelas células nervosas pode ser inibida ou acelerada pelo mercúrio. A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima que atua no metabolismo das catecolaminas e na conversão do neurotransmissor central serotonina. A inibição da MAO pelo mercúrio implicará no acúmulo de serotonina no sistema nervoso central (SNC) com conseqüentes perturbações neuropsíquicas. O mesmo acontece com a produção de citocina pela células dos sistema imunológico e a secreção de hormônios pelas gândulas endócrinas. Estes efeitos têm sido observados em experimentos *in vitro* com culturas de diferentes tipos de células ou com auxílio de eletrodos intracelulares [19].

Dentre os compostos sulfidrilados de destacado papel bioquímico tem-se a coenzima A (CoA-SH). Uma evidência de que a toxicidade do mercúrio se deve à sua ligação com a sulfidril da coenzima A é a elevada concentração deste metal em órgãos vitais ricos em CoA-SH (fígado, cérebro, rins). Além disso, esta interação explica alguns sinais e sintomas da intoxicação mercurial com base no bloqueio metabólico das funções da coenzima A, como, por exemplo, a anemia (provocada pelo dano à síntese do heme no nível de incorporação da succinil CoA) e algumas manifestações neurológicas (devido à perturbação do metabolismo cerebral do piruvato).

1. Introdução

Outras enzimas cuja atividade pode ser prejudicada pelo mercúrio são a glicose-6-fosfatase, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), hexoquinase, isocitrato desidrogenase, succinato desidrogenase, fosfoglicose isomerase, fosfatase alcalina, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, beta-galactosidase, beta-glicuronidase e a N-acetil- β -glicosaminidase (NAG).

Algumas moléculas especiais contendo grupos -SH ou -SeH com capacidade de ligar fortemente o Hg^{2+} foram identificadas. A glutatona e a metalotioneína são moléculas que podem neutralizar o íon de mercúrio, preservando os processos celulares. Ligado a estas moléculas, o mercúrio pode ser transportado, armazenado, e eliminado do corpo. A sensibilidade dos diferentes tipos de células à citotoxicidade do mercúrio está relacionada à capacidade de sintetizar glutatona e metalotioneína [24]. A ligação com as metalotioneínas explica, por exemplo, porque concentrações tão altas de mercúrio podem ser encontradas nos rins.

O mercúrio, além de se combinar com o grupo tiólico, também pode se ligar com outros grupamentos químicos de importância fisiológica como amidas (CONH_2), aminas (NH_2), carboxilas (COOH), e fosfatos (PO_4), e estas interações resultam em alterações da atividade enzimática e da estrutura de proteínas e de membranas.

1.3.2.2. Absorção, distribuição e eliminação do mercúrio elementar

O mercúrio elementar ou mercúrio metálico é solúvel em gorduras (lipossolúvel), o que lhe permite atravessar membranas celulares e ser absorvido pelo organismo. A absorção do mercúrio elementar ocorre principalmente pelas vias respiratória e digestiva. A via respiratória é, sem dúvida, a mais importante via de introdução no organismo para o vapor de mercúrio elementar.

O vapor de mercúrio inalado é absorvido do ar com eficiência (o organismo humano retém cerca de 80% do vapor de mercúrio inalado); ele se difunde rapidamente através da membrana alvéolo-capilar, passando para o sangue e estabelecendo-se nos eritrócitos. No sangue, existirá por tempo transitório sob a forma elementar, já que as células vermelhas têm a capacidade de ligar e oxidar o Hg^0 a Hg^{2+} . Esta oxidação ocorre, em parte, sob a influência da catalase e, apesar de rápida, pode durar tempo suficiente para que o cérebro e outros órgãos sejam expostos ao mercúrio elementar dissolvido no sangue. O Hg^0 inalterado ou não oxidado tem grande poder de difusão (pela ausência de carga elétrica e por sua lipossolubilidade) nas células dos tecidos. Assim, ele atravessa facilmente as membranas celulares e pode ser transportado através das barreiras *hemato-encefálica* e *placentária*.

Ao deixar o sangue, passando para os tecidos, o Hg^0 é rapidamente oxidado a Hg^{2+} . Este cátion tem menores possibilidades de atravessar de volta (no sentido oposto) as membranas e barreiras, por ter perdido a lipossolubilidade e ter se ligado aos sítios de proteínas celulares. Esta oxidação funciona, então, como uma "câmara de retenção" para o mercúrio, determinando sua acumulação local e a manifestação de sua toxicidade.

1. Introdução

O mercúrio oxidado (Hg^{2+}) presente no sangue atinge os tecidos dos rins, fígado, medula óssea, baço, parte superior do aparelho respiratório, mucosa bucal, parede intestinal, pele, glândulas salivares, coração, músculos esqueléticos, cérebro e pulmões.

O mercúrio metálico líquido é muito pouco absorvido pelo trato gastrointestinal. Como resultado disto, a quantidade de mercúrio metálico ingerida não apresenta relevância toxicológica [49]. No entanto, pode ocorrer a formação de algum sulfeto na superfície do epitélio intestinal (*biotransformação*) e, conseqüentemente, a absorção do mercúrio. A presença de fístulas faz com que o tempo de permanência do mercúrio na mucosa intestinal seja maior, aumentando, assim, a possibilidade de ocorrer a sua biotransformação e absorção.

A *biotransformação* é um processo de alteração química da estrutura original de um agente tóxico que acontece no organismo quase sempre por via enzimática com o objetivo de subtrair sua toxicidade e/ou favorecer sua eliminação renal, tornando-o hidrossolúvel. Contudo, a biotransformação nem sempre resulta em um produto menos tóxico ou com um tempo de meia-vida mais curta. Às vezes ocorre justamente o oposto, em ambos os casos. O mercúrio pode sofrer as seguintes reações de *biotransformação*:

- (1) oxidação do mercúrio metálico (Hg^0) a mercúrio divalente (Hg^{2+});
- (2) redução do mercúrio divalente (Hg^{2+}) a mercúrio metálico (Hg^0);
- (3) conversão do metilmercúrio a mercúrio inorgânico (ruptura da ligação C-Hg);
- (4) metilação do mercúrio inorgânico.

O vapor de mercúrio é lentamente liberado da superfície do mercúrio metálico a uma velocidade proporcional à área da superfície presente. Uma camada de sulfeto de mercúrio (HgS) tende a se formar sobre a superfície do mercúrio metálico, limitando a quantidade de vapor de mercúrio que pode ser liberada.

Experimentos em camundongos e primatas [21, 23] mostraram que após uma exposição única a vapor de mercúrio, 10 vezes mais mercúrio é retido no cérebro do que após injeção intravenosa da mesma dose de mercúrio mercúrico. Isto acontece porque o vapor de mercúrio fisicamente dissolvido no sangue é transportado para o cérebro. Os eritrócitos e a hemoglobina servem como transportadores de vapor de mercúrio.

Como mencionado anteriormente, o Hg^0 , em contraste com o Hg^{2+} , atravessa a barreira placentária, causando um acúmulo de mercúrio no feto quando a mãe é exposta a vapor de mercúrio elementar durante a gestação [32]. No entanto, o Hg^0 tem um tempo de vida limitado no corpo, sendo rapidamente oxidado a Hg^{2+} nos tecidos.

O tempo de retenção do mercúrio acumulado varia largamente entre diferentes órgãos. Os tempos de meia-vida biológicos variam de poucos dias a meses. Os órgãos com os maiores tempos de retenção são o cérebro, os rins e os testículos. Estes órgãos têm portanto a propensão de mostrar acúmulo de mercúrio após exposição prolongada. O cérebro humano, por exemplo, acumula mercúrio resultante da exposição ocupacional a vapor de mercúrio.

1. Introdução

A *eliminação* do mercúrio após exposição a vapor de mercúrio ocorre principalmente pela excreção de Hg^{2+} . Quantidades pequenas de vapor de mercúrio podem ser exaladas. Um fração do vapor de mercúrio exalado é resultado da redução do Hg^{2+} armazenado nos tecidos.

A taxa de excreção é dependente da dose. Alguns dados indicam que a maior parte do mercúrio acumulado no corpo (80%) é excretado em aproximadamente 60 dias. Parte do mercúrio acumulado no cérebro é lentamente eliminado em tempo médio biológico que pode exceder vários anos [49].

1.3.2.3. Intoxicação causada pela exposição a vapor de mercúrio

Como visto anteriormente, o mercúrio é citotóxico; liga-se a grupos -SH e -SeH modificando a estrutura terciária e quaternária de proteínas. O mercúrio pode interagir com receptores, afetar canais iônicos e alterar funções celulares básicas.

A toxicidade do mercúrio pode afetar as funções dos nervos periféricos, as funções renais e musculares, bem como o sistema imunológico e endócrino. No entanto, o sistema nervoso central é o principal alvo da ação tóxica deste metal.

Uma revisão dos casos de intoxicação acidental por mercúrio publicados durante o período de 1998-2002 revelou uma variedade surpreendente de sintomas [20]. As concentrações de mercúrio foram registradas após análise da urina e sangue dos indivíduos expostos. Os sintomas observados incluíram uma variedade de síndromes cutâneas, como a dermatite de contato sistêmica (síndrome de baboon) [16]. Adachi *et al.* [3] e Pigatto *et al.* [102] descreveram três casos de dermatite numular, cujos sintomas desapareceram após remoção do amálgama dental. Boyd *et al.* resume as doenças de pele causadas pelo mercúrio em um artigo de revisão [25]. Existem ainda vários casos de crianças com hipertensão e secreção elevada de catecolaminas induzida pela exposição ao mercúrio [71].

O pulmão é o órgão crítico no caso de exposição aguda acidental a altas concentrações de vapor de mercúrio. O vapor de mercúrio causa bronquite erosiva e bronquiolite com pneumonite intersticial. O paciente eventualmente morre de insuficiência respiratória. Estes sintomas podem estar combinados a sinais causados pelos efeitos sobre o sistema nervoso central, tais como tremores e um aumento na excitabilidade [49].

Em exposição a longo prazo a níveis tóxicos de vapor de mercúrio, os órgãos do sistema nervoso central são os órgãos críticos. Pouco é conhecido a respeito das disfunções cerebrais causadas pela exposição a vapor de mercúrio. Conforme a dose aumenta, os sintomas podem ser caracterizados como uma síndrome astênica vegetativa e incluem: fraqueza, fadiga, anorexia, perda de peso e distúrbios gastrintestinais. Esta síndrome também é conhecida como micromercurialismo [90].

1. Introdução

Em níveis de exposição mais altos, tremores musculares característicos aparecem. Inicialmente, estes tremores ficam restritos às partes periféricas como os dedos, as pálpebras e os lábios, progredindo para um tremor generalizado que envolve o corpo todo.

A sintomatologia que mais se destaca na intoxicação mercurial crônica é o eretismo mercurial. Caracteriza-se por severas alterações de comportamento e personalidade, excitabilidade aumentada, perda de memória e insônia, que pode progredir para depressão. Em casos graves podem ocorrer delírios e alucinações. Paralelamente aos efeitos sobre o sistema nervoso central, em casos de intoxicação grave observa-se inflamação das gengivas e salivação excessiva.

White [133] descreveu um trabalhador de uma fábrica de termômetros que foi exposto durante 3 anos e desenvolveu sintomas neuropsicológicos. Seu nível de mercúrio urinário era de $690\mu\text{g.L}^{-1}$. As imagens obtidas por ressonância magnética mostraram atrofia cortical. Haut *et al.* [57] estudou 13 homens expostos a vapor de mercúrio proveniente da soldagem de materiais pintados com tinta contendo mercúrio por um período de exposição equivalente a 2-4 semanas. Cessada a exposição, a média da concentração de mercúrio no sangue dos homens foi de $48\mu\text{g.L}^{-1}$ ($21\text{-}84\mu\text{g.L}^{-1}$). Um ano depois, estes homens foram submetidos à uma bateria de testes neuropsicológicos e comparados com um grupo de controle de 13 trabalhadores não expostos. O grupo exposto apresentou um déficit cognitivo de coordenação motora e problemas emocionais como depressão e ansiedade. Além disso, esses homens mostraram-se mais retraídos socialmente.

Nos casos de intoxicação leve, os sintomas da intoxicação por mercúrio aparentemente regridem ou desaparecem quando a exposição é interrompida. No entanto, em casos mais graves, devido à exposição a longo prazo, seqüelas persistentes relacionadas ao sistema nervoso são comuns. Uma pesquisa americana [74] foi conduzida em 205 trabalhadores com idade média de 71 anos. Destes, 104 haviam sido expressivamente expostos a vapor de mercúrio por mais de 19 anos, com eliminação de mercúrio em excesso na urina ($600\mu\text{g.L}^{-1}$). Os demais 101 trabalhadores não haviam sido expostos. A coordenação motora nos trabalhadores expostos foi reduzida a um grau estatisticamente significativo. A velocidade de condução nos nervos periféricos também mostrou relação com a exposição cumulativa ao mercúrio, expressando-se como uma neuropatia periférica residual.

Diversos estudos [10, 70, 99] mostraram que os sintomas neurológicos decorrentes da exposição ocupacional a vapor de mercúrio podem permanecer por décadas após o término da exposição, o que indica um dano permanente. Um estudo comparativo na Noruega [79] envolveu 75 trabalhadores de uma indústria de cloro-álcali e um grupo de controle de 52 indivíduos revelou que os efeitos da exposição sobre a capacidade de atenção e a capacidade visuomotora foram encontrados 12 anos após o término da exposição. A exposição deste grupo foi consideravelmente menor do que a exposição do grupo americano mencionado previamente. A concentração de mercúrio na urina destes trabalhadores foi equivalente a $100\mu\text{g.L}^{-1}$ durante o período de exposição ocupacional.

1. Introdução

O tecido nervoso do feto constitui o tipo de célula mais sensível ao íon Hg^{2+} . Efeitos evidentes no desenvolvimento do sistema nervoso surgem a um nível de concentração de $5\text{-}50\text{nmol.L}^{-1}$ ou $1\text{-}10\text{ ng.g}^{-1}$ no tecido [86]. Este foi o nível encontrado em recém-nascidos cujas mães eram portadoras de amálgama dental [42, 76].

Estudos experimentais em cobaias e em primatas [22, 35, 96, 129] mostraram que a exposição a vapor de mercúrio causa aborto, aumento na incidência de mortes de recém-nascidos e distúrbios no desenvolvimento do cérebro semelhantes àqueles observados após a exposição a metilmercúrio, resultando em alterações comportamentais permanentes e capacidade de aprendizado reduzida.

Existem poucos relatos de mulheres expostas a vapor de mercúrio durante a gestação. Alguns dos efeitos descritos incluem retardo mental e peso abaixo do normal de recém-nascidos cujas mães foram ocupacionalmente expostas a vapor de mercúrio durante a gestação.

Um grande número de pessoas tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento têm restaurações de amálgama dental. Para a maioria das pessoas, esta exposição não causa efeitos adversos à saúde. No entanto, o mercúrio, assim como outras substâncias ou fármacos, tende a induzir efeitos colaterais mais sérios às pessoas geneticamente predispostas. Este assunto é discutido posteriormente na Seção 1.4.

1.3.2.4. Intoxicação causada pela exposição a mercúrio inorgânico

Não há evidências de que os efeitos tóxicos do mercúrio resultantes da exposição a vapor de mercúrio sobre os rins, sistema imunológico e glândulas endócrinas sejam diferentes daqueles produzidos pela exposição a Hg^{2+} . Os rins são os órgãos-alvo primários; absorvem e acumulam prontamente íons Hg^{2+} do sangue após a exposição [139].

No caso de intoxicação aguda, ou seja, quando o cloreto de mercúrio (HgCl_2) ou outros sais de mercúrio II são ingeridos acidental ou propositalmente, os órgãos do trato gastrintestinal são os órgãos críticos. O efeito corrosivo de uma solução concentrada de sal de Hg^{2+} sob o trato gastrintestinal causa necrose das mucosas e morte. Os sintomas incluem dores de estômago, dores abdominais, vômito e diarreia com sangue. Se o paciente sobreviver aos danos causados no trato gastrintestinal, os órgãos críticos serão os rins. Dentro de 24 horas, ocorre a falência renal causada pela necrose do epitélio tubular proximal.

A intoxicação crônica causada exclusivamente por sais de Hg^{2+} é bastante incomum. Grande parte da exposição é ocupacional e envolve uma mistura de vapor de mercúrio elementar e mercúrio mercúrico (Hg^{2+}). O mercúrio mercurioso (Hg_2^{2+}) é oxidado a Hg^{2+} no trato gastrintestinal. No caso de exposição crônica a Hg^{2+} , os rins são os órgãos críticos. Outros alvos são o sistema imune, os tecidos musculares e a tireóide. Os sintomas também podem aparecer na forma de salivação elevada, inflamação nas gengivas e linhas negras nos dentes por causa da precipitação do sulfeto de mercúrio (HgS) [49].

1.3.3. Vigilância da intoxicação por exposição ocupacional

No Brasil, o Anexo II do Regulamento dos Benefícios da Previdência Social [81] registra as atividades associadas ao mercúrio (e seus compostos) que representam um risco aos trabalhadores, tais como: extração e fabricação do mineral de mercúrio e de seus compostos; fabricação de tintas; fabricação de solda; fabricação de barômetros, manômetros, termômetros, interruptores, lâmpadas, válvulas eletrônicas, ampolas de raio X, retificadores; amalgamação de zinco para fabricação de eletrodos, pilhas e acumuladores; douração e estanhagem de espelhos; recuperação de mercúrio por destilação de resíduos industriais; tratamento a quente de amálgamas de ouro e prata para recuperação desses metais; secretagem de pêlos, crinas e plumas e feltragem à base de compostos de mercúrio; fabricação de fungicidas para o tratamento de sementes; etc.

Este regulamento lista ainda as doenças que podem estar relacionadas ao mercúrio e a seus compostos (denominadas e codificadas segundo CID-10¹): transtornos de personalidade e de comportamento decorrentes de doença, lesão e disfunção de personalidade; transtorno mental orgânico ou sintomático não especificado; episódios depressivos; neurastenia (inclui a "síndrome da fadiga"); ataxia cerebelosa; outras formas especificadas de tremor; transtorno extrapiramidal do movimento não especificado; encefalopatia tóxica aguda; encefalopatia tóxica crônica; arritmias cardíacas; gengivite crônica; estomatite ulcerativa crônica; dermatite alérgica de contato; doença glomerular crônica; e nefropatia túbulo-intersticial induzida por metais pesados [82].

O controle da exposição ocupacional de trabalhadores expostos ao mercúrio, nas mais diferentes atividades em que ele ou seus compostos são empregados ou produzidos, pode e deve ser feita pela aplicação simultânea de duas medidas: as de ordem técnica e tecnológicas (adoção de mecanismos limpos de produção) e as de ordem médica. Estas medidas buscam impedir ao máximo o contato deste agente químico com o organismo do trabalhador.

Considerando-se o ambiente ocupacional, as vias mais importantes na exposição/absorção ao mercúrio e seus compostos são as vias respiratória, cutânea, ocular e digestiva. A via respiratória é a principal via de introdução em se tratando do mercúrio elementar.

Entre as medidas técnicas para controle e prevenção da exposição ocupacional ao mercúrio, é importante: (1) ventilar adequadamente o ambiente de trabalho, (2) instruir corretamente os trabalhadores quanto ao risco das operações e quanto às normas de higiene e (3) garantir o uso de roupas e equipamentos de proteção individual (EPIs) apropriados.

Além disso, é essencial o monitoramento permanente das concentrações de vapores e/ou poeiras de mercúrio e seus compostos no ar dos ambientes de trabalho e obediência aos limites sugeridos e/ou adotados pela legislação específica. Tais limites são obtidos a partir do estudo das relações dose-efeito e dose-resposta para a exposição humana ao mercúrio e seus compostos. O cumprimento destas medidas garantem máxima segurança à saúde dos trabalhadores expostos, minimizando - mas não eliminando - o risco de intoxicação.

¹CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

1. Introdução

Os limites para exposição ocupacional ao mercúrio e seus compostos variam de 0,025 a 10mg.m⁻³ de ar, dependendo do tempo e do tipo de exposição (jornada diária de trabalho, acidentes, falha ou defeito nos EPIs, etc.).

A legislação brasileira, através das Normas Regulamentadoras (NRs) do Ministério do Trabalho, estabelece um *limite de tolerância biológica* (LTB) para o trabalhador exposto ao mercúrio de 33 microgramas de mercúrio por grama de creatinina urinária e 0,04 miligramas por metro cúbico de ar. A NR-15 [85] lista o mercúrio entre os principais agentes nocivos que afetam a saúde do trabalhador.

Dentre os metais que causam doença ocupacional, o mercúrio é o que apresenta a maior diversidade de efeitos (neurológicos, psicológicos, cardio-respiratórios, gastrintestinais, renais e bucais). A NR-15, entretanto, não fixa limites para as várias formas de mercúrio como faz a ACGIH². Assim, para todas as formas de mercúrio, exceto as orgânicas, o *limite de exposição ocupacional* (LEO) é de 0,04mg.m⁻³ de ar, como citado anteriormente.

O *indicador biológico de exposição* (IBE) é um parâmetro específico medido em tecidos ou fluidos do organismo humano e utilizado como ferramenta para avaliação da exposição humana a um agente químico tóxico de interesse [37]. O IBE informa a quantidade de exposição em termos de absorção ou de efeito e pode ser representado:

- pela presença do agente químico inalterado em constituintes do organismo, um indicativo de sua absorção;
- pela presença de um produto de biotransformação do agente químico no organismo;
- pela alteração qualitativa e/ou quantitativa da atividade de enzimas ou outros parâmetros biológicos, o que reflete o efeito tóxico do agente químico.

O uso dos IBEs e dos LTBs constituem o monitoramento biológico, cujo objetivo é garantir a conservação da saúde das pessoas ocupacionalmente expostas ao mercúrio e seus compostos. O valor-limite admitido para o IBE é um *indicador biológico máximo permitido* (IBMP), que, uma vez não ultrapassado, não haverá intoxicação decorrente daquela exposição. No entanto, não se observa um consenso em relação a estes limites, variando de autor para autor.

Na exposição a concentrações de 0,05mg.m⁻³ de ar de vapores de mercúrio metálico (limite para ambientes de trabalho e jornadas de 40 horas semanais, em alguns países), por mais de um ano, os níveis de mercúrio no sangue e na urina alcançam, respectivamente, 3,5µg.dl⁻¹ e 150µg.L⁻¹, não havendo sintomas específicos. Para uma exposição a 0,1-0,2mg.m⁻³, as concentrações, após um ano, podem alcançar 7-14µg.dl⁻¹ e 300-600µg.L⁻¹ no sangue e na urina, respectivamente, podendo ocorrer tremores [135].

²ACGIH: *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

1. Introdução

Segundo um grupo de especialistas da Organização Mundial de Saúde [136], a concentração de mercúrio no ar do ambiente de trabalho está relacionada à concentração urinária do metal na proporção de 1:2. Assim, uma concentração de Hg^0 no ar de $25\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, limite proposto pelo grupo para ambientes de trabalho, está associada a um LTB de $50\mu\text{gHg}\cdot\text{L}^{-1}$ de urina.

Em contrapartida, em pesquisa desenvolvida com trabalhadores expostos a vapores de mercúrio, Roels [108] registrou uma relação de 1:1,2 entre o mercúrio no ar e na urina, sugerindo um limite de tolerância de $40\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ de ar.

Os teores de mercúrio total considerados normais (pessoas não expostas) pela Organização Mundial da Saúde são $5\text{-}10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no sangue, até $4\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ na urina e $1\text{-}2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no cabelo. Os limites de tolerância biológica no sangue e no cabelo devido a exposição a vapores de mercúrio são $30\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente [104].

O Departamento de Saúde do Estado da Califórnia [29] divulgou os seguintes valores de referência para interpretação dos níveis urinários de mercúrio:

- eliminação normal: $< 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;
- eliminação elevada denotando aumento da absorção: $> 50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;
- nível de advertência: $> 200\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;
- nível perigoso (evitar futuras exposições) e eliminação excessiva (podem ocorrer sinais e sintomas da intoxicação): $> 300\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

No Brasil, a Norma Regulamentadora 7 (NR-7) [84], que dispõe sobre os parâmetros do controle biológico da exposição ocupacional a agentes químicos, propõe a utilização do mercúrio inorgânico urinário total como indicador biológico da exposição (IBE) de trabalhadores ao mercúrio e seus compostos.

A NR-7 estabelece ainda o valor de $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de urina como índice biológico máximo permitido de mercúrio inorgânico urinário e $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de urina como valor de referência indicando normalidade (ou $35\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de creatinina e $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de creatinina, respectivamente).

Uma avaliação da exposição ocupacional de mineiros a vapores de mercúrio (processo de amalgamação e queima) em regiões de garimpo de ouro no lago Vitória, Baía de Nungwe, na Tanzânia, revelou uma média de $241\text{ngHg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de urina, enquanto, para a população não exposta ocupacionalmente, a média foi de $2,6\text{ngHg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de urina [60].

Um estudo [118] envolvendo 35 indivíduos saudáveis da cidade de Maracaibo revelou níveis de mercúrio no sangue e na urina de $11,2 \pm 7,8\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $9,2 \pm 3,6\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Em contraposição, os níveis de mercúrio encontrados no sangue e na urina de indivíduos ocupacionalmente expostos foram de $20,8 \pm 7,9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $19,7 \pm 7,5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

1. Introdução

Os efeitos da exposição ocupacional ao mercúrio em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas fluorescentes localizada em Santo Amaro foram investigados em um estudo no qual 23 dos trabalhadores (11,97%) apresentaram mercúrio urinário abaixo de $10\mu\text{g.L}^{-1}$, 100 (52,08%) entre 10 e $50\mu\text{g.L}^{-1}$, 27 (14,06%) acima de $50\mu\text{g.L}^{-1}$ e 42 (21,87%) sem informação [140].

A Anvisa não possui nenhum parâmetro de exposição ocupacional ao mercúrio. Segundo a Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde e a Gerência de Tecnologia da Organização em Serviços de Saúde ³, a Anvisa apenas orienta os profissionais da odontologia a realizar suas atividades, incluindo aquelas que envolvam o uso de amálgama dental, de forma segura, obedecendo uma lógica de proteção e prevenção de riscos [54]. Algumas orientações desta agência, a título de exemplo, são: (1) usar somente amálgama em cápsulas; (2) usar lençol de borracha durante a aplicação e remoção de restaurações de amálgama; (3) realizar a remoção de restaurações de amálgama somente com broncas novas, sugadores de saliva e sob refrigeração da caneta.

A Secretaria de Atenção à Saúde do Ministério da Saúde e a Anvisa elaboraram um manual [8] sobre a prevenção e controle dos riscos em serviços odontológicos. Este manual auxilia os profissionais da odontologia a adotar boas práticas em suas atividades, com o intuito de eliminar (ou reduzir) e prevenir os riscos à saúde.

³Informação obtida por comunicação eletrônica.

1.4. Amálgama dental

O mercúrio tem a propriedade de dissolver quase todos os metais, formando uma liga chamada amálgama. Devido à sua resistência e durabilidade, o amálgama dental vem sendo empregado na odontologia como material de preenchimento por mais de um século sem efeitos adversos evidentes [105].

O amálgama dental é uma liga estável composta pela combinação de cerca de 45 – 55% de mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), 30% de prata (Ag^0), estanho (Sn^0), cobre (Cu^0) e, possivelmente, outros elementos metálicos como o zinco (Zn^0) [137].

Dodes [41] faz uma descrição dos benefícios do amálgama dental em comparação aos demais materiais restauradores disponíveis atualmente. O amálgama dental é durável, de fácil aplicação, altamente resistente e relativamente barato.

É crescente a preocupação com os riscos à saúde decorrentes da exposição ao mercúrio contido em restaurações de amálgama dental [115]. No entanto, existem poucas evidências para sustentar ou refutar inteiramente tais alegações.

A exposição ocupacional ao mercúrio elementar (Hg^0) tem sido associada a inúmeros sintomas neuropsicológicos. A absorção de vapor de Hg^0 é largamente demonstrada na literatura [21,37,47]. A exposição ocupacional de dentistas, por exemplo, tem sido associada a tremores musculares, mudanças de personalidade, de comportamento, perda de memória, irritabilidade e depressão grave [43].

Na ausência de uma exposição ocupacional, o influxo (ingestão, consumo, absorção) diário de mercúrio, proveniente da inalação de vapores de mercúrio ou da ingestão de água e alimentos, provavelmente não excederia $10\mu\text{g}$. Entretanto, uma significativa contribuição poderia resultar da liberação de vapor de mercúrio das restaurações de amálgama dental [4, 11, 28, 125].

O mercúrio liberado a partir de restaurações de amálgama pode adquirir várias formas: vapor de mercúrio elementar, íons metálicos, e/ou finas partículas [64]. No caso do vapor de mercúrio, uma parte é expirada, outra é aspirada para os pulmões e absorvida pelo sangue, outra é retida na saliva sob a forma de vapor e engolida juntamente com partículas de amálgama e outra é oxidada à sua forma iônica e expelida pela boca ou engolida. Da porção engolida, apenas uma pequena fração seria absorvida pelo trato gastrointestinal [5]. A reabsorção pelas vias aéreas do mercúrio liberado sob a forma de vapor de mercúrio pode chegar a 80%.

As partículas de amálgama resultantes da fricção dos dentes podem ser engolidas e, ainda que em menor extensão, oxidadas no trato gastrointestinal. Porém, menos do que 10% do mercúrio ingerido é reabsorvido como Hg^{2+} . O mercúrio também pode ser absorvido nas terminações nervosas e transportado para os gânglios e células nervosas centrais [12].

Alguns estudos indicam que o amálgama dental contribui significativamente para a carga corporal de mercúrio em indivíduos portadores de restaurações de amálgama [58, 64, 124, 131].

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde [5], o amálgama dental constitui uma fonte potencialmente significativa de exposição ao mercúrio elementar. A estimativa é que o influxo de mercúrio proveniente de restaurações de amálgama varie de 1 a $27\mu\text{g}$ em indivíduos expostos a uma quantidade inferior a $5\mu\text{g}$ de mercúrio por dia.

Em um estudo a respeito do impacto do mercúrio na saúde humana, sendo a urina o *indicador biológico de exposição* (IBE) escolhido, a média encontrada em gabinetes odontológicos para um total de 204 indivíduos (dentistas e assistentes) foi de $8,1\mu\text{gHg.L}^{-1}$ de urina ($1,2$ a $36,4\mu\text{g.L}^{-1}$) e em uma faculdade de odontologia para um total de 47 professores e alunos, esta média foi igual a $7\mu\text{gHg.L}^{-1}$ de urina ($2,5$ a $52,7\mu\text{g.L}^{-1}$) [46].

Outro estudo avaliou a exposição ocupacional ao mercúrio metálico em um módulo odontológico de uma unidade básica de saúde da cidade de São Paulo. Os níveis de mercúrio urinário para cerca de 62,5% dos trabalhadores foram de 10 a $49\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto para os demais trabalhadores, os níveis ficaram abaixo de $10\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo que o valor mais baixo observado foi de $2,5\mu\text{g.L}^{-1}$ [51].

Oikawa *et al.* [98] avaliou os teores de mercúrio urinário de 20 alunos da Faculdade de Odontologia do Centro de Ensino Superior do Estado do Pará (CESUPA). Os níveis de mercúrio urinário encontrados em 80% dos alunos investigados foram inferiores a $10\mu\text{g.L}^{-1}$. Apenas 4 indivíduos apresentaram teores de mercúrio urinário acima do dito "limite de normalidade" ($10\mu\text{g.L}^{-1}$), porém, dentro do limite máximo tolerado ($50\mu\text{g.L}^{-1}$).

Berdouses *et al.* [18] estudou a liberação de Hg do amálgama dental sob condições controladas de escovação e mastigação e descobriu que apenas $0,03\mu\text{g}$ de Hg são liberados por dia.

A contribuição das restaurações de amálgama à absorção diária de mercúrio foi avaliada em inúmeros artigos. Os valores geralmente alcançam de $1-5\mu\text{g.dia}^{-1}$, embora Sandborgh-Englund *et al.* [110] tenha estimado uma dose de 5 a $9\mu\text{g}$ de mercúrio por dia proveniente do amálgama dental. Halbach [55] examinou dados de 14 estudos independentes e concluiu que a dose provável de mercúrio proveniente do amálgama dental é inferior a $10\mu\text{g.dia}^{-1}$.

Barregård *et al.* [15] fez uma descrição de três casos em que os indivíduos de estudo apresentavam sintomas de intoxicação por mercúrio. Estes indivíduos eliminavam grandes quantidades de mercúrio pela urina, de $23-60\mu\text{g.dia}^{-1}$ ou $25-54\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina, indicando uma absorção de Hg diária equivalente a $100\mu\text{g}$. A quantidade de Hg encontrada no sangue foi de $12-23\mu\text{g.L}^{-1}$, que é 5 a 10 vezes a média encontrada para a população geral não exposta. Estes indivíduos não estavam expostos a nenhuma outra fonte de mercúrio, com a exceção de suas restaurações de amálgama dental e a remoção das mesmas resultou em concentrações normais de Hg.

Um caso similar foi publicado por Langworth e Strömberg [72]. O estudo demonstrou uma absorção de mercúrio de aproximadamente $100\mu\text{g.dia}^{-1}$, 10 vezes maior do que a absorção relatada pela Organização Mundial da Saúde [64]. Vários estudos mostram que a absorção de mercúrio a partir do amálgama dental eleva a concentração deste elemento no cérebro, plasma e rins proporcionalmente ao número de obturações [134].

1. Introdução

As concentrações de mercúrio no plasma e na urina de indivíduos que não têm amálgama dental correspondem a $0,2\mu\text{g.L}^{-1}$ e $2\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente [110]. A autópsia de indivíduos sem restaurações de amálgama revelou uma quantidade de mercúrio no córtex occipital de aproximadamente 7ng.g^{-1} (média, 6,7; alcance, 1,9-22,1). Em contrapartida, a investigação do córtex de indivíduos que tinham amálgama dental constatou uma quantidade equivalente a 15ng.g^{-1} (média, 15,2; alcance, 3,8-121,4) [64]. Contudo, esta diferença não implica que a absorção de mercúrio seja exclusivamente devido ao amálgama dental. Em fetos, observa-se também um aumento da concentração de mercúrio no cérebro e nos rins, com uma média de concentração de mercúrio duas vezes maior naqueles cujas mães possuem restaurações de amálgama comparados àqueles cujas mães não as têm [42, 76].

Em 1990, o canal de TV CBS apresentou um programa intitulado “Veneno na Boca” (*Is There Poison In Your Mouth?*), intensificando a controvérsia. Em resposta ao programa, o *National Institutes of Health* (NIH) e o *American Dental Association* (ADA) reportaram que não havia correlação alguma entre o amálgama dental e a saúde [78, 93]. A controvérsia em torno da chamada “doença do amálgama” desencadeou uma série de estudos multidisciplinares nas últimas duas décadas.

Amostras de sangue e urina de 40 mulheres que alegavam sofrer sérios danos à saúde decorrentes da exposição ao Hg^0 presente em restaurações de amálgama dental foram analisadas em um estudo de monitoramento biológico. O Hg foi determinado por espectrometria de absorção atômica com vapor frio. O número e as superfícies das restaurações de amálgama foram determinadas por dentistas para cada indivíduo de estudo. Os níveis médios de Hg no sangue e na urina foram $2,35\mu\text{g.L}^{-1}$ e $1,55\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina, respectivamente. Contudo, a diferença entre os níveis de Hg encontrados entre o grupo de estudo e o grupo controle não foi significativa [141].

Um estudo envolvendo 1100 homens indicou que 10 restaurações de amálgama em um indivíduo podem aumentar o nível de mercúrio urinário em cerca de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ [1]. Mackert e Berglund [77] apontaram que 450 a 530 restaurações de amálgama seriam necessárias para produzir efeitos pré-clínicos leves nos pacientes. Neste caso, a probabilidade de haver intoxicação por mercúrio proveniente da presença de amálgama dental é bastante remota.

Um grupo de 550 indivíduos não expostos ocupacionalmente ao Hg foi estudado para avaliar se o amálgama dental está adversamente associado às funções cognitivas [47]. Estes indivíduos foram submetidos a testes neuropsicológicos, questionários estruturados, exame dental e coleta de sangue e urina. O estudo mostrou que a exposição ao Hg derivado de restaurações de amálgama não está associado com nenhum déficit detectável nas funções cognitivas ou motoras.

As principais instituições e organizações científicas e de saúde (NIH, USPHS, CDC, FDA e WHO) estão convencidas de que o amálgama utilizado em restaurações dentais é um material restaurador seguro, confiável e efetivo [2].

1. Introdução

Como as informações encontradas na literatura são bastante controversas (e, por vezes, radicais), existe a necessidade de uma investigação mais profunda e conclusiva a respeito dos riscos aos quais profissionais e pacientes estão sujeitos devido ao uso do amálgama dental. Muito embora existam produtos alternativos de função similar disponíveis no mercado (as resinas), muitos dentistas ainda optam pelo amálgama dental por ser um material mais resistente e durável. Além disso, as resinas, muitas vezes importadas, são mais caras que o amálgama.

O Professor Dr. William W. Johnson, professor associado e vice presidente do Departamento de Odontologia Restaurativa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nebraska, Estados Unidos, em declaração extra-oficial ⁴, a pedido da autora desta dissertação, resume:

”Como educador e cientista da área de biomateriais, não tenho quaisquer restrições quanto ao uso do amálgama dental em meus pacientes e em minha família. É verdade que uma ínfima quantidade de mercúrio é liberada de restaurações de amálgama diariamente, mas nenhum estudo confiável encontrou ligação alguma entre esta liberação e qualquer problema médico.” [68]

Dr. William W. Johnson
Universidade de Nebraska

A Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, através da Divisão de Saúde Bucal e do Programa Estadual de Controle DST/AIDS, elaborou um manual, revisado pela Anvisa, que dispõe de normas e padrões de biossegurança no controle de riscos operacionais relacionados à prática odontológica [112]. As diretrizes de procedimentos descritos envolvem equipamentos de proteção individual (EPIs), práticas de limpeza, desinfecção e esterilização, recomendações da ADA relativas ao Hg, manipulação e destino de resíduos, leis, códigos, normas e portarias sobre biossegurança, etc.

Enfim, é inegável a necessidade de estudos mais significativos a respeito dos possíveis efeitos relacionados ao amálgama dental. Informações mais conclusivas servirão como base para a elaboração de novas diretrizes e normas que auxiliem no controle da exposição ao mercúrio metálico.

⁴Informação obtida por comunicação eletrônica

2. Objetivo do estudo

Dentistas e assistentes estão possivelmente expostos a vapores de mercúrio metálico liberados durante o preparo, manuseio ou remoção do amálgama dental. Um estudo foi iniciado pela Fundação de Medicina Tropical do Tocantins, sob a coordenação da Professora Dra. Maria Aparecida Faustino Pires do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, para avaliar o risco ocupacional e ambiental da exposição ao mercúrio, ao qual estão expostos profissionais da equipe auxiliar de odontologia da rede pública de saúde da cidade de Araguaína (TO). Em colaboração com este estudo, o Laboratório de Análises Químicas e Ambientais do IPEN se responsabilizou pela realização das análises pertinentes. Para tanto, foi necessário definir uma metodologia analítica, cuja implantação no laboratório possibilitasse a quantificação de mercúrio em amostras de urina dos indivíduos expostos. Entretanto, antes de implantar qualquer metodologia analítica, o laboratório deve realizar a sua validação a fim de garantir a qualidade dos resultados. Neste contexto, este estudo representa uma etapa prévia às análises propriamente ditas e tem por objetivo *validar a metodologia analítica para a determinação de mercúrio total em amostras de urina*. Os parâmetros de desempenho do método serão testados através de ensaios práticos, nos quais materiais de referência certificados serão empregados a fim de estabelecer a rastreabilidade das medições. Por fim, a interpretação dos resultados obtidos permitirá avaliar se a metodologia atende adequadamente a todos os requisitos necessários para a sua aplicação.

3. Metodologia analítica

O desenvolvimento de técnicas analíticas para determinação quantitativa de mercúrio em uma grande variedade de matrizes foi estimulado pela necessidade de se estimar o impacto causado pelo mercúrio e seus compostos sobre o meio ambiente e os seres humanos. Além disso, a quantificação de mercúrio é indispensável para o monitoramento da poluição ambiental, diagnósticos clínicos e para uma variedade de processos industriais e laboratoriais.

Na maioria das vezes, o mercúrio está presente nas amostras em quantidades muito pequenas e, geralmente, associado a outros compostos. Isto exige da técnica selecionada uma alta sensibilidade e precisão. Durante os últimos anos, diversas técnicas foram desenvolvidas, contribuindo significativamente para a compreensão da química do mercúrio [48].

A seleção das técnicas analíticas é feita de acordo com a natureza da amostra (matriz) e, principalmente, com o teor de mercúrio que se pretende quantificar. As principais técnicas incluem a colorimetria, a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, a análise por ativação neutrônica e a cromatografia gasosa. A Tabela 3.1 apresenta um resumo das técnicas frequentemente empregadas para quantificar mercúrio e seus respectivos limites de detecção [80].

A técnica colorimétrica é empregada na determinação de mercúrio total. A amostra é submetida à digestão ácida e subsequente complexação com ditizona. A espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS¹), técnica muito utilizada para analisar mercúrio em água e urina, permite quantificar mercúrio inorgânico por redução com cloreto estânico (SnCl_2) e mercúrio total por redução com borohidreto de sódio (NaBH_4). A técnica de ativação neutrônica (NAA²) baseia-se na irradiação da amostra em reator de baixa potência e medição de raios gama para determinar mercúrio total. A cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD³) é uma técnica capaz de determinar todos os compostos de mercúrio [37].

A técnica selecionada para determinação de mercúrio total em amostras de urina foi a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). Esta técnica reúne uma série de características favoráveis à análise de mercúrio total em amostras de urina: simplicidade, limite de detecção adequado, rapidez e, no caso em questão, disponibilidade.

¹CV-AAS: Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry

²NAA: Neutron Activation Analysis

³GC-ECD: Gas Chromatography With Electron Capture Detection

3. Metodologia analítica

Tabela 3.1.: Técnicas analíticas para determinação de mercúrio

Método	Limite de Detecção
Método Colorimétrico	0,01-0,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$
Espectrometria de Absorção Atômica	
- Forno de grafite (GF AAS)	1 ng.g^{-1}
- Vapor frio (CV AAS)	0,01-1 ng.g^{-1}
- Injeção em Fluxo (FIMS) [101]	< 0,05 ng.L^{-1}
- Determinação Direta (DMA) [101]	0,005 ng
Espectrometria de Fluorescência Atômica	
- Vapor frio (CV AFS)	0,001-0,01 ng.g^{-1}
Análise por Ativação com Nêutrons	
- Instrumental (INAA)	1-10 ng.g^{-1}
- Radioquímica (RNAA)	0,01-1 ng.g^{-1}
Cromatografia Gasosa	
- Detector de Captura Eletrônica	0,01-0,05 ng.g^{-1}
- Detector de Emissão Atômica	0,05 ng.g^{-1}
- Espectrometria de Massa	0,1 ng.g^{-1}
- CV AAS / CV AFS	0,01-0,05 ng.g^{-1}
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
- Detector de Ultra-violeta	1 ng.mL^{-1}
- CV AAS	0,5 ng.mL^{-1}
- CV AFS	0,08 ng.mL^{-1}
- Eletroquímico	0,1-1 ng.mL^{-1}
Plasma Acoplado Indutivamente	
- Espectrometria de Massa (ICP MS)	0,01 ng.mL^{-1}
- Espectrometria de Emissão Atômica (ICP OES)	2 ng.mL^{-1}
Espectrometria Foto-Acústica	0,05 ng
Fluorescência de Raio X	5 ng.g^{-1} - 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$
Métodos Eletroquímicos	0,1-1 $\mu\text{g.g}^{-1}$
Analizador de Filme de Ouro	0,05 $\mu\text{g.g}^{-1}$

Fonte: adaptada de Azevedo [37]

3.1. A espectroscopia atômica

Existem três técnicas analíticas essenciais em espectrometria atômica: emissão atômica, absorção atômica e fluorescência atômica. Um átomo é basicamente constituído de um núcleo rodeado por elétrons. Cada elemento possui um número específico de elétrons associados em órbita ao núcleo. Estes elétrons ocupam posições ordenadas e previsíveis na órbita. A configuração orbital normal de um átomo é a configuração de menor energia, eletronicamente mais estável, de um átomo. Quando energia suficiente é aplicada, o átomo absorve esta energia e um elétron da camada externa é promovido a uma configuração menos estável ou “estado excitado”. Como este estado é instável, o átomo retorna imediatamente e espontaneamente ao seu estado fundamental. O elétron volta então ao estado inicial estável e há emissão de energia equivalente à quantidade de energia absorvida inicialmente no processo de excitação.

3. Metodologia analítica

O comprimento de onda da radiação emitida está diretamente relacionado com a transição eletrônica ocorrida. Como cada elemento tem uma estrutura eletrônica única, o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade única de cada elemento individualmente.

O processo de excitação e decaimento para o estado fundamental está presente em todos os três campos da espectroscopia atômica. A energia absorvida no processo de excitação e a energia emitida no processo de decaimento podem ser medidas e utilizadas para fins analíticos. Na *emissão atômica*, uma amostra é submetida a uma alta energia para produzir átomos no estado excitado, capazes de emitir luz. A fonte de energia pode ser um arco elétrico, uma chama ou um plasma. O espectro de emissão de um elemento exposto a estas fontes de energia consiste de um conjunto de comprimentos de onda de emissão chamado de linhas de emissão.

O espectro de emissão pode ser usado para identificar qualitativamente um determinado elemento. As técnicas de emissão também podem ser utilizadas para determinação quantitativa, medindo-se a intensidade da luz emitida no comprimento de onda do elemento. A intensidade de luz neste comprimento de onda será diretamente proporcional ao número de átomos do analito.

Se a luz, de comprimento de onda adequado, colidir com um átomo livre no estado fundamental, este átomo pode absorver a luz à medida que entra em um estado excitado. Este processo é chamado de *absorção atômica*. A capacidade de um átomo de absorver luz de comprimentos de onda muito específicos é utilizada na espectroscopia de absorção atômica [17].

Como se pode observar, existem diferenças básicas entre os processos de *emissão* e *absorção atômica*. Na *emissão atômica*, uma chama é empregada para converter o aerossol de amostra em vapor atômico e excitar, termicamente, estes átomos, levando-os do "estado fundamental" ao "estado excitado". Ao retornar para o "estado fundamental", estes átomos emitem luz de comprimento de onda específico que será detectada pelo instrumento. A intensidade da luz emitida está relacionada com a concentração do elemento de interesse na amostra.

Já na *absorção atômica*, a única função da chama é converter o aerossol da amostra em vapor atômico. Os átomos no "estado fundamental" podem então absorver a luz proveniente de uma fonte primária. A fonte emite luz em um espectro específico do elemento da qual é feita. A quantidade de radiação absorvida está relacionada com a concentração do elemento de interesse.

Um terceiro campo da espectroscopia atômica é a *fluorescência atômica*. Esta técnica incorpora aspectos de ambas, absorção atômica e emissão atômica. Assim como na absorção atômica, átomos no estado fundamental são criados em uma chama e excitados focando-se um feixe de luz no vapor atômico. Ao invés de considerar a quantidade de luz absorvida no processo, mede-se a emissão resultante do decaimento dos átomos excitados pela fonte de luz. A intensidade desta "fluorescência" aumenta com o aumento da concentração de átomos, fornecendo a base para a determinação quantitativa. A diferença técnica entre a fluorescência e a emissão atômica está no posicionamento da lâmpada, montada em ângulo em relação ao restante do sistema óptico, de forma que o detector de luz enxergue apenas a fluorescência na chama e não a luz da lâmpada propriamente dita. [17]

3.2. Processo de absorção atômica

A medida de interesse em absorção atômica é a quantidade de luz no comprimento de onda ressonante absorvida conforme a luz atravessa uma nuvem de átomos. À medida que o número de átomos aumenta no caminho óptico, a quantidade de luz absorvida aumenta de maneira previsível. É possível determinar a quantidade de analito presente, medindo-se a quantidade de luz absorvida. A utilização de fontes de luz especiais e a seleção cuidadosa do comprimento de onda permitem uma determinação quantitativa específica de elementos na presença de outros.

A nuvem atômica é produzida quando energia térmica suficiente é fornecida, promovendo a dissociação dos componentes da amostra em seus átomos livres. Para isso, pode-se aspirar a solução da amostra para uma chama que esteja alinhada ao feixe de luz. Sob as condições de chama apropriadas, a maior parte dos átomos permanece no estado fundamental. Estes átomos são capazes de absorver luz no comprimento de luz específico. A facilidade e rapidez com a qual determinações precisas e exatas podem ser realizadas com esta técnica fez que com que a absorção atômica se tornasse um dos métodos mais populares para a determinação de metais.

O processo de absorção atômica pode ser descrito da seguinte maneira: um feixe de luz de comprimento de onda ressonante de intensidade inicial, I_0 , é focado no compartimento da chama contendo átomos no estado fundamental. A intensidade inicial de luz é decrescida de uma quantidade determinada pela concentração de átomos na chama. A luz é então direcionada para o detector onde a intensidade reduzida, I , é medida. A quantidade de luz absorvida é determinada comparando-se I a I_0 .

Vários termos são usados para definir a quantidade da absorção de luz neste processo. A transmitância é definida como a razão entre a intensidade final e a intensidade inicial.

$$T = I/I_0 \quad (3.1)$$

A transmitância indica a fração da luz inicial que passa através da chama que chega ao detector. A porcentagem de transmissão é expressa conforme a Equação 3.2 a seguir:

$$\%T = 100.T \quad (3.2)$$

Os valores de T podem variar de 0 a 1. A transmitância não estabelece uma relação linear com a concentração, mas sim uma relação exponencial inversa, isto é:

$$T = 10^{-kc} \quad (3.3)$$

onde "k" é uma constante de proporcionalidade e "c" é a concentração.

3. Metodologia analítica

A porcentagem de absorção é o complemento da porcentagem de transmissão, definindo a porcentagem da intensidade de luz inicial absorvida pela chama.

$$\%A = 100 - \%T \quad (3.4)$$

A absorbância (A) está associada à capacidade que uma determinada substância tem de absorver luz em um comprimento de onda específico. Matematicamente, é expressa como o logaritmo do inverso da transmitância:

$$A = \log(1/T) \quad (3.5)$$

ou

$$A = \log(I/I_0) \quad (3.6)$$

Substituindo-se a Equação 3.3 na Equação 3.5, temos:

$$A = kc \quad (3.7)$$

A absorbância é, portanto, um termo mais conveniente para caracterizar a absorção de luz em espectrofotometria de absorção, pois esta quantidade obedece uma relação linear com a concentração, como mostra a Equação 3.7. A Lei de Beer define esta relação. Sendo $k = ab$:

$$A = abc \quad (3.8)$$

onde “A” é absorbância; “a” é o coeficiente de absorção; “b” é o comprimento do caminho óptico; e “c” é a concentração da espécie absorvedora.

A Equação 3.8 mostra que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvedora para um determinado conjunto de condições instrumentais. Esta relação pode ser explorada para a construção da curva analítica (Figura 3.1).

Na região em que a Lei de Beer é observada, o comportamento da curva analítica é linear. À medida que a concentração e a absorbância aumentam, a *auto-absorção* pode causar um desvio da linearidade. A *auto-absorção* é um fenômeno no qual a radiação emitida por átomos excitados pode ser absorvida por átomos da mesma espécie no estado fundamental no interior da lâmpada. Neste caso, a intensidade da radiação que alcança a amostra é menor e, portanto, a intensidade de luz absorvida (absorbância) também será menor.

A curva analítica pode ser obtida a partir da leitura da absorbância de n soluções-padrão, cada qual com uma concentração conhecida do analito de interesse. Os valores de absorbância obtidos servem como referência para determinação da concentração do analito presente nas amostras a serem analisadas [17].

3. Metodologia analítica

Portanto, esta relação entre x e y, estabelecida pela curva analítica e representada por uma reta (Equação 5.3), é aplicada para quantificar o analito de interesse em soluções nas quais a sua concentração seja desconhecida.

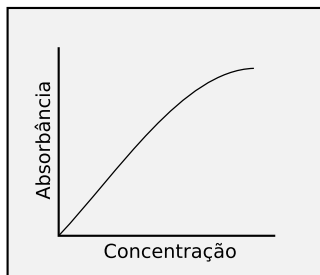


Figura 3.1.: Representação da Curva Analítica de acordo com a Lei de Lambert-Beer.

3.3. Instrumentação – componentes básicos

Um espectrômetro de absorção atômica é composto por três áreas funcionais básicas:

- (1) uma fonte de luz;
- (2) uma célula ou compartimento da amostra;
- (3) um sistema de medição.

O compartimento da amostra para um espectrômetro de absorção atômica com chama (F-AAS) ou com forno de grafite (GF-AAS) é também chamado de atomizador.

O diagrama de blocos a seguir ilustra os principais componentes das três áreas funcionais de um espectrômetro de absorção atômica.

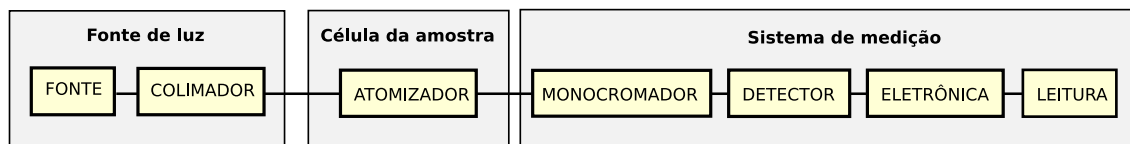


Figura 3.2.: Espectrômetro de absorção atômica básico

Um átomo absorve luz de comprimentos de onda distintos. É necessário, portanto, uma fonte que emita radiação de comprimento de onda específico e átomos no estado fundamental para que o processo de absorção ocorra.

As duas fontes mais comuns empregadas no processo de absorção atômica são a lâmpada de cátodo oco ou HCL (*Hollow Cathode Lamp*) e a lâmpada de descarga sem eletrodo ou EDL (*Electrodeless Discharge Lamp*). Lâmpadas específicas são selecionadas de acordo com o elemento a ser determinado.

3. Metodologia analítica

A lâmpada de catodo oco é a fonte de luz mais empregada. Estas lâmpadas são projetadas para emitir o espectro atômico de um elemento em particular. O catodo da lâmpada é um cilindro feito com o metal do qual se deseja produzir o espectro. O anodo e o catodo encontram-se lacrados em um cilindro de vidro preenchido com neônio ou argônio a baixa pressão. Quando um potencial elétrico é aplicado entre o anodo e o catodo, uma parte dos átomos do gás de preenchimento é ionizada. Os íons deste gás, carregados positivamente, são acelerados através do campo elétrico até colidirem com o catodo negativamente carregado e expulsarem átomos individuais do metal em um processo chamado ejeção catódica (*sputtering*). Os átomos ejetados do metal são excitados a um estado de emissão através da transferência de energia cinética por impacto com os íons do gás de preenchimento. Por fim, a radiação de comprimento de onda característico do metal ejetado é emitida.

As lâmpadas de catodo oco têm um tempo de vida finito. A causa principal para o colapso da lâmpada é a adsorção de átomos do gás de preenchimento nas superfícies internas da lâmpada. À medida que o gás de preenchimento diminui, a eficiência da ejeção e excitação dos átomos ejetados do metal também diminui, reduzindo a intensidade da emissão da lâmpada. Além disso, há desgaste do catodo.

Para a maioria dos elementos, a lâmpada de catodo oco é uma fonte absolutamente satisfatória para absorção atômica. No entanto, a qualidade da análise, em alguns casos, é prejudicada devido a limitações da lâmpada de catodo oco. A lâmpada de catodo oco não é adequada para analisar elementos muito voláteis, como, por exemplo, o mercúrio, devido ao rápido desgaste do catodo e à redução da intensidade da emissão da lâmpada com o tempo.

As lâmpadas de descarga sem eletrodo são tipicamente muito mais intensas e, em alguns casos, mais sensíveis do que as lâmpadas de catodo oco. Estas lâmpadas oferecem uma melhor precisão, implicando em limites de detecção mais baixos. Além disso, o tempo de vida útil de uma EDL tipicamente é muito maior que o de uma HCL. Uma pequena quantidade de metal ou sal do elemento para o qual será empregada a fonte está contida dentro de um bulbo de quartzo. Um gerador de radiofrequência ou gerador RF envolve este bulbo e um campo RF é gerado quando energia é aplicada a este dispositivo. Os átomos do interior do bulbo são vaporizados e excitados, emitindo seu espectro característico. As lâmpadas de descarga sem eletrodo estão disponíveis para uma variedade de elementos, incluindo antimônio (Sb), arsênio (As), bismuto (Bi), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), selênio (Se), estanho (Sn) e zinco (Zn).

O fotômetro é a porção do sistema óptico do espectrômetro de absorção atômica que conduz a luz da fonte ao monocromador. Três tipos de fotômetro são tipicamente empregados em instrumentos de absorção atômica:

- (1) feixe simples (*single-beam*);
- (2) feixe duplo (*double-beam*); e
- (3) feixe simples compensado (*compensated single-beam*) ou pseudo feixe duplo (*pseudo double-beam*).

3. Metodologia analítica

O fotômetro de feixe simples é assim chamado porque todas as medições são baseadas na variação da intensidade de um único feixe de luz em um único caminho óptico. O fotômetro de feixe duplo emprega um sistema óptico adicional para dividir o feixe de luz proveniente da lâmpada em dois feixes: o “feixe da amostra” (direcionado através do compartimento da amostra) e um “feixe de referência” (contornando o compartimento da amostra). O feixe de referência serve como um monitor da intensidade da lâmpada, compensando as oscilações de intensidade da lâmpada que afetam de maneira similar ambos os feixes. A absorbância é determinada pela razão entre as leituras do feixe da amostra e do feixe de referência. O fotômetro de feixe simples compensado é um sistema alternativo que combina as qualidades dos sistemas de feixe simples e duplo. Emprega dois espelhos mecanicamente ajustáveis para alternativamente direcionar a luz emitida pela fonte ora para o caminho da amostra, ora para o caminho de referência.

A radiação da fonte deve ser modulada, isto é, ativada e desativada rapidamente, para possibilitar uma maneira de selecionar seletivamente a luz emitida da lâmpada e ignorar a emissão proveniente do compartimento da amostra. Esta modulação pode ser feita através da rotação de um dispositivo chamado *chopper* ou obturador eletromecânico localizado entre a fonte e o compartimento da amostra, ou pulsando-se a energia para a fonte.

O compartimento da amostra também requer considerações especiais. Um vapor atômico deve ser gerado no caminho óptico. Geralmente, isto acontece introduzindo-se a amostra em uma chama (F-AAS) ou forno eletricamente aquecido (GF-AAS) alinhado no caminho óptico do espectrofotômetro. Neste caso, o compartimento da amostra é chamado de atomizador.

A análise de mercúrio é um caso particular em que o compartimento da amostra não funciona como um atomizador. O mercúrio é previamente reduzido a mercúrio elementar (Hg^0) e o vapor monoatômico é então conduzido ao compartimento da amostra, que, neste caso, funciona unicamente como uma célula de absorção.

O monocromador é usado para dispersar os diversos comprimentos de onda da luz proveniente da fonte, enquanto a fenda de saída isola uma linha de interesse em particular. A seleção de uma fonte de luz específica somada à escolha de um comprimento de onda em particular faz com seja possível a determinação de um elemento de interesse na presença de outros.

O comprimento de luz isolado pelo monocromador é direcionado para o detector, o “olho” do instrumento. Normalmente, o detector é um tubo fotomultiplicador que produz corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da luz. A corrente elétrica é então amplificada e processada pelos instrumentos eletrônicos para produzir um sinal que é uma medida da luz atenuada no compartimento da amostra. O sinal pode ser posteriormente processado para produzir uma leitura diretamente em unidades de concentração [17].

3.4. A técnica de geração de vapor frio

Para que ocorra a absorção atômica, a técnica analítica deve ser capaz de produzir átomos do elemento de interesse no estado fundamental e transferí-los à célula de absorção, posicionada no caminho óptico do espectrômetro. A espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS) é uma técnica específica para determinação de mercúrio.

O mercúrio pode ser facilmente reduzido de seus compostos ao estado elementar (Hg^0) e apresenta uma pressão de vapor de 0,0016 mbar à 20°C , que corresponde a uma concentração de aproximadamente $14\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ de Hg^0 na fase de vapor. Estas características possibilitam a determinação de mercúrio diretamente por espectrometria de absorção atômica, dispensando o atomizador.

A primeira etapa da determinação é a redução do mercúrio a mercúrio elementar. Os átomos de mercúrio são então transferidos para a fase de vapor e transportados à célula de absorção. Este procedimento é denominado de técnica de geração de vapor frio [132].

A espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio é adequada para determinação de quantidades muito pequenas de mercúrio (da ordem de partes por bilhão) devido, principalmente, à sua seletividade e sensibilidade. Em geral, a determinação de mercúrio por CV-AAS envolve quatro etapas fundamentais: coleta da amostra, pré-tratamento, digestão e quantificação. Os procedimentos de descontaminação e a calibração do instrumento representam dois aspectos críticos da análise de mercúrio [48].

Um aspecto problemático da análise de mercúrio é resultado da sua afinidade com grupos orgânicos. O mercúrio presente na maioria das amostras encontra-se firmemente unido à matéria orgânica. Em vista disto, é necessário realizar a digestão ou a mineralização da amostra prévia à determinação propriamente dita. Ou seja, o mercúrio deve ser liberado de seus compostos.

A digestão da amostra pode envolver oxidação por via úmida sob aquecimento ou aquecimento a altas temperaturas. O aquecimento a altas temperaturas pode levar a perdas significativas por volatilização enquanto que uma oxidação muito branda pode resultar na destruição parcial da matéria orgânica. Normalmente, a digestão é realizada com partes iguais de ácido nítrico e ácido sulfúrico e a amostra é aquecida a temperaturas de, no máximo, $90\text{-}100^\circ\text{C}$ em sistemas fechados ou semi-fechados.

O procedimento de digestão das amostras de urina deve garantir uma eficiente decomposição da matéria orgânica, de maneira a permitir a subsequente determinação de mercúrio total por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS). Tahán [118] descreve a mineralização de amostras de urina por decomposição ácida usando aquecimento por convecção e irradiação de microondas. Comparativamente, a digestão que envolve aquecimento por convecção requer um tempo considerável (cerca de 12h, incluindo dois intervalos de resfriamento de 4h), enquanto a digestão por irradiação de microondas é muito mais rápida (cerca de 70s).

3. Metodologia analítica

O procedimento de digestão adotado (Lopez-Colon [75]) envolve digestão ácida com ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) e aquecimento das amostras de urina em estufa à 60°C durante uma noite (*overnight*). Após a digestão, permanganato de potássio (KMnO_4) é adicionado em excesso para garantir que todos os íons de mercúrio em solução estejam sob sua forma mais oxidada (Hg^{2+}) para subsequente redução a mercúrio elementar (Hg^0) com borohidreto de sódio (NaBH_4) ou cloreto estanoso (SnCl_2) no compartimento de reação. Antes, porém, o excesso de permanganato de potássio é reduzido com hidroxilamina clorídrica ⁴ ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$) e uma solução diluente ácida (HNO_3 e H_2SO_4) é adicionada para se obter um volume final de 10mL ($V_f=10\text{mL}$).

A redução com borohidreto de sódio (NaBH_4) impede a distinção das formas de mercúrio presentes na amostra, pois reduz todo o mercúrio presente na amostra (sob a forma de Hg^{2+}) a mercúrio elementar (Hg^0) e, assim, permite dosar apenas o mercúrio total [114,122]. Esta técnica é bastante empregada para o controle rotineiro de pessoas expostas ao mercúrio e o pré-tratamento da amostra é relativamente simples.

O gás de arraste (argônio, Ar) transporta o vapor de mercúrio elementar à célula de absorção, posicionada no caminho óptico do espectrômetro de absorção atômica. O Hg^0 absorve radiação de comprimento de onda de 253,7nm emitida por uma lâmpada EDL de mercúrio. A intensidade da luz transmitida através da célula é detectada por um fototubo sensor de raios ultravioleta (detector UV), dosando a quantidade de mercúrio presente na amostra [37].

O procedimento de mineralização de amostras de urina por decomposição ácida usando aquecimento por convecção de Tahán [118] também foi testado. Neste procedimento, são adicionados a um frasco de politetrafluoretileno (PTFE, Teflon): 1mL de urina, 1mL de água deionizada e 1mL de ácido nítrico (HNO_3). O frasco é então aquecido por convecção à 130°C por 2h. Após resfriamento à temperatura ambiente, 1mL de ácido perclórico (HClO_4) é adicionado e a solução é novamente aquecida à 130°C durante 2h. A solução é diluída a um volume final de 10mL ($V_f=10\text{mL}$) com água deionizada. No entanto, o Laboratório de Análises Químicas e Ambientais não conseguiu reproduzir as mesmas condições (mesma aparelhagem, mesmo material) descritas no procedimento de Tahán. Esta foi, provavelmente, a causa da baixa recuperação obtida para o analito.

Dadas as condições laboratoriais específicas e os recursos disponíveis, o procedimento de Lopez-Colon [75] mostrou-se mais adequado. Sua aplicação é simples e relativamente barata e sua execução envolve o uso de instrumentos e aparelhos facilmente encontrados em um laboratório analítico.

⁴A hidroxilamina clorídrica não reduz os íons Hg^{2+} em solução, reduz somente o permanganato de potássio em excesso.

4. Materiais e métodos

Na literatura, é possível encontrar várias metodologias destinadas à determinação de mercúrio total em urina [50,75,88,118]. A seleção da metodologia analítica deve levar em consideração a infra-estrutura do laboratório analítico, os aparelhos e instrumentos à disposição do analista, os recursos disponíveis e a adequabilidade do procedimento e da técnica analítica ao propósito em questão.

A metodologia adotada para determinação de mercúrio em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio foi descrito por Lopez-Colon e Lozano [75] e adaptado às dependências do Laboratório de Análises Químicas e Ambientais (LAQA) do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN (ver Seção 4.3.2). Esta metodologia foi selecionada por atender todos os requisitos citados acima e mostrou-se bastante satisfatória.

4.1. Reagentes e materiais

4.1.1. Reagentes

Os reagentes empregados na realização dos ensaios foram:

- Triton® X-100 ($C_{33}H_{60}O_{10,5}$) p.a. MERCK;
- Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) CAAL Reagentes Analíticos;
- Ácido nítrico 65% (HNO_3) p.a. MERCK;
- Ácido sulfúrico 95-97% (H_2SO_4) p.a. MERCK;
- Permanganato de potássio ($KMnO_4$) p.a. MERCK;
- Borohidreto de sódio ($NaBH_4$) p.a. MERCK;
- Ácido clorídrico 37% (HCl) p.a. MERCK;
- Hidroxilamina clorídrica ($NH_2OH.HCl$) p.a. NUCLEAR;
- Hidróxido de sódio ($NaOH$) p.a. MERCK;
- Padrão MERCK - Mercúrio em HNO_3 5% ($1000mg.L^{-1}$);
- Água ultrapura destilada $18,3M\Omega.cm^{-1}$.

4. Materiais e métodos

4.1.2. Soluções

As soluções utilizadas na determinação de Hg total em amostras de urina foram: Triton® X-100 0,2% (v/v); HNO₃ 50% (v/v); K₂Cr₂O₇ 0,5% (m/v); KMnO₄ 5% (m/v); NaBH₄ 0,2% e NaOH 0,05% (m/v); HCl 3% (v/v); NH₂OH.HCl 10% (m/v); HNO₃ 10% e H₂SO₄ 20% (v/v); e solução estoque Hg 500µL (v/v).

4.1.3. Materiais

Utensílios e equipamentos comumente disponíveis em um laboratório analítico foram empregados para realização da parte experimental do trabalho. É importante verificar a viabilidade da execução de um determinado procedimento analítico nas dependências do laboratório onde será implantado antes de adotá-lo.

Os materiais utilizados para a realização dos ensaios foram:

- Espectrômetro de absorção atômica PerkinElmer AAnalyst 800;
- Sistema PerkinElmer de injeção em fluxo FIAS 400;
- Tubos de polipropileno (PP) de 15mL (120 x 17mm) da Sarstedt (No/REF 62.554.001 LOT 7042401);
- Micropipeta automática Wheaton Socorex Calibra® 822 10-100µL (Wheaton No.: 851164);
- Micropipeta automática Wheaton Socorex Calibra® 822 100-1000µL (Wheaton No.: 851168);
- Macropipeta automática Socorex Calibra® CS1 1-10mL (Wheaton No.: 851345);
- Balança analítica Gehaka - BG 400;
- Béqueres de 50, 100 e 250mL;
- Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000mL;
- Estufa Ética - Equipamentos Científicos S.A.;
- Equipamento de purificação de água por osmose reversa ELIX 3, Millipore;
- Purificador de água EASYpure RF da BARNSTEAD;
- Liofilizador Terroni® LS 3000.

A lavagem do material de laboratório é feita inicialmente com detergente e água deionizada. O material fica então submerso por 24h em uma solução de HNO₃ 5%. Este procedimento é adequado para garantir uma limpeza efetiva dos materiais utilizados para determinar elementos ao nível de traços [104].

4.2. Indicador Biológico de Exposição: Urina

A urina é considerada o melhor indicador biológico de exposição (IBE) ou biomarcador da carga corporal de mercúrio para exposição a longo prazo a mercúrio elementar e inorgânico. O sangue é útil principalmente em casos de exposição a altas doses em um curto período de tempo, mas não é um indicador muito confiável da carga corporal total em exposições de longo prazo. Muitos métodos analíticos não são capazes de diferenciar entre mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. A concentração total de mercúrio na urina ou no sangue reflete a carga corporal total de mercúrio. As formas inorgânicas de mercúrio não são excretadas em quantidades significativas no cabelo, fazendo deste um indicador inadequado de exposição ao mercúrio inorgânico.

O tempo de meia-vida do mercúrio no sangue é de 3 dias, confirmando a importância da coleta de amostras de sangue tão logo ocorra a exposição. Os níveis de mercúrio no sangue são mais acentuados durante e logo após exposições de curto prazo. No caso de exposições a níveis baixos e a longo prazo, a urina é o melhor indicador de carga corporal. A determinação de mercúrio em urina é confiável e simples, permitindo identificar rapidamente os indivíduos com níveis de mercúrio elevados [89].

A urina é portanto o IBE mais adequado para mercúrio inorgânico, já que o mercúrio orgânico representa apenas uma pequena fração do mercúrio urinário. Os níveis urinários de mercúrio inorgânico apresentam uma melhor relação com a exposição se comparados com os níveis sanguíneos de mercúrio inorgânico após exposição ocupacional a baixos níveis de vapor de mercúrio elementar [138].

A concentração de mercúrio na urina pode variar durante o dia [111]. Uma forma de contornar este problema é realizar a coleta de todas as amostras em um período específico do dia. Normalmente, a primeira urina do dia é coletada pois está mais concentrada. Desta forma, também é possível evitar as variações próprias do ciclo circadiano [75].

A ICOH (*International Commission on Occupational Health*) e a Comissão sobre Toxicologia da IUPAC estimaram que um valor médio de $2\mu\text{g/L}$ corresponde à concentração de fundo (*background concentration*) de mercúrio no sangue de pessoas que não ingerem peixe [97]. Este valor representa o nível médio de mercúrio no sangue da população em geral e não está associado a um tipo de exposição em particular. No entanto, as diferenças intra e inter-indivíduos para este biomarcador são substanciais, possivelmente por causa de restaurações dentais de amálgama ou ingestão de peixe contaminado [64,127].

Vários estudos mostram que existe uma correlação entre o mercúrio presente no ar e aquele encontrado no sangue e na urina. Para uma exposição ocupacional contínua de 8h/dia, foi estimado que uma concentração de mercúrio de 1mg.m^{-3} no ar leva a uma concentração média de mercúrio na urina de $1,4\text{mg.L}^{-1}$ ($0,7 - 2,3\text{mg.L}^{-1}$) e a uma concentração média de mercúrio no sangue de $0,48\text{mg.L}^{-1}$ ($0,17 - 0,81\text{mg.L}^{-1}$) [33].

A concentração de mercúrio na urina é um indicativo da exposição às formas elementar e inorgânica deste elemento. Normalmente, os valores de concentração esperados para uma população assintomática são inferiores a $10\mu\text{g.L}^{-1}$ [4,5].

4.2.1. **Coleta, armazenamento e transporte de urina**

A coleta, o armazenamento e o transporte de urina constituem etapas fundamentais para garantir a qualidade dos resultados. Durante estas etapas, podem ocorrer perdas, contaminações e, até mesmo, a decomposição das amostras. As principais fontes de contaminação são:

- material de coleta;
- reagentes adicionados para estabilizar ou conservar a amostra;
- higiene do paciente ou técnico responsável pela coleta; e
- ambiente de coleta.

O transporte e armazenamento inadequados podem causar perdas ou mudanças na composição da amostra. Quanto mais baixa a concentração do analito a ser determinado, mais críticas serão estas etapas.

Os frascos para a coleta de urina devem ser devidamente esterilizados e fornecidos pelo laboratório. Existem no mercado alguns kits apropriados para análises toxicológicas de urina. Os frascos contendo urina devem ser adequadamente rotulados, selados e acondicionados em caixas térmicas com gelo sob temperaturas de, no máximo, 4°C [118].

Durante o armazenamento das amostras, além dos problemas de contaminação dos frascos e perdas por adsorção, a precipitação é o processo que mais freqüentemente altera a composição da urina.

A urina é usada para estimar a exposição de populações ou grupos ao vapor mercúrio (Hg^0). Como a excreção urinária de mercúrio varia significativamente ao longo do dia, é recomendável que a coleta seja realizada no mesmo horário, tanto para os indivíduos ocupacionalmente expostos quanto para os indivíduos não expostos (grupo controle). Normalmente, coleta-se a primeira urina da manhã. Um volume de 50mL de urina deve ser coletado em um frasco de polipropileno de boca larga, previamente descontaminado. Não há necessidade de adição de conservante. Os frascos, devidamente selados e identificados, devem ser armazenados à uma temperatura de 20°C negativos e podem ser assim estocados por algumas semanas. As amostras devem ser mantidas congeladas durante o transporte. Os frascos de polipropileno não quebram durante o transporte e o congelamento das amostras [104].

Antes de iniciar a análise, as amostras devem ser descongeladas à temperatura ambiente. Algumas amostras podem apresentar sedimentação ao serem descongeladas. Neste caso, é necessário homogeneizá-las sob forte agitação.

4. Materiais e métodos

Caso não seja possível congelar as amostras, deve-se adicionar persulfato de potássio $K_2S_2O_8$ (0,1g para 100mL de urina) e armazená-las a 4°C. Sob tais condições, as amostras podem ser estocadas por 8 dias [83]. O congelamento, entretanto, é preferível, pois a adição de conservante pode levar à contaminação da amostra. Amostras mantidas em frascos de polipropileno a 4°C, sem conservantes, devem ser analisadas dentro de 3 dias [104].

Entretanto, quando a distância entre o local da coleta e o local de análise é considerável, o transporte das amostras nas condições especificadas pode ser economicamente desvantajoso. As amostras de urina, coletadas pela Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (FMT), foram enviadas para o laboratório de análises do Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN em São Paulo para serem analisadas quanto ao teor de mercúrio total. Para assegurar a integridade das amostras e facilitar o transporte, sugere-se a liofilização das amostras de urina.

4.2.1.1. Liofilização das amostras de urina

A liofilização (*freeze drying*) é um processo de desidratação a frio muito empregado para preservar substâncias perecíveis como certos tipos de alimentos, produtos farmacêuticos e materiais biológicos. Neste processo, a água é retirada por sublimação, sem que a mesma passe pelo estado líquido.

A amostra é congelada e o aumento gradativo da temperatura sob vácuo permite que a água congelada passe diretamente da fase sólida à fase gasosa, sem alterar a composição da amostra. No final do processo, a quantidade de água na amostra foi extremamente reduzida, inibindo a ação de microorganismos e enzimas responsáveis pela degradação da amostra.

Este processo é muito mais benéfico para a amostra do que os demais métodos de desidratação, que geralmente envolvem temperaturas mais altas, reduzindo significativamente a decomposição térmica, a perda de voláteis, a desnaturação de proteínas e as alterações na estrutura da amostra. Além disso, selando-se devidamente o frasco que contém a amostra liofilizada, impede-se a reabsorção de água pela amostra, que pode então ser armazenada à temperatura ambiente por muitos anos sem sofrer degradação, prolongando sua vida útil. Não há, portanto, a necessidade de refrigeração da amostra, o que favorece o seu transporte para diferentes lugares.

A reidratação ou reconstituição das amostras liofilizadas, inicialmente no estado líquido, é simples e instantânea. A água preenche os poros deixados pelos cristais de gelo que sublimaram durante a liofilização.

As amostras de urina foram submetidas à liofilização no laboratório da FMT (TO) e posteriormente enviadas para o laboratório de análises do IPEN em São Paulo. Este procedimento é justificado devido à dificuldade de conservação da urina enquanto amostra *in natura*, em vista do percurso considerável a ser percorrido entre o local de coleta e o local de análise. Geralmente, quando o tempo entre a coleta e análise é curto (de algumas horas a 2 ou 3 dias), não há necessidade de liofilizar as amostras. Pode-se, simplesmente, armazená-las sob refrigeração.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica da PerkinElmer® modelo AAnalyst 800, equipado com um sistema de injeção em fluxo PerkinElmer® FIAS 400 com gerador de vapor frio, foi utilizado para a determinação de mercúrio em amostras de urina.



Figura 4.1.: Representação fotográfica do espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 800 e sistema FIAS 400 da PerkinElmer®

4.3.2. Procedimento analítico

O procedimento analítico adotado [75] pode ser dividido em quatro etapas fundamentais: (1) digestão da amostra de urina, (2) oxidação com permanganato de potássio (KMnO_4), (3) redução com borohidreto de sódio (NaBH_4) e (4) quantificação do Hg^0 . A execução cuidadosa de cada uma destas etapas determina a qualidade dos resultados obtidos no processo como um todo. As etapas descritas nas seções a seguir foram executadas nas dependências do laboratório analítico no Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN.

4.3.2.1. Digestão da amostra de urina

A um tubo de polipropileno com capacidade para 15mL foram adicionados:

- ◇ 1mL de urina;
- ◇ 0,5mL de solução Triton® X-100 0,2%;
- ◇ 0,1mL de solução estabilizadora $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5% em HNO_3 50%;
- ◇ 1mL de HNO_3 concentrado; e
- ◇ 2mL de H_2SO_4 concentrado.

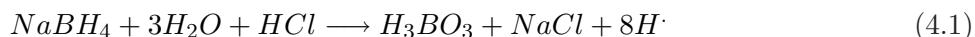
A mistura é então aquecida à temperatura constante de 60°C em estufa *overnight* para digestão da amostra.

4.3.2.2. Oxidação com KMnO_4

Após a digestão, a solução deve ser retirada da estufa e deixada à temperatura ambiente para esfriar e, em seguida, KMnO_4 deve ser adicionado em quantidade suficiente para que a solução adquira uma cor púrpura, indicando o excesso do oxidante em solução. Se a solução permanecer imutável por cerca de 15 minutos, significa que o KMnO_4 está em excesso, o que garantirá a completa oxidação dos íons de mercúrio em solução a $\text{Hg}(\text{II})$. Caso a solução volte a ser incolor, significa que o KMnO_4 foi totalmente consumido e, portanto, a quantidade adicionada foi insuficiente para oxidar todas as espécies em solução. Deve-se então adicionar mais KMnO_4 até que o evento não mais se repita e a cor púrpura persista por mais de 15 minutos. Quando esta situação é alcançada, a solução deve permanecer em repouso por 1 hora. Em seguida, adicionam-se $15\mu\text{L}$ de hidroxilamina clorídrica ($\text{NH}_2\cdot\text{OH}\cdot\text{HCl}$) para reduzir o excesso de permanganato em solução. A solução readquire seu aspecto inicial (incolor). Por fim, a solução é diluída a um volume final de 10mL com solução diluente [HNO_3 10% (*v/v*) e H_2SO_4 20% (*v/v*) em H_2O].

4.3.2.3. Redução com NaBH_4

A solução contendo íons Hg^{2+} é introduzida por injeção em fluxo e direcionada ao compartimento de reação, onde será reduzida a Hg^0 . O sistema de geração de vapor frio consiste de uma solução redutora de borohidreto de sódio em meio básico (NaBH_4 0,2% (*m/v*) em NaOH 0,05% (*m/v*)) e uma solução carregadora (*carrier*) de ácido clorídrico (HCl 3% (*v/v*)). A reação entre o NaBH_4 e o HCl gera os seguintes produtos:



A espécie H^\cdot gerada reduz os íons Hg^{2+} na solução da amostra e o vapor de Hg^0 é então conduzido para o compartimento da amostra, posicionado no caminho óptico do espectrômetro, por um gás de arraste (argônio, Ar) e quantificado.

4.3.2.4. Quantificação do Hg^0

A concentração de Hg^0 nas amostras é obtida a partir da interpolação dos valores de absorbância em uma curva analítica previamente construída com soluções padrão de mercúrio, como mencionado na Seção 3.2.

Os padrões empregados na construção da curva analítica foram preparados a partir de uma *solução padrão estoque de Hg* de $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que, por sua vez, foi obtida a partir de uma solução padrão da MERCK de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estes padrões, adicionados a uma amostra de *urina controle*¹, foram então submetidos a todo o procedimento analítico ao qual também são submetidas as amostras.

¹ *Urina controle*: urina que não contém o analito.

4.3.3. Procedimento de liofilização

A liofilização das amostras de urina foi realizada nas dependências do laboratório da Fundação de Medicina Tropical de Tocantins. As amostras liofilizadas foram enviadas para São Paulo e analisadas no Laboratório de Análises Químicas e Ambientais (LAQA/CQMA) do IPEN.

O procedimento de liofilização envolve 3 etapas fundamentais: (1) homogeneização, (2) congelamento e (3) liofilização. Na primeira etapa, a amostra de urina coletada (primeira urina da manhã) é homogeneizada em uma câmara de fluxo laminar e uma alíquota específica é transferida para um frasco estéril com tampa, previamente descontaminado. Em seguida, a amostra é acondicionada em um freezer à uma temperatura de -20°C . A amostra congelada é então submetida à liofilização. A liofilização acontece quando o frasco contendo a amostra congelada é colocado (sem a tampa) sobre uma bandeja dentro do liofilizador. O compartimento de amostra do liofilizador é lacrado com graxa de silicone e vácuo é aplicado de modo que a amostra sofra desidratação. Um volume de amostra de 10mL requer uma permanência de 48h no aparelho à uma temperatura de -47°C . O resultado é a urina sólida, em pó. Finalmente, o frasco é retirado do liofilizador e vedado com fita adesiva ou de teflon de maneira que não tenha contato com a umidade do ar, garantindo, assim, a integridade da amostra. O aparelho utilizado é da marca Terroni, modelo LS 3000, conforme a figura a seguir.



Figura 4.2.: Liofilizador Terroni LS 3000

As amostras liofilizadas de urina podem então ser enviadas a longas distâncias, sem a necessidade de acondicionamento a baixas temperaturas. Além disso, elimina-se o risco de vazamento e contaminação cruzada. As amostras de urina em pó são então retomadas ao volume inicial através da adição de volume adequado de água. A agitação intermitente, isto é, aguardando-se alguns minutos entre uma agitação e outra, assegura uma reconstituição eficiente da amostra, obtendo-se uma solução homogênea.

4.3.3.1. Biossegurança na análise de urina liofilizada

A *biossegurança* é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados [119].

Neste contexto, a análise de amostras biológicas requer uma atenção especial. A urina humana é basicamente composta de água (cerca de 96%), uréia e ácido úrico.

As amostras de urina coletadas para análise podem estar infectadas por algum agente patogênico, representando, assim, um risco à saúde do analista. O uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) apropriados (avental, luvas, máscara e óculos de proteção) e a manipulação das amostras dentro de uma capela com exaustão constante são medidas essenciais para a prevenção da contaminação direta e indireta do analista e dos indivíduos que trabalham no laboratório. Além disso, é importante que todo o material de uso comum seja adequadamente desinfetado com álcool após o uso.

A urina liofilizada pode ser rapidamente reconstituída a seu estado original e o analista só terá de manipular a urina líquida na etapa de pipetagem, na qual um volume de 1mL deve ser transferido para um frasco de polipropileno, onde serão adicionados os demais reagentes. Feito isso, a amostra líquida (*in natura*) pode ser lacrada e armazenada sob refrigeração ou devidamente descartada.

Quando se trabalha com a urina líquida, desde a sua coleta, até a sua manipulação, aumenta-se o risco de contaminação, pois, como discutido anteriormente, existe a possibilidade de vazamento da amostra, permitindo a contaminação por microorganismos. Com a liofilização, a porcentagem de água remanescente na amostra (em pó) é mínima, impedindo ou retardando a proliferação dos microorganismos já presentes na amostra coletada, enquanto a contaminação devido ao vazamento é totalmente evitada.

Não existe um procedimento de biossegurança específico para a análise de amostras biológicas implantado no Laboratório de Análises Químicas e Ambientais (LAQA). Entretanto, todas as precauções cabíveis foram tomadas para a prevenção de riscos, determinando, tanto quanto possível, um ambiente saudável e seguro para os usuários do laboratório.

4.3.4. Descarte das soluções de mercúrio

O Laboratório de Análises Químicas e Ambientais (LAQA) do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN tem implantado um programa de gerenciamento de tratamento e descarte de resíduos químicos. Os rejeitos das soluções utilizadas durante o estudo foram devidamente descartadas em um frasco próprio para resíduos de mercúrio. Os resíduos ácidos foram adequadamente neutralizados antes de serem descartados.

5. Validação da metodologia analítica

O desempenho da metodologia analítica é influenciado essencialmente pela qualidade das medidas instrumentais e pela confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no tratamento dos dados. Para assegurar a aplicabilidade e o alcance do método adotado é necessário estabelecer alguns limites associados aos parâmetros de desempenho a serem avaliados durante a etapa de validação analítica [38].

A validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos [95]. Segundo a ANVISA [7], a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. O desempenho do método sob investigação precisa ser consistente com a aplicação para a qual ele se destina [44].

A norma ISO/IEC 17025 [65] define validação como a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional. A validação assegura, portanto, a credibilidade do método.

É fundamental que o laboratório disponha de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executa conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida [61]. Antes de implantar um método, o laboratório precisa demonstrar que tem condições de operá-lo de maneira adequada, dentro das condições específicas existentes em suas instalações.

A IUPAC publicou um guia para a calibração em química analítica com o intuito de padronizar os procedimentos para a estimativa dos parâmetros de desempenho do método [36]. As agências regulatórias FDA (EUA), MHLW (Japão) e EMEA (União Européia) organizam a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) para estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. O guia para validação de procedimentos analíticos elaborado pelo ICH [63] tem sido empregado em outras áreas, não somente a farmacêutica, e foi, por diversas vezes, consultado no decorrer deste estudo.

Os métodos padronizados para análise de contaminantes publicados pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) contêm orientações pertinentes à validação de métodos químicos na área ambiental. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO regulamentam a validação de métodos analíticos [61].

5. Validação da metodologia analítica

Os parâmetros de desempenho selecionados são, portanto, os indicadores quantitativos da adequabilidade e do desempenho da metodologia analítica em questão. O documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO [61] foi aqui adotado como principal referência no estudo da validação da metodologia analítica para quantificação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

A validação analítica é um processo demorado, que requer um grande número de ensaios e cálculos estatísticos, aumentando o custo das análises. Portanto, é necessário selecionar os parâmetros que possuem o maior impacto sobre a qualidade dos resultados e a rapidez com a qual eles são obtidos. Além disso, os recursos do laboratório devem ser utilizados de maneira consciente. Instrumentos de medição, reagentes e o próprio analista (encargos, treinamento, etc.) representam um custo ao laboratório. Por isso, muitas vezes, não é economicamente pertinente realizar todos os ensaios de validação sugeridos nos guias encontrados na literatura [7, 36, 61, 63, 103, 107]. É aceitável a não inclusão de um determinado parâmetro, contanto que os demais possam ser considerados suficientes para comprovar que a metodologia analítica adotada é capaz de produzir resultados satisfatórios.

Os parâmetros selecionados para avaliar o desempenho da metodologia analítica adotada [75] foram: (1) curva analítica, (2) faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, (3) linearidade, (4) seletividade, (5) sensibilidade, (6) limite de detecção e limite de quantificação, (7) exatidão e (8) precisão.

Materiais de referência certificados da NIST (CRM1641d e SRM2670a¹) foram empregados durante todo o processo da validação a fim de assegurar a rastreabilidade dos resultados obtidos.

5.1. Curva analítica

A *calibração* é um conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões [62].

A *curva analítica* é a representação gráfica da relação entre a resposta obtida (y) e a concentração de analito (x), estabelecida pela calibração. A maneira mais simples de descrever esta dependência é através do *modelo de regressão linear*. Este modelo assume que a variável aleatória x (concentração) é conhecida e a variável dependente y (sinal ou absorbância) é desconhecida e é empregado para prever os valores de y em função dos valores de x .

Em termos práticos, deve-se preparar uma série de soluções padrão contendo uma concentração (x) conhecida do analito de interesse e efetuar a leitura do sinal (y) correspondente a cada concentração. A interpolação dos pontos correspondentes gera a curva analítica.

¹Ver Apêndice B: Certificados dos materiais de referência 1641d e 2670a da NIST.

5. Validação da metodologia analítica

A relação estabelecida entre as duas variáveis será representada por uma reta definida por uma equação matemática em que y está em função de x :

$$y = f(x) \quad (5.1)$$

No caso de um ajuste linear, a equação de $f(x)$ será:

$$f(x) = ax + b \quad (5.2)$$

E, portanto, a equação da reta será:

$$y = ax + b \quad (5.3)$$

O ajuste da curva pelo método dos mínimos quadrados fornecerá os coeficientes de regressão que, no caso de um ajuste linear (ver a Equação 5.3), correspondem à intersecção da reta com o eixo y ou coeficiente linear (b) e à inclinação da reta ou coeficiente angular (a) [38]

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (5.4)$$

$$a = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (5.5)$$

Em que \bar{x} é o valor médio da concentração (x_i) e \bar{y} é o valor médio do sinal (y_i) para o número de amostras (N) utilizadas como padrões analíticos.

$$\bar{x} = \sum_i^N \frac{x_i}{N} \quad (5.6)$$

$$\bar{y} = \sum_i^N \frac{y_i}{N} \quad (5.7)$$

Estabelecida a relação entre x e y e conhecidos os coeficientes a e b , é possível prever a concentração do analito nas amostras de estudo a partir dos sinais analíticos obtidos (*"regressão inversa"*).

Como mencionado, a relação matemática entre a concentração do analito de interesse (x) e o sinal medido (y) é determinada empiricamente a partir de soluções padrão de concentrações conhecidas do analito (padrões analíticos), dando origem à curva analítica. A curva analítica deve ser construída com, no mínimo, cinco concentrações distintas diferentes de zero [121].

5.2. Faixa de Trabalho, Faixa Linear e Faixa Linear de Trabalho

A faixa de trabalho representa o intervalo de concentrações no qual o método será aplicado. O limite inferior da faixa de trabalho normalmente é estipulado pelos valores dos limites de detecção (LD) e quantificação do método (LQ). A faixa de trabalho adotada neste estudo compreende um intervalo de 0 a $12\mu\text{g.L}^{-1}$.

A faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante é a faixa linear. Esta faixa pode conter a faixa de trabalho que, neste caso, será denominada *faixa linear de trabalho* (FLT). A FLT é estabelecida através da confirmação de que a metodologia analítica é capaz de fornecer um grau aceitável de exatidão, precisão e linearidade quando aplicados às amostras contendo quantidades de analito dentro da faixa de trabalho especificada. Nesta faixa, portanto, o sinal medido (y) terá uma relação linear com a concentração do analito (x).

5.3. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados linearmente correlacionados às concentrações do analito em uma determinada faixa de aplicação [63, 117].

Como visto na Seção 3.2, a Lei de *Beer* estabelece que a relação linear entre o sinal medido (y) e a concentração do analito (x), descrita pela Equação 5.3, só é válida para o intervalo que corresponde à faixa linear da curva analítica.

O ajuste da função matemática escolhida para a curva analítica é feito pelo *método dos mínimos quadrados* (MMQ). Este método procura encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados, tentando minimizar a soma quadrática (Q) das diferenças entre os valores experimentais (x_i e y_i) e os valores estimados pela equação da reta (x'_i e y'_i). Tais diferenças são chamadas resíduos.

A equação da reta da curva analítica que melhor se ajusta é aquela da qual se obtém os menores valores de resíduos [$(x_i - x'_i)$ e $(y_i - y'_i)$].

A soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (y'_i), para um conjunto de N pontos experimentais corresponde matematicamente à Equação 5.8 [34].

$$Q = \sum_i^N (y_i - y'_i)^2 \quad (5.8)$$

A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo *coeficiente de correlação de Pearson*, r , também chamado de *coeficiente de correlação produto-momento* ou simplesmente de *r de Pearson*.

O coeficiente de correlação é estimado como a razão da covariância (S_{xy}) entre a concentração (x) e o sinal analítico (y) com o produto dos desvios-padrão de x (s_x) e y (s_y), conforme descrito na Equação 5.13 [38].

5. Validação da metodologia analítica

A covariância (S_{xy}) entre a concentração (x) e o sinal analítico (y) é calculada a partir da equação de S_{xy} :

$$S_{xy} = \left[\frac{1}{(N-1)} \right] \sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})] \quad (5.9)$$

E os desvios-padrão de x (s_x) e y (s_y) são estimados de acordo com as seguintes equações:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (5.10)$$

e

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_i^N (y_i - \bar{y})^2}{(n-1)}} \quad (5.11)$$

O coeficiente de correlação é definido pela equação:

$$r = \frac{S_{xy}}{(s_x)(s_y)} \quad (5.12)$$

Finalmente, substituindo-se adequadamente os termos que compõem S_{xy} , s_x e s_y , temos:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2) (\sum (y_i - \bar{y})^2)}} \quad (5.13)$$

O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre -1 e 1 ($-1 \leq r \leq 1$) e indica o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático [61].

Quanto mais próximo de 1 ou -1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais, ou seja, menor o erro em y . Nestas condições o ajuste da função matemática escolhida para a curva analítica será máximo.

No caso hipotético em que $r = -1$, todos os pontos da curva estarão contidos em uma reta com inclinação negativa e, no caso em que $r = 1$, os pontos estarão sobre uma reta com inclinação positiva. Um valor de $r = 0$ ou próximo a ele indica uma relação não linear ou não satisfatoriamente linear entre x e y [36].

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão [53,67,113]. A ANVISA [7] recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO [61] considera um valor superior a 0,90 como usualmente requerido. Além disso, o método pode ser considerado livre de tendências (*unbiased*) se a reta contiver a origem.

Portanto, a obtenção de um r superior a 0,9 assegura a linearidade da relação entre o sinal medido (y) e a concentração (x) para o intervalo de concentrações em questão.

5. Validação da metodologia analítica

A correlação entre as variáveis de estudo, em termos dos valores de r , pode ser interpretado conforme a Tabela 5.1 a seguir.

Tabela 5.1.: Correlação entre as variáveis x e y de acordo com r

Valor de r	Correlação
0,0	nula
0,0 - 0,3	fraca
0,3 - 0,6	média
0,6 - 0,9	forte
0,9 - 0,99	fortíssima
1,0	perfeita

Fonte: adaptada de Brito et al. [27]

5.4. Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no sinal do analito de interesse. A seletividade avalia o grau de interferência destes componentes sobre o sinal medido. A resposta obtida deve corresponder exclusivamente ao analito [128]. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

Como a técnica adotada (*CV-AAS*) é específica para análise de mercúrio, a seletividade foi avaliada para o método empregado [75] comparando-se dois grupos de amostras, um com a matriz (*urina controle*²) e outro sem, ambos com concentrações do analito idênticas em cada nível de concentração de interesse.

Um material de referência certificado da NIST³ foi empregado como padrão de mercúrio, assegurando a rastreabilidade dos resultados obtidos. Alíquotas distintas deste material foram adicionadas aos dois grupos de amostras (com e sem urina) de forma a se obter três diferentes níveis de concentrações na faixa de trabalho: $1,59\mu\text{g.L}^{-1}$ (C_1); $4,77\mu\text{g.L}^{-1}$ (C_2) e $7,95\mu\text{g.L}^{-1}$ (C_3). As concentrações foram estimadas através da obtenção da massa das alíquotas adicionadas às amostras, do volume final das amostras e da concentração do analito declarada no certificado do material de referência. Desta forma, ao invés dos valores *nominais* de concentração (C_1 , C_2 e C_3), foram obtidos os valores *reais* de concentração ou os valores de concentração *corrigidos* (C'_1 , C'_2 e C'_3) com base na quantidade *real* de analito adicionado às amostras.

O número de amostras paralelas em cada nível de concentração correspondeu a 7 ($n = 7$), conforme recomendação do INMETRO [61].

² *Urina controle*: urina na qual o analito está ausente.

³ NIST CRM1641d: Mercury in Water acidified to 2% nitric acid = $1,590\text{mg.kg}^{-1} \pm 0,018\text{mg.kg}^{-1}$

5.4.1. Teste de hipóteses

Para avaliar os resultados obtidos, o teste de hipóteses foi aplicado. Assume-se duas hipóteses: a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_a). Aceitar a hipótese nula significar rejeitar a hipótese alternativa e vice-versa.

A hipótese nula corresponde a dizer que a diferença entre as variâncias calculadas para os dois grupos de amostras (s_1^2 e s_2^2) a um determinado nível de concentração é insignificante. Neste caso, pode-se considerar iguais as variâncias ($s_1^2 = s_2^2$).

O teste F de Fisher-Snedecor deve ser aplicado para verificar se a hipótese nula é verdadeira. F é calculado segundo a equação 5.14.

$$F_{calculado} = s_1^2/s_2^2 \quad (5.14)$$

Os índices 1 (numerador) e 2 (denominador) das variâncias representam a maior e a menor variância, respectivamente, e correspondem, cada qual, a um grupo de amostras (com e sem matriz). O valor $F_{tabelado}$ é obtido com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador e nível de confiança de 95%. A variância é calculada como segue:

$$s^2 = \frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)} \quad (5.15)$$

Na Equação 5.15, X_i é o resultado da "iésima" medição e \bar{X} é a média aritmética dos n resultados considerados.

Por fim, os valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ são comparados. Se $F_{calculado} > F_{tabelado}$, a diferença entre as variâncias é significante e rejeita-se H_0 . Neste caso, a hipótese alternativa é aceita e, portanto, as variâncias não podem ser consideradas iguais. Se $F_{calculado} < F_{tabelado}$, a diferença entre as variâncias é insignificante e H_0 é verdadeira.

Como será visto na Seção 6.2, $F_{calculado} < F_{tabelado}$ para todas as concentrações de estudo. A matriz, portanto, não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Neste caso, aplica-se o teste t de Student para verificar se as diferenças entre as médias dos dois conjuntos de amostras é estatisticamente significante.

O t calculado com base nos resultados obtidos será então comparado com o t obtido da tabela de distribuição de Student. O cálculo de t é efetuado de acordo com a equação abaixo.

$$t_{calculado} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}} \quad (5.16)$$

Onde \bar{x} (\bar{x}_1 e \bar{x}_2) e s (s_1 e s_2) correspondem, respectivamente, às médias e aos desvios-padrão das respostas dos analitos para cada grupo de amostras em um determinado nível de concentração.

5. Validação da metodologia analítica

A variável "s²" é calculada como segue:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (5.17)$$

Os parâmetros n_1 e n_2 correspondem aos tamanhos das amostras (número de replicatas) dos grupos 1 e 2, respectivamente.

O valor de t_{tabelado} é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e nível de confiança de 99,5% (risco de 0,5% ou $\alpha = 0,05$).

Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, a diferença entre as médias é estatisticamente significativa e, portanto, $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$. Se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, H_0 é verdadeira e as médias podem ser consideradas iguais. Neste caso, a matriz não afeta ensaio. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.3.

5.4.2. Estudo do comportamento da Curva Analítica

A função matemática escolhida para a curva analítica reflete o melhor ajuste dos pontos experimentais e os resultados analíticos serão obtidos a partir da equação da reta que representa a relação entre o sinal medido e a concentração do analito.

Se o ajuste linear considerar o zero como origem, o coeficiente linear da reta será nulo ($b=0$) e a inclinação da reta (a) provavelmente será diferente da inclinação da reta quando $b \neq 0$. Naturalmente, os resultados obtidos também serão diferentes, dependendo da função adotada. Por isso, é aconselhável avaliar a extensão desta dispersão, ou seja, se o fato da reta se originar no zero $[(x,y) = (0,b) \text{ e } b = 0]$ ou não $[(x,y) = (0,b) \text{ e } b \neq 0]$ altera o comportamento da curva de tal modo que a diferença entre os resultados obtidos de cada equação da reta ($y = ax + b$, quando $b \neq 0$ e $y = ax$, quando $b = 0$) seja estatisticamente significativa.

A curva analítica obtida no estudo da seletividade (ver Seção 5.4) foi investigada para $b=0$ e para $b \neq 0$. Para $b=0$:

$$y = 0,0046x$$

Em contrapartida, quando o ajuste não faz com que a reta passe pela origem, a equação da reta é:

$$y = 0,0047x - 0,0006$$

A diferença entre os coeficientes angulares não é visualmente significativa, mas, para fins estatísticos, o teste de hipóteses foi aplicado para avaliar a diferença dos resultados obtidos de cada equação. Os resultados encontram-se na Seção 6.2.

5.5. Sensibilidade

A sensibilidade (S) é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função do analito [61] e pode ser expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (Equação 5.5). Por exemplo, para a curva considerada (Figura 6.1), a sensibilidade é equivalente a 0,00514.

Quando uma pequena variação na concentração do analito é suficiente para causar uma variação considerável do sinal analítico (a inclinação da curva será mais acentuada), pode-se dizer que o método é sensível, pois é capaz de distinguir duas concentrações muito próximas [27].

5.6. Limite de detecção e Limite de quantificação

Medir a capacidade de detecção e quantificação é particularmente útil quando o analito que se deseja mensurar está presente em quantidades muito baixas (traços) na amostra. Para validar um método analítico, é suficiente indicar a concentração do analito a partir da qual a detecção e a quantificação se tornam problemáticas.

O limite de detecção (LD) ou mínimo valor detectável considera os riscos α (falso positivo) e β (falso negativo). O limite de quantificação (LQ) ou mínimo valor quantificável, por sua vez, é expresso em termos do desvio padrão relativo (%RSD).

5.6.1. Limite de Detecção

Conceitualmente, o limite de detecção é a menor quantidade de uma substância que um método analítico consegue confiavelmente distinguir de zero. Formalmente, é a mínima concentração ou quantidade de um analito alvo que produz um sinal que o analista consiga distinguir, a um nível de confiança especificado, do sinal produzido pelo branco [126].

O INMETRO [61] define o limite de detecção do equipamento (LDE) como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. O limite de detecção do método (LDM ou, simplesmente, LD) é definido como a concentração mínima de uma substância medida com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior do que zero. O LD é determinado a partir da análise de uma determinada matriz contendo o analito e pode variar de acordo com o tipo de amostra.

Estimar a menor concentração detectável do analito é muito importante quando o analito está presente em quantidades muito pequenas em uma amostra.

O primeiro passo para obtenção do limite de detecção é a seleção dos brancos apropriados. O branco ideal é o branco da amostra. Este branco é idêntico à amostra, sem o analito que se quer analisar. Alternativamente, uma amostra com baixo teor de analito pode ser utilizada. Os brancos da amostra são analisados da mesma forma que as amostras, sendo submetidos a todo o procedimento, do pré-tratamento até a medição propriamente dita.

5. Validação da metodologia analítica

Normalmente é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, " $|\bar{X}| + k_D s$ " e " $0 + k_D s$ ", considerando-se a análise de sete ou mais brancos da amostra e de brancos da amostra com adição, respectivamente. O fator de multiplicação k_D corresponde ao t de Student para um nível de confiança $(1 - \alpha) \times 100\%$ e $(n - 1)$ graus de liberdade e s corresponde ao desvio padrão calculado para o conjunto de respostas dos brancos.

O desvio padrão (s) é obtido a partir da fórmula 5.28 para uma série de "n" medições de um mensurando.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}} \quad (5.18)$$

onde X_i é o resultado da "iésima" medição e \bar{X} é a média aritmética dos n resultados considerados.

O limite de detecção (LD) do método foi então calculado com base no desvio padrão obtido para uma série de 7 (n) replicatas do branco da amostra adicionadas com a menor concentração aceitável de analito, que corresponde a $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$, como será visto na Seção 5.6.2 a seguir.

O valor do t de Student, neste caso, refere-se a um nível de confiança de 99% e 6 graus de liberdade. Um nível de confiança de 99% corresponde a um risco $\alpha = 1\%$ para concluir que o analito está presente quando de fato está ausente (falso positivo) e a um risco $\beta = 1\%$ para concluir que o analito está ausente quando, na realidade, ele está presente (falso negativo). Para limitar o risco de se fazer uma decisão errada, o uso de um fator de multiplicação (k_D ou t de Student) menor do que 3 deve ser desencorajado (t = 3 corresponde a $\alpha = \beta = 7\%$) [116].

O resultado obtido para o LD pode ser visto na Seção 6.4.

5.6.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ), também conhecido como limite de determinação, é definido como a menor concentração de analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (*trueness*) [61,63]. Assim como o LD, o LQ é expresso como uma concentração e corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo-se o branco. Para obtenção do LQ é necessário que as condições analíticas estejam muito bem definidas [73].

Sendo \bar{X} a média dos valores dos brancos e s o desvio padrão dos brancos, pode-se obter o LQ a partir da análise de n replicatas do branco da amostra ($n \geq 7$) como segue:

$$LQ = \bar{X} + k_Q s \quad (5.19)$$

O fator de multiplicação k_Q é dependente da precisão, expressa como o desvio padrão relativo percentual (DPR%), desejada no limite de quantificação.

$$DPR(\%) = 100/k_Q \quad (5.20)$$

5. Validação da metodologia analítica

Por exemplo, se a precisão ou DPR% ⁴ desejada no limite de quantificação for de 10% (DPR%), k_Q será igual a 10.

No entanto, a obtenção do branco pode ser problemática em amostras cujo analito está ausente ou está presente em concentrações inferiores ao LD. Neste caso, o LQ pode ser estimado a partir da adição de concentrações variadas do analito ao branco da amostra e $n_i \geq 7$. Desta maneira, é possível identificar a menor concentração de analito que pode ser quantificada com a precisão desejada.

A precisão foi então examinada para uma faixa de concentrações do analito de 0,1 a $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (primeiro ponto da curva) e 7 replicatas para cada nível de concentração. A média (\bar{X}) e o desvio padrão (s) foram calculados com base nos resultados obtidos para cada concentração e aplicados na equação do DPR% a seguir:

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (5.21)$$

Com base nos valores de DPR% calculados, foi possível determinar a menor concentração de analito que pode ser quantificada com uma precisão aceitável. A precisão desejada no limite de quantificação corresponde a um DPR% de 10%. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.5 da Seção 6.3.

5.7. Exatidão

É improvável que um resultado obtido experimentalmente seja exatamente igual ao valor de referência convencionalmente aceito como verdadeiro [61, 63, 73]. A exatidão (*accuracy*) é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando [62].

O ICH e a ANVISA [7] estabelecem um mínimo de 9 determinações independentes para 3 diferentes níveis de concentrações. O INMETRO [61], por sua vez, recomenda um mínimo de 7 replicatas para cada nível de concentração. A exatidão do método foi avaliada a partir da realização de ensaios com material de referência certificado e testes de recuperação do analito.

5.7.1. Materiais de referência certificados

Os materiais de referência certificados (MRC) são empregados em processos de validação para estabelecer a rastreabilidade do resultado de uma medição em uma análise química [62]. Um material de referência vem acompanhado de um certificado que contém um ou mais valores de propriedades e suas respectivas incertezas associadas. Os materiais de referência certificados são fornecidos por órgãos reconhecidos e confiáveis (*NIST, LGC, NBL, IRMM, BAM, IAEA, etc.*). Sempre que possível, os MRCs devem ser empregados no processo de validação para avaliar o desempenho do método [61].

⁴DPR% = Desvio Padrão Relativo, também conhecido como Coeficiente de Variação (CV%).

5. Validação da metodologia analítica

A exatidão é avaliada comparando-se os valores obtidos experimentalmente e os valores certificados. A interpretação dos resultados obtidos é feita com auxílio de algumas ferramentas matemáticas como o erro relativo, o teste de hipóteses, o índice Z (*Z Score*) e o erro normalizado.

5.7.1.1. Erro relativo

O erro relativo expressa o grau de divergência entre o valor de uma medição e o valor adotado como verdadeiro do mensurando. Matematicamente, o erro relativo é o erro da medição (erro absoluto) dividido pelo valor verdadeiro do objeto da medição [62]. Como o valor verdadeiro normalmente não pode ser determinado, utiliza-se um valor verdadeiro convencional (valor do MRC). O cálculo do erro relativo percentual (ER%) é efetuado como segue:

$$ER\% = \frac{\bar{X} - X_{CRM}}{X_{CRM}} \cdot 100 \quad (5.22)$$

onde \bar{X} é a média aritmética dos valores obtidos e X_{CRM} é o valor certificado do MRC aceito como verdadeiro.

Os valores de ER% calculados a partir dos resultados do teste efetuado com material de referência certificado da NIST ⁵ para 3 níveis de concentrações ($n = 7$) podem ser observados na Tabela 6.6.

5.7.1.2. Teste de hipóteses

O teste de hipóteses permite verificar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia e foi anteriormente descrito na Seção 5.4.

5.7.1.3. Índice Z

O índice Z (*Z Score*) também possibilita avaliar o desempenho do método pois expressa a diferença entre o resultado da medição e o valor verdadeiro em unidades de desvio padrão. Z é calculado segundo a Equação 5.23, onde s é a incerteza do material de referência certificado (SRM 2670a).

$$Z = \frac{\bar{X} - X_{MRC}}{s} \quad (5.23)$$

Os resultados podem ser observados na Tabela 6.6 e a interpretação de Z é apresentada na Tabela 6.7.

⁵NIST - SRM 2670a: Toxic Elements in Urine (Freeze-Dried) – High Level Mercury = $95,1\mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,98$

5.7.1.4. Erro normalizado

O valor verdadeiro (X_{MRC}) deve estar dentro do intervalo de incerteza (\bar{U}) calculado para o valor obtido (\bar{X}). O conceito de erro normalizado (E_n) é empregado para avaliar o desempenho.

$$E_n = \frac{(\bar{X} - X_{MRC})}{\sqrt{\bar{U}^2 + U_{MRC}^2}} \quad (5.24)$$

onde \bar{U} é a incerteza do resultado obtido e U_{MRC} é a incerteza ao valor verdadeiro. Se $|E_n| \leq 1$, então pode-se considerar \bar{X} .

5.7.2. Recuperação

A recuperação ou fator de recuperação (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, recuperada com o processo analítico [120]. Reflete, portanto, a quantidade de determinado analito efetivamente quantificada em relação à quantidade "real" presente na amostra. Neste caso, a exatidão é expressa como erro sistemático percentual inerente ao processo, devido, entre outras coisas, a perdas, medidas imprecisas e interferentes na amostra [27].

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de material de referência certificado ou de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*). No último caso, obtém-se um valor para a amostra não adicionada (branco analítico) e outro para a amostra adicionada [73]. A recuperação é então calculada conforme a equação 5.25. O INMETRO [61] recomenda adição de analito em 3 níveis de concentração: próxima ao limite de detecção, próxima à concentração máxima permissível e próxima à média da faixa de trabalho do método. No entanto, o analito adicionado pode não estar necessariamente na mesma forma do analito presente na amostra, o que pode levar a avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) \times 100 \quad (5.25)$$

onde: C_1 é a concentração determinada na amostra adicionada, C_2 é a concentração determinada na amostra não adicionada e C_3 é a concentração adicionada.

Alternativamente, quando a recuperação é obtida a partir da análise de material certificado, calcula-se:

$$R(\%) = \frac{\bar{C}}{C_{MRC}} \times 100 \quad (5.26)$$

onde: \bar{C} é a média das recuperações obtidas para n repetições e C_{MRC} é a concentração verdadeira.

5. Validação da metodologia analítica

Material certificado de referência da NIST (SRM 2670a) foi empregado no teste de recuperação e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.6, Seção 6.5.

A recuperação esperada depende da matriz da amostra, do processamento da amostra e da concentração do analito. A Tabela 5.2 adaptada de Huber [59] apresenta valores estimados de recuperação em função da concentração do analito sugeridos pelo manual da AOAC [14].

Tabela 5.2.: Valores estimados de recuperação em função da concentração do analito.

% de Analito	Proporção de Analito	Unidade	Recuperação Média (%)
100	1	100%	98-102
≥10	10 ⁻¹	10%	98-102
≥1	10 ⁻²	1%	97-103
≥0,1	10 ⁻³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	80-110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60-115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40-120

Fonte: adaptada de Huber [59]

Quanto menor a quantidade de analito presente na amostra, menor a recuperação obtida. Isto porque a análise de amostras nas quais o analito esteja presente em quantidades muito pequenas está sujeita a mais erros sistemáticos.

De acordo com o Jornal Oficial das Comunidades Européias [69], os valores de recuperação só são aceitáveis se ficarem dentro de um limite de $\pm 10\%$ do valor-alvo, o que corresponde a um intervalo aceitável de recuperação de 90-110%.

O teste de hipóteses é aplicado para avaliar a diferença entre o valor recuperado e o valor certificado. O teste t de Student é calculado e então comparado com o t_{tabelado} .

$$t = \frac{(C_{MRC} - \bar{C})}{\frac{s_R}{\sqrt{n-1}}} \quad (5.27)$$

onde: C_{MRC} é a concentração verdadeira, \bar{C} é a média das recuperações obtidas para n repetições, s_R é o desvio padrão das recuperações e n é o número de replicatas.

O método pode ser considerado exato se o valor de t obtido estiver dentro do intervalo estabelecido pelo valor tabelado para (n - 1) graus de liberdade e um determinado nível de confiança. Os resultados de $t_{\text{calculado}}$ estão apresentados na Tabela 6.8 da Seção 6.5.

5.8. Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de um mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [61, 63] e pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR%), também conhecido como coeficiente de variação (CV%). Como visto na Seção 5.6.2, o DPR% é calculado conforme a Equação 5.21.

Tabela 5.3.: Relação entre a concentração do analito e a precisão esperada.

(%) de Analito	Proporção de Analito	Unidade	DPR(%)
100	1	100%	1,3
10	10 ₋₁	10%	2,8
1	10 ₋₂	1%	2,7
0,1	10 ₋₃	0,1%	3,7
0,01	10 ₋₄	100 ppm	5,3
0,001	10 ₋₅	10 ppm	7,3
0,0001	10 ₋₆	1 ppm	11
0,00001	10 ₋₇	100 ppb	15
0,000001	10 ₋₈	10 ppb	21
0,0000001	10 ₋₉	1 ppb	30

Fonte: adaptada de Huber [59]

A Tabela 5.3 mostra a relação entre a concentração do analito e a precisão esperada. De acordo com Huber [59], os métodos empregados para quantificar o analito em escalas macro requerem um DPR% de 1 a 2%. Para a análise de traços, é aceitável um DPR% de até 30%, dependendo da complexidade da amostra. A precisão pode ser melhorada aumentando-se o número de replicatas.

O DPR% foi calculado para uma série de 7 replicatas independentes do material de referência da NIST (SRM 2670a) em três diferentes concentrações da faixa de trabalho. Os resultados são apresentados na Tabela 6.9 da Seção 6.6.

5.8.1. Repetitividade

A repetitividade (*repeatability*) é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade [62]: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; e repetições em curto espaço de tempo.

A ANVISA [7] usa o termo "repetibilidade" ao invés de repetitividade. A repetitividade depende da concentração do analito e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações da faixa de trabalho.

5. Validação da metodologia analítica

Sob condição de repetitividade, é possível calcular o desvio padrão de repetitividade (s_r) para 7 ou mais repetições ($n \geq 7$) como segue:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n - 1)}} \quad (5.28)$$

onde X_i é o resultado da "iésima" medição e \bar{X} é a média aritmética dos n resultados considerados.

A precisão dos resultados obtidos pode ser avaliada através do cálculo do *limite de repetitividade* "r". O valor de "r" capacita o analista a decidir se a diferença entre os resultados obtidos para uma amostra, determinada sob condições de repetitividade, é significativa. Para tanto, compara-se a diferença de dois ou mais resultados com o valor de "r". Se a diferença absoluta entre tais resultados não exceder o valor de "r", pode-se aceitar todos os resultados e calcular a média aritmética.

Para um nível de confiança de 95%, o r é avaliado da seguinte forma [61]:

$$r = (\sqrt{2}) * (t_{gl,1-\alpha}) * (s_r) \quad (5.29)$$

onde "t" é o valor tabelado de t de Student para 95% de confiança e 6 graus de liberdade ($t = 1,943$).

$$r = 2,8.s_r \quad (5.30)$$

Os valores de "r" calculados para o método proposto estão apresentados na Tabela 6.9 da Seção 6.6.

6. Resultados e discussão

6.1. Curva Analítica

A curva analítica foi construída a partir da leitura da absorvância de n soluções-padrão, cada qual com uma concentração conhecida de mercúrio. As soluções-padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque de Hg $500\mu\text{g.L}^{-1}$.

A faixa de trabalho adotada compreende um intervalo de 0 a $12\mu\text{g.L}^{-1}$ e foi inicialmente investigada para uma série de 10 pontos, isto é, 10 soluções-padrão de concentrações (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) variadas desta faixa: 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 9,0 | 12,0. O coeficiente de correlação (r) obtido para a curva foi de 0,999.

Em uma investigação simplificada aplicada a uma série de 6 pontos (em $\mu\text{g.L}^{-1}$): 1,0 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 9,0 | 12,0; o valor de r obtido foi igual a 0,998. A equação da reta da curva é:

$$y = 0,0051.x \quad (6.1)$$

A curva analítica, construída com estes pontos, pode ser observada na Figura 6.1 e os valores das concentrações nominais e das concentrações corrigidas ¹, das médias das absorvâncias obtidas para cada concentração, bem como os valores dos respectivos desvios-padrão, encontram-se na Tabela 6.1.

Tabela 6.1.: Valores de concentração e absorvância utilizados para construir a curva analítica.

Concentração Nominal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração Corrigida (C) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Absorvância (A)	Desvio Padrão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0,0	0,000	0,0003	0,0001
1,0	1,050	0,0046	0,0003
3,0	3,300	0,0160	0,0012
5,0	5,150	0,0264	0,0013
7,0	7,200	0,0356	0,0021
9,0	9,300	0,0500	0,0015
12,0	12,350	0,0627	0,0034

¹Alíquotas específicas da solução estoque de Hg $500\mu\text{g.L}^{-1}$ foram adicionadas à matriz de estudo na qual o analito esteja ausente, isto é, na *amostra controle*, de maneira a se obter as 6 diferentes concentrações. As concentrações *reais* ou *corrigidas* foram estimadas através da obtenção da massa das alíquotas adicionadas às *amostras controle*, do volume final e da concentração inicial da solução estoque de Hg $500\mu\text{g.L}^{-1}$.

6. Resultados e discussão

A linearidade foi ainda verificada para uma faixa mais extensa (de $0-50\mu\text{g.L}^{-1}$) com coeficiente de correlação de 0,981 ($r > 0,90$ [61]). Isto significa que a faixa linear se aplica a um intervalo de concentrações do analito bastante extenso. A faixa de trabalho, portanto, está incluída na faixa linear de trabalho e pode ser então denominada *faixa linear de trabalho*.

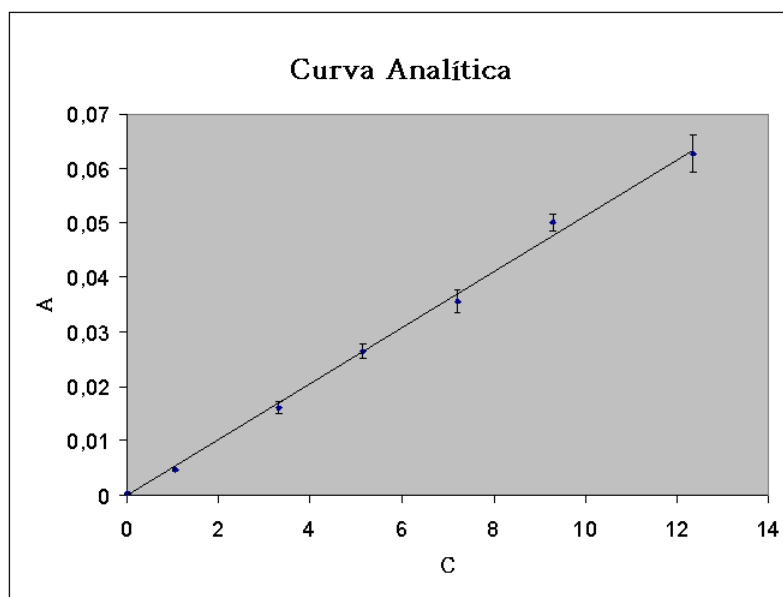


Figura 6.1.: Curva Analítica

As soluções-padrão ou padrões de calibração foram obtidas pela diluição do padrão de mercúrio da MERCK (1000 mg.L^{-1}) e foram submetidas ao mesmo procedimento analítico (ver Seção 4.3.2) ao qual são submetidas as amostras de urina. Os valores de absorbância foram obtidos por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (ver Seção 3.4).

6.2. Seletividade

A seletividade foi testada para o método adotado [75] para avaliar a influência dos efeitos da matriz sobre os resultados. Teoricamente, quantidades indênticas de analito devem ser adicionadas a 2 grupos de amostras, um com matriz (*urina controle*) e outro sem, em 3 níveis de concentração distintos.

Na prática, 7 replicatas são preparadas para cada nível de concentração em ambos os grupos de amostras. Alíquotas específicas do material de referência certificado da NIST (CRM 1641d) foram adicionadas a todas as amostras, determinando uma concentração distinta para cada nível e totalizando, assim, um número de 21 amostras² pertencentes ao grupo de amostras sem matriz e outras 21 amostras do grupo de amostras no qual a matriz está presente.

²Número total de amostras = 21: 3 níveis de concentração e 7 (n) replicatas para cada nível de concentração.

6. Resultados e discussão

A Tabela 6.2 apresenta os valores das concentrações nominais e as médias dos valores das concentrações adicionadas ou corrigidas obtidas para cada grupo de amostra.

Tabela 6.2.: Valores da concentração nominal e da concentração adicionada de analito em cada grupo de amostra (com e sem matriz)

Conc. Nominal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	s/ Matriz	c/ Matriz
1,59	1,50	1,59
4,77	4,95	5,06
7,95	8,90	8,84

Os resultados obtidos, bem como os valores das variâncias (s^2), de F de Fisher-Snedecor e de t de Student podem ser observados na Tabela 6.3 para os dois grupos de amostras, com e sem matriz, em 3 níveis de concentração diferentes: uma próxima ao limite inferior da curva analítica ($C_1 = 1,59\mu\text{g.L}^{-1}$), uma intermediária ($C_2 = 4,77\mu\text{g.L}^{-1}$) e uma próxima ao limite superior da curva ($C_3 = 7,95\mu\text{g.L}^{-1}$).

Aos resultados obtidos, foi aplicado o *teste de hipóteses*, calculando-se F e t a partir das variâncias obtidas para cada grupo de amostras. O valor de F_{tabelado} (F_t) foi obtido para (n_1-1) graus de liberdade no numerador, (n_2-1) no denominador e nível de confiança de 95% e t_{tabelado} (t_t) foi obtido para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e nível de confiança de 99,5% (risco de 0,5% ou $\alpha = 0,05$). Os valores de F_t e t_t podem ser observados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3.: Médias dos resultados obtidos e variâncias calculadas para cada grupo de amostras e valores de F e t de Student

Médias dos Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Variância ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ²		F_c	F_t	t_c	t_t
s/ Matriz	c/ Matriz	s/ Matriz	c/ Matriz				
1,43	1,54	0,0274	0,0276	1,00	4,28	1,21	3,05
4,88	4,99	0,0896	0,0465	1,93	4,28	0,79	3,05
8,82	8,78	0,1717	0,1493	1,15	4,28	0,18	3,05

$$F_c = F_{\text{calculado}}; F_t = F_{\text{tabelado}}; t_c = t_{\text{calculado}}; t_t = t_{\text{tabelado}}$$

Para avaliar as variâncias obtidas para cada grupo de amostras, os valores calculados de F (F_c) foram comparados ao valor tabelado de F. Como é possível observar na Tabela 6.3, em todos os níveis de concentração:

$$F_{\text{calculado}} (F_c) < F_{\text{tabelado}} (F_t)$$

A matriz, portanto, não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentrações em estudo. Neste caso, aplica-se o teste t de *Student* para verificar se as diferenças entre as médias dos dois conjuntos de amostras é estatisticamente significativa ou não.

6. Resultados e discussão

Os valores calculados de t (t_c) para todos os níveis de concentração foram então comparados com o valor tabelado de t (t_t) e:

$$t_{\text{calculado}} (t_c) < t_{\text{tabelado}} (t_t)$$

A matriz, portanto, não interfere de maneira significativa na determinação de mercúrio. Isto provavelmente se deve à uma digestão efetiva das amostras, garantindo a completa degradação das moléculas orgânicas e, conseqüentemente, a disponibilidade de íons Hg^{2+} livres em solução.

6.2.1. Estudo do comportamento da Curva Analítica

O ajuste da curva analítica pode considerar ou não o zero como origem. Se a origem da reta for zero, isto é, se o coeficiente linear for zero ($b = 0$), a inclinação da reta (coeficiente angular, a) provavelmente será diferente de sua inclinação quando $b \neq 0$. É possível avaliar se esta diferença é ou não estatisticamente significativa através do *teste de hipóteses*.

Os valores de absorvância obtidos na Seção 6.2 para cada grupo de amostras, em determinado nível de concentração, devem ser aplicados nas equações descritas na Seção 5.4.2 para obtenção dos respectivos valores de concentração do analito, os quais, juntamente aos respectivos valores das variâncias, além dos valores de F (F_t e F_c) e t (t_t e t_c), são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4.: Valores de concentração obtidos por aplicação das absorvâncias nas equações das retas para $b=0$ e $b \neq 0$ e valores de F e de t de Student.

Concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		Variância ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ²		F_c	F_t	t_c	t_t
$b = 0$	$b \neq 0$	$b = 0$	$b \neq 0$				
s/ Matriz							
1,418	1,515	0,028	0,027	1,04	4,28	1,09	3,05
4,842	4,866	0,089	0,085			0,15	
8,761	8,702	0,168	0,161			0,27	
c/ Matriz							
1,528	1,623	0,027	0,026	1,04	4,28	1,08	3,05
4,950	4,973	0,045	0,043			0,20	
8,717	8,659	0,204	0,195			0,24	

$$F_c = F_{\text{calculado}}; F_t = F_{\text{tabelado}}; t_c = t_{\text{calculado}}; t_t = t_{\text{tabelado}}$$

O valor de F_{tabelado} (F_t) foi obtido para (n_1-1) graus de liberdade no numerador, (n_2-1) no denominador e nível de confiança de 95%, enquanto t_{tabelado} (t_t) foi obtido para um nível de confiança de 99% e 6 graus de liberdade.

Os valores calculados de F (F_c) e t de *Student* (t_c) são inferiores aos valores tabelados de F (F_t) e t de *Student* (t_t).

É possível afirmar, portanto, que a diferença entre os resultados obtidos para cada nível de concentração quando $b = 0$ e quando $b \neq 0$ não é estatisticamente significativa. Isto significa que a mudança no comportamento da curva quando o ajuste da função matemática força a origem da reta a ser zero ($b = 0$) não interfere significativamente nos resultados obtidos a partir da mesma, quando comparados àqueles obtidos da reta cuja origem não é zero ($b \neq 0$).

6.3. Limite de Quantificação

Para determinar a menor concentração de analito quantificável, isto é, o limite de quantificação, alíquotas específicas de analito são adicionadas ao branco da amostra de maneira a se obter soluções da amostra com concentrações variadas ao longo da faixa de trabalho.

No caso, o objetivo é determinar a menor concentração do analito que se pode quantificar com um nível aceitável de precisão. Concentrações inferiores à concentração do primeiro ponto da curva ($1,0\mu\text{g.L}^{-1}$), incluindo esta concentração, foram investigadas. O número de replicatas independentes a cada nível de concentração (n_i) correspondeu a 7.

Os valores de precisão, expressa como o desvio padrão relativo (DPR%), correspondentes à quantificação do analito em cada nível de concentração podem ser observados na Tabela 6.5 a seguir.

Tabela 6.5.: Desvio Padrão Relativo (DPR%) obtido para cada concentração do analito.

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,0
DPR (%)*	123	22	7	5	3	2	3

*DPR(%) calculado para uma série de 7 replicatas a cada nível de concentração

Se uma precisão de 10% for adotada como aceitável, é possível observar na Tabela 6.5 que a precisão começa a ficar problemática em concentrações inferiores a $0,3\mu\text{g.L}^{-1}$, ou seja, a precisão ou DPR% é superior a 10% em concentrações inferiores a $0,3\mu\text{g.L}^{-1}$.

Portanto, a menor concentração aceitável do analito ou limite de quantificação (LQ) é:

$$\text{LQ} = 0,3\mu\text{g.L}^{-1}$$

6.4. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) do método foi calculado com base no desvio padrão obtido para uma série de 7 (n) brancos da amostra adicionadas com a menor concentração aceitável de analito, a qual corresponde à uma concentração de $0,3\mu\text{g.L}^{-1}$. Este valor refere-se ao limite de quantificação, isto é, a menor concentração de mercúrio que pode ser determinada com uma precisão de 10% (ver Seções 5.6.2 e 6.3).

6. Resultados e discussão

O desvio padrão calculado é aplicado à Equação:

$$LD = t.s \quad (6.2)$$

Onde: s é o desvio padrão e t corresponde ao fator de multiplicação ou t de Student para um nível de confiança de 99% e 6 graus de liberdade.

O t de Student, para 99% de confiança e 6 graus de liberdade é igual a 3,143 e o desvio padrão foi calculado a partir da Equação 5.28.

$$s = 0,021199$$

Substituindo-se os valores de t de Student e de s na Equação 6.2:

$$LD = 3,143 \cdot 0,021$$

$$LD \approx 0,07\mu\text{g.L}^{-1}$$

Portanto, a menor quantidade de analito que o método consegue confiavelmente distinguir de zero é $0,07\mu\text{g.L}^{-1}$.

6.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada comparando-se os valores obtidos experimentalmente dos valores descritos nos certificados dos materiais de referência utilizados. Para tanto, fez-se uso das seguintes ferramentas matemáticas: erro relativo, teste de hipóteses (ver Seção 6.2), índice Z (Z Score) e erro normalizado.

6.5.1. Erro relativo e Índice Z

Os valores de Z e de ER% (erro relativo) foram calculados a partir da Equação 5.23 e da Equação 5.22, respectivamente, para três níveis de concentrações distintos, após ensaios realizados com material de referência certificado, SRM 2670a, da NIST ³. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.6.

Os 3 níveis de concentração compreendem as concentrações próximas aos limites inferior e superior da curva e uma concentração intermediária, situada no meio da curva analítica, abrangendo, assim, toda a faixa de trabalho à qual o método é aplicado. Além disso, é possível visualizar a variação dos erros em função da concentração analisada.

³NIST SRM2670a: Toxic Elements in Urine (Freeze-Dried) – High Level Mercury = $95,1\mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,98$

6. Resultados e discussão

A Tabela 6.6 exibe um comportamento previsível em análises nas quais elementos ou substâncias presentes em quantidades traço devem ser determinados em uma determinada amostra. Observa-se que o erro é maior para as concentrações mais próximas aos extremos da curva analítica, como previsto pela Lei de Beer.

Tabela 6.6.: Valores das concentrações adicionadas e das concentrações recuperadas do analito, erro relativo (ER%) e índice Z.

Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. Recuperada* ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ER (%)	Z
1,90	1,83	3,66	0,65
4,75	4,73	0,40	0,15
9,51	9,19	3,42	0,80

*Média dos resultados obtidos para uma série de 7 replicatas.

Os valores de Z calculados podem ser interpretados segundo a Tabela 6.7 a seguir:

Tabela 6.7.: Índice Z

Z	Resultado
$ Z \leq 2$	satisfatório
$2 < Z \leq 3$	questionável
$ Z > 3$	insatisfatório

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o método é capaz de gerar resultados satisfatórios ($|Z| \leq 2$ em todas as concentrações).

6.5.2. Erro normalizado

O valor verdadeiro (X_{MRC}) deve estar dentro do intervalo de incerteza (\bar{U}) calculado para o valor obtido (\bar{X}).

$$E_n = \frac{(\bar{X} - X_{MRC})}{\sqrt{\bar{U}^2 + U_{MRC}^2}} \quad (6.3)$$

onde \bar{U} é a incerteza do resultado obtido e U_{MRC} é a incerteza ao valor verdadeiro.

Os cálculos para obtenção dos valores de \bar{X} e \bar{U} podem ser posteriormente observados na Seção 7.1. Considerando-se $X_{MRC} = 95,1\mu\text{g.L}^{-1}$ e $U_{MRC} = 0,98\mu\text{g.L}^{-1}$ (NIST SRM 2670a):

$$E_n = \frac{(95,12 - 95,1)}{\sqrt{(11,70)^2 + (0,98)^2}} = 0,0017 \quad (6.4)$$

Portanto, como $|E_n| \leq 1$, pode-se considerar o valor de \bar{X} .

6.5.3. Recuperação

A recuperação ou fator de recuperação (R) reflete a quantidade de determinado analito efetivamente quantificada em relação à quantidade "real" presente na amostra.

O material de referência, SRM 2670a, da NIST foi empregado no ensaio da recuperação e os resultados obtidos para uma série de 7 medições independentes em cada nível de concentração são mostrados na Tabela 6.8. O *t de Student* foi calculado segundo a Equação 5.27 para avaliar a exatidão do método. O método pode ser considerado exato se o valor de *t* obtido estiver dentro do intervalo estabelecido pelo valor tabelado para (n - 1) graus de liberdade e um determinado nível de confiança.

Os valores de recuperação obtidos na Tabela 6.8 estão dentro do intervalo aceito para a faixa de trabalho em questão (ver Tabela 5.2). Além disso, $t_{calculado} < t_{tabelado}$ ⁴ em todos os níveis investigados. O método pode, portanto, ser considerado exato.

Tabela 6.8.: Taxa de recuperação do analito e valores de *t* de Student.

Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. Recuperada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)	t_c	t_t
1,90	1,83	96,34	1,59	3,14
4,75	4,73	99,60	0,38	3,14
9,51	9,19	96,58	1,96	3,14

$$t_c = t_{calculado}; t_t = t_{tabelado}$$

6.6. Precisão

A precisão do método foi avaliada e expressa como desvio padrão relativo (DPR%) obtido para uma série de medições sucessivas do analito sob condições de repetitividade. O DPR% foi calculado segundo a equação 5.21 e os resultados podem ser visualizados na Tabela 6.9 abaixo.

Tabela 6.9.: Desvio padrão de repetitividade (s_r), limite de repetitividade (r) e desvio padrão relativo (DPR%) calculados para os resultados obtidos.

Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. Recuperada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Desvio Padrão (s_r) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Limite (r) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	DPR (%)
1,90	1,83	0,11	0,30	5,84
4,75	4,73	0,12	0,34	2,60
9,51	9,19	0,41	1,14	4,40

Como visto na Seção 5.8, um DPR% de até 30% é aceitável quando o analito está presente em quantidades muito baixas na amostra analisada. Como os resultados obtidos ficam muito abaixo deste limite, o método pode ser considerado preciso.

⁴ $t_{tabelado}$ para (n - 1) = 6 graus de liberdade e nível de confiança de 99% (risco de 1% ou $\alpha = 0,010$).

6.6.1. Repetitividade

A repetitividade foi verificada através da análise de material de referência SRM 2670a para três diferentes níveis de concentração do analito na faixa de trabalho ($n = 7$). Na Tabela 6.9, é possível observar também os valores de s_r (desvio padrão da repetitividade) e de r (limite de repetitividade) calculados para cada concentração de estudo.

Todos os valores de " r " calculados para o método proposto são maiores que as diferenças entre os respectivos resultados. Esta diferença pode ser visualizada pelos valores de s_r . Pode-se, portanto, considerar precisos os resultados obtidos a partir do método em questão.

6.7. Resultados Gerais da Validação

A tabela a seguir agrupa os resultados obtidos com a validação do método ⁵. Os resultados podem ser considerados favoráveis e confirmam a aplicabilidade do método à proposta de estudo, possibilitando a análise das amostras provenientes de Tocantins quanto ao teor de mercúrio total com rastreabilidade e confiabilidade.

Tabela 6.10.: Resumo dos resultados obtidos com a validação do método.

Parâmetro	Resultados obtidos						
r^1	0,999						
Seletividade	Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		F_c	F_t	t_c	t_t	
	s/Matriz	c/Matriz					
	1,43	1,54	1,00	4,28	1,21	3,05	
	4,88	4,99	1,93	4,28	0,79	3,05	
	8,82	8,78	1,15	4,28	0,19	3,05	
L.D. ²	0,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$						
L.Q. ³	0,30 $\mu\text{g.L}^{-1}$						
Precisão	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		RSD (%)		
	1,90		1,83		5,8		
	4,75		4,73		2,6		
	9,51		9,19		4,4		
Exatidão	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	E.R. (%)	Z	Recuper. (%)	t_c	t_t
	1,90	1,83	3,66	0,65	96,34	1,59	3,14
	4,75	4,73	0,40	0,15	99,60	0,38	3,14
	9,51	9,19	3,42	0,80	96,58	1,96	3,14

¹r = coeficiente de correlação; ²L.D. = limite de detecção; e ³L.Q. = limite de quantificação

$$F_c = F_{\text{calculado}}; F_t = F_{\text{tabelado}}; t_c = t_{\text{calculado}}; t_t = t_{\text{tabelado}}$$

⁵Ver Apêndice C.1., C.2. e C.3.

6.8. Avaliação da recuperação do analito em urina liofilizada

A recuperação do analito em amostras de urina submetidas à liofilização foi avaliada por meio da adição de material de referência certificado da NIST (CRM 1641d) às amostras de *urina controle*, isto é, amostras nas quais o analito está ausente. Quantidades similares de analito foram adicionadas à quatro frascos contendo a *urina controle*, os quais foram submetidos à liofilização (ver Seção 4.3.3). Em paralelo, frascos contendo somente a *urina controle* (branco matriz) foram liofilizados. Todas as amostras foram devidamente lacradas e a massa do material de referência adicionada a cada frasco foi cuidadosamente transcrita para as etiquetas de identificação.

A etapa de adição e liofilização das amostras de urina foi feita no laboratório da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins (TO). As amostras foram então enviadas para o Laboratório de Análises Químicas e Ambientais do CQMA no IPEN em São Paulo para quantificação de Hg total e estudo da recuperação. O objetivo era avaliar se o procedimento de liofilização interferia de alguma maneira na recuperação do analito, ou seja, se haveriam alterações significativas na quantidade de analito presente devido à submissão das amostras a este processo.

O material de referência certificado foi empregado para garantir a rastreabilidade dos resultados. O mesmo material de referência foi adicionado ao branco matriz, após a sua reconstituição nas dependências do laboratório em São Paulo, e ao branco reagente, ambos, para verificação em paralelo. O branco reagente contém todos os reagentes utilizados durante o procedimento analítico e diferencia-se do branco matriz pela ausência da amostra (urina).

A média dos resultados obtidos para o branco matriz, isto é, a *urina controle* não adicionada foi de $(0,261 \pm 0,026)\mu\text{g.L}^{-1}$ ($n = 6$). Este resultado será referido como branco da *urina controle* (BcoU_c) e será subtraído da média dos resultados obtidos para as amostras contendo adição do analito (*urina controle* adicionada) para obtenção da concentração de analito efetivamente recuperada. Os resultados obtidos para uma série de 8 replicatas (n) de urina adicionada com material de referência certificado podem ser observados na Tabela 6.11 a seguir ⁶.

Tabela 6.11.: Recuperação do analito em urina liofilizada

Concentração Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Média dos Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Resultado Final (Média - BcoU_c) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1,255	1,501	0,038	1,240	98,8

Pode-se concluir, com isso, que o processo de liofilização não prejudica a recuperação do Hg total contido na urina, isto é, não leva à perdas significativas do analito. Além disso, o próprio material de referência certificado, empregado na validação da metodologia (NIST-SRM 2670a), era urina liofilizada, uma evidência de que as amostras de urina nas quais se pretende quantificar mercúrio podem ser submetidas ao processo de liofilização.

⁶Ver Apêndice C.4.

6.9. Análise das amostras de Tocantins

Realizada a validação da metodologia analítica, foi possível aplicá-la em uma análise inicial para determinação de mercúrio total em 39 amostras de urina enviadas da Fundação de Medicina Tropical de Tocantins. Estas amostras fazem parte de um estudo referente aos riscos da exposição ambiental e ocupacional ao mercúrio no atendimento odontológico de consultórios da rede pública de saúde da cidade de Araguaína (TO).

As amostras liofilizadas de urina foram enviadas de Tocantins para São Paulo ⁷, de modo que o tempo entre a coleta e a análise laboratorial foi de uma semana. Os resultados da análise das amostras em duplicata encontram-se na Tabela 6.12.

A média dos resultados foi de $6\mu\text{g.L}^{-1}$. Seis amostras (15%) apresentaram níveis de mercúrio urinário superiores ao limite de normalidade equivalente a $10\mu\text{g.L}^{-1}$ [84]. A amostra 021 ficou na concentração limiar e o restante ficou abaixo de $10\mu\text{g.L}^{-1}$, o que revela uma exposição ao mercúrio, ainda que dentro do limite de normalidade.

As amostras liofilizadas foram enviadas em frascos de polietileno com tampa rosqueável, devidamente rotulados e embalados. A urina liofilizada mostrou-se uma opção muito mais adequada de envio, uma vez que não precisa estar acondicionada em gelo e não existe o risco de vazamento e concomitante contaminação das amostras.

Foram feitas algumas tentativas prévias de enviar as amostras de urina *in natura* (líquida). Entretanto, uma vez que as mesmas levam cerca de 7 dias para chegar ao destino, o gelo no qual são acondicionadas, obviamente, derrete em algumas horas, não sendo suficiente para preservar a temperatura requerida para o transporte. Outro problema observado foi a contaminação das amostras que vazaram de seus respectivos recipientes. Os resultados obtidos para estas amostras, portanto, não são inteiramente confiáveis e, por isso, foram desconsiderados.

A liofilização elimina a necessidade de refrigeração e os riscos de vazamento. É essencial, porém, que os frascos sejam eficientemente lacrados para impedir o contato da amostra seca (em pó) com o ar úmido. Qualquer resquício de água é suficiente para proporcionar a proliferação de microorganismos e a subsequente decomposição da amostra.

Os resultados apresentados na Tabela 6.12 serão posteriormente interpretados pela equipe de Tocantins, que deverá sugerir ações e realizar um acompanhamento do grupo de estudo através de coletas e análises futuras. Este acompanhamento se faz necessário para uma avaliação mais conclusiva da exposição dos trabalhadores estudados ao vapor de mercúrio em consultórios odontológicos.

⁷Ver Apêndice A: Aprovação do projeto parceiro (da Fundação de Medicina Tropical) junto ao comitê de ética em pesquisas para seres humanos.

6. Resultados e discussão

Tabela 6.12.: Concentração de Hg Total em amostras de urina de 39 indivíduos

Número da Amostra	R.G. da Amostra	Média dos Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	D.P.R. (%)	Limite de Normalidade ($10\mu\text{g.L}^{-1}$)
001	359/09	23,36 ± 0,08	0,34	Acima
002	360/09	11,15 ± 0,03	0,27	Acima
003	362/09	3,42 ± 0,02	0,58	Abaixo
004	363/09	7,68 ± 0,03	0,39	Abaixo
005	364/09	5,62 ± 0,01	0,18	Abaixo
006	365/09	4,15 ± 0,01	0,24	Abaixo
007	366/09	5,83 ± 0,01	0,17	Abaixo
008	367/09	5,84 ± 0,01	0,17	Abaixo
009	369/09	6,16 ± 0,01	0,16	Abaixo
010	372/09	3,98 ± 0,01	0,25	Abaixo
011	373/09	11,21 ± 0,01	0,09	Acima
012	374/09	10,70 ± 0,02	0,19	Acima
013	375/09	5,76 ± 0,01	0,17	Abaixo
014	376/09	4,83 ± 0,01	0,21	Abaixo
015	377/09	4,61 ± 0,01	0,22	Abaixo
016	378/09	9,23 ± 0,03	0,32	Abaixo
017	379/09	6,14 ± 0,01	0,16	Abaixo
018	381/09	7,39 ± 0,01	0,13	Abaixo
019	382/09	5,00 ± 0,03	0,60	Abaixo
020	384/09	12,24 ± 0,03	0,24	Acima
021	386/09	10,01 ± 0,03	0,30	No Limiar
022	387/09	8,39 ± 0,01	0,12	Abaixo
023	678/09	11,36 ± 0,07	0,62	Acima
024	679/09	1,97 ± 0,02	1,01	Abaixo
025	680/09	3,84 ± 0,01	0,26	Abaixo
026	681/09	7,11 ± 0,25	3,52	Abaixo
027	682/09	2,70 ± 0,03	1,11	Abaixo
028	683/09	2,09 ± 0,23	11,00	Abaixo
029	684/09	1,77 ± 0,08	4,52	Abaixo
030	685/09	2,59 ± 0,04	1,54	Abaixo
031	686/09	4,17 ± 0,09	2,16	Abaixo
032	687/09	2,77 ± 0,01	0,36	Abaixo
033	688/09	3,04 ± 0,08	2,63	Abaixo
034	689/09	4,75 ± 0,06	1,26	Abaixo
035	690/09	2,65 ± 0,21	7,92	Abaixo
036	691/09	3,22 ± 0,00	0,00	Abaixo
037	692/09	1,53 ± 0,03	1,96	Abaixo
038	693/09	1,02 ± 0,11	10,78	Abaixo
039	694/09	4,65 ± 0,13	2,79	Abaixo

7. Cálculos das incertezas

O resultado de uma medição ou a média de uma série de medições de um mensurando corresponde a uma estimativa do valor real e só é representativo se estiver acompanhado do valor da incerteza associada. Como, na maioria das vezes, o objeto de medição é um parâmetro associado a diagnósticos clínicos ou de natureza ambiental, é vital que ele seja expresso com confiabilidade e rastreabilidade adequadas.

A incerteza da medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando [62]. No caso de estudo, o mensurando é a concentração do analito.

Podem contribuir para a incerteza de um resultado: a amostragem, os efeitos de matriz e interferências, as condições ambientais, as incertezas das massas e equipamentos volumétricos, os valores de referência, as aproximações ou suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição e a variação aleatória [45].

Para avaliação da incerteza global, é necessário considerar, uma a uma, as várias fontes de incerteza e tratá-las separadamente para obter a contribuição correspondente a cada fonte. Cada uma das contribuições individuais para a incerteza é denominada *componente da incerteza* [48]. Existem dois tipos de incertezas:

Incertezas do tipo A: baseadas em métodos estatísticos, consideram a distribuição estatística de uma série de medições. As incertezas do tipo A são caracterizadas pelo desvio padrão experimental, permitindo uma avaliação da dispersão dos resultados de uma série de medidas.

Incertezas do tipo B: métodos de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de série de observações. Incertezas deste tipo são determinadas a partir de informações acessórias e externas ao processo de medição como resultados de medições similares anteriores, experiência ou conhecimento do comportamento do instrumento, dados do fabricante, dados fornecidos por certificados de calibração, referência de manuais de instrução, handbooks, etc.

A incerteza de uma medição pode ser expressa como *incerteza padrão*, *incerteza combinada* e *incerteza expandida*. A incerteza padrão (u_i) leva em conta o desvio padrão (s) de uma série de medidas. A incerteza combinada (u_c) agrega todas as fontes de incertezas de um método analítico e, normalmente, é calculada para o intervalo de ± 1 desvio padrão, o que corresponde a um nível de confiança de 68% [48, 106].

7. Cálculos das incertezas

Para um resultado y de uma medição, a incerteza total ou incerteza combinada, denotada por $u_c(y)$, é um desvio padrão estimado equivalente à raiz quadrada positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza, independentemente de como foram avaliados, usando a lei de propagação da incerteza. Para modelos que incluem apenas uma soma ou diferença de grandezas, isto é $y = (p + q + r + \dots)$, a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ é dada por:

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (7.1)$$

O valor do mensurando deve estar acompanhado por um intervalo correspondente à incerteza expandida (U). A incerteza U é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada ($u_i(y)$) por um fator de abrangência k . O fator k depende do nível de confiança desejado. Para um nível de confiança aproximado de 95%, $k = 2$. Neste caso, U é expressa como $\pm 2u_i$ e acompanha o resultado.

A estimativa da incerteza associada a um método analítico começa com a especificação do mensurando. No estudo em questão, o mensurando é a concentração do analito. Em seguida, deve-se indentificar as fontes de incertezas e, por fim, quantificá-las. Identificar todas as fontes de incertezas do método é fundamental para a avaliação da incerteza global. O fluxograma da Figura 7.1 mostra as etapas do procedimento que contribuem para a incerteza do resultado na determinação de mercúrio.

Foram consideradas apenas as etapas relacionadas ao cálculo da concentração do analito e, conseqüentemente, às suas respectivas incertezas associadas. Estas etapas correspondem à pesagem da amostra, digestão, diluição e curva analítica preparada com padrões de calibração.

O material de referência certificado empregado no processo de validação do método analítico em questão estabelece a rastreabilidade e a confiabilidade das medições. Além disso, a matriz do material de referência é similar à das amostras de estudo (urina).

A concentração do analito no material de referência utilizado foi calculada da seguinte maneira:

$$C_0 * V_0 = C_f * V_f \quad (7.2)$$

Em que: C_0 é a concentração do analito do material de referência certificado, V_0 é o volume inicial ou alíquota analisada do material de referência, C_f é a concentração obtida de analito e V_f é o volume final da amostra.

7. Cálculos das incertezas

Como a concentração do analito foi controlada por meio da leitura da massa da alíquota da amostra, V_0 será considerado como m_a (massa da amostra). Rearranjando a equação anterior, temos:

$$C_0 = \frac{C_f * V_f}{m_a} \quad (7.3)$$

Em termos da recuperação do analito, a concentração final ou C_f pode ser expressa como:

$$C_f = \frac{C * 100\%}{Rec(\%)} \quad (7.4)$$

Onde, C é a concentração de analito efetivamente obtida para a alíquota do material de referência (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) e $Rec(\%)$ é a porcentagem da recuperação obtida para o analito. Substituindo-se a Equação 7.4 na Equação 7.3, temos:

$$C_0 = \frac{C * V_f * 100\%}{Rec(\%) * m_a} \quad (7.5)$$



Figura 7.1.: Fluxograma das etapas do procedimento que contribuem para a incerteza na determinação de Hg em urina.

7. Cálculos das incertezas

O *Diagrama de Causa e Efeito*, também conhecido como *Diagrama de Espinha de Peixe* ou *Diagrama de Ishikawa* é bastante útil quando se deseja listar todas as possíveis fontes de incerteza do procedimento analítico. Este diagrama permite uma simplificação e uma visão clara das principais fontes de incerteza, pois agrupa as incertezas de uma série de repetições e remove termos duplicados. Desta forma, todas as fontes de incerteza são levadas em consideração. Os princípios da construção do *Diagrama de Causa e Efeito* são descritos na norma NBR ISO 9004 [94].

As principais fontes de incerteza do procedimento analítico para determinação de Hg total em amostras de urina estão representadas no *Diagrama de Causa e Efeito* da Figura 7.2.

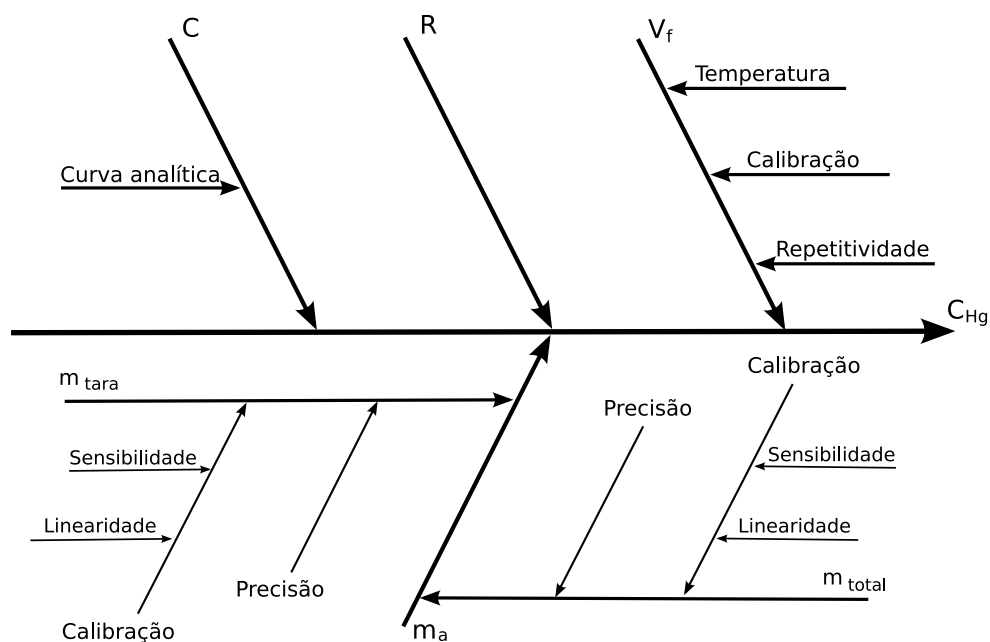


Figura 7.2.: Diagrama de Causa e Efeito do procedimento analítico para determinação de Hg total em urina

Os termos da Equação 7.5 constituem os ramos principais do diagrama, representando as mais importantes contribuições para a incerteza global. Os ramos secundários representam os fatores que contribuem para os ramos principais.

7.1. Cálculo das incertezas associadas

7.1.1. Incerteza padrão associada à massa m_a ($u_c(m_a)$)

A massa da amostra foi obtida através da diferença entre as massas do tubo vazio empregado na pesagem e do tubo com a amostra:

$$m_a = m_{(0+a)} - m_0 = (m_a + m_0) - m_0 \quad (7.6)$$

onde: m_a é a massa da amostra; $m_{(0+a)}$ é a massa do tubo com a amostra; e m_0 é a massa do tubo.

A balança analítica utilizada para pesar as amostras tem uma resolução de 0,0001g (Gehaka, modelo BG400) e as medidas estão sujeitas à variabilidade das pesagens sucessivas (*repetitividade*) e à incerteza da calibração, correspondendo respectivamente às componentes *precisão* e *calibração* no Diagrama da Figura 7.2. Duas fontes de incerteza contribuem para a calibração: a linearidade e a sensibilidade da balança. Entretanto, a contribuição da sensibilidade pode ser considerada nula, pois as medidas foram realizadas na mesma balança em um curto intervalo de tempo.

O certificado de calibração da balança (Nº = R070873956) fornece a incerteza expandida da balança (U) para um nível de 95% de confiança e peso padrão de 50mg:

$$U = 0,001g$$

Como visto anteriormente, a incerteza U é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada (u_i) por um fator de abrangência k (k = 2,00 para um nível de 95% de confiança). Portanto, é possível obter u_1 a partir de U, dividindo-se U por k:

$$u_1 = \frac{U}{2,00} \quad (7.7)$$

$$u_1 = 0,0005g$$

onde, u_1 é a incerteza padrão da massa, quando componentes do Tipo B obtidos a partir de documentação são avaliados.

A contribuição da componente *repetitividade* para a incerteza padrão associada à massa (u_2) foi investigada por meio de dez pesagens sucessivas de um peso-padrão de massa 0,500g (500mg), disponível no laboratório. A incerteza (u_2) é calculada conforme a Equação 7.8:

$$u_2 = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7.8)$$

sendo "s" o desvio padrão da série de medidas e "n" o número de repetições sucessivas (n = 10).

7. Cálculos das incertezas

O desvio padrão (s) calculado para a série de medidas foi de:

$$s = 0,0003\text{g}$$

Substituindo-se este valor na Equação 7.8, obtem-se o valor da incerteza associada à repetitividade das pesagens do peso-padrão (u_2).

$$u_2(0,500) = 0,0001\text{g}$$

O certificado de calibração dos pesos-padrão ($N^\circ = \text{MA1470808}$) fornece a incerteza expandida (U) da medição do peso-padrão de 0,500g (500mg) para uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%:

$$U = 0,000008\text{g}$$

A incerteza expandida (U) é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada (u_i) por um fator de abrangência k ($k = 2,00$). Portanto, é possível obter u_3 a partir de U, dividindo-se U por k:

$$u_3 = \frac{U}{2,00} \quad (7.9)$$

$$u_3 = 0,000004\text{g}$$

onde, u_3 representa o valor da incerteza associada à linearidade (assim como u_1), quando componentes do Tipo B obtidos a partir de documentação são avaliados.

A partir do gráfico de controle para padronização da balança é possível obter, para um determinado período, o valor do desvio padrão, uma contribuição adicional da repetitividade para a incerteza padrão associada à massa [87]. A quarta componente da incerteza (u_4) será, portanto, o desvio padrão (s) calculado a partir de uma série de medidas realizadas em um determinado período. No entanto, o laboratório de análises químicas do CQMA não mantém um gráfico de controle e, portanto, esta componente não será considerada ($u_4 = 0$).

Por fim, todas as componentes da incerteza associada à massa (*repetitividade e linearidade*) foram combinadas para fornecer a incerteza padrão combinada da massa da amostra ($u_c(m_a)$):

$$u_c(m_a) = \sqrt{2 * [(u_1)^2] + (u_2)^2 + 2 * [(u_3)^2] + (u_4)^2} \quad (7.10)$$

O termo relativo à repetitividade foi considerado apenas uma vez, pois o desvio padrão das medidas de massa (diferença entre a massa do peso-padrão e a tara) foi determinado diretamente. Por outro lado, as contribuições da linearidade foram consideradas em dobro, uma para a tara e a outra para a massa da amostra.

7. Cálculos das incertezas

Como mencionado, a quarta componente de incerteza não será considerada.

$$u_4^2 = 0$$

Portanto, a incerteza padrão combinada da massa da amostra ($u_c(m_a)$) será:

$$u_c(m_a) = \sqrt{2 * [(0,0005)^2] + (0,0001)^2 + 2 * [(0,000004)^2]} \quad (7.11)$$

$$u_c(m_a) = 0,00051\text{g}$$

7.1.2. Incerteza padrão associada ao volume V_f ($u_c(V_f)$)

Após a etapa da digestão do procedimento analítico, a solução é diluída com solução diluente (HNO_3 [10%] e H_2SO_4 [20%]) a um volume final (V_f) de 10mL. As principais fontes de incertezas associadas ao V_f são a *calibração*, a *repetitividade* e a *temperatura* [45].

A contribuição da calibração é uma incerteza do Tipo B, sendo fornecida pelo fabricante. No entanto, os tubos de prolipropileno empregados não vêm com certificado de calibração. Por isso, apenas a contribuição da *repetitividade* e da *temperatura* foram consideradas no cálculo da incerteza associada ao volume.

É possível obter o volume médio (\bar{V}) de dez tubos a partir da medida da massa média (\bar{m}), aplicando-se a fórmula da densidade:

$$d = \frac{\bar{m}}{\bar{V}} \quad (7.12)$$

Considerando-se a densidade da solução final igual à densidade da água para simplificar os cálculos e, sendo a densidade da água à 25°C igual a 0,997044g/cm³ (1,0g/cm³) [130], o volume médio será:

$$\bar{V} = 10,043\text{mL}$$

A incerteza padrão associada ao volume ($u_1(V)$) é o desvio padrão (s) das medidas.

$$s = 0,001\text{mL}$$

Portanto:

$$u_1(V) = 0,001\text{mL}$$

O resultado pode ser expresso da seguinte forma:

$$\bar{V} = (10,043 \pm 0,001)\text{mL}$$

7. Cálculos das incertezas

Considerando-se que a temperatura do laboratório pode variar cerca de $\pm 4^\circ\text{C}$, é possível estimar a incerteza associada à variação da temperatura a partir do coeficiente de expansão de volume da água [45] ($[2,1 \times 10^{-4}]^\circ\text{C}$), que produz uma variação de volume de $\pm (10 \times 4 \times 2,1 \times 10^{-4}) = \pm 0,0084$. Por se tratar de uma incerteza do Tipo B, é possível adotar uma distribuição de probabilidade retangular para a incerteza associada à esta grandeza:

$$u_2(V) = \frac{0,0084}{\sqrt{3}} \quad (7.13)$$

$$u_2(V) = 0,005\text{mL}$$

A incerteza padrão combinada do volume final é dada pela Equação abaixo.

$$u_c(V_f) = \sqrt{(u_1(V))^2 + (u_2(V))^2} \quad (7.14)$$

$$u_c(V_f) = \sqrt{(0,001)^2 + (0,005)^2} \quad (7.15)$$

E, finalmente:

$$u_c(V_f) = 0,0051\text{mL}$$

7.1.3. Incerteza padrão associada à concentração ($u_c(C)$)

O método de calibração empregado na espectrometria de absorção atômica requer a medição de um conjunto de soluções-padrão de diferentes concentrações conhecidas do analito de interesse. Para estimar a incerteza associada à curva analítica deve-se considerar a equação da curva (Equação 7.16) e os valores de absorbância obtidos para cada concentração.

A equação da reta que representa a curva analítica pode ser expressa como:

$$A_i = \alpha * C_i + \beta \quad (7.16)$$

onde: " A_i " é a absorbância da i -ésima medição, " C_i " é a concentração do i -ésimo padrão de calibração, " α " é o coeficiente angular da curva e " β " é o coeficiente linear da curva.

Segundo o guia EURACHEM [45], o ajuste linear dos mínimos quadrados, empregado na construção da curva analítica, resulta na insignificância das incertezas associadas aos valores das abcissas frente às incertezas associadas aos valores das ordenadas. Por isso, o cálculo das incertezas associadas à concentração do analito ($u_i(C)$) leva em consideração apenas as incertezas dos valores de absorbância (ordenada) e não aquelas associadas aos padrões de calibração e às diluições (abscissa).

7. Cálculos das incertezas

Os valores das absorvâncias dos padrões empregados para a construção da curva analítica (Figura 6.1) foram obtidas em triplicata e encontram-se listadas na Tabela 7.1 a seguir.

Tabela 7.1.: Valores de absorvância obtidos para cada padrão analítico

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,05	3,30	5,15	7,20	9,30	12,35
Absorvância	0,0042	0,0165	0,0272	0,0377	0,0483	0,0590
	0,0049	0,0169	0,0272	0,0335	0,0508	0,0637
	0,0046	0,0147	0,0249	0,0355	0,0510	0,0655

O método dos mínimos quadrados foi empregado para ajustar a curva analítica obtida a partir dos valores da Tabela 7.1 e a equação que representa esta curva é:

$$A = 0,0051.x \quad (7.17)$$

A contribuição da curva analítica para incerteza associada à concentração ($u_c(C)$) é avaliada pelo cálculo de $u_c(C)$ após ajuste dos mínimos quadrados de um conjunto de n pares de valores (C_i, A_i). Quatro fontes de incerteza devem ser levadas em consideração na composição da incerteza $u_c(C)$ do resultado analítico [45]: (1) variações aleatórias das medidas de A , afetando tanto a medida de calibração (A_i) como a determinação; (2) efeitos aleatórios que resultam em erros nos valores C_i atribuídos aos padrões de calibração; (3) erros desconhecidos e constantes que podem afetar os valores de C_i e A_i como, por exemplo, quando os valores de C_i são obtidos a partir de diluições de uma solução estoque; e (4) não linearidade do método.

Das quatro fontes citadas, somente a primeira é considerada na prática para o cálculo da incerteza do resultado [45]. Para estimar a incerteza associada à concentração ($u_c(C)$) emprega-se a equação do desvio padrão residual (s) que avalia a variação residual para o i -ésimo padrão de calibração:

$$u_c(C) = \frac{s}{\alpha} * \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (7.18)$$

onde:

s = desvio padrão residual;

α = coeficiente angular da reta da regressão;

p = número de repetições para determinar C_0 ;

n = número de medições para a construção da curva analítica;

C_0 = concentração do analito obtida para a amostra;

\bar{C} = medida das concentrações dos padrões de calibração;

S_{xx} = somatória dos desvios padrões residuais.

7. Cálculos das incertezas

O desvio padrão residual (s) pode ser calculado como segue:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (\alpha * C_j + \beta)]^2}{n - 2}} \quad (7.19)$$

onde j é o índice do número da medida para se obter a curva analítica. O desvio padrão residual obtido por esta equação foi:

$$s = 0,0021$$

O valor de S_{xx} é obtido pela Equação 7.20 a seguir:

$$S_{xx} = \sqrt{\sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2} \quad (7.20)$$

O valor de S_{xx} calculado a partir da Equação 7.20 foi:

$$S_{xx} = 15,8997$$

Considerando-se os valores de C_i obtidos experimentalmente para as soluções preparadas com o material de referência certificado empregado na determinação de Hg total em urina da Tabela 6.6, pode-se finalmente estimar os valores de incerteza associados à concentração:

$$u_c(C) = 0,3864 \mu\text{g.L}^{-1}$$

7.1.4. Incerteza padrão associada à taxa de recuperação (u(R))

O resultado do estudo de recuperação do analito pode ser observado na Tabela 6.8 e pode ser expresso como:

$$\text{Rec}(\%) = 96,6\% \pm 4,4\%$$

A taxa de recuperação pode ser estimada de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{\% \text{Rec}}{100} \quad (7.21)$$

Obtém-se, assim, a taxa de recuperação do analito:

$$R = 0,966$$

Como é possível observar, a taxa de recuperação obtido para o analito é muito próxima a 1, que corresponde ao total de analito presente na amostra. A incerteza padrão associada a esta grandeza pode ser calculada como segue:

$$u(R) = \frac{\% \text{RSD}}{100} \quad (7.22)$$

7. Cálculos das incertezas

Finalmente, o valor de $u(R)$ estimado foi:

$$u(R) = 0,044$$

7.2. Cálculo da incerteza combinada

Os valores obtidos para as variáveis m_a , V_f , C e R , bem como as respectivas incertezas encontram-se agrupadas na Tabela 7.2.

Tabela 7.2.: Valores das variáveis m_a , V_f , C e R e de suas respectivas incertezas.

Variável	Descrição	Valor	Incerteza Padrão Absoluta (u)	Incerteza Padrão Relativa (u/valor)
m_a	Massa da Amostra	1,0g	0,00051g	0,00051
V_f	Volume Final	10mL	0,0051mL	0,0005
C	Concentração	9,1886 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,3864 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,0420
R	Taxa de Recuperação	0,966	0,044	0,045

Substituindo-se as variáveis da Equação 7.5 pelos respectivos valores da Tabela 7.2, obtém-se C_{Hg} do material de referência certificado Toxic Elements in Urine (NIST SRM2670a):

$$C_{Hg} = \frac{9,1886 * 10 * 100\%}{96,6\% * 1,0} = 95,12\mu\text{g.g}^{-1} = 0,09512\text{mg.kg}^{-1} \quad (7.23)$$

A incerteza padrão combinada pode então ser calculada levando-se em consideração as incertezas de cada componente:

$$\frac{u_c(C_{Hg})}{C_{Hg}} = \sqrt{\left(\frac{u(m_a)}{m_a}\right)^2 + \left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2} \quad (7.24)$$

$$\frac{u_c(C_{Hg})}{0,09512} = \sqrt{(0,00051)^2 + (0,00051)^2 + (0,0420)^2 + (0,045)^2} \quad (7.25)$$

Finalmente, substitui-se nesta equação os valores da incerteza padrão associada a cada componente apresentados na Tabela 7.2 e o valor de C_{Hg} calculado, obtendo-se:

$$u_c(C_{Hg}) = 0,00585\text{mg.kg}^{-1}$$

7. Cálculos das incertezas

Analisando-se os valores de incerteza padrão da Tabela 7.2, fica claro que a maior contribuição para a incerteza global é proveniente da recuperação do analito (R), seguida da *curva analítica*, a componente da incerteza padrão associada à concentração, ambas relacionadas com a resposta obtida pelo equipamento.

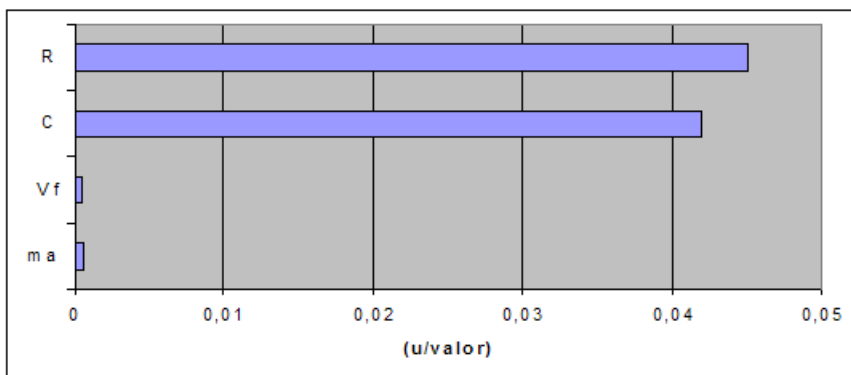


Figura 7.3.: Contribuição de cada componente para a incerteza global

7.3. Cálculo da incerteza expandida

A incerteza combinada expressa a incerteza do resultado de uma medição. Entretanto, em alguns casos, é necessário estimar a incerteza em um intervalo definido. Assim, espera-se abranger uma grande parcela da distribuição de valores que deveriam ser atribuídos ao mensurando em uma distribuição normal.

A incerteza expandida (U) é obtida a partir da multiplicação da incerteza combinada ($u_c(C_{Hg})$) por um fator de abrangência k , sendo $k = 2$ para um nível de confiança de 95%.

$$U = u_c(C_{Hg}) * 2 = 0,01170 \text{mg.kg}^{-1} \quad (7.26)$$

Assim, é possível expressar o resultado obtido para a concentração de Hg (C_{Hg}) acompanhado da incerteza expandida (U) do procedimento analítico para determinação de Hg em urina, empregando-se o material de referência certificado Toxic Elements in Urine (NIST SRM2670a):

$$C_{Hg} = C_{Hg} \pm U \quad (7.27)$$

$$C_{Hg} = (0,09512 \pm 0,01170) \text{mg.kg}^{-1}$$

Ou seja, C_{Hg} encontra-se no intervalo entre $0,08 \text{mg.kg}^{-1}$ e $0,11 \text{mg.kg}^{-1}$. Em partes por bilhão:

$$C_{Hg} = (95,12 \pm 11,70) \mu\text{g.kg}^{-1}$$

7. Cálculos das incertezas

A incerteza expandida corresponde a, aproximadamente, uma precisão de 12% do valor do mensurando.

$$DPR(\%) = \left(\frac{U}{C_{Hg}}\right) \cdot 100\% \quad (7.28)$$

$$DPR(\%) = 12,3\%$$

Como mencionado anteriormente, uma precisão de até 30% é aceitável na faixa de concentração em que o mensurando está sendo quantificado [59]. Como a precisão obtida está dentro do intervalo esperado, pode-se concluir que a incerteza do método é satisfatória.

8. Conclusões

A validação analítica comprovou a adequação da metodologia adotada para quantificar Hg total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com vapor frio. Todos os testes foram efetuados de modo a abranger a faixa de concentração na qual se pretende aplicar o método. A menor concentração de Hg que pode ser determinada com uma precisão aceitável corresponde a $0,30\mu\text{g.L}^{-1}$ (LQ). Além disso, o limite de detecção do método ($\text{LD} = 0,07\mu\text{g.L}^{-1}$) assegura a determinação de Hg em quantidades traço. Entretanto, a relevância dos ensaios de validação recai sobre os parâmetros que confirmam a boa performance do método na faixa de aplicação. O desempenho satisfatório do método nesta faixa é essencial para que se possa extrair um significado bioquímico dos resultados, levando em conta os limites pré-estabelecidos. Os resultados devem possibilitar ao analista dizer se o teor de Hg urinário (HgU) determinado está ou não dentro da faixa de normalidade (até $10\mu\text{g.L}^{-1}$ [84]). Neste quesito, os testes para verificar a exatidão e a precisão do método foram fundamentais para demonstrar que os erros associados aos resultados não são estatisticamente significantes e que os mesmos são confiáveis. Além disso, o método permite uma recuperação quase que total do analito investigado. A incerteza associada à concentração de Hg do material de referência certificado da NIST (SRM 2670a) foi calculada, mostrando a dispersão de valores que podem ser atribuídos ao resultado obtido com o procedimento analítico adotado (Lopez-Colon e Lozano [75]). Tem-se, com isso, uma estimativa comprovadamente representativa e rastreável do valor real, pois o resultado vem acompanhado do valor da incerteza associada, que equivale a $(95,12 \pm 11,70)\mu\text{g.kg}^{-1}$ ($C_{Hg} \pm U$).

A metodologia adotada representa, portanto, uma importante ferramenta para avaliar a exposição ao Hg e os resultados obtidos constituem uma evidência de que esta exposição possa ter, de fato, alguma influência sobre os níveis de Hg no organismo. Ainda que direcionada à questão do amálgama dental, esta metodologia pode também ser aplicada para investigar outros casos nos quais exista uma exposição ao Hg, salvo exposições aos compostos orgânicos de Hg, para as quais a urina não é o IBE mais adequado. Espera-se, com isso, que o laboratório possa, futuramente, ampliar a sua área de atuação. Uma análise inicial permitiu constatar o teor de Hg urinário (HgU) de 39 indivíduos pertencentes ao estudo da Fundação Tropical de Tocantins, 6 dos quais apresentaram níveis de HgU superiores ao limite de normalidade. Os resultados obtidos encontram-se em uma faixa de concentração de 1 a $23\mu\text{g.L}^{-1}$ com até 11% de precisão. Testes adicionais deverão ser realizados para constatar se existe alguma alteração em função do tempo e da carga de exposição dos indivíduos aos quais correspondem as amostras analisadas.

A. Aprovação do Comitê de Ética

O documento abaixo refere-se à aprovação do projeto parceiro: *"Avaliação dos níveis de exposição ambiental e ocupacional ao mercúrio no atendimento odontológico nos consultórios públicos de Araguaína-Tocantins"* junto ao comitê de ética em pesquisas para seres humanos.

 Governo do Estado do Tocantins FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO TOCANTINS		COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP	
PARECER CONSUBSTANCIADO			PROCESSO Nº 103
PROJETO DE PESQUISA		<input checked="" type="checkbox"/>	
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO		<input type="checkbox"/>	
O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins elaborar seu parecer final.			
1 – Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso			
Título: Avaliação dos níveis de exposição ambiental e ocupacional ao mercúrio no atendimento odontológico nos consultórios públicos de Araguaína-Tocantins.			
Coordenador do Projeto ou Professor Fernanda Villibor Xavier			
Aluno (a) Participante (TCC):			
Curso/ Faculdade: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo			
2 – Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso			
A pesquisa proposta visa avaliar risco ocupacional e ambiental de exposição ao mercúrio, ao qual estão expostos profissionais da equipe auxiliar de odontologia da rede pública de saúde de Araguaína, bem como avaliar procedimentos de biossegurança adotados no manuseio do mercúrio. O estudo é pertinente e possui valor científico, visto que se propõe a ser realizado em uma região onde existe escassez de informações científicas na área, podendo gerar informações que podem contribuir para a melhoria das condições de trabalho da equipe de odontologia e redução dos riscos de exposição ao mercúrio.			
2.1 – Objetivos e Adequação metodológica (Verificar a exequibilidade da proposta, isto é, se existe clareza do objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, evidenciando consistência entre objetivos, procedimentos, ações de execução da pesquisa e capacidade do proponente, demonstrada por outros trabalhos similares.)			
<ul style="list-style-type: none"> - Os objetivos são claros, concisos e estão respaldados pela fundamentação teórica. - A metodologia é exequível e atende aos objetivos propostos. - O cronograma de execução está adequado 			

A. Aprovação do Comitê de Ética

2.2 – Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Os questionários apresentados estão adequados e atendem aos objetivos do projeto.
Os termos de consentimento livre estão de acordo com as exigências da resolução 196/96 do CNS.

2.3 – Revisão Bibliográfica

Satisfatória

3 – Qualificação do Pesquisador/Orientador (Indicar os atributos do Pesquisador/Orientador, salientando a titulação e experiência compatíveis com a função de orientação; qualidade e regularidade da produção científica/tecnológica/artística, compatível com o projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Adequada.

Parecer substanciado CEP / FMT - Página 1/2



4 – Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:

As recomendações de correção foram atendidas.

5 – Pendências: (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso)

Não se aplica.

6 – Parecer Substanciado

Aprovado Aprovado com recomendações Pendências Não aprovado

Assinatura do Coordenador do CEP:

Data da reunião:

12/ 03/ 2008



Parecer substanciado CEP / FMT - Página 2/2

B. Certificados dos Materiais de Referência

Os certificados dos materiais de referência encontram-se disponíveis no site do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [91,92].



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1641d

Mercury in Water
(Acidified to 2% Nitric Acid)

This Standard Reference Material (SRM) is intended for the calibration of instruments and techniques used for the determination of mercury in natural waters. It is designed for the preparation of calibration solutions and for use as a "spike" sample in a "method-of-additions" analytical procedure. A unit of SRM 1641d consists of 10 ampoules, each ampoule containing approximately 10 mL of solution comprised of a trace amount of mercury in 2 % (v/v) nitric acid, initially stabilized with 1 mg/kg gold.

The mercury content in this SRM was certified using cold vapor isotope dilution inductively-coupled plasma mass spectrometry [1]. The certified mercury content and its estimated uncertainty are:

Table 1. Certified Value of Mercury (mass fraction)

1.557 mg/kg \pm 0.020 mg/kg

The uncertainty in the certified value is given as an expanded uncertainty $U = ku_c$, where u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO and NIST Guides [2] and k is a coverage factor used to obtain an approximate confidence level of 95 %. The value of u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with random measurement error and additional Type B measurement error. The coverage factor, $k = 2$.

Expiration of Certification: The certification of SRM 1641d is valid, within the measurement uncertainty specified, until **01 October 2014**, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate (see "Instructions for Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

The coordination of the technical measurements leading to certification was under the direction of J.D. Fassett of the NIST Analytical Chemistry Division.

B. Certificados dos Materiais de Referência

This SRM was prepared by B.R. Norman and certification analyses were performed by S.E. Long and W.C. Davis of the NIST Analytical Chemistry Division.

The statistical evaluation of certification data was provided by H-K. Liu of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 19 August 2008
See Certificate Revision History on Last Page

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

NOTICE AND WARNINGS TO USER

At or below the mg/kg level, mercury solutions are not stabilized adequately with mineral acid alone. The addition of trace quantities of gold (~1 mg/kg) to the nitric acid solution of mercury provides greater stability. The gold may plate out on the ampoule wall during the period for which the certification is valid. Experience with the four previous issues of this SRM indicates that this has no effect on the mercury concentration.

CAUTION: Traces of mercury vapor are present in most laboratory environments. Therefore, contamination of reagents, equipment, and common laboratory materials may cause a severe blank or background problem. Apparatus for analyses at and below the mg/kg level must be scrupulously cleaned immediately before use, and only the purest reagents with respect to mercury should be used.

INSTRUCTIONS FOR USE

Ampoules are to be opened immediately before use by breaking the glass at the score line in the narrowest segment of the neck of the ampoule. Ampoules should not be resealed, nor stored in some other manner for subsequent use. Once ampoules are opened, dilutions should be prepared and used without delay since stability of the dilutions cannot be guaranteed. Blank determinations should be made of the diluent reagents. In the certification process at NIST, the samples were diluted by a factor of 1:400 in two steps using a 3 % (v/v) nitric acid solution containing 0.05 % (w/v) potassium dichromate as the diluent, in order to stabilize the mercury and to fall within the linear range of the instrumentation.

PREPARATION AND ANALYSIS

Preparation of the SRM Solution: The polyethylene drum used to prepare SRM 1641d was first filled with a 10 % nitric acid solution containing approximately the same mercury and gold concentration as the SRM solution and conditioned with this solution for several weeks. The drum was then flushed with distilled water. SRM 1641d was prepared by filling the drum with approximately 200 L of distilled water, and acidifying to 2 % (v/v) nitric acid with high purity acid. Then spikes of high purity gold dissolved in aqua regia and high purity mercury dissolved in concentrated nitric acid were added sequentially, with thorough mixing. Finally, the bulk solution was ampouled. The density of the solution at 22 °C was 1.007 g/mL.

Preparation of Standard Solutions by Mass: Diluted working standard solutions can be prepared by transferring an aliquot of the SRM to an empty, dry, preweighed polyethylene bottle, and then reweighing the bottle. An appropriate dilute acid must be added by mass to bring the solution to the approximate desired dilution. The dilution need not be exact since the mass of the empty bottle, mass of the bottle plus SRM aliquot, and the final diluted mass of the solution will permit calculation of the exact concentration of the working solution. Dilutions prepared gravimetrically as described will need no correction for temperature and no further correction for true concentration in vacuum and will be in mg/kg units. Volumetric dilutions are **NOT** recommended due to uncertainties in volume calibrations and variations in density.

Preparation of Standard Solutions by Volume: Dilutions may be made by the addition of accurately measured aliquots, withdrawn from the just opened ampoule, to known volumes of an appropriate dilute acid using conventional techniques. The volumetric apparatus used should be scrupulously cleaned. The reliability of the dilution process will depend on the care exercised and on the reliability of the calibration of the volumetric apparatus used.

B. Certificados dos Materiais de Referência

REFERENCES

- [1] Christopher, S.J.; Long, S.E.; Rearick, M.S.; Fassett, J.D.; *Development of High Accuracy Vapor Generation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and its Application to the Certification of Mercury in Standard Reference Materials*; Anal. Chem., Vol. 73, pp. 2190-2199 (2001).
- [2] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; ISBN 92-67-10188-9, 1st ed.; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.

Certificate Revision History: 19 August 2008 (Certified value for Hg revised; extension of certification period); 30 December 1999 (Original certificate date).



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 2670a

Toxic Elements in Urine (Freeze-Dried)

This Standard Reference Material (SRM) is primarily intended for use in evaluating the accuracy of clinical methods and for the calibration of apparatus used to determine the concentration of toxic metals and other elements in human urine or similar matrices. It can also be used to validate working or secondary reference materials. A unit of SRM 2670a consists of four bottles of freeze-dried urine, two bottles each at the low and high levels. Before use, the urine in each bottle is to be reconstituted with 20.00 mL of high purity deionized water (see *Instructions for Use*). The low level urine was prepared from human urine that was lyophilized after pooling and centrifugation. The high level urine was prepared by spiking an aliquot of the pooled and homogenized low-level urine with selected metals, followed by lyophilization. Due to the centrifugation (which improved sample homogeneity), neither level represents a fresh urine pool from a normal human population.

The certified, reference, and information concentration values apply only to properly reconstituted urine at room temperature (20 °C to 25 °C, see *Instructions for Use*).

Expiration of Certification: The certification of this SRM is valid within the measurement uncertainties specified until **31 December 2012**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see *Instructions for Use*). However, the certification will be nullified if the SRM is contaminated or modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Return of the attached registration card will facilitate notification.

Analytical measurements on this SRM were performed by C.M. Beck II, T.A. Butler, W.R. Kelly, S.E. Long, E.A. Mackey, J.L. Mann, M.S. Rearick, R.D. Vocke, Jr., L.J. Wood and L.L. Yu and by Ö. Ertaş, a Research Associate at NIST in the NIST Analytical Chemistry Division. R.L. Jones and G. Shakirova at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA and D.E. Nixon at the Mayo Clinic, Rochester, MN performed additional analytical measurements.

B. Certificados dos Materiais de Referência

The CDC provided partial financial support for the development of this SRM under the direction of project officers E.W. Gunter, D.C. Paschal, and R.L. Jones of the National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences, Atlanta, GA.

The lyophilization and bottling operations were carried out by Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.

C. Hagwood of the NIST Statistical Engineering Division provided consultation on the evaluation of the data.

The overall direction and coordination of the analyses were under the chairmanship of R.D. Vocke, Jr. and G.C. Turk of the NIST Analytical Chemistry Division.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Standard Reference Materials Program by B.S. MacDonald of the NIST Measurement Services Division.

Willie E. May, Chief
Analytical Chemistry Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 11 August 2003

John Rumble, Jr., Chief
Measurement Services Division

NOTICE AND WARNINGS TO USERS: SRM 2670a IS INTENDED FOR IN-VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY. THIS IS A HUMAN SOURCE MATERIAL AND SHOULD BE TREATED AS A BIOHAZARDOUS SUBSTANCE CAPABLE OF TRANSMITTING INFECTIOUS DISEASE. THE RECONSTITUTED URINE SHOULD BE HANDLED WITH PRECAUTIONS SUITABLE FOR FRESH URINE.

INSTRUCTIONS FOR USE: In order for the Certified concentrations to be valid, this SRM must be reconstituted as follows. Remove the bottle from the refrigerator, and allow it to equilibrate at room temperature before reconstitution. Carefully remove the metal seal. Take extra care in removing the rubber stopper, as some of the lyophilized urine may adhere to it. Using a Type I, Class A calibrated volumetric transfer pipette or other dispenser of known accuracy, add 20.00 mL of CAP/NCCLS Type I water [1] or equivalent to each bottle. After replacing the stopper, the bottle should be allowed to stand at room temperature with occasional swirling for 30 minutes to ensure complete dissolution. **DO NOT SHAKE.** Vigorous shaking causes foaming, which may lead to an inhomogeneous distribution of the analytes within the bottle. Allow 2 h for reconstitution. After reconstitution, the contents should be used immediately or stored between 2 °C and 8 °C until ready for use, preferably within 12 h. Density measurements made on the reconstituted material with a micro-pycnometer gave values of 1.0024 ± 0.0003 g/mL for both levels of SRM 2670a.

Stability and Storage: The urine comprising SRM 2670a is lyophilized (freeze-dried) material and should be stored in a refrigerator at a temperature between 2 °C and 8 °C until ready for use. It should not be frozen or exposed to sunlight or ultraviolet radiation. After reconstitution, the contents should be used immediately or stored between 2 °C and 8 °C until ready for use, preferably within 12 h. Some of the elements, most notably Hg, are volatile and are progressively lost after reconstitution. Freezing of the reconstituted material is not recommended.

Certified Values and Uncertainties: Certified concentration values for 10 elements in the low level and 14 elements in the high level of SRM 2670a are listed in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST. All values are reported on a mass/volume basis [2] (see *Instructions for Use*) and are based on measurements using the entire lyophilized sample mass.

B. Certificados dos Materiais de Referência

Table 1. Certified Concentration Values

Element	Low Level				High Level			
	Quantity	Units	Uncertainty	<i>k</i>	Quantity	Units	Uncertainty	<i>k</i>
Antimony	0.971	µg/L	± 0.033	2.45	0.824	µg/L	± 0.070	2.57
Cadmium	0.0591	µg/L	± 0.0034	2.36	4.862	µg/L	± 0.084	2.36
Cesium	1.075	µg/L	± 0.031	2.57	1.085	µg/L	± 0.052	2.31
Cobalt	0.166	µg/L	± 0.040	2.09	51.2	µg/L	± 3.2	2.23
Iodine ^a	88.2	µg/L	± 1.1	2.00	88.2	µg/L	± 1.1	2.00
Lead	0.49	µg/L	± 0.16	2.57	233.2	µg/L	± 9.4	2.57
Mercury	0.0663	µg/L	± 0.0058	2.57	95.1	µg/L	± 0.98	2.00
Manganese	---	---	---	---	99	µg/L	± 12	2.78
Molybdenum	---	---	---	---	114.1	µg/L	± 4.8	2.01
Platinum	---	---	---	---	51.5	µg/L	± 6.6	2.00
Selenium	---	---	---	---	229.5	µg/L	± 8.3	2.57
Thallium	0.0162	µg/L	± 0.0045	3.18	5.417	µg/L	± 0.064	2.36
Thorium	0.0053	µg/L	± 0.0014	2.57	0.01606	µg/L	± 0.00077	2.45
Uranium	0.1020	µg/L	± 0.0023	2.57	4.997	µg/L	± 0.071	4.30

^a Iodine concentrations, as measured, are for Iodide.

The certified values for cadmium, iodine, lead, mercury, thallium, thorium and uranium are the means of results obtained by NIST using isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry (ID-ICPMS). The expanded uncertainties are calculated as prediction intervals where $U = ku_c$. The uncertainty component u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined standard uncertainty calculated according to the ISO Guide [3]. The coverage factor, k , is determined from the Student's t -distribution for the appropriate degrees of freedom to yield 95 % confidence. The certified values and uncertainties for the remaining elements are derived from the results of at least one analysis performed at NIST and independent results from one or more methods provided by the CDC (Atlanta, GA) and/or the Mayo Clinic, (Rochester, Minnesota) using the approach described by Levenson, *et al.* [4] for combining results from multiple methods. Multiple method results from the laboratories outside NIST were first combined to give a single value and uncertainty before being combined with the NIST results. The certified value is an unweighted mean of the results from NIST and these laboratories. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean, $U = ku_c$, with a coverage factor k determined from the Student's t -distribution for the appropriate degrees of freedom to yield 95 % confidence. Each u_c is calculated by combining a between-method variance [4] with a pooled, within-method variance [3]. Analytical methods are listed in Appendix A.

Reference Values and Uncertainties: Reference concentration values for 7 elements at the low level and 8 elements at the high level are given in Table 2. Reference values are non-certified values that are the best estimate of the true value; however, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may not include all sources of uncertainty.

B. Certificados dos Materiais de Referência

Table 2. Reference Concentration Values

Element	Low Level			High Level		
	Quantity	Units	Uncertainty	Quantity	Units	Uncertainty
Calcium	29	mg/L	± 2	30	mg/L	± 2
Magnesium	21.0	mg/L	± 0.2	21.2	mg/L	± 0.2
Potassium	410	mg/L	± 10	415	mg/L	± 10
Sodium	856	mg/L	± 15	942	mg/L	± 20
Arsenic	---	---	---	220	µg/L	± 10
Copper	---	---	---	110	µg/L	± 4
Manganese	2.6	µg/L	± 0.7	---	---	---
Selenium	8	µg/L	± 3	---	---	---
Tin	---	---	---	89	µg/L	± 7
Zinc	130	µg/L	± 30	410	µg/L	± 30

The reference concentration values are based either on the results of a single NIST method or on the results of a single NIST method and one or more outside laboratories methods. Reference values and uncertainties were derived from multiple results in the same manner as was done for the certified values and uncertainties. Zinc, an important analyte in urine, was not certified in SRM 2670a due to possible contamination from the stopper used in the packaging. Analytical methods are listed in Appendix A.

Information Values: Information concentration values are provided in Table 3. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value.

Table 3. Information Concentration Values

Element	Low Level		High Level	
	Quantity	Units	Quantity	Units
Aluminum	4	µg/L	100	µg/L
Arsenic	3	µg/L	---	---
Barium	2	µg/L	2	µg/L
Beryllium	---	µg/L	5	µg/L
Chromium	2	µg/L	20	µg/L
Copper	5	µg/L	---	---
Molybdenum	17	µg/L	---	---
Nickel	2	µg/L	100	µg/L
Tin	<1	µg/L	---	---
Tungsten	<1	µg/L	<1	µg/L
Vanadium	<1	µg/L	30	µg/L

B. Certificados dos Materiais de Referência

REFERENCES

- [1] *Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition*, NCCLS document C3-A3, NCCLS, Wayne, Pennsylvania (1997).
- [2] Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811, 1995 Ed.; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1995).
- [3] *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [4] Levenson, M.S.; Banks, D.L.; Eberhardt, K.R.; Gill, L.M.; Guthrie, W.F.; Liu, H.K.; Vangel, M.G.; Yen, J.H.; Zhang, N.F.; *An Approach to Combining Results from Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*; J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., Vol. 105, pp. 571-579 (2000).

Appendix A. Methods Used in Analyte Determinations

Method	Analytes Determined
Cold Vapor Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at NIST	Hg
Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at NIST	Cd, I, Pb, Th, Tl, U
Standard Additions Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at NIST	Mn, Al, V
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at NIST (High Level only)	As, Co, Cu, Mn, Mo, Pt, Se, Sn
Instrumental Neutron Activation Analysis at NIST	Co, Cs, Sb, Se, Zn
Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry at NIST	Ca, K, Mg
Flame Emission Spectrometry at NIST	Na
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at the CDC, Atlanta, GA	Be, Ba, Cd, Co, Cs, Mo, Pb, Pt, Sb, Tl, U, W
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry at the Mayo Clinic, Rochester, MN	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Tl, V, Zn
Electrothermal Vaporization Atomic Absorption Spectrometry at the Mayo Clinic, Rochester, MN	Al, Cr, Mn

C. Resultados

C.1. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Tabela C.1.: Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Replicatas	Concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$)						
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,0
n	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,0
1	0,030	0,146	0,260	0,458	0,608	0,766	0,983
2	0,068	0,113	0,296	0,412	0,612	0,789	0,982
3	0,047	0,116	0,297	0,408	0,645	0,799	0,941
4	0,008	0,212	0,325	0,436	0,589	0,803	0,896
5	0,100	0,149	0,315	0,417	0,620	0,793	0,926
6	-0,012	0,167	0,309	0,394	0,601	0,754	0,958
7	-0,007	0,170	0,287	0,394	0,595	0,780	0,945
Média	0,033	0,153	0,298	0,417	0,610	0,783	0,947
Desvio Padrão	0,041	0,034	0,021	0,023	0,019	0,018	0,031
DPR(%)	123,145	22,282	7,118	5,516	3,115	2,299	3,273

C. Resultados

C.2. Teste de Seletividade

Tabela C.2.: Teste de Seletividade com Material de Referência da NIST - CRM1641d

Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	s/ Matriz	c/ Matriz	s/ Matriz	c/ Matriz	s/ Matriz	c/ Matriz
	1,50	1,59	4,95	5,06	8,90	8,84
Replicatas	Conc. Lida ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
1	1,428	1,625	4,771	5,373	8,447	8,246
2	1,411	1,453	4,889	4,846	9,299	8,634
3	1,460	1,572	5,482	5,140	9,154	8,560
4	1,553	1,269	4,883	4,746	8,878	9,330
5	1,665	1,706	4,796	4,963	8,553	8,384
6	1,127	1,730	4,823	5,013	8,227	8,859
7	1,390	1,429	4,489	4,822	9,172	9,439
Média	1,433	1,541	4,876	4,986	8,819	8,779
Desvio Padrão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,1658	0,1661	0,2993	0,2156	0,4144	0,4573
Variância ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ²	0,0275	0,0276	0,0896	0,0465	0,1717	0,1493
$F_{\text{calculado}} (F_c)$	1,00		1,93		1,15	
$F_{\text{tabelado}} (F_t)$	4,28					
$t_{\text{calculado}} (t_c)$	1,21		0,79		0,19	
$t_{\text{tabelado}} (t_t)$	3,05					

C. Resultados

C.3. Teste de Exatidão e Precisão

Tabela C.3.: Teste com Material de Referência da NIST - SRM2670a

Conc. Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,9034	4,7523	9,5141
Replicatas (n)	Conc. Lida ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
1	1,765	4,554	9,775
2	1,790	4,808	9,306
3	1,645	4,691	9,601
4	1,876	4,922	9,015
5	1,936	4,925	8,571
6	1,879	4,784	8,996
7	1,945	4,750	9,056
Média	1,8337	4,7334	9,1886
Desvio Padrão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,1072	0,1223	0,4071
DPR(%)	5,84	2,60	4,40
$t_{\text{calculado}} (t_c)$	1,59	0,38	1,96
$t_{\text{tabelado}} (t_t)$	3,14		
Recuperação (%)	96,34	99,60	96,58
Limite de Repetitividade	0,30	0,34	1,14
Erro Relativo (%)	3,66	0,40	3,42
Índice Z	0,65	0,15	0,80

C.4. Teste de Recuperação do analito em urina liofilizada

Tabela C.4.: Recuperação do analito em urina liofilizada

Replicatas (n)	Concentração Adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Média dos Resultados ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Resultado Final (Média - BcoU _c *) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1	1,300	1,460	1,200
2	1,310	1,440	1,180
3	1,210	1,490	1,230
4	1,200	1,550	1,290
5	1,260	1,540	1,270
6	1,250	1,510	1,250
7	1,250	1,510	1,240
8	1,250	1,520	1,260
Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,255	1,501	1,240
Recuperação (%)	98,8		

*BcoU_c (branco da *urina controle*) = $0,260\mu\text{g.L}^{-1}$

Referências Bibliográficas

- [1] A. KINGMAN AND T. ALBERTINI AND L. J. BROWN. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a U.S. military population. *J Dent Res* 77, 3 (March 1998), 461–471.
- [2] ACADEMY OF GENERAL DENTISTRY. Whats in a filling? *AGD Impact* 36, 3 (March 2008), 52.
- [3] ADACHI, A., HORIKAWA, T., TAKASHIMA, T., AND ICHIHASHI, M. Mercury-induced nummular dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 43, 2/2 (2000), 383–385.
- [4] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Mercury. U.S. Department of Health and Human Services em <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.html>>, March 1999. Último acesso em maio de 2008.
- [5] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspect. World Health Organization em <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>>, 2003. Último acesso em maio de 2008.
- [6] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n. 528, Abril 2001.
- [7] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução RE n. 899, Maio 2003.
- [8] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Ministério da Saúde. Anvisa em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_odonto_servicos.pdf>, 2006. Último acesso em novembro de 2008.
- [9] ALBRECHT, J., AND MATYJA, E. Glutamate: A potential mediator of inorganic mercury neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 11, 2 (1996), 175–184.
- [10] ANDERSON, A., ELLINGSEN, D. G., MORLAND, T., AND KJUUS, H. A neurological and neurophysiological study of chloralkali workers previously exposed to mercury vapour. *Acta Neurol Scand* 88, 6 (1993), 427–433.
- [11] ARONSSON, A. M., LIND, B., NYLANDER, M., AND NORDBERG, M. Dental amalgam and mercury. *BioMetals* 2, 1 (March 1989), 25–30.
- [12] ARVIDSON, B. Accumulation of mercury in brainstem nuclei of mice after retrograde axonal transport. *Acta Neurol Scand* 82, 4 (October 1990), 234–237.

Referências Bibliográficas

- [13] ASCHNER, M., RISING, L., AND MULLANEY, K. J. Differential sensitivity of neonatal rat astrocyte cultures to mercuric chloride (MC) and methylmercury (MeHg): studies on K^+ and amino acid transport and metallothionein (MT) induction. *Neurotoxicology* 17, 1 (1996), 107–116.
- [14] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Peer-Verified methods Program, Manual on policies and procedures. AOAC. Arlington, VA em <<http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf>>, November 1998. Último acesso em julho de 2008.
- [15] BARREGÅRD, L., SÄLLSTEN, G., AND JÄRVHOLM, B. People with high mercury uptake from their own dental amalgam fillings. *Occup Environ Med* 52, 2 (February 1995), 124–128.
- [16] BARTOLOME, B., CORDOBA, S., SANCHEZ-PEREZ, J., FERNANDEZ-HERRERA, J., AND GARCIA-DIEZ, A. Baboon syndrome of unusual origin. *Contact Dermatitis* 43, 2 (2000), 113.
- [17] BEATY, R. D., AND KERBER, J. D. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorbtion Spectrophotometry*. Perkin-Elmer, U.S.A., 2002.
- [18] BERDOUSES, E., VAIDYANATHAN, T. K., DASTANE, A., WEISEL, C., HOUPPT, M. L., AND SHEY, Z. Mercury release from dental amalgams: an in vitro study under controlled chewing and brushing in artificial mouth. *J Dent Res* 74, 5 (1995), 1185–1193.
- [19] BERLIN, M. Mercury in dental fillings – an environmental medicine risk assessment. A literature and knowledge summary. *Amalgam and Health - Swedish Council for Planning and Coordination of Research, Stockholm* (1999), 369.
- [20] BERLIN, M. Mercury in dental-filling materials – an updated risk analysis in environmental medical terms. In: *Dental Materials em* <<http://www.cent4dent.com/pdfs/mercury1.pdf>> (2003), 33. Último acesso em julho de 2008.
- [21] BERLIN, M., FAZACKERLEY, J., AND NORDBERG, G. The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and mercuric salts. *Arch Environ Health* 18 (1969), 719–729.
- [22] BERLIN, M., HUA, J., LOGDBERG, B., AND WARFVINGE, K. Prenatal exposure to mercury vapor: effects on brain development. *Fund Appl Toxicol* 19 (1992), 324–326.
- [23] BERLIN, M., AND JOHANSSON, L. G. Mercury in mouse brain after inhalation of mercury vapour and after intravenous injection of mercury salts. *Nature* 204 (1964), 85–86.
- [24] BOHETS, H. H., VAN THIELEN, M. N., VAN DER BIEST, I., VAN DER BIEST, I., VAN LANDEGHEM, G. F., D’HAESE, P. C., NOUWEN, E. J., DE BROE, M. E., AND DIERICKX, P. J. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int* 47 (1995), 395–403.
- [25] BOYD, S. A., SEGER, D., VANNUCCI, S., LANGLEY, M., ABRAHAM, J. L., AND KING JR., L. E. Mercury Exposure and Cutaneous Disease. *J Am Acad Dermatol* 43, 1 (2000), 81–90.

Referências Bibliográficas

- [26] BRIDGES, C. C., BAUCH, C., VERREY, F., AND ZALUPS, R. K. Mercuric conjugates of cysteine are transported by the amino acid transporter system b0,+ : implications of molecular mimicry. *J Am Soc Nephrol* 15 (2004), 663–673.
- [27] BRITO, N. M., DE AMARANTE JUNIOR, O. P., POLESE, L., AND RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. de Meio Ambiente* 13 (2003), 129–146. Último acesso em junho de 2008.
- [28] BRUNE, D., AND EVJE, D. M. Man’s mercury loading from a dental amalgam. *Sci Total Environ* 44, 1 (July 1985), 51–63.
- [29] CALIFORNIA BUREAU OF OCCUPATIONAL HEALTH - DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH. Medical supervision for employees in mercury mines and mills. Technical Bulletin for Physicians, September 1967.
- [30] CAMARA, V. M., SILVA, A. P., AND CANCIO, J. A. Notas para a constituição de um programa de vigilância ambiental dos riscos e efeitos da exposição do mercúrio metálico em áreas de produção de ouro. *IESUS* 7, 2 (1998), 35–44.
- [31] CANO, S. E. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. In: Jornada internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal em Iberoamérica. Lima, Perú em <<http://www.gama-peru.org/jornada-hg/espanol.pdf>>, September 2001. Último acesso em julho de 2008.
- [32] CLARKSON, T. W., MAGOS, L., AND GREENWOOD, M. R. The transport of elemental mercury into fetal tissues. *Biol Neonate* 21 (1972), 239–244.
- [33] CROSS, H. J., SMILLIE, M. V., CHIPMAN, J. K., FLETCHER, A. C., LEVY, L. S., SPURGEON, A., FAIRHURST, S., HOWE, A., AD C. NORTHAGE, H. M., AND WRIGHT, A. *Mercury and its inorganic divalent compounds. Criteria document for an occupational exposure limit*. HSE Books, 1995.
- [34] CUSTÓDIO, R., ANDRADE, J. C., AND AUGUSTO, F. O Ajuste de Funções Matemáticas aos Dados Experimentais. *Química Nova* 20, 2 (1997), 219–225.
- [35] DANIELSSON, B. R., FREDRIKSSON, A., DAHLGREN, L., GARDLUND, A. T., OLSSON, L., DENCKER, L., AND ARCHER, T. Behavioral effects of prenatal metallic mercury inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 15, 6 (1993), 391–396.
- [36] DANZER, K., AND CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. *Pure & Applied Chemistry* 70 (1998), 993–1014.
- [37] DE AZEVEDO, F. A. *Toxicologia do mercúrio*. RIMA, 2003.
- [38] DE LIMA RIBEIRO, F. A., AND FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova* 31, 1 (2008), 164–171.
- [39] DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Mercury and Vaccines (Thimerosal). Centers for Disease Control and Prevention em <<http://www.cdc.gov>>, October 2007. Último acesso em maio de 2008.

Referências Bibliográficas

- [40] D'ITRI, F. M. *The Environmental Mercury Problem*. CRC Uniscience Series (USA), Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (USA), 1972.
- [41] DODES, J. E. The amalgam controversy. An evidence-based analysis. *The Journal Of the American Medical Association* 132, 3 (2001), 348–356.
- [42] DRASCH, G., SCHUPP, I., HÖFL, H., REINKE, R., AND ROIDER, G. Mercury burden of human fetal and infant tissues. *Eur J Pediatr* 153, 8 (August 1994), 607–610.
- [43] ECHEVERRIA, D., HEYER, N. J., MARTIN, M. D., NALEWAY, C. A., WOODS, J. S., AND BITTNER, A. C. Behavioral effects of low-level exposure to Hg⁰ among dentists. *Neurotoxicology and Teratology* 17 (1995), 161–168.
- [44] EURACHEM/CITAC GUIDE. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. EURACHEM Working Group, December 1998.
- [45] EURACHEM/CITAC GUIDE. Determinando a incerteza nas medições analíticas. 2. ed. Ellison, S. L. R.; Rosslein, M. and Williams, A., 2002.
- [46] F. PIVETTA. Analysis of mercury in urine performed at CESTEH's laboratory, period 1992-1999. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz em <<http://www.chem.unep.ch/mercury/2001-gov-sub/sub66govatt3.pdf>>, 2002. Último acesso em outubro de 2008.
- [47] FACTOR-LITVAK, P., HASSELGREN, G., JACOBS, D., BEGG, M., KLINE, J., GEIER, J., MERVISH, N., SCHOENHOLTZ, S., AND GRAZIANO, J. Mercury Derived from Dental Amalgams and Neuropsychologic Function. *Environmental Health Perspectives* 111, 5 (2003), 719–723.
- [48] FARIAS, L. Avaliação do conteúdo de mercúrio, metilmercúrio e outros elementos de interesse em peixes e em amostras de cabelos e dietas de pré-escolares da região amazônica. 2006. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- [49] FOWLER, B. A., NORDBERG, M., FRIBERG, L., AND NORDBERG, G. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3. ed. Academic Press, 2007.
- [50] G. A. HAMS. Determination of mercury in blood and urine by Cold Vapor AAS using the VGA-77. AA Instruments at Work. Varian AA-126 em <<https://www.varianinc.com/media/sci/apps/aa126.pdf>>, September 1997. Último acesso em outubro de 2008.
- [51] GLINA, D. M. R., SALUT, B. T. G., AND ANDRADE, E. M. O. A. C. A exposição ocupacional ao mercúrio metálico no módulo odontológico de uma unidade básica de saúde localizada na cidade de São Paulo. *Cadernos de Saúde Pública* 13, 2 (Abril/Junho 1997).
- [52] GRAEME, A. K., AND POLLACK, C. V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *J Emerg Med* 16, 1 (1998), 45–56.
- [53] GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem* 68 (1996), 305A–309A.

Referências Bibliográficas

- [54] GTOSS. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail em 31 de outubro de 2008.
- [55] HALBACH, S. Amalgam tooth fillings and man's mercury burden. *Hum Exp Toxicol* 13, 7 (July 1994), 496–501.
- [56] HARADA, M. Minamata Disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25 (1995), 1–24.
- [57] HAUT, M. W., MORROW, L. A., POOL, D., CALLAHAN, T. S., HAUT, J. S., AND FRANZEN, M. D. Neurobehavioral effects of acute exposure to inorganic mercury vapor. *Appl Neuropsychol* 6, 4 (1999), 193–200.
- [58] HEALTH CANADA. The Safety of Dental Amalgam. Ontario: Health Canada em <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/md-im/applic-demande/pubs/dent_amalgam_e.html>, August 1996. Último acesso em maio de 2008.
- [59] HUBER, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. *Revision 2.01 LC/GC International em* <<http://www.labcompliance.com>> 11 (2001), 22. Último acesso em junho de 2008.
- [60] INKINGURA, J. R., AND AKAGI, H. Methylmercury production in aquatic systems. *Science of Total Environment* 234, 1-3 (1999), 109–118.
- [61] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, Março 2003.
- [62] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia (VIM)*. 3.ed. Portaria INMETRO 029 de 1995. Rio de Janeiro. 75p., 2003.
- [63] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH Topic Q2B (CPMP/ICH/281/95). EMEA em <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/038195en.pdf>>, 1995. Último acesso em junho de 2008.
- [64] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Inorganic Mercury. IPCS INCHEM em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc118.htm>>, 1991. Último acesso em maio de 2008.
- [65] INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, September 2004.
- [66] JAMES B. CALVERT. The lore of mercury, especially its uses in science and engineering. Dr. James Calvert webpage em <<http://mysite.du.edu/~jcalvert/phys/mercury.htm>>, November 2002. Último acesso em outubro de 2008.

Referências Bibliográficas

- [67] JENKE, D. R. Development and validation of an ion-exclusion chromatographic method for the quantitation of organic acids in complex pharmaceutical products. *J Chromatogr Sci* 36, 4 (1998), 179–186.
- [68] JOHNSON, W. W. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por e-mail em 20 de junho de 2008.
- [69] JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. DECISÃO DA COMISSÃO de 12 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, Bruxelas em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:PT:PDF>>, Agosto 2002. Último acesso em outubro de 2008.
- [70] KISHI, R., DOI, R., FUKUCHI, Y., SATOH, T., ONO, A., MORIWAKA, F., ASHIRO, K., AND TAKAHATA, N. Subjective symptoms and neurobehavioral performances of ex mercury miners at an average of 18 years after the cessation of chronic exposure to mercury vapor. *Environ Res* 62, 2 (1993), 289–302.
- [71] KOSAN, C., TOPALOGLU, A. K., AND OZKAN, B. Chronic mercury intoxication simulating pheochromocytoma: Effect of captopril on urinary mercury excretion. *Pediatrics Int* 43, 4 (2001), 429–430.
- [72] LANGWORTH, S., AND STRÖMBERG, R. A case of high mercury exposure from dental amalgam. *Eur J Oral Sci* 104, 3 (June 1996), 320–321.
- [73] LEITE, F. *Validação em Análise Química*. Átomo, 4. ed., 2002.
- [74] LETZ, R., GERR, F., CRAGLE, D., GREEN, R. C., WATKINS, J., AND FIDLER, A. T. Residual neurologic deficits 30 years after occupational exposure to elemental mercury. *Neurotoxicology* 21, 4 (2000), 459–474.
- [75] LOPEZ-COLON, J. L., AND LOZANO, R. Determination of mercury levels in blood and urine of occupationally exposed workers using flow injection with cold vapor AAS. *Atom Spect* 27, 3 (2006), 98–104.
- [76] LUTZ, E., LIND, B., HERIN, P., KRAKAU, I., BUI, T., AND VAHTER, M. Concentrations of mercury, cadmium and lead in brain and kidney of second trimester fetuses and infants. *Trace Elem Med Biol* 10, 2 (June 1996), 61–67.
- [77] MACKERT JR, J. R., AND BERGLUND, A. Mercury exposure from dental amalgam fillings: absorbed dose and the potential for adverse health effects. *Crit Rev Oral Biol Med* 8, 4 (August 1997), 410–436.
- [78] MANDEL, I. D. Amalgam Hazards: an assessment of research. *J Am Dent Assoc* 122, 8 (1991), 62–65.
- [79] MATHIESEN, T., ELLINGSEN, D. G., AND KJUUS, H. Neuropsychological effects associated with exposure to mercury vapor among former chloralkali workers. *Scand J Work Environ Health* 25, 4 (1999), 342–350.

Referências Bibliográficas

- [80] MICARONI, R. C. C. M., BUENO, M. I. M. S., AND JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova* 23, 4 (2000), 487–495.
- [81] MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA E ASSISTÊNCIA SOCIAL (MPAS). Agentes Patogênicos Causadores de Doenças Profissionais ou do Trabalho, Conforme previsto no Art. 20 da L-008.213-1991. Regulamento dos Benefícios da Previdência Social - D-003.048-1999. Anexo II em <http://www.dji.com.br/decretos/1999-003048/anexo_ii.htm>, 1999. Último acesso em outubro de 2008.
- [82] MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA E ASSISTÊNCIA SOCIAL (MPAS). Doenças causalmente relacionadas com os respectivos agentes ou fatores de risco (Denominadas e codificadas segundo a CID-10). Regulamento dos Benefícios da Previdência Social - Anexo II em <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/ldoen_a.asp>, 1999. Último acesso em outubro de 2008.
- [83] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília - DF, 6. ed. em <www.saude.gov.br/svs>, 2005. Último acesso em agosto de 2009.
- [84] MINISTÉRIO DO TRABALHO (MT) - NORMAS REGULAMENTADORAS DE SEGURANÇA E SAÚDE NO TRABALHO. NR-7 - Norma Regulamentadora N° 7, Portaria N 24. Ministério do Trabalho e Emprego. Diário Oficial da União, 0/12 (seção I):21278-21280 em <http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_07.pdf>, Dezembro 1994. Último acesso em outubro de 2008.
- [85] MINISTÉRIO DO TRABALHO (MT) - NORMAS REGULAMENTADORAS DE SEGURANÇA E SAÚDE NO TRABALHO. NR-15 - Atividade e Operações Insalubres. Anexo N 13 - Agentes Químicos. Ministério do Trabalho e Emprego em <http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15_anexo13.pdf>, 1996. Último acesso em outubro de 2008.
- [86] MONNET-TSCHUDI, F., ZURICH, M. G., AND HONEGGER, P. Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat telencephalon. *Brain Res* 741 (1996), 52–59.
- [87] MOREIRA, E. G., VASCONCELLOS, M. B. A., PAIVA, R. P., AND SAIKI, M. Utilização de gráficos de controle para verificação da estabilidade de balanças analíticas e determinação da incerteza associada à pesagem. Congresso Brasileiro de Metrologia - 2003, Recife. Anais do Congresso Brasileiro de Metrologia, Setembro 2003.
- [88] MORETON, J. A., AND DELVES, H. T. Simple direct method for the determination of total mercury levels in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13, 7 (1998), 659–665.
- [89] NALEWAY, C., CHOU, H. N., MULLER, T., DABNEY, J., ROXE, D., AND SIDDIQUI, F. On-site screening for urinary Hg concentrations and correlation with glomerular and renal tubular function. *J Public Health Dent* 51, 1 (1991), 12–17.

Referências Bibliográficas

- [90] NASCIMENTO, E. S., AND CHASIN, A. A. M. *Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos*. 2001.
- [91] NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. SRM 2670a - Toxic Elements in Urine (Freeze-Dried). NIST em <<http://www.nist.gov/srm>>, 2003. Último acesso em agosto de 2009.
- [92] NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. SRM 1641d - Mercury in Water. NIST em <<http://www.nist.gov/srm>>, 2008. Último acesso em agosto de 2009.
- [93] NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Effects and side-effects of dental restorative materials. NIH Technology Assessment Conference on Effects and Side-effects of Dental Restorative Materials, August 26-28, 1991, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *Adv Dent Res* 6 (September 1992), 139–144.
- [94] NBR ISO 9004. Quality management systems – guidelines for performance improvements, 2000.
- [95] NBR ISO/IEC 9000. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário., Dezembro 2000.
- [96] NEWLAND, M. C., WARFVINGE, K., AND BERLIN, M. Behavioral consequences of In Utero exposure to mercury vapor: alterations in lever-press durations and learning in squirrel monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 139, 2 (1996), 374–386.
- [97] NORDBERG, G. F., BRUNE, D., GERHARDSSON, L., GRANDJEAN, P., VESTERBERG, O., AND WESTER, P. O. The ICOH and IUPAC international programme for establishing reference values of metals. *Sci Total Environ* 120, 1/2 (1992), 17–21.
- [98] OIKAWA, T., DA CONCEIÇÃO PINHEIRO, M., VAZ, L. B. F., AND TODA, K. S. Avaliação dos teores de mercúrio na urina dos graduandos de odontologia. *Revista Paraense de Medicina* 21, 3 (2007), 25–29.
- [99] O’CARROLL, R. E., MASTERTON, G., DOUGALL, N., EBMEIER, K. P., AND GOODWIN, G. M. The neuropsychiatric sequelae of mercury poisoning. The Mad Hatter’s disease revisited. *Br J Psychiatry* 167, 1 (1995), 95–98.
- [100] PENDERGRASS, J. C., AND HALEY, B. E. Inhibition of Brain Tubulin-Guanosine 5’-Triphosphate Interactions by Mercury: Similarity to Observations in Alzheimer’s Diseased Brain. *Metal Ions Biol Syst* 34 (1997), 461–478.
- [101] PERKINELMER. Human Health | Environmental Health. PerkinElmer For The Better em <http://www.redemetrologica.com.br/ftp/dados/Downloads/download_53.pdf>, 2009. Último acesso em agosto de 2009.
- [102] PIGATTO, P. D., GUZZI, G., AND PERSICHINI, P. Nummular lichenoid dermatitis from mercury dental amalgam. *Contact Dermatitis* 46, 6 (2002), 355–356.
- [103] PIMENTEL, M. F., AND NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova* 19, 3 (1996), 268–277.

Referências Bibliográficas

- [104] PIVETTA, F., AND CAMPOS, R. C. Métodos de Coleta e Análise de Amostras de Sangue, Urina e Cabelo para Dosagem de Teores de Mercúrio. *Câmara V. de M., (Ed.). Mercúrio em áreas de garimpos de ouro. Metepec, México: Centro Panamericano de Ecologia Humana e Saúde (ECO/OPS), Série Vigilância 12* (1993), 129–136.
- [105] RAMOS, J. P., AND CATIRSE, A. B. E. B. Influência do Tipo de Liga e Momento de Polimento na Dureza Superficial do Amálgama. *JOFA 2*, 1 (2002).
- [106] REDE METROLÓGICA RS. Incerteza de Medição: Guia Prático do Avaliador de Laboratórios. RM 68 em <http://www.redemetrologica.com.br/ftp/dados/rec/DOC_53.pdf>, fevereiro 2009. Último acesso em agosto de 2009.
- [107] RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., AND MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova 27* (2004), 771–780.
- [108] ROELS, H., ABDELADIM, S., CEULEMANS, E., AND LAUWERYS, R. Relationships between the concentration of mercury in air and in blood or urine in workers exposed to mercury vapour. *Annals of Occupational Hygiene 31*, 2 (1987), 135–145.
- [109] ROM, W. N. *Environmental and Occupational Medicine*. Little, Brown & Company, 1992.
- [110] SANDBORGH-ENGLUND, G., ELINDER, C., LANGWORTH, S., SCHÜTZ, A., AND EKSTRAND, J. Mercury in biological fluids after amalgam removal. *J Dent Res 77*, 4 (April 1998), 615–624.
- [111] SCHALLER, K. H. Inorganic mercury. In: Biological monitoring of chemical exposure at the workplace. *World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland* (1996), 132–155.
- [112] SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. Manual de biossegurança no atendimento odontológico. Pernambuco. Secretaria Estadual de Saúde. Divisão Estadual de Saúde Bucal de Pernambuco em <<http://www.cro-rj.org.br/biosseguranca/index.asp>>, 2001. Último acesso em outubro de 2008.
- [113] SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr 987*, 1 (2003), 57–66.
- [114] SHARMA, D. D., AND DAVIS, P. S. Direct determination of mercury in blood by use of sodium borohydride reduction and atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem 25*, 5 (May 1979), 769–772.
- [115] SKARE, I., AND ENGQVIST, A. Human exposure to mercury and silver released from dental amalgam restorations. *Archives of Environmental & Occupational Health 49*, 5 (1994), 384–394.
- [116] SMEYERS-VERBEKE, J., AND BOQUÉ, R. Harmonized advice on method validation. Virtual Institute for Chemometrics and Industrial Metrology (VICIM) em <<http://www.vicim.com/metrology.htm>>, 2000. Último acesso em junho de 2008.

Referências Bibliográficas

- [117] SWARTZ, M. E., AND KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm Technol* 2, 3 (1998), 12–20.
- [118] TAHÁN, J. E., GRANADILLO, V. A., SÁNCHEZ, J. M., CULLIBÁN, H. S., AND ROMERO, R. A. Mineralization of Biological Materials Prior to Determination of Total Mercury by Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8, 7 (1993), 1005–1010.
- [119] TEIXEIRA, P., AND VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Fiocruz, 1. ed., 1996.
- [120] THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., FAJGELJ, A., WILLETTS, P., AND WOOD, R. Harmonized Guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure Appl Chem* em <http://www.iupac.org/publications/pac/1999/71_02_pdf/thompson.pdf> 71, 2 (1999), 337–348. Último acesso em junho de 2008.
- [121] THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., AND WOOD, R. Harmonised guidelines for single laboratory validation of methods of analysis). *Pure Appl Chem* 74, 5 (2002), 835–855.
- [122] TOFFALETTI, J., AND SAVORY, J. Use of sodium borohydride for determination of total mercury in urine by atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* 47, 13 (November 1975), 2091–2095.
- [123] UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals em <<http://www.chem.unep.ch>>, December 2002. Último acesso em maio de 2008.
- [124] UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Dental amalgam: a scientific review and recommended public health service strategy for research, education and regulation. DHHS Public Health Service em <<http://health.gov/environment/amalgam1/ct.htm>>, January 1993. Último acesso em maio de 2008.
- [125] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Mercury Study Report to Congress: An Assessment of Exposure to Mercury in the United States. U.S.EPA em <<http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume4.pdf>>, December 1997. Último acesso em maio de 2008.
- [126] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Procedures for Detection and Quantification. Federal Advisory Committee on Detection and Quantification for Uses in Clean Water Act Programs em <www.epa.gov/waterscience/methods/det/faca/mtg20050929/defintionoptions.html>, September 2005. Último acesso em junho de 2008.
- [127] VERSCHOOR, M. A., HERBER, R. F., AND ZIELHUIS, R. L. Urinary mercury levels and early changes in kidney function in dentists and dental assistants. *Community Dent Oral Epidemiol* 16, 3 (1988), 148–152.
- [128] VESSMAN, J., STEFAN, R. I., VAN STADEN, J. F., DANZER, K., LINDNER, W., BURNS, D. T., FAJGELJ, A., AND MÜLLER, H. Selectivity

Referências Bibliográficas

- in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem em* <<http://media.iupac.org/publications/pac/2001/pdf/7308x1381.pdf>> 73, 8 (2001), 1381–1386. Último acesso em junho de 2008.
- [129] WARFVINGE, K., HUA, J., AND LOGDBERG, B. Mercury distribution in cortical areas and fiber systems of the neonatal and maternal adult cerebrum after exposure of pregnant squirrel monkeys to mercury vapor. *Environ Res* 67, 2 (1994), 196–208.
- [130] WEAST, R. C. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 53. ed., 1972.
- [131] WEINER, J. A., AND NYLANDER, M. An estimation of the uptake of mercury from amalgam fillings based on urinary excretion of mercury in Swedish subjects. *Sci Total Environ* 168, 3 (June 1995), 255–265.
- [132] WELZ, B., AND SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-VCH, 3. ed., 1999.
- [133] WHITE, R. F., FELDMAN, R. G., MOSS, M. B., AND PROCTOR, S. P. Magnetic resonance imaging (MRI), neurobehavioral testing, and toxic encephalopathy : two cases. *Environ Res* 61, 1 (1993), 117–123.
- [134] WINDHAM, B. Dental Mercury Toxicity and Health effects. Mercury Exposure em <http://mercuryexposure.org/index.php?article_id=67>. Último acesso em maio de 2009.
- [135] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mercúrio (Criterios de salud ambiental), n.1). WHO. Genebra, 178 p., 1978.
- [136] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Limites de exposición profesional a los metales pesados que se recomiendan por razones de salud. WHO. Genebra, p. 110-24. Série de Informes Técnicos, 647, 1980.
- [137] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mercury in Health Care. WHO, September 2005.
- [138] YOSHIDA, M. Relation of mercury exposure to elemental mercury levels in the urine and blood. *Scand J Work Environ Health* 11, 1 (1985), 33–37.
- [139] ZALUPS, R. K. Renal accumulation and intrarenal distribution of inorganic mercury in the rabbit: Effect of unilateral nephrectomy and dose of mercuric chloride. *J Toxicol Environ Health* 33, 2 (1993), 213–228.
- [140] ZAVARIZ, C., AND GLINA, D. M. R. Efeitos da exposição ocupacional ao mercúrio em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada em Santo Amaro, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro* 9, 2 (1993), 117–129.
- [141] ZIMMER, H., LUDWIG, H., BADER, M., BAILER, J., EICKHOLZ, P., STAEHLE, H. J., AND TRIEBIG, G. Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205, 3 (2002), 205–211.