

	<p style="text-align: center;">MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE</p>
---	--

Nota Técnica nº 17/2018/CTBio/DIBIO/ICMBio

Vitória-ES, 03 outubro de 2018

Assunto: Análise de solicitação de substituição do método de análise em material biológico

1. DESTINATÁRIO

Comitê Interfederativo – CIF.

2. INTERESSADO

Fundação Renova

3. REFERÊNCIA

Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta - TTAC, celebrado entre União, estados de Minas Gerais, Espírito Santo e as empresas Samarco Mineração S/A, Vale S/A e BHP Billiton Brasil LTDA. Cláusulas 164, 165, 166, 167, 168, 181 e 182;

Notificação IBAMA nº 678322-E, de 03/12/2015, Processo SEI IBAMA 02009.001474/2015-17.

Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO (SEI 0013955);

Plano de Trabalho Avaliação dos Impactos e Monitoramento da Fauna e Flora Terrestre nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo (SEI 02001.001896/2018-05);

Processo de solicitação de autorização para realização de captura, coleta e transporte de fauna silvestre para execução do Plano de Trabalho para Avaliação de Impactos e Monitoramento da Fauna e Flora nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (SEI 02001.001896/2018-05);

Autorização de Captura, Coleta e Transporte de Material Biológico n.º 6/2018-CGBIO/DBFLO (SEI 3102359);

Ofício RENOVA OFI.NII.122017.1879, de 23 de agosto de 2018 (SEI 3196892);

PG-030 – Programa de Conservação da Fauna e Flora Terrestre. Definição do Programa – Etapa 3. FM-GPR-001 Rev. 01 (SEI 2454418);

Brandão, P. A. A. 2015. *Determinação de estanho em tecidos de ratas por ICP – MS*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.

Nunes, J. A. 2009. *Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP – MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Souza, R. M. 2007. *Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Elementos – Traços em Amostras Oleosas e Pastosas por ICP OES e ICP – MA*. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

4. FUNDAMENTAÇÃO/ANÁLISE TÉCNICA/PARECER

A Fundação Renova submeteu à CT-BIO/CIF, em 23 de agosto de 2018, o Ofício OFI.NII.122017.1879 (SEI 3196892) onde que encaminha o documento intitulado “*Análises de Metais em Bioindicadores Ambientais pela Técnica de ICP-OES/ICP-MS ou Fluorescência Atômica*” o qual apresenta argumentação para requerer substituição do método para análise da determinação de metais e arsênio em material biológico aprovado pelo Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO (SEI 0013955), processo IBAMA 02009.001474/2015-17.

O referido Parecer Técnico determina que, para quantificação de metais e arsênio nas amostras de material biológico, deverá ser utilizado o método: espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado (HR-CS-AAS; ContrAA 700 Analytik Jena, Alemanha), conforme descrito no Anexo 1 do Termo de Referência 4, com as amostras analisadas em triplicata.

Contudo, Fundação argumentou através de sua Contratada Bicho do Mato Meio Ambiente, que após rigorosa avaliação, a metodologia proposta não forneceria com acurácia necessária e esperada a resposta apresentada pela flora e fauna frente ao EVENTO, incluindo os aspectos relacionados à bioacumulação e biomagnificação de elementos traços e ultratraços de metais, sendo necessário a substituição do método por outro de eficácia superior e que atenda a premissa de acreditação pelo INMETRO, especialmente na matriz bioindicadores ambientais.

Diante do exposto, para atender de maneira mais eficiente e segura às exigências do Plano de Trabalho, a Fundação Renova sugere e solicita alteração para os métodos de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

A Fundação esclarece ainda que a Contratada chegou a essa conclusão, devidamente detalhada no documento encaminhado pelo Ofício supracitado, após disparar consultas às Universidades públicas e diversos laboratórios particulares.

Além disso, a RENOVA destaca que as Universidades onde seriam possíveis a utilização do método de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado, não se dispuseram a receber o material, seja por falta de tempo para atender a demanda, ou por não poderem conduzir as análises devido ao fator de credenciamento, uma vez que a universidade não possui certificação por ISO ou pelo INMETRO, ou mesmo, por falta de interesse.

Em relação à importância destas análises serem conduzidas por laboratório acreditado pelo INMETRO, compreende-se de que a acreditação confere qualidade, credibilidade e validade aos ensaios, bem como garante a rastreabilidade dos mesmos. Desta forma, no que concerne à realização das análises por laboratório acreditado, o posicionamento é de que preferivelmente, tais estudos sejam realizados por laboratório competente cujo escopo de acreditação abarque as análises supracitadas.

Já os laboratórios particulares, retornaram com a informação de que os métodos de ICP-OES, ICP-MS e da fluorescência atômica para a quantificação dos elementos traços e ultratraços de metais, são técnicas comprovadamente adequadas para a correta detecção e quantificação dos metais, tanto quanto a HR-CS-AAS. Essa última, contudo, não disponível em nenhum laboratório acreditado no Brasil.

No documento encaminhado através do Ofício supracitado, a Fundação apresenta comparações entre os métodos definidos no Plano de Trabalho e o método proposto, adverte sobre a importância da compatibilidade com as análises de solo, que serão feitas por ICP-OES e ICP-MS, e elenca uma série de pontos que devem ser considerados para a tomada de decisão sobre o método mais adequado, do ponto de vista da acreditação, e conclui que as análises devem ser realizadas com acreditação na matriz bioindicadores, utilizando as metodologias: ICP-OES e ICP-MS.

Alguns desses pontos citados no parágrafo anterior foram extraídos do texto e destacados abaixo:

- *A acreditação de um laboratório se configura como uma ferramenta utilizada em escala internacional para gerar confiança dos laudos e das análises;*
- *Qualidade garantida pelo CGCRE (Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO) quanto à qualidade, credibilidade e validade do serviço perante órgãos importantes (nacionais e internacionais);*
- *A norma utilizada pela INMETRO é a mesma utilizada mundialmente: ABNT NBR ISO/IEC 17025;*
- *Relatório de ensaio possível de rastreabilidade;*
- *Certificado de calibração;*
- *Processo de avaliação único, transparente e reproduzível;*
- *Devido à visibilidade internacional do projeto em questão e do impacto associado a este, é importante que análises como estas tenham acreditação do INMETRO;*
- *Não há no Brasil, legislação aplicada para nenhum laboratório acreditado pelo método HR-CS-AAS para bioindicadores, somente para os métodos de ICP-OES e ICP-MS;*
- *No Plano de Trabalho e no Parecer Técnico, consta que as análises de metais-traço em amostras vegetais e animais deverão ser comparadas com as amostras de solo, não sendo adequado a utilização de metodologias diferentes – a comparabilidade não seria eficaz;*
- *Os materiais de referência (DORM-4 e tecido de mexilhão) aprovam técnicas de análise de elementos traço, tais como ICP-OES e ICP-MS, que são adequadas para correta quantificação, tanto quanto a HR-CS-AAS, não representando esta troca uma perda na qualidade, mas a elevação da eficiente e da comparação do meio biótico com o meio físico (solo).(sic).*

Como informado no item 2 do OFI.NII.082018.3715 (Técnicas ICP-OES, ICP-MS e de Fluorescência Atômica), a escolha da melhor técnica de detecção e quantificação de elementos traços deve ser pautada no problema analítico e como este deve ser resolvido. Além disso, para a escolha de um sistema, é importante entender não só a aplicação, mas também os pontos fortes e fracos de cada técnica instrumental. Tendo em vista o exposto, após análise dos questionamentos arrolados no documento, destaca-se que foram avaliados os seguintes pontos a respeito de cada método a fim de sustentar a resposta à solicitação de substituição da metodologia:

1. Sensibilidade de detecção e quantificação dos elementos;
2. Quantidade de amostra necessária (levando em consideração o esforço de obtenção das amostras de material biológico);
3. Confiabilidade do equipamento/metodologia.

Diante da demanda, essa discussão metodológica foi pautada na 26ª Reunião Ordinária da CT-BIO/CIF, ocorrida nos dias 04 e 05 do mês de setembro na sala Multimídia da Fundação Renova em Belo Horizonte, com a participação, por videoconferência, do Professor Dr. Adalto Bianchini, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Rio Grande (FURG), o qual foi bastante enfático ao se posicionar quanto à efetividade e acurácia do método de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado (HR-CS-AAS).

Segundo o Professor Dr. Adalto, o método HR-CS-AAS apresenta uma maior sensibilidade para quantificação de metais, em comparação ao método proposto pela Fundação. E ao ser mencionado, em reunião, a utilização de metodologias diferentes na determinação de metais em matrizes distintas (sedimento, água e material biológico), ele relatou a possibilidade de calibrar os dados e assegurar a comparabilidade dos resultados obtidos nos diferentes métodos. Entretanto, o Professor considerou que as técnicas de ICP-OES e ICP-MS permitem analisar um número maior de amostras em um tempo mais curto, ao contrário da técnica HR-CS-AAS, utilizada por ele, a qual analisa um único elemento por vez, sendo necessárias multianálises de uma mesma amostra para a determinação de cada um dos metais alvo o que, por experiência do professor, a torna mais sensível.

O Professor destacou que o laboratório da FURG possui dois equipamentos para rodar a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite acoplado (HR-CS-AAS), onde são trabalhadas as amostras coletadas para o monitoramento ecotoxicológico dos impactos causados pelo EVENTO nos ecossistemas dulcícolas, estuarinos e costeiros, e que um terceiro equipamento está sendo providenciado pela Fundação Renova.

Diante do exposto, o Professor afirmou que, caso seja acatada a opção das técnicas metodológicas alternativas requeridas pela Fundação Renova, é crucial que seja adotada para a fauna terrestre apenas o método de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), devido à maior sensibilidade desse método em comparação ao espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

Na 4ª Reunião Extraordinária - CTBIO/CIF, ocorrida em Vitória/ES, nos dias 25 e 26 de setembro de 2018, o representante da Fundação Renova, senhor Bruno Pimenta, levantou a possibilidade de orientar a sua Contratada que faça uma cotação junto à Universidade do Rio Grande (FURG).

5. CONCLUSÃO E/OU PROPOSIÇÃO

A partir da análise técnica de cada metodologia, foi possível compreender que a espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é a técnica mais atual, e segundo Brandão (2015), tem sido amplamente utilizada para análises de amostras biológicas, oferecendo baixos níveis de detecção, alta sensibilidade, capacidade multielementar e seletividade quando comparada a outras técnicas como de espectrometria de absorção atômica (AAS) e ICP – OES. Além disso, o estudo de Souza (2007), também assente que os limites de detecção são geralmente muito menores do que em ICP-OES, e certos elementos podem ser detectados ao nível de ng L⁻¹.

De acordo com Nunes (2009), que realizou análises de elementos traços em material biológico por meio da técnica de ICP – MS, esta técnica é exata e precisa, e que devido a sua ampla faixa linear de calibração e excelente sensibilidade, possibilita a determinação dos elementos de interesse nutricional – toxicológico no plasma e sangue na faixa de 0,1 a 1000 µg L⁻¹, com elevada taxa de amostragem. Cabe ressaltar ainda, que devido às baixas concentrações em fluidos biológicos, muitos elementos químicos essenciais ou tóxicos só podem ser detectados e quantificados nestas matrizes com utilização desta técnica. O estudo de Nunes (2009), traz ainda informações de limites de detecção de alguns elementos químicos, conforme Tabela 1.

Em relação a importância destas análises serem realizadas por laboratório acreditado pelo INMETRO, compreende-se de que a acreditação confere qualidade, credibilidade e validade aos ensaios, bem como garante a rastreabilidade dos mesmos. Desta forma, no que concerne à realização das análises por laboratório acreditado, o posicionamento é de que preferivelmente, tais estudos sejam realizados por laboratório competente cujo escopo de acreditação abarque as análises supracitadas.

Tabela 1: Limites de detecção dos elementos químicos As, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Se, Ti, Zn, em plasma, pelas técnicas ICP – MS, GF-AAS (Absorção atômica com forno de grafite) e ICP – OES em µg/L⁻¹. Adaptado de Nunes (2009).

Elemento	ICP – MS (µg/L ⁻¹)	GF AAS (µg/L ⁻¹)	ICP – OES (µg/L ⁻¹)
As	0,05	1	20
Al	0,01	0,5	3
Cd	0,01	0,03	3
Co	0,005	0,5	10
Cr	0,005	0,15	10
Cu	0,01	0,5	5
Li	0,02	0,5	991
Mn	0,005	0,06	0,5
Ni	0,005	0,5	10
Pb	0,005	1	20
Se	0,1	1	50
Ti	0,01	1,5	30
Zn	0,02	0,01	1

Todavia, ressalta-se que a metodologia de ICP – MS apresenta algumas interferências que podem provocar ruído na leitura, essas interferências podem ser: **a)** Não espectrais: como viscosidade, tensão superficial, pH, teor de sólidos dissolvidos etc; **b)** Espectrais: espécie com a mesma relação massa/carga que o analito de interesse.

Em análises de amostras mais complexas, problemas relacionados com interferências da matriz (espectrais e não-espectrais) podem ser minimizados com a otimização do procedimento de preparação da amostra e uso de métodos apropriados para introdução da amostra e dos padrões.

Isto posto, considerando a importância primordial da acurácia das análises e a importância de assegurar a integridade dos resultados assim como a sua credibilidade perante a comunidade científica e órgãos nacionais e internacionais.

Considerando a Notificação IBAMA nº 678322-E, considerando o Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO o qual remete ao Anexo 1 do Termo de Referência 4 para estabelecer o método a ser utilizado para a quantificação de metais e arsênio nas amostras de material biológico.

Considerando as perguntas que esperamos ver respondidas, neste particular, os subitens da Questão 4 do Parecer Técnico nº 1/2017-COREC/CGBIO/DBFLO:

1. *Qual o impacto do evento sobre as espécies da fauna terrestre e aquática?*
2. *Houve acumulação de metais nas diferentes espécies e no solo?*
3. *Até qual distância do rio Doce a acumulação de metais foi observada?*
4. *Como os metais estão circulando nas cadeias?*
5. *Como as taxas de ocupação das diferentes espécies são afetadas pela distâncias de rios, bordas, estradas ou ferrovias, e aspectos físicos e químicos?*

Considerando, por fim, ser imprescindível que as análises sejam feitas com exatidão, clareza e robustez;

Opinamos pelo deferimento da solicitação de substituição da metodologia de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite para a técnica de ICP – MS para as análises dos metais, com exceção do mercúrio, observando que:

1. Esse método deve ser executado com equipamento de alta resolução, ou que disponha de mecanismos para contornar interferências garantindo a confiabilidade da análise;
2. O técnico responsável pelas análises deve observar atentamente a natureza das amostras a fim de reduzir possíveis interferências.
3. As amostras devem ser abertas preferencialmente utilizando técnicas com fornos de micro-ondas.

Com relação à metodologia para análise de mercúrio, destaca-se que a técnica de vapor a frio gera hidretos do metal o que aumenta substancialmente a sensibilidade de detecção deste elemento, desta forma, orienta-se manter a análise por esta técnica.

Fica condicionada a aprovação da mudança de metodologia à construção e apresentação à CTBIO de um reporte técnico contendo metodologia de análise para cada elemento, individualmente, constando referência metodológica e justificativa para escolha da mesma bem como das linhas de emissão ou relação m/z utilizada para a detecção da amostra e limite de detecção e quantificação da amostra.



Documento assinado eletronicamente por **Thatiana Cappi da Costa, Usuário Externo**, em 03/10/2018, às 19:46, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Guimarães Diniz, Usuário Externo**, em 04/10/2018, às 17:03, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **VINICIUS ANDRADE LOPES, Usuário Externo**, em 05/10/2018, às 08:53, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Joao Carlos Alciati Thome, Coordenador CTBIO**, em 05/12/2018, às 15:16, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **3958573** e o código CRC **E4222523**.