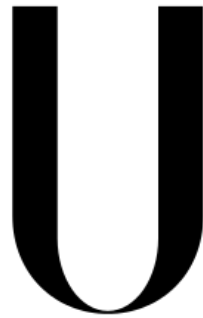


FACULDADE DE FARMÁCIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Avaliação da exposição da população portuguesa ao
metilmercúrio por consumo de pescado proveniente dos
grandes mercados fornecedores**

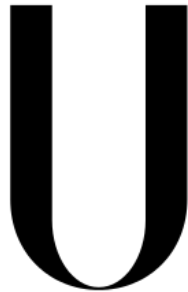
Luciana Marina Pires dos Santos

Dissertação

MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2015

FACULDADE DE FARMÁCIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Avaliação da exposição da população portuguesa ao
metilmercúrio por consumo de pescado proveniente dos
grandes mercados fornecedores**

Luciana Marina Pires dos Santos

Dissertação orientada pela Prof^ª Doutora Cristina
Maria Leitão de Carvalho, Professora Associada da
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa,
elaborada para a obtenção do grau de Mestre em
Controlo de Qualidade e Toxicologia.

2015

Em memória ao meu pai

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Cristina Carvalho, pela sua paciência e sentido crítico. Pelo incentivo à excelência cuja transmissão de motivação possibilitou a tinta nestas páginas.

Aos alunos de doutoramento e post-doc do grupo de toxicologia, Neusa Figueiredo e Vasco Branco, por me terem recebido de braços abertos e estarem sempre disponíveis.

À gestão de topo do Laboratório de Medicina Veterinária por ter permitido a conciliação de meu horário laboral com a presença no mestrado assim como às minhas colegas de trabalho pelo apoio.

À minha mãe por me ter possibilitado tempo e à minha irmã por ter disponibilizado minha mãe.

Ao meu marido Renato e a meus filhos Guilherme e Giselle.

RESUMO

A principal via de exposição ao metilmercúrio é a alimentação, nomeadamente devido ao consumo de peixe e produtos de pesca. Os portugueses, por serem os terceiros maiores consumidores mundiais de peixe, são uma população a considerar na avaliação de risco. Para avaliar a exposição da nossa população ao metilmercúrio através do consumo de pescado, foram analisadas 162 amostras de peixe adquiridas em grandes cadeias de distribuição alimentar, com ênfase para as espécies mais apreciadas tais como sardinhas, bacalhau, atum e salmão. Analisou-se o mercúrio total e considerou-se que todo o mercúrio presente se encontrava sob a forma de metilmercúrio.

Validaram-se duas técnicas analíticas distintas, por espectrofotometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS) e por amalgamação/ espectrofotometria de absorção atômica com combustão direta da amostra (A-AAS) com o analisador direto de mercúrio AMA 254 da Leco. O CV-AFS é um método muito específico e sensível mas o A-AAS foi eleito para analisar as amostras por ser mais expedito e não requerer uma mineralização prévia da amostra. O CV-AFS apresentou um z-score de -1,3 e o A-AAS de 1,6 na análise do material de referência certificado BCR 463.

Com base na avaliação da exposição alimentar, efetuada com as concentrações de mercúrio total obtidas experimentalmente (espécies mais consumidas) e estimativa de quantidades ingeridas semanalmente, foi calculado o Índice de Risco (IR) para diferentes faixas etárias. Calculou-se o IR para a dose de referência para exposição oral crónica (RfD) da agência americana para a proteção ambiental (EPA) de 0,1 µg/kg peso corporal/dia e para o valor adotado pela EFSA como dose tolerável semanal (DTS) de 1,3 µg/kg peso corporal/semana. Para consumos elevados de peixe, todas as classes etárias apresentam níveis de risco superiores a 1 para ambos os DTS considerados, com exceção dos lactentes cujo IR com o DTS da EFSA é 0,5. Para consumos médios, encontram-se igualmente em risco as crianças e adolescentes. Os índices mais elevados apurados são de crianças atingindo 3,2 para o DTS da EFSA e 5,9 com o da EPA, quando existe um consumo de 7 refeições de peixe numa semana. No entanto, se uma criança ingerir numa semana uma refeição de pescada e outra de peixe de espada preto atinge um índice de 3,2 com o

DTS da EFSA, equivalente ao de 7 refeições das espécies mais consumidas pela população portuguesa. A preocupação é acrescida para bebés e crianças por serem mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos do metilmercúrio. Porém, o consumo de peixe não deve ser evitado porque este possui nutrientes essenciais, tais como selénio e ácidos gordos ómega 3. A opção das populações deverá recair sobre peixes com pouco mercúrio tais como o salmão, sardinha e dourada e evitar predadores como o peixe de espada e atum fresco.

ABSTRACT

The main exposure route of methylmercury is fish consumption. The Portuguese population is the third largest fish consumer in the world therefore a population to assess risk exposure to methylmercury. To evaluate the exposure, 162 samples of diverse fish species among the most appreciated such as sardines, cod-fish, tuna and salmon, commercially available throughout the Portuguese large food chain distributors, were analyzed for total mercury. It was assumed that all mercury present in the samples was in the form of methylmercury.

Two different techniques were validated, cold vapor atomic fluorescent spectroscopy (CV-AFS) which is a highly specific and sensitive technique and atomic absorption spectrophotometry with direct combustion (A-AAS) (direct mercury analyzer AMA 254 from Leco) which was chosen to analyze the samples for there is no need of a previous digestion or elution. By using the certified reference material BCR 463 for CV-AFS the value of z-score was -1.3 and for A-AAS the value was 1.6.

Based on the estimation of the exposure, risk characterization was made by calculating the Risk Index (IR) for different age stratum of Portuguese's population. The IR was calculated with the reference dose for chronic oral exposure (RfD) of the US Environmental Protection Agency which is $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day and the provisional tolerable weekly intake PTWI of $1.3\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/week from the European Food Safety Authority (EFSA).

For high fish consumption levels, all age classes have an index of risk higher than 1 for any of the PTWI considered, except babies with the $\text{IR} = 0.5$ for EFSA's PTWI. For a medium consumption, only children and teenagers are at risk. The highest indexes were estimated for children reaching 3.2 with EFSA's PTWI and 5.9 with EPA's, considering the consumption of 7 meals of fish per week. On the other hand, if a child eats in one week a meal of hake and another of black scabbard fish, the IR reaches 3.2 with EFSA's PTWI, the same as the IR as for 7 fish meals of the most consumed (prey) species by the portuguese population. For babies and young children there is great concern due to their sensitivity to methylmercury's neurotoxicity.

Fish has essential micronutrients such as selenium and omega-3, therefore it's consumption should not be reduced. To minimize the risk, populations should prefer non-predator fishes like salmon, sardines and bream, avoiding predator species such as scabbard fish and fresh/frozen tuna.

ÍNDICE

Agradecimentos	
Resumo	i
Abstract.....	iii
Índice de ilustrações	viii
Índice de tabelas	x
Abreviaturas.....	xii
1 Introdução.....	1
1.1 Mercúrio – Origem e Especificação.....	1
1.2 Toxicidade.....	3
1.3 Toxicocinética: Absorção oral, Distribuição, Metabolização, Excreção	5
1.4 Consumos de peixe e grupos de risco	6
1.5 Teores máximos nos géneros alimentícios e doses toleráveis de ingestão	7
2 Metodologia da Investigação	11
2.1 Objetivos	11
2.1.1 Objetivo geral	11
2.1.2 Objetivos específicos	11

2.2	Caraterização das amostras	12
2.3	Métodos de análise de mercúrio	13
2.3.1	Espectroscopia de fluorescência atômica com vapor frio: CV-AFS	13
2.3.2	Analizador direto de mercúrio: A-AAS.....	15
2.4	Método Experimental CV-AFS	17
2.4.1	Mineralização de amostras em vasos de Teflon	17
2.4.2	Método de Quantificação do Mercúrio total por CV – AFS	18
2.4.3	Método Experimental do analisador direto de mercúrio (A-AAS)	21
2.5	Validação de métodos	21
2.6	Cálculo dos Índices de risco	22
3	Resultados e discussão	26
3.1	Validação de método para análise de mercúrio por Espectrofotometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio (CV-AFS)	26
3.1.1	Especificidade/seletividade	26
3.1.2	Gama de trabalho.....	27
3.1.3	Linearidade	29
3.1.4	Limites de Detecção e Quantificação	31
3.1.5	Precisão.....	33
3.1.6	Exatidão	35
3.1.7	Incerteza.....	36

3.2	Validação de método para análise de mercúrio com Analisador Direto de Mercúrio (A-AAS)	39
3.2.1	Precisão.....	40
3.2.2	Exatidão.....	41
3.3	Seleção do método analítico	42
3.4	Concentrações de mercúrio nas amostras de peixe.....	44
3.5	Avaliação da exposição ao metilmercúrio e caracterização do risco	49
4	Conclusões	58
5	Sugestões de trabalho futuro	60
6	Bibliografia.....	61
ANEXO 1 – Resultados detalhados da análises de peixe realizadas por CV-AFS		I
ANEXO 2 – Resultados detalhados das análises de peixe realizadas com A-AAS		VIVIII
ANEXO 3 – Tratamento estatístico.....		XV
ANEXO 4 – Certificado do Material de referencia.....		XXII
ANEXO 5 – Analisador de mercúrio AMA 254		XXXXV

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo Biogeoquímico do mercúrio	2
Figura 2: Ciclo do mercúrio com origem antropogénica.....	3
Figura 3: Esquema do CV-AFS.....	14
Figura 4: Esquema do detetor de fluorescência do CV-AFS.....	14
Figura 5: Esquema interno do analisador direto de mercúrio AMA-254.	16
Figura 6: Analisador de Mercúrio AMA 254 e respetiva montagem.	16
Figura 7: Digestor Ethos 1 da Milestone, vasos de digestão e <i>software</i>	18
Figura 8: Curva de crescimento do peso de lactentes (sexo masculino).	24
Figura 9: Curva de crescimento de peso de crianças e jovens (sexo masculino)	25
Figura 10: Gráfico do ajuste linear aos pontos de calibração e equação de reta para cálculo dos pontos com interpolação linear.....	30
Figura 11: Gráfico do ajuste não linear aos pontos de calibração e equação da curva para cálculo dos pontos com interpolação não linear	31
Figura 12: Concentração de mercúrio do MRC (BCR 463) analisada por A-AAS obtidos em dias diferentes	42
Figura 13: Comparação dos níveis de Hg do MRC em mg/kg dos dois métodos analíticos estudados.	43
Figura 14: Concentrações de Hg por espécie de peixe determinadas em amostras com o equipamento AMA 254	45
Figura 15: Comparação de resultados de mercúrio obtidos no A-AAS e CV-AFS.	46
Figura 16: Comparação dos valores analisados com os valores médios reportados pela EFSA...47	

Figura 17: Comparação dos valores máximos por espécie de peixe obtidos com o seu respectivo limite legal48

Figura 18: Representação gráfica dos índices de risco calculados para cada faixa etária tendo por base os valores de DTS propostos pela EPA e EFSA, e considerando para a população consumos: baixo, médio e alto de pescado.....54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do mercúrio	1
Tabela 2: Consumos <i>per capita</i> de peixe e produtos de peixe nos países mediterrânicos da União.	6
Tabela 3: Teores máximos admissíveis de mercúrio em diferentes produtos de pesca expressos em mg/kg de peso fresco.	8
Tabela 4 : Valores de DTS propostos por várias agências reguladoras.....	9
Tabela 5: Caraterização das amostras analisadas.	12
Tabela 6: Taxas de recuperação médias de fortificações efetuadas antes da digestão em duplicados independentes ao longo da gama de trabalho.	27
Tabela 7: Leituras obtidas no CV-AFS com padrões da curva de calibração	28
Tabela 8: Dados para o cálculo do valor teste. (Teste de Mandel).....	30
Tabela 9: Dados utilizados para o cálculo do limite de deteção (LD).....	32
Tabela 10: Leituras (L) do padrão de 50 µg/L para avaliar a precisão.....	34
Tabela 11: Determinação do teor de humidade do MRC	35
Tabela 12: Concentrações de MRC obtidas em condições de precisão intermédia e respetivos erros relativos.	35
Tabela 13: Amplitude média de duplicados para cálculo da componente da precisão.	37
Tabela 14: Concentrações de Hg obtidas no MRC para o cálculo da componente da exactidão. .	38
Tabela 15: Concentrações lidas a partir de padrão de 0,5mg/L por A-AAS para avaliar a precisão	40
Tabela 16: Leitura da concentração do MRC em mg/kg para a valiação da exatidão.	41

Tabela 17: Comparação de alguns parametros de validação de ambos os métodos analíticos: CV-AFS e A-AAS.....	43
Tabela 18: Concentrações de mercúrio nas amostras de peixe por A-AAS expressas em mg/Kg.	44
Tabela 19: Dados do peso corporal considerado e quantidade de peixe ingerido por faixa etária.	49
Tabela 20: Número de refeições semanais consoante o tipo de consumo: baixo, médio e elevado	50
Tabela 21: Estimativa da quantidade de mercúrio ingerida por semana consoante o número e tipo de refeições de peixe consumidas.....	51
Tabela 22: Dose de ingestão semanal (DSI) consoante o consumo para a respetiva faixa etária.	52
Tabela 23: Índices de Risco calculados com base nos valores de DTS propostos pela EPA e pela EFSA para várias faixas etárias e diferentes consumos de peixe.	53
Tabela 24: Índices de risco calculados utilizando os valores propostos como seguros (DTS) pela EPA e pela EFSA para consumo elevado e consumo baixo considerando o consumo de uma espécie de peixe com maior concentração de MeHg numa das refeições (consumo baixo* e consumo elevado**).	55

ABREVIATURAS

A-AAS – espectrofotometria de absorção atômica com amalgamação e combustão direta da amostra

AAS –espectrometria de absorção atômica (*AtomicAbsorptionSpectroscopy*)

AMA ou AMA 254– analisador direto de mercúrio da Leco

ATSDR-*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

AU–unidades arbitrárias

CH₃Hg - metilmercúrio

CH₃HgCH₃ –dimetilmercúrio

C_{MRC} – concentração de mercúrio do material de referência certificado

C_{obs} – media das concentrações de mercúrio observadas

CV-AFS – espectrofotometria de fluorescência atômica com vapor frio ou *Cold Vapour* – *Atomic Fluorescence Spectrometry*

CV_r – coeficiente de variação de repetibilidade

DGS – Direção Geral de Saúde

DS²–diferença das variâncias

DSI– dose média semanal ingerida

DTS– dose tolerável para ingestão semanal

EC-JRC-IRMM – Instituto de Referencia de Materiais e Medidas da Comissão Europeia, (*Institute of Reference of Materials and Measures of the European Commission*)

EFSA– Autoridade Europeia da Segurança Alimentar, (*European Food Safety Agency*)

F – valor tabelado F de Fisher / Snedecor

Hg– mercúrio

Hg– mercúrio

Hg⁺¹– estado monovalente do mercúrio ou mercúrio mercurioso

Hg⁺²– estado bivalente do mercúrio ou mercúrio mercúrico

Hg⁰– estado elementar do mercúrio

INE– Instituto Nacional de Estatística

IR–Índice de Risco

JECFA– Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

K – constante utilizada no cálculo do LD e LQ
L – leitura
LD – limite de detecção
LI – Limite inferior do intervalo de incerteza certificado do MRC
LQ – limite de quantificação
LS -- Limite superior do intervalo de incerteza certificado do MRC
MeHg – CH_3Hg^+ - metilmercúrio
MRC ou BCR – material de referência certificado
OMS – Organização Mundial de Saúde
ppb – parte por bilhão ou $\mu\text{g}/\text{kg}$
ppm – parte por milhão ou $\mu\text{g}/\text{g}$ ou mg/kg
PTWI - provisional tolerable weekly intake
R – coeficiente de correlação
r – limite de repetibilidade
R1; R2; R3 – válvulas redutoras de pressão, fluxómetros
RfD – dose de referência de exposição crônica oral, (*reference dose for chronic oral exposure*)
 $S^2_{y/x}$ – desvio-padrão residual
 S^2_{y2} – desvio padrão residual não linear
 S_{obs} – desvio padrão da série de análises efetuadas
 S_{ri} – desvio padrão da repetibilidade
t – t-student, valor tabelado utilizado em cálculos estatísticos
 $u(\text{CMRC})$ – incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC
US EPA – Agencia Americana para a Proteção Ambiental, (*United States Environmental Protection Agency*)
Var ou S_i^2 – variância
VT – valor de teste
 \bar{X}_0 – média aritmética de uma série de brancos
Z – Z-score, um fator de desempenho
 σ_0 – desvio padrão associado a X_0 .
 \bar{R}_m – recuperação média do método

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio – Origem e Especificação

O mercúrio é um elemento da crosta terrestre, estando presente no solo em concentrações da ordem de 0,5 mg/kg e na água do mar cerca de 0,03mg/dm³ (UNEP, 2002). Nas rochas é encontrado principalmente em cinnabar sob a forma de sulfureto de mercúrio (HgS). A rocha, quando aquecida, liberta o mercúrio em forma de vapor. As fontes naturais de libertação de mercúrio são atividade vulcânica e emissões gasosas e erosão da crosta terrestre (Yu, 2005).

O mercúrio é o único metal que no seu estado elementar se encontra no estado líquido à temperatura ambiente e isto deve-se às suas propriedades físico-químicas. (ver Tabela1).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do mercúrio (Encyclopedia Britannica, 2012)



Símbolo:

Hg

Número atômico:

80

Massa atômica:	Tabela periódica:	Ponto de fusão:
200,59	Grupo 12 e período 6	-38,87 °C (-37,97 °F)
Ponto de ebulição:	Configuração eletrônica:	Estrutura cristalina:
356,9 °C (674 °F)	2-8-18-32-18-2 ou (Xe)4f145d106s	romboédrica

Porém, na natureza, o mercúrio raramente se encontra no seu estado elementar (Hg^0), encontramos-lo mais frequentemente em sais ou ligado a compostos na forma monovalente (Hg^{+1}) ou bivalente (Hg^{+2}). (UNEP, 2002).

Em meios marinhos e terrestres, o mercúrio inorgânico sofre metilações, transformando-se em espécies orgânicas de mercúrio sendo a mais abundante o metilmercúrio (CH_3Hg^+) (Figura 1). As espécies orgânicas de mercúrio são mais tóxicas do que as suas formas inorgânicas devido à sua maior facilidade de absorção e bioacumulação nos organismos vivos (IUPAC, 1998).

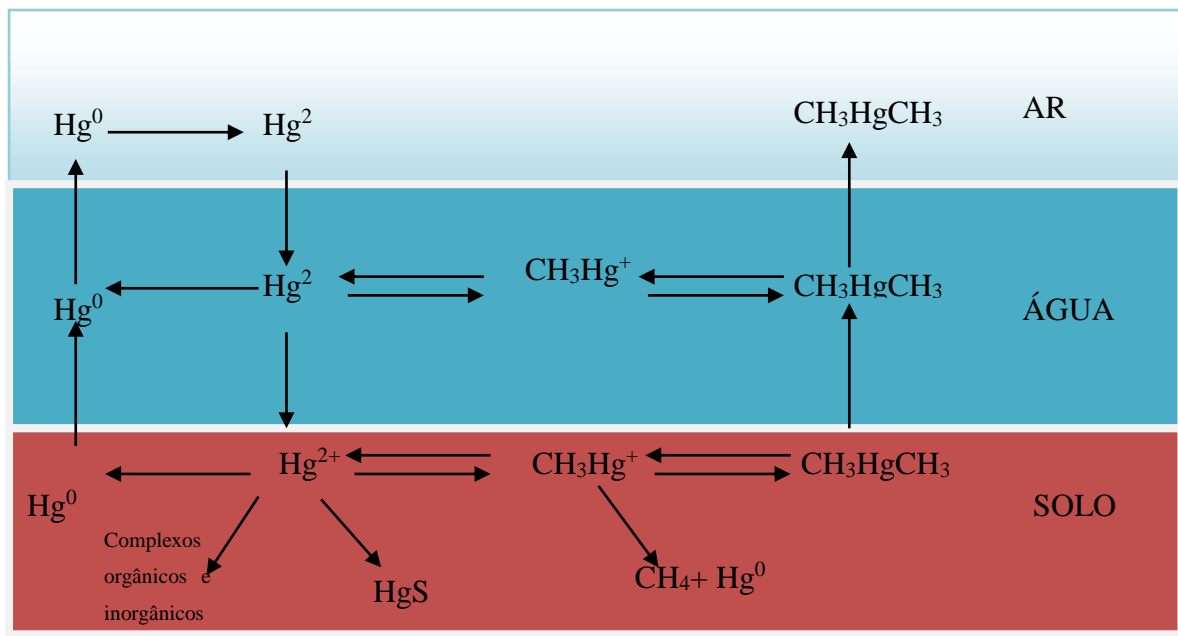


Figura 1: Ciclo Biogeoquímico do mercúrio adaptado de (U.S. EPA, 2009).

A metilação do mercúrio pode ocorrer por processos abióticos, mas ocorre, maioritariamente, por processos bióticos relacionados com o metabolismo de certas bactérias (UNEP, 2002), bioacumulando-se em concentrações significativas na fauna marinha.

A estas concentrações ambientais de mercúrio, acrescem as provenientes de atividades antropogénicas tais como extração de ouro (Yu, 2005), o fabrico de lâmpadas, baterias, termómetros, entre outras (UNEP, 2002). A luz emitida por uma descarga elétrica através de um vapor de Hg é rica em raios ultravioleta (UV), sendo este tipo de lâmpadas empregues em

espectrofotómetros. (Yu, 2005). Com o aumento de mercúrio inorgânico na hidrosfera e biosfera devido à chuva ácida, atividades mineiras industriais e a sua subsequente biometilação, é esperado que a exposição ao metilmercúrio aumente no século XXI (Chan, 2000). (Figura 2 adaptada de U.S. EPA, 2010).

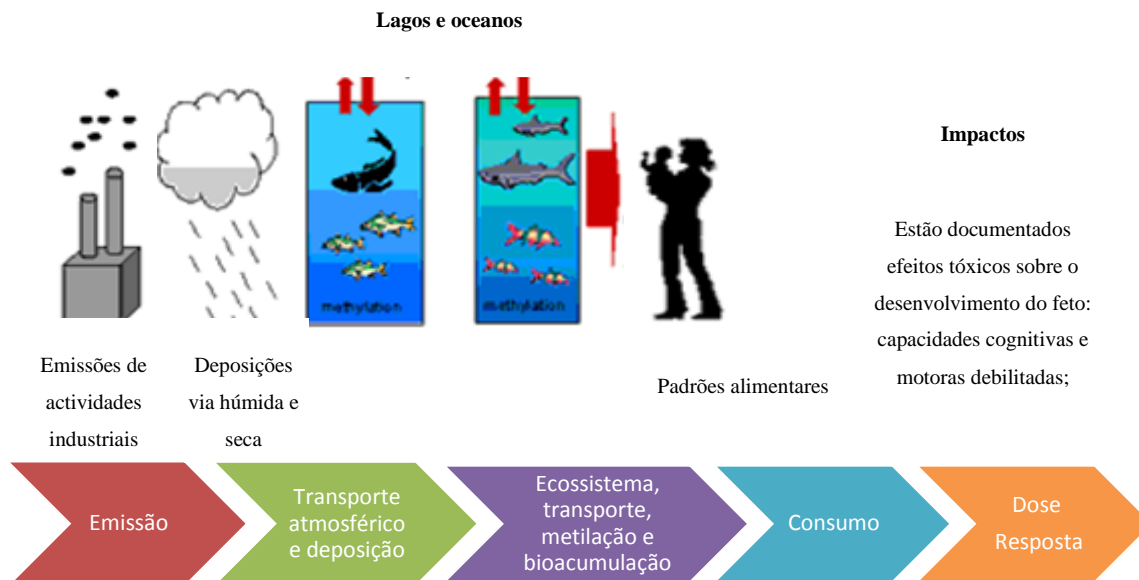


Figura 2: Ciclo do mercúrio com origem antropogénica.

O mercúrio sofre bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar, ou seja, encontra-se em maior concentração nos peixes predadores de grande porte (UNEP, 2008; ATSDR, 1999). A principal via de exposição da população humana ao mercúrio é a alimentação, nomeadamente devido ao consumo de peixe. Do teor de mercúrio presente em peixe, cerca de 90% está na forma metilmercúrio (JOUE, 2006), razão pela qual a estimativa de teores de metilmercúrio ingeridos são considerados equivalentes aos teores de mercúrio total (EFSA, 2004). A exposição ao metilmercúrio está dependente da sua concentração nos alimentos e dos hábitos alimentares do consumidor (Chan, 2000).

1.2 Toxicidade

Os alvos mais sensíveis à toxicidade do mercúrio e seus compostos são o sistema nervoso, sistema cardiovascular e os rins. Outros sistemas podem ser afectados como o respiratório,

gastrointestinal, imunitário, reprodutivo e hematológico (UNEP, 2008). Este contaminante, quando ingerido, atravessa a membrana celular e liga-se a grupos tiol e selenol(-SH, -SeH) de péptidos e proteínas (Yu, 2005). Estruturalmente estes complexos são semelhantes aos do aminoácido L-metionina e atravessam a barreira hemato-encefálica com o auxílio de transportadores de grandes aminoácidos neutros (Clarkson, 2002). Numa exposição pré-natal ou pós-natal, durante o desenvolvimento cerebral, podem ocorrer danos devidos ao metilmercúrio, tais como: indução de alterações nos microtúbulos, dano oxidativos nos neurónios, desregulação da homeostasia neuronal e do cálcio glial, entre outros (Clarkson., 2009).

A ação do metilmercúrio em adultos é caracterizada por um período latente entre a exposição e os sintomas (Clarkson, 2002). Este período pode variar entre semanas ou até meses consoante a dose e tempo de exposição. Os primeiros sintomas de intoxicação a surgir no adulto são parestesias, ou seja, dormência nas extremidades, seguindo-se a perda de audição, a limitação do campo de visão, a descoordenação e o desequilíbrio. Estes sintomas devem-se à destruição de neurónios em determinadas zonas do cérebro como o cerebelo (Clarkson, 2002). Obteve-se muita informação acerca dos sintomas de exposição e efeitos tóxicos deste contaminante a partir de duas grandes situações de intoxicação aguda por metilmercúrio, respetivamente em Minamata e no Iraque. Em Minamata, Japão, nos fins da década de 1950, devido a descargas industriais, que contaminaram as águas e respetiva fauna marinha de uma baía, a população sofreu intoxicações graves, ficando a patologia conhecida por doença de Minamata.

No Iraque, na década de 1970, houve um envenenamento por consumo de pão devido ao uso de metilmercúrio como fungicida nas sementes (ATSDR, 1999). Os dados recolhidos indicaram maior toxicidade do metilmercúrio em bebés com exposição pré-natal do que nos adultos. Por exemplo, em Minamata registaram-se casos de grávidas, com sintomas ligeiros de intoxicação, que deram à luz bebés com danos cerebrais graves (Yu, 2005). O caso iraquiano também contribuiu para o aprofundamento do conhecimento dos efeitos nefastos do metilmercúrio a partir dos dados obtidos junto dos pacientes que recorreram ao hospital devido à intoxicação. Num estudo realizado com 49 dessas crianças, foram observados sintomas como incontinência, salivação, perda de tónus muscular, disfunções sensoriais inclusive auditivas e visuais, disartria, clonus, priapismo, entre outros (Zaki, 1978). A severidade dos sintomas observados variou desde dormência nas extremidades a ataxia que podia ir de descoordenação até à completa incapacidade de ficar de pé ou sentar-se, podendo mesmo nos casos extremos, ocorrer paralisias.

De entre as crianças avaliadas, 11 casos eram muito severos, com deficiências mentais, físicas, cegueira e surdez. Estas crianças apresentavam concentrações sanguíneas de mercúrio superiores a 10 $\mu\text{mol/L}$ no início do internamento hospitalar (Zaki, 1978), sendo as concentrações normais na ordem de 0,05 $\mu\text{mol/L}$ e associadas a toxicidade aguda a partir de 0,25 $\mu\text{mol/L}$ (Dart, 2003).

Estudos efetuados em populações que são grandes consumidoras de peixe contribuíram com dados de exposição crónica. Dois estudos relevantes acerca da exposição pré-natal ao metilmercúrio foram os realizados nas populações dos arquipélagos das Seychelles e das Ilhas Faroé. Estes estudos indicaram o metilmercúrio como provável responsável por atrasos psicómotores observados nas crianças dessas regiões (Chan, 2000).

1.3 Toxicocinética: Absorção oral, Distribuição, Metabolização, Excreção

Existem inúmeros estudos que têm mostrado uma correlação entre quantidade de mercuriais em sangue, cabelo e o respetivo consumo de peixe, (EFSA, 2012) sendo estas as matrizes analisadas para monitorizar a exposição humana a este contaminante. Os resultados deste tipo de análise contribuíram para estimar a exposição humana aos mercuriais e conhecer sua interação com o organismo, ou seja, a sua toxicocinética desde a absorção até a excreção. A toxicocinética do metilmercúrio ocorre por:

Absorção- Dado que a fonte maioritária de MeHg ser o consumo de pescado e a taxa de absorção deste a nível gastrointestinal rondar os os 90-95% contribui significativamente para a sua toxicidade. (Farina, 2011)

Distribuição- No sangue, 90% do MeHg fica nos glóbulos vermelhos e 10% no plasma. O mercúrio inorgânico distribui-se de forma balanceada entre plasma e células ou num rácio célula/plasma ≥ 2 . (Harris et al, 2007)

Metabolização- No cérebro o MeHg é convertido em mercúrio, esta desmetilização também ocorre em outros tecidos como no fígado, reduzindo assim a sua toxicidade. No fígado o Hg liga-se à glutathione, cisteína e outras moléculas contendo ligandos sulfidrílo. Estes complexos são libertados na biliar existindo assim a reabsorção do Hg pelo intestino. (Harris et al, 2007)

Excreção- A excreção do MeHg e Hg é maioritariamente efetuada pelas fezes, (Harris et al, 2007), sendo o mercúrio elementar e nas suas formas iónicas também libertadas via urina. (UNEP, 2008)

1.4 Consumos de peixe e grupos de risco

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs como grupos populacionais em risco: grávidas, crianças e pessoas com problemas hepáticos, renais ou pulmonares, por serem mais suscetíveis aos efeitos tóxicos e também as populações em geral que apresentam um elevado consumo de peixe (UNEP, 2008). A população portuguesa é considerada uma possível população de risco devido ao facto de nos seus hábitos alimentares mediterrâneos incluir um consumo de peixe de 55 kg peixe/ano *per capita*, que a coloca em terceiro lugar no mundo, somente ultrapassada pelo Japão e pela Islândia (Lem, 2008). A média europeia em 2006 rondava os 26 kg/ano *per capita*, variando significativamente entre os países da União (Tabela 2 adaptada de Lem, 2008).

Tabela 2: Consumos *per capita* de peixe e produtos de peixe nos países mediterrânicos da União.

	Portugal	Espanha	França	Itália	Grécia	Restantes 10 países da UE	Os 10 países novos na UE	Europa
Consumos (ton)	602 045	2 103 060	2 177 239	1 648 896	243 540	5 407 374	690 745	12 872 899
População (mil)	11 000	43 000	62 000	60 000	11 500	202 500	110 000	500 000
Consumo <i>per capita</i> (Kg/ano)	54,7	48,9	35,1	27,5	21,2	26,7	6,3	25,8

Ao dividir-se consumo de 55 kg peixe/ano *per capita* pelo número de dias por ano, obtém-se um consumo de 150g peixe/dia *per capita*. Num inquérito efetuado pelo INE (Instituto Nacional de Estatística) com objetivo de averiguar os hábitos alimentares da população portuguesa, uma média de 49,5% dos inquiridos consumiram peixe no dia anterior (INE, 2006). Um inquérito no distrito de Setúbal indica consumos médios de 3-4 refeições de peixe por semana, ocorrendo também consumos altos de 7 ou mais refeições por semana em 17 % da população questionada

de Setubal e 6,1% da população de Caneças, (Carvalho, et al., 2008). Outro inquérito sobre o consumo de peixe em crianças de 7-11 anos da zona de Lisboa indica uma média de 5 refeições de peixe por semana (Nunes, E et al, 2014). Num questionário a 343 grávidas apurou-se também um consumo médio de 3 refeições por semana sendo as espécies mais consumidas por ordem decrescente a pescada, bacalhau, dourada, carapau, lulas, atum, polvo, salmão e sardinha (Nunes., 2014). O Instituto Português do Mar e Atmosfera efectuou um inquérito nacional onde apuraram os seguintes produtos de pesca mais consumidos: o bacalhau, pescada, atum em conserva, dourada, salmão, carapau e sardinha (Eduardo & Nunes).

1.5 Teores máximos nos géneros alimentícios e doses toleráveis de ingestão

O Regulamento n.º 1831/2003 revisto pelo REGULAMENTO (CE) N.º 609/2008, que fixa os teores máximos de certos contaminantes nos géneros alimentícios, estipula teores máximos de 0,5 mg de mercúrio por quilograma de produto de pesca e parte edível do peixe (JOUE, 2006), existindo algumas exceções para peixes predadores em que o valor máximo de mercúrio é de 1mg/kg, segundo a tabela abaixo (JOUE, 2008).

Tabela 3: Teores máximos admissíveis de mercúrio em diferentes produtos de pesca expressos em mg/kg de peso fresco.

REGULAMENTO (CE) N.º1881/2006

Produtos de pesca ⁽²⁶⁾ e parte comestível do peixe ⁽²⁴⁾ e ⁽²⁵⁾ , com exceção das espécies referidas no ponto 3.3.2. Os teores máxios aplicam-se aos crustáceos, com exceção da carne escura do carangueijo e da carne da cabeça e do torax da lagosta e de grandes crustáceos similares (Nephropidae e Palinuridae)	0,50mg/kg
---	-----------

REGULAMENTO (CE) N.º 629/2008

3.3.2 Parte comestível dos seguintes peixes (24)(25): tamboril (<i>Lophius</i> species) peixe-lobo riscado (<i>Anarhichaslupus</i>) bonito (<i>Sarda sarda</i>) enguia (<i>Anguilla</i> species) ronquinhas, olho-de-vidro, olho-de-vidro laranja (<i>Hoplostethus</i> species) lagartixa-da-rocha (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) alabote-do-atlântico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) maruca-do-cabo (<i>Genypterus capensis</i>) espadins (<i>Makaira</i> species) areeiros (<i>Lepidorhombus</i> species) salmonetes (<i>Mullus</i> species) abadejos rosados (<i>Genypterus blacodes</i>) lúcio (<i>Esox lucius</i>) palmeta (<i>Orcynopsis unicolor</i>) fanecão (<i>Trisopterus minutus</i>) carocho (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) raia (<i>Raja</i> species) peixe-vermelho (<i>Sebastesmarinus</i> , <i>S. mentella</i> e <i>S. viviparus</i>) veleiro-do-atlântico (<i>Istiophorus platypterus</i>) peixe-espada (<i>Lepidopuscaudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) bicas e gorazes (<i>Pagellus</i> species) tubarões (todas as espécies) escolares (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettuspretiosus</i> , <i>Gempylusserpens</i>) esturjão (<i>Acipenserspecies</i>) espadarte (<i>Xiphiasgladius</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonuspelamis</i>)	1,0mg/kg
3.3.3 Suplementos alimentares	0,1mg/kg

Os Regulamentos (CE) N.os 1881/2006 de 19/12 e 629/2008 de 3/07 não têm teores máximos para metilmercúrio mas sim para mercúrio total permitido no peixe, no entanto, refere que o aconselhamento orientado ao consumidor pode ser uma abordagem para a proteção de grupos vulneráveis, fazendo referência a uma nota de informação no sítio da Internet da Direção Geral de Saúde (DGS) e Defesa do Consumidor Europeu.

O Regulamento também refere que a EFSA (Autoridade Europeia da Segurança Alimentar) em 2004 adotou como dose tolerável de ingestão semanal (DTS) o valor proposto pela Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) de 1,6 µg de mercúrio/kg peso corporal. No entanto, em 2012 reduziu esse valor para 1,3 µg de mercúrio/kg peso corporal/semana (EFSA, 2012), ligeiramente inferior ao valor da agência de saúde do Canada de 1,4 µg de mercúrio/kg peso corporal/semana (Health Canada, 2007). A Environmental Protection Agency (EPA) tem atualmente uma dose de referência de 0,1 µg/kg peso corporal/dia, ou seja, 0,7 µg/kg peso corporal/semana, mais conservadora que as supracitadas (U.S. EPA, 2010)(UNEP, 2008). Estas doses de ingestão consideradas seguras, foram determinadas por organizações reguladoras internacionais a partir dos estudos epidemiológicos que decorreram nas populações dos arquipélagos das Seychelles e das Ilhas Faroé (EFSA, 18 de Março 2004). No entanto, há diferenças nítidas entre os vários DTS propostos entre agências reguladoras (ver resumo na tabela 4).

Tabela 4 : Valores de DTS propostos por várias agências reguladoras.

Agência reguladora	ATSDR (ATSDR, 2015)	EPA (U.S. EPA, 2010)	EFSA (EFSA, 2012)	JECFA (JECFA, 2007)	Health Canada (Health Canada, 2007)
DTS (µg/kg peso corporal/semana)	2,1	0,7	1,3	1,6	1,4

Estes valores pretendem evitar o risco por exposição crónica ao metilmercúrio, ou seja, limitar as quantidades ingeridas do contaminante e assim evitar que se excedem as doses máximas estimadas como seguras para os humanos.

Sabe-se que a população portuguesa ingere muito peixe mas continua a ser escassa a informação disponível sobre níveis de contaminação de pescado ingerido e que pode ser proveniente da costa portuguesa ou de outras áreas (Carvalho, et al., 2008). Alguns estudos têm vindo a debruçar-se sobre os níveis de exposição das grávidas e crianças em Portugal, uma vez que estes alimentos são consumidos pela maioria das mulheres e crianças em quantidades apreciáveis ao longo da gestação, amamentação e vida (Nunes E. , 2010). A caracterização do risco existente pode ser feita por cálculo dos índices de risco e é possível que uma parte da população portuguesa se encontre em risco, especialmente as crianças (Carvalho, et al., 2008).

2 METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo geral

Efetuar uma avaliação da exposição da população portuguesa ao metilmercúrio por consumo de pescado proveniente de locais de enorme difusão, as grandes superfícies que são os fornecedores de uma elevada percentagem do peixe que é consumido pela população.

2.1.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o teor de mercúrio nas espécies de peixe mais vendidas, adquiridas em grandes superfícies comerciais de norte a sul de Portugal continental;
- 2) Validar dois métodos de análise de mercúrio total, por espectrofotometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS) e por amalgamação / espectrofotometria de absorção atômica (A-AAS) efetuada com o analisador direto de mercúrio (AMA 254 da LECO);
- 3) Com base nos valores médios apurados por espécie de peixe e em dados estatísticos de inquéritos sobre os consumos de peixe da população, proceder à avaliação da exposição e a estimativa do risco através de cálculo dos Índices de Risco para diferentes faixas etárias da população portuguesa.

2.2 Caraterização das amostras

Foi analisado o mercúrio total em 148 amostras de peixe fresco (tabela 5) das seguintes espécies: atum fresco, salmão, sardinha, robalo, dourada, carapau, truta, lula, perca do Nilo, safio e peixe-espada preto por estarem entre as espécies mais apreciadas e algumas sujeitas a maior bioacumulação (Nunes., 2014). De modo a completar o leque dos peixes mais consumidos, analisaram-se também 14 amostras de pescada congelada, atum enlatado e bacalhau demolhado.

As amostras de peixe fresco foram obtidas nas peixarias de uma rede supermercados bem implantada no nosso país, de norte ao sul do país; estas foram acondicionadas em tubos de plásticos e armazenadas numa arca frigorífica a -20°C até serem analisadas. O atum em lata, pescada congelada e bacalhau demolhado foram adquiridos na mesma rede de supermercados e igualmente congelados.

Tabela 5: Caraterização das amostras analisadas.

Nome da espécie (*)	Nome comum em português	Nome comum em inglês	Nº de amostras analisadas	Local de captura
<i>Thunnus spp.</i>	Atum	Tuna	21	Atlântico centro este
<i>Gadus morhua</i>	Bacalhau	Codfish	5	Pacífico nordeste
<i>Trachurus trachurus</i>	Carapau	Horse mackerel	10	Atlântico nordeste
<i>Sparus aurata</i>	Dourada	Glithed seabream	25	Aquicultura
<i>Loligo spp.</i>	Lula	Squid	10	Atlântico nordeste
<i>Aphanopus carbo</i>	Peixe de espada preto	Black scabbard fish	6	Atlântico nordeste
<i>Perca spp</i>	Perca do Nilo	Perch	14	Água doce - Uguanda
<i>Merluccius merluccius</i>	Pescada	Hake	4	Atlântico sudeste à costa da Namíbia
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Robalo	Seabass	17	Aquicultura
<i>Conger conger</i>	Safio	Conger	6	Atlântico nordeste
<i>Salmo solar</i>	Salmão	Salmon	9	Aquicultura
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardinha	Sardine	19	Atlântico nordeste
<i>Salmo trutta trutta</i>	Truta	Trout	11	Atlântico nordeste

*Nomes de espécies de peixe em latim adaptados de (EFSA, 2012) e (Nunes. E et al, 2014).

Local de captura obtido dos fornecedores do produto.

2.3 Métodos de análise de mercúrio

Foram testados dois métodos de quantificação de mercúrio, *Cold Vapour – Atomic Fluorescence Spectrometry* (CV-AFS) e por *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS) com amalgamação com o analisador direto de mercúrio (AMA 254), de modo a averiguar qual o mais eficiente para analisar o número elevado de amostras previstas. O elevado número de amostras requer a escolha de um método pouco moroso mas rigoroso e preciso. Sabendo-se que 95% do mercúrio no peixe está na forma de metilmercúrio e que portanto podemos dosear o mercúrio total sem necessidade de proceder à sua especificação, o que foi assumido em ambos os métodos utilizados.

2.3.1 Espectroscopia de fluorescência atômica com vapor frio: CV-AFS

No método CV-AFS que se encontra esquematizado na Fig.3, a amostra é injetada através de uma válvula e chega ao separador gás-liquido onde o Hg^{2+} é reduzido para sua forma Hg^0 pela oxidação do estanho Sn^{2+} a Sn^{4+} e transportado por um gás inerte; argon, até ao detetor de fluorescência, passado através de uma membrana de secagem.

No detetor PSA 10.023 Merlin Fluorescence Detector, fabricado pela PS Analytical Ltd (Fig.4), a lâmpada de cátodo oco de mercúrio irradia os átomos de mercúrio que ao ficarem excitados, emitem fluorescência. A luz fluorescente é detetada e sua intensidade quantificada. Por meio de uma curva de calibração com soluções padrão, esta resposta é convertida em concentração de analito na solução analisada.

De salientar que a amostra requer uma mineralização ácida (auxiliada por aumento de pressão e temperatura em vasos de digestão colocados em micro-ondas) e que isso e a necessidade de realização da curva de calibração diariamente tornam este método moroso.

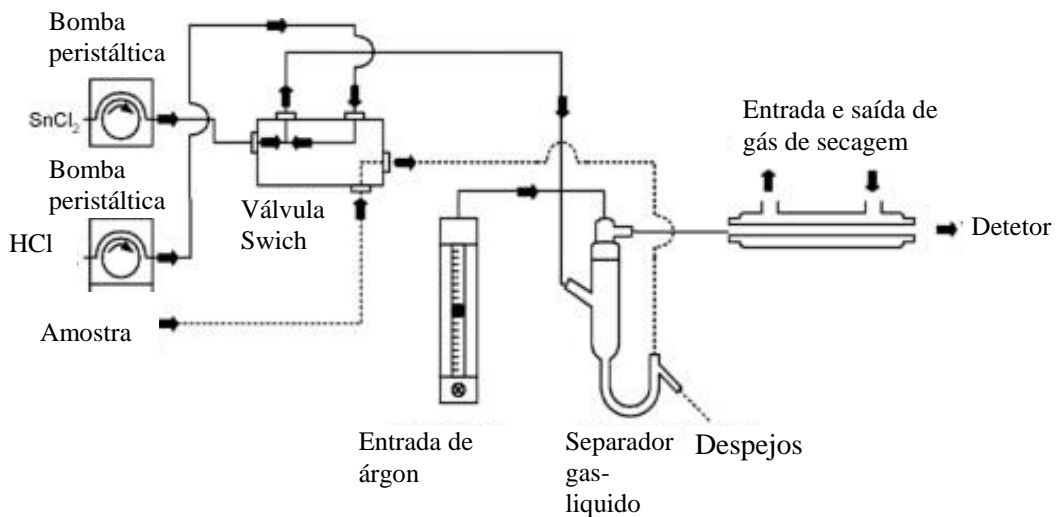


Figura 3: Esquema do CV-AFS. (PS Analytical Ltd, 2001)

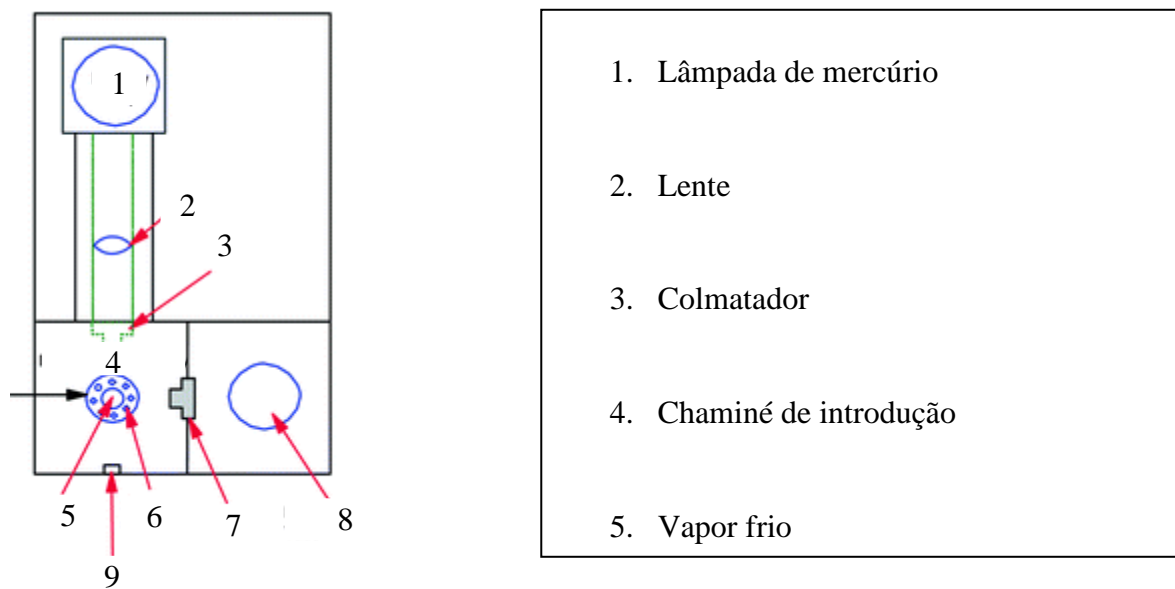


Figura 4: Esquema do detetor de fluorescência do CV-AFS. (PS Analytical Ltd, 2001)

2.3.2 Analisador direto de mercúrio: A-AAS

O método de espectrometria de absorção atômica com amalgamação foi utilizado com o equipamento *Mercury Analyser* AMA 254 acoplado a um computador com o *software* de funcionamento do aparelho versão 5.0.2.4. (Fig.6).

No analisador direto de mercúrio a amostra de peso ou volume conhecido é colocada no recipiente de amostragem e sob comando informático, introduzida no tubo catalisador. A amostra é seca e de seguida sofre pirólise (a 550°C) (Fig.5). Os produtos de decomposição são transportados por um fluxo de oxigénio para o forno catalisador onde a oxidação é finalizada. Os produtos da decomposição são transportados para o amalgamador para uma amalgamação seletiva do mercúrio com ouro, o restante passa pelas cuvets de medição e libertadas pela saída de oxigénio do equipamento. O amalgamador é mantido a 120°C para prevenir a condensação de água.

Após a estabilização da temperatura no amalgamador, a quantidade de mercúrio aprisionada é medida. O mercúrio é libertado do amalgamador por um curto aquecimento e depois é transportado através da cuvete mais longa de medição, depois pela câmara de atraso que está fora do eixo óptico das cuvets e finalmente pela segunda cuvete de medição. O mercúrio presente numa amostra é assim quantificado duas vezes, com sensibilidades diferentes resultando numa gama dinâmica de 0,05-600 ng Hg. A fonte de iluminação é uma lâmpada de baixa pressão de mercúrio de comprimento de onda de 253,65 nm (LECO). Todos os dados medidos pelo microprocessador 8051 são transmitidos para o computador.

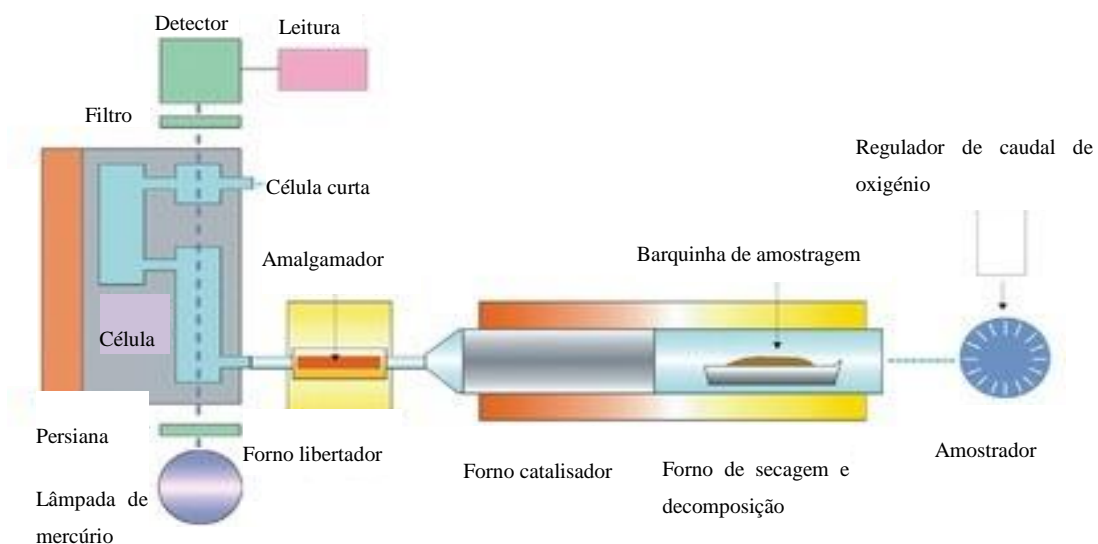


Figura5: Esquema interno do analisador direto de mercúrio AMA-254. (Nortje, 2010)



Figura 6: Analisador de Mercúrio AMA 254 e respetiva montagem.

2.4 Método Experimental CV-AFS

2.4.1 Mineralização de amostras em vasos de Teflon

- Pesar aproximadamente 0,5g de amostra de peixe (espátula de plástico), previamente descongelada;
- Colocar num vaso de digestão previamente descontaminado (previamente submetido a aquecimento com ácido nítrico (HNO_3) em micro-ondas e lavado com água MilliQ);
- Adicionar 5,0 ml HNO_3 concentrado, ou outro volume de acordo com os objetivos da abordagem;
- Adicionar 1 ml de H_2O_2 ;
- Deixar em contacto, cerca de 12 horas;
- Proceder à digestão no digestor de microondas (aumento gradual de temperatura até se atingirem 200°C (15 min), manter a 200°C durante mais 20 min); (fig. 7)
- Deixar arrefecer e diminuir pressão ao longo de aproximadamente 5-12 horas;
- Remover o líquido para um balão de 10 ml;
- Lavar o vaso de digestão com água desionizada e acrescentar ao mesmo balão;
- Acertar para o volume final de 10 ml.



Figura 7: Digestor Ethos 1 da Milestone, vasos de digestão e software.

2.4.2 Método de Quantificação do Mercúrio total por CV – AFS

2.4.2.1 Procedimento operativo do CV-AFS

- Ligar a lâmpada do detetor cerca de 30 minutos antes da análise;
- Ligar o argón e aferir R2 – fluxo de argón dirigido à membrana secante – a (50%), R1 – fluxo de argón no separador gás/líquido, e R3 – fluxo de argón dirigido ao detetor – a 20%;

- Colocar tubos na bomba peristáltica e respectivas soluções de cloreto de estanho (SnCl_2) e ácido clorídrico (HCl) 3M;
- Ligar bomba peristáltica para o caudal de 2,5ml/min;
- Aumentar R2 para 100% (2,4 l/min) e R1 e R3 para 50% (0,3 l/min);
- Verificação dos parâmetros instrumentais de sensibilidade adequados à análise (detetor de fluorescência atômica – integração $\frac{1}{4}$ segundo e sensibilidade 10/6;
- Colocar o mostrador do detetor de AFS a zero carregando em “Auto-zero”;
- Colocar válvula de injeção na posição “load”;
- Após homogeneização, recolher 1,0 ml da amostra digerida (contida no balão volumétrico) com o auxílio de uma seringa de plástico e injetar na válvula de injeção;
- Colocar válvula de injeção na posição “inject”;
- Proceder à leitura do valor máximo de fluorescência indicado pelo detector;
- A partir da análise de soluções-padrão, determina-se uma curva de calibração que permite determinar a concentração de mercúrio total presente na amostra;
- Após execução de todas as análises:
 - Parar a bomba peristáltica;
 - Remover tubos das soluções de SnCl_2 e HCl3M e introduzi-los num copo contendo água desionizada;
 - Ligar a bomba peristáltica e deixar circular água desionizada durante 5 a 10 minutos;
 - Desligar a bomba peristáltica;
 - Fechar torneira da garrafa de argon e aguardar que os manómetros desçam até ao nível zero;

- Quando as 3 saídas de árgon estiverem no zero, fechar o manoreductor da garrafa de árgon;
- De seguida, ligar árgon apenas em R2 durante, pelo menos, 15 minutos a 50% para que membrana fique bem seca e prolongar a sua durabilidade;
- Fechar válvula da garrafa de árgon, aguardar que êmbolo de R2 desça até nível 0 e fechar a saída de árgon;
- Desligar o detetor e verificar se todo o equipamento se encontra corretamente desligado.
- Conferir os procedimentos na folha de utilização e assinar.

2.4.2.2 Curva de Calibração

Proceder à diluição de cloreto de mercúrio de forma a obter uma solução mãe de 1g/L. Por exemplo, pesar 100mg para balão de 100 mL, colocar 1mL de ácido nítrico e perfazer com água pura (tipo 1), proveniente de um equipamento de purificação de água Milli-Q. Diluir a solução mãe de modo a obter uma solução intermédia de trabalho de 1mg/L, por exemplo retirar 400µL da solução mãe para um balão de 250mL, adicionar 2,5mL de ácido nítrico e perfazer com água pura.

Diluir esta solução com água pura, acidificada com ácido nítrico de forma a obter padrões com as concentrações de 2;5;10; 20; 40; 60; 80 e 100µg/L.

Todo o material volumétrico de vidro e os vasos de digestão ficam com ácido nítrico a 10% pelo menos durante 6h após a lavagem de modo remover resíduos de mercúrio.

2.4.2.3 Soluções necessárias

- HCl 3M (36,5-38%, Sharlau, ACS basic para análise)
- Cloreto estanhoso (SnCl_2 , 98%, Panreac para análise) 3% (p/v) com 15% (v/v) de ácido clorídrico (HCl)
- Ácido nítrico (65%, Panreac, PA-ISO para análise)
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2 , 30%, Merck para análise)
- Cloreto de mercúrio (99,5%, Riedel-de-Haën para análise)

2.4.3 Método Experimental do analisador direto de mercúrio (A-AAS)

A análise de mercúrio por este método resume-se em pesar aproximadamente 0,05g de peixe numa balança com precisão de 0,0001g para uma barquinha previamente tarada e introduzir a barquinha no amostrador do equipamento. Introduce-se a identificação da amostra e respetivo peso no *software* do AMA 254. Este por sua vez efetua a análise e reporta o resultado da concentração de mercúrio em mg/kg (ppm). No início da análise, abre-se a torneira da garrafa de oxigénio, verifica-se que o caudal no manómetro é o indicado pelo fabricante e liga-se o equipamento. O *software* só inicia as leituras após o aquecimento devido do equipamento. É boa prática iniciar e terminar um ciclo de leituras com brancos de água de modo a arrastar mercúrio residual do equipamento e descontaminar a barquinha.

Dado a sensibilidade da técnica ao seu meio circundante, é imperativo que o equipamento esteja em local arejado mas sem correntes fortes de ar.

É importante o operador ser sensibilizado para os perigos inerentes desta técnica, ou seja, só falta adicionar um combustível (algo para queimar) no triângulo do fogo para haver um incêndio porque o comburente e calor o equipamento em funcionamento possui. Esta é uma das razões que se deve trabalhar com o caudal de oxigénio adequado e fecha-lo quando não é mais preciso.

2.5 Validação de métodos

Avaliações de conformidade com requisitos legais como com os Regulamentos (CE) N.os 1881/2006 e 629/2008 e decisões importantes assentam em resultados analíticos quantitativos, portanto, torna-se imperativo ter uma indicação da respectiva qualidade, ou seja, em que medida são credíveis para o fim em vista (Camões, 2001). Em alguns sectores da química analítica é agora uma exigência formal (frequentemente legislativa) que os laboratórios introduzam medidas de garantia de qualidade. Tais medidas incluem: o uso de métodos de análise validados; o uso de procedimentos com controlo interno de qualidade bem definido; participação em testes de competência (ensaios interlaboratoriais); acreditação baseada na ISO 17025 (norma com requisitos específicos para laboratórios e seus ensaios laboratoriais) e estabelecimento da rastreabilidade dos resultados das medições. No entanto deve-se aceitar o

facto de que os resultados individuais não são todos 100% fiáveis pela possibilidade de ocorrer erros aleatórios e sistemáticos. (CITAC/ EURACHEM, 2002)

A validação do método de análise tem como objetivo comprovar a sua adequação para o seu fim, ou seja, que suas características de desempenho são capazes de produzir resultados dentro da necessidade do problema analítico. (CITAC/ EURACHEM, 2002)

Os requisitos mínimos de desempenho de um método analítico mais importantes são:

A **seletividade/especificidade** consiste na capacidade do método identificar o analito de interesse numa mistura complexa. Tipicamente pode ser incluída a matriz, as impurezas, os produtos de degradação e os solventes utilizados na presença das amostras. (RELACRE, 2000). Inclui habitualmente testes de recuperação.

A **gama de trabalho** para qual os resultados têm um erro aceitável. A **linearidade** caso se pretenda trabalhar na zona linear dentro da gama de trabalho.

Os limiares analíticos método que se avalia através da definição do **limite de deteção e o limite de quantificação** do método. O limite de deteção é a concentração a partir da qual se consegue distinguir nitidamente a presença do analito em detrimento do branco ou ruído enquanto o limite de quantificação nos permite identificar a concentração a partir da qual o método nos dá resultados fiáveis.

A **precisão** reflete o grau de proximidade entre valores, para um certo número de análises e para o mesmo método analítico enquanto a **exatidão** é o grau de proximidade com o valor verdadeiro.

Ambos os métodos CV-AFS e A-AAS foram validados com base nestes requisitos.

2.6 Cálculo dos Índices de risco

O presente trabalho também pretende fazer uma estimativa da exposição da população ao MeHg e subsequentemente calcular o risco com base nos teores de Hg de amostras de peixe vendidas em grandes mercados fornecedores (grandes superfícies) procurados por uma parte significativa dos consumidores portugueses. A grande vantagem desta abordagem é o facto de as estimativas do risco se aplicarem a uma grande faixa da população portuguesa que usa estes mercados de abastecimento e pela inclusão das espécies mais consumidas nas amostras analisadas.

Para se efectuar esta avaliação com base no cálculo de índices de risco (IR), é necessário apurar as doses semanais ingeridas (DSI) para os diferentes grupos populacionais e para tal são

requisitos dados sobre seus pesos corporais médios, padrões alimentares e concentrações do contaminante nos alimentos. A DSI é comparada com as doses toleráveis de ingestão semanal (DTS) por cálculo do índice conforme a equação abaixo. Os cálculos de índices de risco (IR) foram efetuados para várias faixas etárias e quando o IR for superior a 1, o subgrupo em questão encontra-se em risco (Carvalho, et al., 2008).

$$\text{Índice de Risco (IR)} = \frac{\text{Dose semanal ingerida (DSI)}}{\text{Dose tolerável semanal (DTS)}}$$

Calculou-se o IR para o DTS da EPA (0,1 µg/kg peso corporal/dia) mas para uma semana (0,7 µg/kg peso corporal/semana) e para o valor adotado pela EFSA de 1,3 µg/kg peso corporal/semana. Estes resultados encontram-se no capítulo Resultados e Discussão no ponto 3.5 (Avaliação da exposição e Caracterização do Risco).

A DSI foi calculada dividindo a quantidade de mercúrio ingerida numa semana pelo peso corporal:

$$\text{Hg ingerido} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{semana}} \right) = \sum_{n=1}^{n \text{ refeições}} \left(\text{quantidade de peixe ingerido numa refeição (kg)} \times [\text{Hg}] \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right)$$

Os DSI foram calculados com base em vários pressupostos:

- a) Assumiu-se que o mercúrio no peixe se encontra na totalidade na forma de MeHg e usou-se o teor médio de Hg apurado para espécie do pescado analisado;
- b) Definiram-se as espécies de peixe mais consumidas em Portugal com base nos inquéritos de E. Nunes *et al* 2014; (ver tabela 22)
- c) O número de refeições de peixe por semana foi classificado em baixo, médio e elevado. O número médio foi considerado ser 3-4 refeições semanais com base em Carvalho *et al* 2008; (ver tabela 21)
- d) As quantidades de peixe por refeição foram ajustadas consoante a faixa etária e as recomendações dietéticas subjacentes. Aos lactentes aconselham-se 20 g por refeição (Nestle, 2013) e para os adultos foram considerados 200g e estabeleceram-se quantidades intermédias para crianças e adolescentes;

- e) Para as diferentes faixas etárias, os pesos corporais foram estimados no percentil 50%, a partir das curvas de crescimento do boletim de saúde infantil e juvenil masculino adotado pela Direção Geral de Saúde, (Figuras 8 e 9) e para adultos foram utilizados 60 kg igual ao peso assumido pela EFSA na sua avaliação de exposição ao risco de mercúrio em peixe, (EFSA, 18 de Março 2004).

RAPAZES

peso 0-24 meses

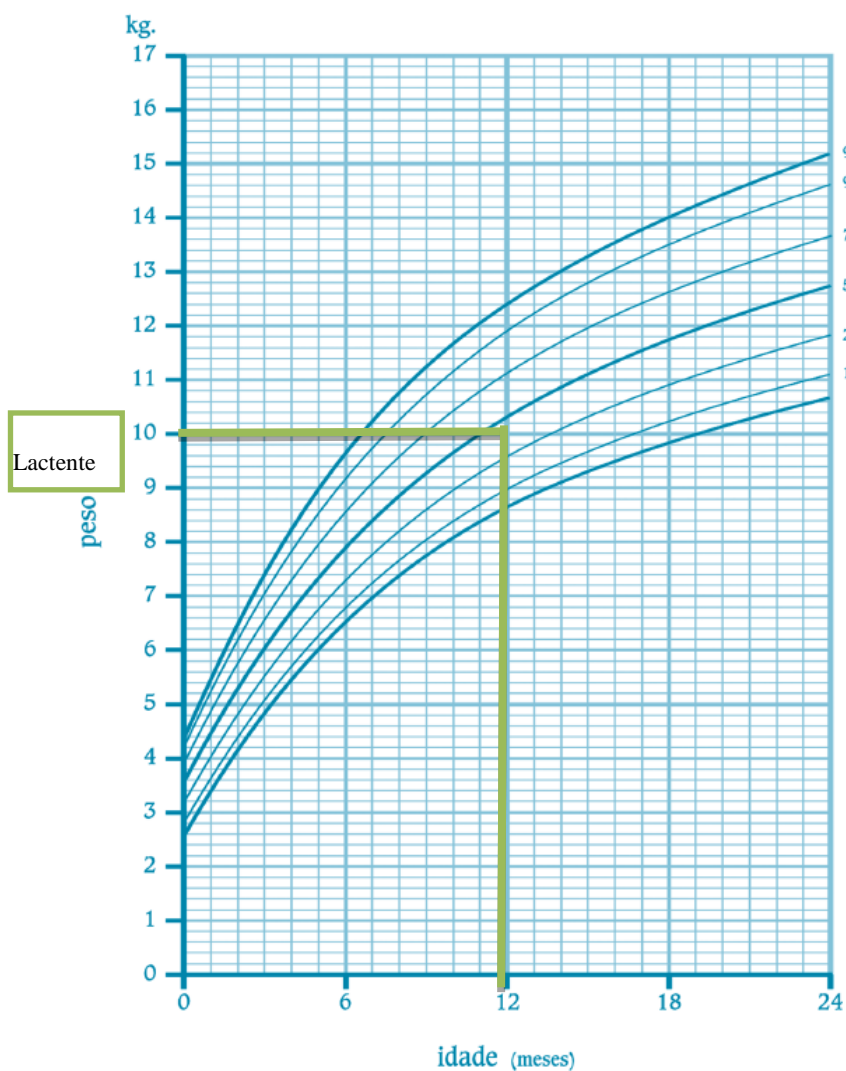


Figura 8: Curva de crescimento do peso de lactentes (sexo masculino). (Direção Geral de Saúde., 2005)

RAPAZES

peso 2-20 anos

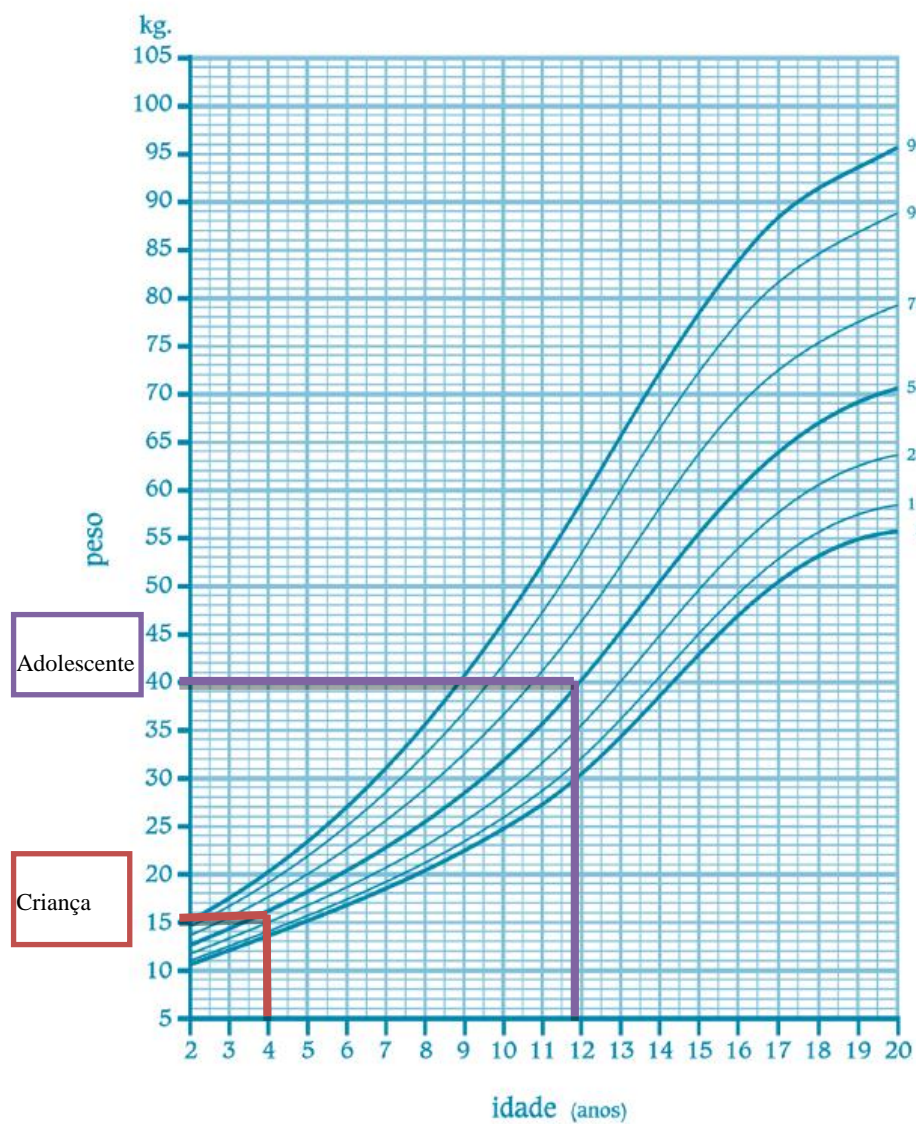


Figura 9: Curva de crescimento de peso de crianças e jovens (sexo masculino). (Direção Geral de Saúde., 2005)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação de método para análise de mercúrio por Espectrofotometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio (CV-AFS)

A validação adequada de um método analítico permite evidenciar que os resultados obtidos são credíveis. Com este intuito, procedeu-se a validação do método CV-AFS para as seguintes características de desempenho:

- a) Especificidade/seletividade;
- b) Gama de trabalho;
- c) Linearidade;
- d) Limite analítico de detecção e quantificação;
- e) Precisão;
- f) Exatidão.

3.1.1 Especificidade/seletividade

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito numa amostra complexa (como o peixe), sem interferência dos outros componentes (Relacre, 2000). As características do método CV-AFS para análise de mercúrio são por si específicas devido ao facto de o detetor possuir uma lâmpada de cátodo de mercúrio que excita os átomos de mercúrio da amostra e esta por sua vez emite radiação no comprimento de onda específico do elemento, quantificando assim exclusivamente mercúrio. É possível a utilização de vapor frio devido à volatilidade do mercúrio (Hg^0), este facto contribui para aumentar a seletividade do método.

Para avaliar as interferências do método pode realizar-se um teste de recuperação utilizando uma série de amostras com a mesma matriz em que se varia a concentração de mercúrio em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. As taxas de recuperação devem ser próximas de 100%.

Com este intuito, efectuou-se fortificações numa mesma amostra antes da sua mineralização, obtendo-se as taxas de recuperação referidas na tabela 6. Obtiveram-se ainda outras taxas de recuperação mais baixas mas não foram consideradas porque houve perda significativa do analito durante digestão. O procedimento de digestão foi otimizado para diminuir esta perda, deixando a amostra em contato com o ácido cerca de 12 horas. Dado o facto de as taxas serem inferiores a 90%, é provável que ainda tenha ocorrido alguma libertação de mercúrio durante o processo da digestão.

Tabela 6: Taxas de recuperação médias de fortificações efetuadas antes da digestão em duplicados independentes ao longo da gama de trabalho.

Volume de padrão de 1mg/L Fortificado (µL)	Concentração final esperada (µg/L)	Concentração obtida (µg/L)	% Recuperação
200	20	16,54	82,70
600	60	51,94	86,57
800	80	71,64	89,55

3.1.2 Gama de trabalho

Relativamente a um método de análise é importante garantir que a resposta do sistema de medida seja proporcional à concentração do nosso analito, no caso o mercúrio.

Ao utilizar uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, estabelece-se um gráfico em que o sinal do equipamento é função da concentração dos padrões e depois por interpolação determina-se a concentração do metal nas amostras em estudo. Neste caso, a gama de trabalho é avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias de modo a avaliar a adequabilidade da gama de padrões da curva de calibração, ou seja, averiguar se a variação nos limites da gama de trabalho é aceitável.

O primeiro e o último padrão são analisados em 10 replicados independentes. Para este teste é aconselhado o uso de uma reta de calibração composta por um mínimo de 6 padrões. Utilizou-se

uma reta com 8 padrões (tabela 7), cujas leituras foram feitas num só dia. São calculadas as variâncias (Var ou S_i^2) das leituras dos padrões de 2 µg/L e de 100 µg/L e a de valor maior dividida pela menor, obtendo-se assim o valor de teste (VT) que por sua vez é comparado com o valor tabelado F de Fisher/Snedecor para 99% de probabilidade e N-1 graus de liberdade (RELACRE, 2000).

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Para $i=1$ e $i=10$ Sendo:

i – o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10)

j – o número de repetições efetuadas para cada padrão

Tabela 7: Leituras obtidas no CV-AFS com padrões da curva de calibração

Padrão (µg/L)	Leitura (AU)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0	0,1								
2	3,1	4,2	4,3	3,6	4,8	3,9	3,7	3,6	3,5	3,7
5	9,1	8,6								
10	17,8	18,8								
40	76	75								
50	90,6	91								
60	113,5	113,3								
80	140	141								
100	155	156	154	156	155	154	155	153	154	154

Os padrões de 2 e 100 ppb estão realçados porque foram os utilizados para testar a adequação da gama de trabalho.

$$N-1 = 10-1 = 9$$

$$F_{(9; 9; 0,01)} = 5,35 \text{ (tabela em anexo 3) (USP)}$$

$$\text{Var}_{2\text{ppb}} = 0,232$$

$$\text{Var}_{100\text{ppb}} = 0,933$$

$$(\text{VT}) = \text{Var}_{100\text{ppb}} / \text{Var}_{2\text{ppb}} = 4,03$$

$\text{VT} < F_{(9;9;0,01)} \approx 4,03 < 5,35$ a diferença entre as variâncias não é significativa, logo a gama de trabalho encontra-se bem ajustada.

3.1.3 Linearidade

A determinação da linearidade é necessária para a verificação de que a resposta analítica é proporcional à concentração da substância em análise, num intervalo adequado, que compreende as concentrações esperadas nos produtos a analisar. Um ajuste adequado resulta num menor desvio padrão residual, menor incerteza de interpolação aumentando assim a qualidade do resultado. Quanto mais próximo de um, for o coeficiente de correlação (R), melhor é o ajuste dos pontos à reta de calibração. No entanto, o R não é por si uma garantia acerca da linearidade. Existem alguns testes como o Teste de Mandel, que foi utilizado para averiguar a linearidade da curva de calibração. A partir de um conjunto de pares ordenados, calculou-se a função de calibração linear (figura 10), a função de calibração não linear (figura 11) e respetivos desvios-padrão residuais $S^2_{y/x}$ e S^2_{y2} . A diferença das variâncias (DS^2) foi calculada pela equação seguinte em qual o N é o número de padrões utilizada na curva de calibração, neste caso foram 8:

$$DS^2 = (N-2) \cdot S^2_{y/x} - (N-3) \cdot S^2_{y2}$$

O valor teste (VT) é a divisão da diferença das variâncias DS^2 pelo desvio padrão residual não linear S^2_{y2} : (RELACRE, 2000)

$$VT = DS^2 / S^2_{y2}$$

O método é linear se $VT \leq F_{(0,05;1; N-3)}$

Oscálculos para o teste de Mandel (tabela 8) efetuado com base no valor médio das leituras da curva de calibração da tabela 7.

Tabela 8:Dados para o cálculo do valor teste. (Teste de Mandel).

$\mu\text{g/L}$ (ppb)	Média das leituras	Pontos com interpolação linear	Pontos com interpolação polinomial
0	0,05	3,42	-1,74
2	3,65	6,74	2,71
5	8,85	11,72	9,30
10	18,3	20,02	20,03
40	75,5	69,79	77,69
50	90,8	86,38	94,35
60	113,4	102,98	109,72
80	140,5	136,16	136,64
100	155,5	169,34	158,44
Variâncias		3733,76	3786,09

Dados utilizados para averiguar liniaridade da curva de calibração.

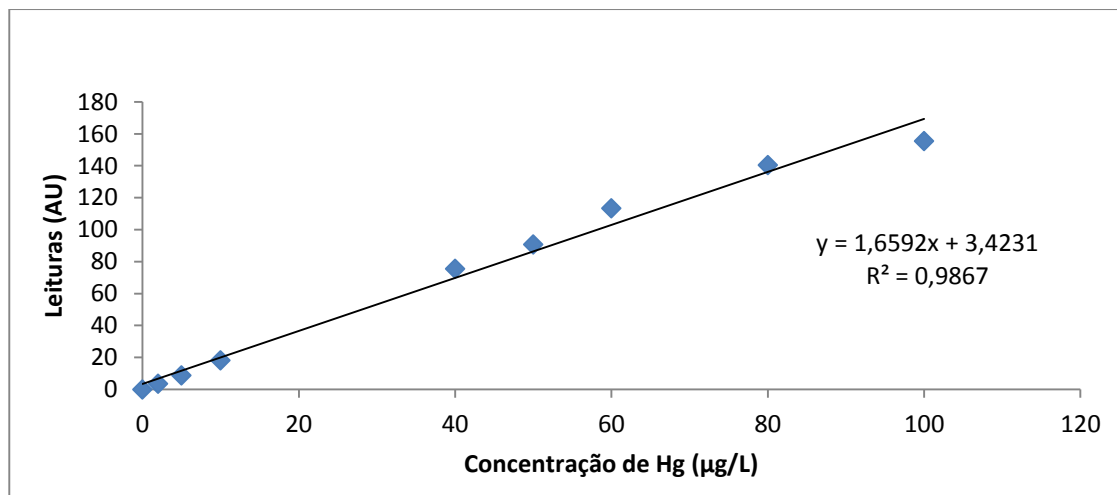


Figura10: Gráfico do ajuste linear aos pontos de calibração e equação de reta para cálculo dos pontos com interpolação linear. Concentrações experimentais da gama de calibração (♦). Ajuste linear (—).

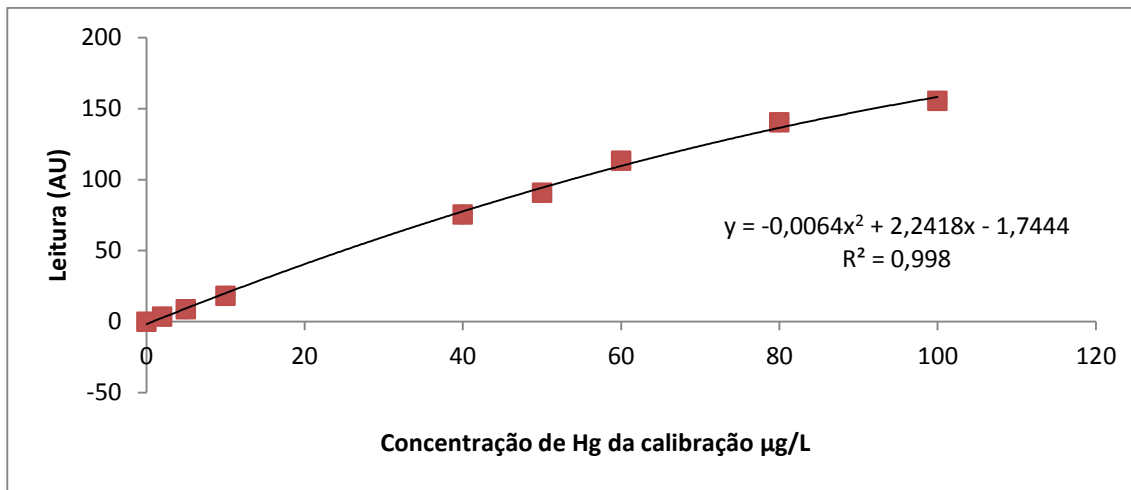


Figura11:Gráfico do ajuste não linear aos pontos de calibração e equação da curva para cálculo dos pontos com interpolação não linear. Concentrações experimentais da gama de calibração (■). Ajuste com equação de segundo grau (∩).

Com os dados supracitados, obtemos para N=8, ou seja número de padrões utilizados:

$$DS^2 = 3472,12 \quad VT = 3472,12/3786,09 = 0,92$$

$$VT < F_{(0,05;1;5)} \approx 0,92 < 6,61 \text{ (valor tabelado em anexo 3) (USP)}$$

Verificou-se a veracidade da preposição, logo pode-se considerar o ajuste linear adequado.

3.1.4 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção é um limiar analítico que corresponde à menor quantidade de analito detetável numa amostra mas não necessariamente quantificável (Relacre, 2000).

O limite de detecção (LD) foi calculado de forma seguinte:

$$LD = X_0 + K \cdot \sigma_0$$

Em que:

- X_0 é a média aritmética de uma série de brancos preparados de forma independente e lidos

ao longo de vários dias de trabalho;

- σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .
- $K = 3,3$ para um nível de confiança de cerca de 99,7% partindo do princípio que X_0 segue uma distribuição normal de erros (gaussiana).

Tabela 9: Dados utilizados para o cálculo do limite de detecção (LD).

Leitura de brancos (AU)	
0,4	0,4
0	0,1
0	0,1
0,2	0,1
0	0
0	0
0,4	0,2
Média dos brancos	0,14
Desvio padrão	0,16

As leituras de fluorescência dos brancos expresso em unidades arbitrárias (UA) na tabela 9, foram obtidas em dias diferentes. Ao substituir os valores na equação supracitada, obtemos o seguinte LD;

$$LD = 0,14 + 3,3 * 0,16 = 0,66 \text{ AU}$$

O limite de quantificação corresponde à menor concentração de analito medida para a qual é possível a sua quantificação com valores de exatidão e precisão determinados; na prática acaba por corresponder ao padrão de calibração de menor concentração.

O limite de quantificação (LQ) calcula-se de forma semelhante ao limite de deteção, mas com $K= 10$, obtendo-se assim o seguinte LQ:

$$LQ= X_0 + 10.\sigma_0$$

$$LQ = 0,14 + 10* 0,16 = 1,73 \text{ AU}$$

Ao comparar o LQ com as leituras do padrão de $2\mu\text{g/L}$ acima na tabela 6, com um valor médio de $3,65\text{AU}$, verificamos que este padrão encontra-se acima do LQ, não sendo necessário ajustar a gama de trabalho.

3.1.5 Precisão

É uma medida que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, ou seja, o grau de repetibilidade ou de reprodutibilidade do método analítico.

Quando estabelecemos a precisão avaliamos a dispersão dos resultados obtidos, correspondentes a várias análises sobre uma mesma amostra, padrões ou amostras semelhantes, em condições definidas.

Na precisão consideram-se 3 níveis:

- Repetibilidade do do ensaio, expressa a precisão em condições tão idênticas quanto possível, ou seja, usando as mesmas condições de análise, mantendo o laboratório, o analista, os reagentes, o mesmo equipamento, e considerando um curto intervalo de tempo;
- Precisão Intermédia, por vezes designada de variabilidade intralaboratorial – em que a análise é efetuada em dias diferentes ou por técnicos diferentes;
- Reprodutibilidade – Faz-se variar as condições do ensaio como: laboratórios diferentes, operadores, equipamentos diferentes, ou em períodos de tempo bem distintos. Participar em ensaios interlaboratoriais é uma forma de verificar a reprodutibilidade (RELACRE, 2000).

Na determinação da precisão, é comum avaliar-se a repetibilidade e para isso efetua-se uma série de medições ($n \geq 10$) de uma solução correspondente à concentração média da gama de trabalho, de padrão, MRC ou amostra.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo: (RELACRE, 2000)

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot 3,60 = 10,09$$

sendo:

S_{ri} – desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

Para o cálculo da repetibilidade foram efetuadas as seguintes 10 medições do padrão correspondente à concentração de 50 $\mu\text{g/L}$. Os 10 padrões de 50 $\mu\text{g/L}$ foram preparados em simultâneo a partir da mesma solução mãe cloreto de mercúrio de 1mg/L e as leituras da tabela 10, efectuadas no mesmo dia da preparação.

Tabela 10: Leituras (L) do padrão de 50 $\mu\text{g/L}$ para avaliar a precisão.

Leitura (AU)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
	90,6	91,0	85,0	85,9	85,9	81,9	86,0	81,5	81,0	82,0

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r), expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = (S_{ri} / \bar{x}) * 100$$

Sendo:

CV_r igual ao desvio padrão de repetibilidade (S_{ri}) a dividir pela média dos valores considerados (\bar{x}). Obtendo-se assim o seguinte CV_r :

$$CV_r = (3,60 / 85,08) * 100 = 4,23\%$$

Dado o CV_r ser inferior a 5%, conclui-se que o método é preciso.

3.1.6 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o resultado obtido e o verdadeiro valor.

Uma das aplicações mais frequentes dos materiais de referência certificados é a validação de procedimentos de medição. (IRMM, 2012) A exactidão do método foi averiguada por meio de análise ao material de referência certificado BCR 463 (anexo 4) fornecido pela *Bureau of Reference of European Commission* com o teor de mercúrio de $2,85 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ em peso seco.

Efetuuou-se a análise de humidade do BCR 463 por secagem em estufa a 103°C até atingir peso constante.

Tabela 11: Determinação do teor de humidade do MRC

Massa inicial de MRC (g)	Massa capsula (g)	MRC+capsula (g)	Massa final total (g)	Massa final MRC (g)	Humidade % (= 100- Matéria seca)	Matéria seca % (= massa final MRC/massa inicial MRC)
0,161	31,5800	31,7410	31,7183	0,1383	14,1	85,9

Pesagens efetuadas em balança com resolução de 0,0001g. As massas finais correspondem as pesagens após secagem em estufa.

Para averiguar a exactidão do método, procedeu-se ao cálculo dos erros relativos com as concentrações de MRC obtidas experimentalmente e a concentração esperada equivalente ao seu valor certificado.

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{(\text{concentração obtida} - \text{concentração esperada})}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

Tabela 12: Concentrações de MRC obtidas em condições de precisão intermédia e respetivos erros relativos.

MRC $\mu\text{g/g}$	Erro relativo (%)
2,74	-3,93
2,78	-2,64
2,79	-2,12
2,45	-13,98
2,46	-13,64
2,55	-10,61
Média 2,63	Média -7,82

A fonte bibliográfica consultada (RELACRE, 2000), refere que um erro relativo de 5% pode ser considerado satisfatório. O erro relativo médio é -7,82%, pelo que se recorreu ao cálculo do z-score para avaliar o desempenho do método. O fator de desempenho “Z-score” do MRC é satisfatório se inferior a 2; questionável entre 2 e 3 e não satisfatório acima de três. (RELACRE, 2000)

$$Z = |X_{\text{lab}} - X_v| / S = |2,63 - 2,85| / 0,16 = 1,31$$

Sendo:

X_{lab} = média dos valores experimentais na análise do MRC, 2,63 µg/g;

X_v = valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor do certificado, 2,85 µg/g;

S = Unidade de desvio que pode ser a incerteza do MRC, 0,16 µg/g;

Z = 1,31 < 2, logo o desempenho é satisfatório.

3.1.7 Incerteza

Existe 3 abordagens principais para a quantificação da incerteza da medição:

- i. “Passo a passo”, ou, na língua inglesa, abordagem “*bottom-up*” em qual se considera a incerteza de cada passo da análise e sua soma dá a incerteza final, ou seja, seria considerada a incerteza do padrão utilizado, do material volumétrico, da balança, interpolação do sinal instrumental na curva de calibração, entre outras;
- ii. Baseada em informação interlaboratorial, ou seja, no desvio padrão de reprodutibilidade do método;
- iii. Baseada em dados da validação e/ou controlo da qualidade do método analítico recolhidos. (IPAC, 2007)

Adotou-se a terceira opção, que consiste em apurar a incerteza associada às componentes precisão e exactidão.

A incerteza da componente precisão $S_{\text{precisão}}$ foi obtida através das amplitudes de duplicados (tabela 13) de várias amostras processadas independentemente pelo cálculo seguinte:

$$S_{\text{precisão}} = \frac{\text{Amplitude média}}{1,128}$$

$$S_{\text{precisão}} = \frac{0,06}{1,128} = 0,05 \mu\text{g/g}$$

Tabela 13: Amplitude média de duplicados para cálculo da componente da precisão.

Amostra	$\mu\text{g/g}$		Amplitude (AU)
Robalo	0,11	0,11	0,00
espada	0,59	0,93	0,34
carapau	0,04	0,03	0,01
cavala	0,05	0,10	0,04
salmão	0,01	0,01	0,01
safio	0,71	0,76	0,05
atum	0,57	0,62	0,05
chicharro	0,25	0,26	0,01
lulas	0,03	0,02	0,01
robalo	0,33	0,23	0,11
cavala	0,05	0,06	0,01
sardinha	0,64	0,85	0,21
carapau	0,04	0,05	0,01
dourada	0,04	0,03	0,01
Amplitude média			0,06

A incerteza da exatidão foi obtida segundo as equações abaixo com base nos valores da tabela 14 de análise do MRC:

Tabela 14: Concentrações de Hg obtidas no MRC para o cálculo da componente da exactidão.

MRC µg/g	
	2,74
	2,77
	2,79
	2,45
	2,46
	2,55
Média	2,63
Desvio padrão	0,16

A recuperação média do método (\bar{R}_m) foi estimada por:

$$\bar{R}_m = \bar{C}_{obs} / C_{MRC} = 2,63 / 2,85 = 0,92$$

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{MRC})}{C_{MRC}}\right)^2}$$

Onde:

\bar{C}_{obs} – Concentração observada do MRC: 2,63 µg/g

S_{obs} – desvio padrão da serie de análises do MRC: 0,16

n – número de análises do MRC: 6

$u(C_{MRC})$ – Incerteza padrão associada ao teor certificado do MRC: 0,16 µg/g

C_{MRC} – Concentração do MRC : 2,85 µg/g

$$u(0,92) = 0,92 \times \sqrt{((0,16^2/6 \times 2,63^2) + (0,16/2,85)^2)} = 0,059$$

Procedeu-se a seguir para a avaliação da exactidão do método, ou seja, averiguar se os resultados são influenciados por desvios sistemáticos suficientemente relevantes para necessitarem de

correção. Esta verificação foi feita por um teste-*student* em qual o t calculado como indica abaixo é comparado com o $t_{\text{crítico}}$ tabelado:

$$t = |1 - \bar{R}_m| / u(\bar{R}_m) = |1 - 0,92| / 0,059 = 1,35$$

$t_{\text{crítico}}$ bilateral tabelado para um grau de confiança de aproximadamente 97,5% ($\alpha = 0,05/2 = 0,025$) = 2,447 (tabela t-student no anexo 3)

Como $t_{\text{crítico}} > t_{\text{calculado}}$, não há necessidade de efetuar alguma correção sobre o $u(\bar{R}_m)$ calculado.

A incerteza expandida (U) é obtida por multiplicar por 2 o $u(y)$ calculado com a incerteza da precisão e exatidão a concentração desejada (y) (IPAC, 2007).

$$u(y) = y \times \sqrt{(\hat{u}_{\text{precisão}})^2 + (\hat{u}(\bar{R}_m))^2} = y \times \sqrt{(\hat{u}_{\text{precisão}})^2 + (\hat{u}(\bar{R}_m))^2}$$

3.2 Validação de método para análise de mercúrio com Analisador Direto de Mercúrio (A-AAS)

Este método tal como o CV-AFS é por si específico e selectivo sendo somente utilizado para quantificar mercúrio. O *software* do equipamento possuir calibração interna validada em fábrica, não sendo obrigatório a validação da gama de trabalho e linearidade. O equipamento *Mercury Analyser* AMA 254 (LECO), possui duas curvas de calibração, uma gama baixa (0,05 – 40 ng Hg), e outra gama alta (40 – 600 ng Hg) com um limite de deteção de 0,01 ng Hg. Para averiguar se as concentrações nas amostras se encontravam dentro da gama de trabalho do equipamento, calcularam-se os limites de deteção e quantificação com base nos limiares da curva de calibração para a quantidade média de amostra colocada no amostrador, ou seja, para uma amostra de peixe de 0,1 g, o limite de deteção é:

$$LD = 0,01 \times 0,1 = 0,001 \frac{\text{ng}}{\text{g}} \equiv 0,001 \mu\text{g}/\text{kg}$$

O limite de quantificação (LQ) supondo ser dez vezes superior ao LD fica 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb). Este valor está muito abaixo dos resultados já que os resultados estão na ordem dos mg/kg (ppm).

3.2.1 Precisão

Para avaliar a precisão recorreu-se à análise de um padrão de mercúrio de 0,5mg/L lido em dias diferentes de análise, preparado a partir de uma solução mãe de 1 g/L de cloreto de mercúrio no dia de análise. (125µL de solução mãe para balão de 250mL com 1mL de ácido nítrico e volume perfeito com água pura).

Tabela 15: Concentrações lidas a partir de padrão de 0,5mg/L por A-AAS para avaliar a precisão

Padrão 0,5 mg/L	
0,468	
0,693	
0,436	
0,505	
0,595	
0,535	
0,481	
0,475	
Média	0,523
Desvio padrão	0,084

A análise do padrão de 0,5mg/L de mercúrio (tabela 15) serviu de controlo de desempenho do equipamento para esse dia de análises.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo: (RELACRE, 2000)

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot S_{ri} = 2,8 \cdot 0,084 = 0,24$$

sendo:

S_{ri} – desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade (CVr), expresso em percentagem, é dado por:

$$CVr = (Sri/\bar{x}) * 100 = (0,084/0,523)*100= 16,06\%$$

O coeficiente de variação é superior a 5%, no entanto, se as leituras tivessem sido feitas num só dia, seria inferior porque eliminaríamos a variação temporal.

3.2.2 Exatidão

A exatidão foi mensurada pelo erro relativo com o mesmo MRC utilizado na validação do método CV-AFS, o BRC 463 com o teor de mercúrio de $2,85 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ em peso seco.

Tabela 16: Leitura da concentração do MRC em mg/kg para a valiação da exatidão.

Leituras	3,22	3,11	3,26	3,10	2,73	2,94	3,11	3,21	3,21	2,88
BCR	3,30	3,12	3,18	3,14	3,10	3,02	3,11	3,09	3,34	3,07
Média do valor diário	3,26	3,11	3,22	3,12	2,91	2,98	3,11	3,15	3,27	2,98
Média Total	3,11									

A análise do MRC foi feita em duplicado em cada dia de análise.

Os valores na tabela 16 são já com a correção da humidade, sem correcção a média seria de $2,82 \mu\text{g/g}$.

$$Erro\ relativo\ (\%) = \frac{\text{concentração esperada} - \text{concentração obtida}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

$$Erro\ relativo = \frac{3,11 - 2,85}{2,85} \times 100 = 9,16\%$$

O gráfico abaixo (figura 12) permite a visualização das leituras médias da tabela 16e o intervalo do MRC indicado no certificado no anexo 4 ($2,85 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$).

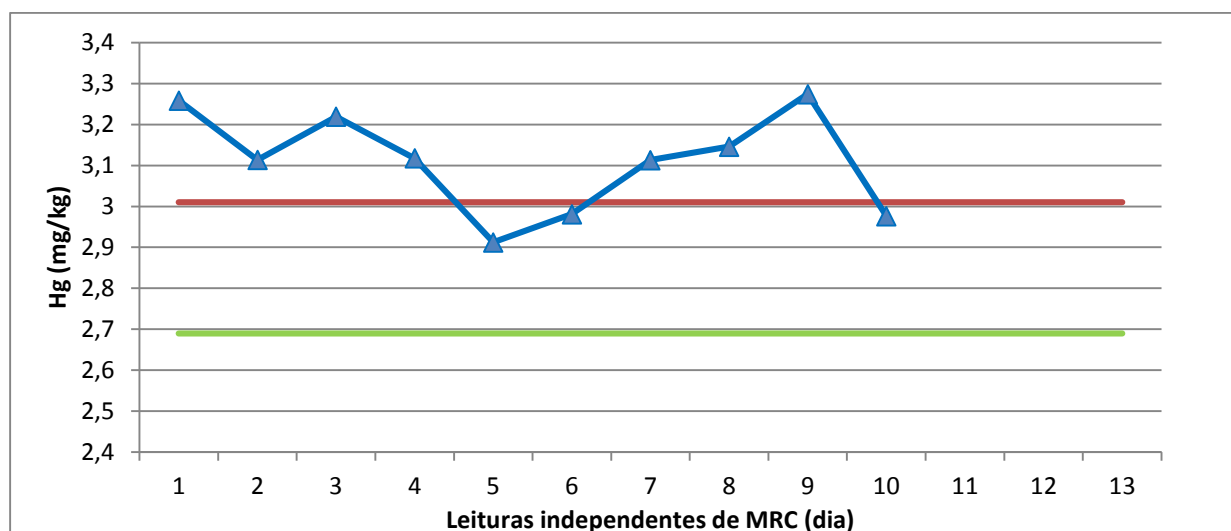


Figura12:Concentração de mercúrio do MRC (BCR463) analisada por A-AAS obtida em dias diferentes. (LS) Limite superior do intervalo de incerteza certificado do MRC (—); (LI) Limite inferior da incerteza certificada do MRC (—); Concentração obtida experimentalmente do MRC (▲).

O erro relativo superior a 5%, pelo que recorreu-se ao cálculo do fator de desempenho “Z-score” do MRC para a avaliarmos a eficácia do método.

$$Z = \frac{([Hg]_{obtido} - [Hg]_{certif})}{Incerteza} = \frac{(3,11 - 2,85)}{0,16} = 1,63$$

Este método é eficaz por seu fator de desempenho ser inferior a 2.

3.3 Seleção do método analítico

Em função dos resultados obtidos que mostraram que ambos os métodos eram adequados para analisar as amostras relativamente ao seu conteúdo em mercúrio, foi escolhido o analisador de mercúrio AMA em vez de CV-AFS. As razões que motivaram essa escolha prenderam-se com a economia de tempo e recursos, já que é um método mais célere, e que não necessita de preparação prévia da amostra. Assim evitam-se os passos da mineralização ácida com digestão por micro-ondas e diluição para volume conhecido. Com o A-AAS, economiza-se tempo, mão-de-obra, reagentes, evita-se a lavagem e descontaminação de material de vidro e diminuem-se os resíduos químicos.

Por não requerer preparação de amostra, os resultados do A-AAS não possuem erros associados a perda de analito durante a digestão por este ser volátil, ou ficar ligado às paredes de vidro dos

balões volumétricos. Estes erros são os responsáveis prováveis das concentrações obtidas com o A-AAS serem superiores aos do CV-AFS, como demonstra o gráfico da Fig. 13.

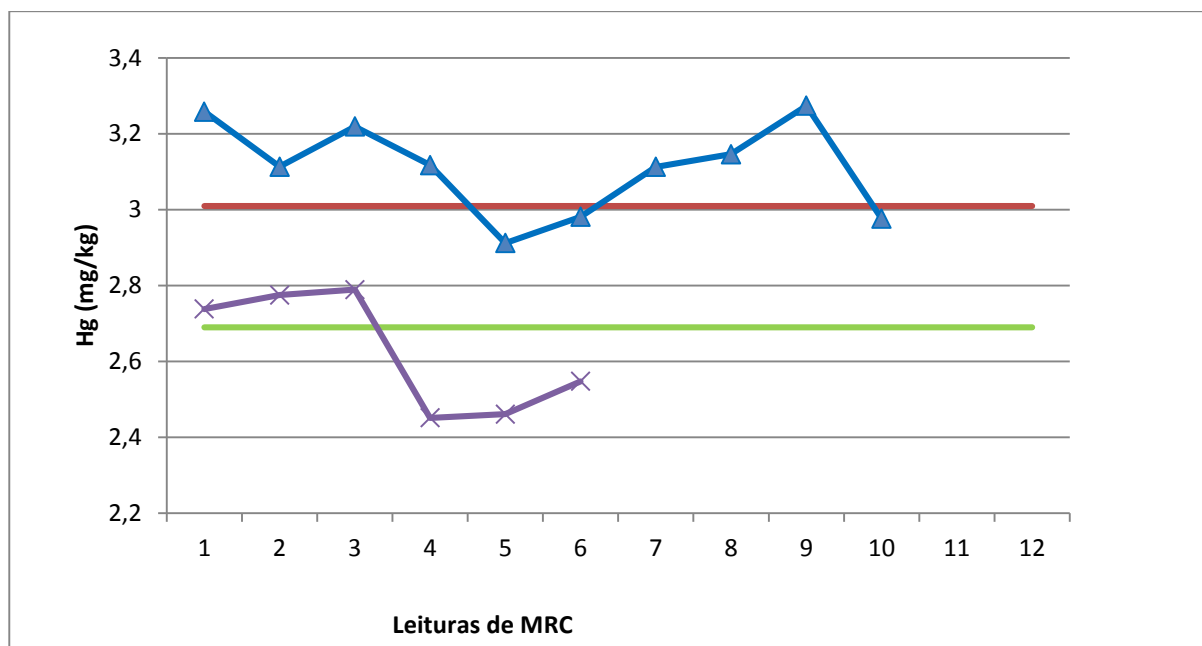


Figura13: Comparação dos níveis de Hg do MRC em mg/kg dos dois métodos analíticos estudados. (LS) Limite superior do intervalo de incerteza certificado do MRC (—); (LI) Limite inferior da incerteza certificada do MRC (—); Concentração obtida experimentalmente do MRC em dias diferentes com CV-AFS (×). Concentração obtida experimentalmente do MRC em dias diferentes com A-AAS (▲).

Concluiu-se que ambos os métodos são adequados para analisar o mercúrio total tendo apresentado as características de desempenho resumidas na tabela 17.

Tabela 17: Comparação de alguns parâmetros de validação de ambos os métodos analíticos: CV-AFS e A-AAS.

	CV-AFS	A-AAS
Coefficiente de variação (%)	4,23 ^a	16,06 ^b
Erro relativo(%)	-7,82 ^c	9,16 ^d
Z-score	-1,31 ^e	1,63 ^f

^a Calculado com base no padrão 50µg/L como indicado na secção 3.1.4

^b Calculado com base no padrão 0,5 mg/L como indicado na secção 3.2.1

^c Calculado com base no MRC como indicado na secção 3.1.5

^d Calculado com base no MRC como indicado na secção 3.2.2

^e Calculado com base no MRC como indicado na secção 3.1.5

^f Calculado com base no MRC como indicado na secção 3.2.2

3.4 Concentrações de mercúrio nas amostras de peixe

Foram analisadas 162 amostras de várias espécies de peixes com o analisador de mercúrio AMA com o intuito de apurar o seu teor de mercúrio. A sua caracterização incluindo o seu local de captura está descrita na tabela 5 da seção 2.2 (materiais e métodos). As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras estão resumidas abaixo na tabela 18 e na Fig. 14. As amostras foram analisadas em duplicado e seu valor médio foi considerado quando a sua amplitude relativa foi igual ou inferior a 20%. Os resultados individuais das amostras encontram-se no anexo 2.

Tabela 18: Concentrações de mercúrio nas amostras de peixe por A-AAS expressas em mg/Kg.

Tipo amostra	Nº amostras	[Hg] mg/kg máxima	[Hg] mg/kg mínima	Desvio padrão	[Hg] mg/kg média
Atum	21	0,99	0,37	0,15	0,61
Atum em lata	5	0,28	0,01	0,13	0,13
Bacalhau	5	0,09	0,04	0,02	0,06
Carapau	10	0,23	0,04	0,07	0,12
Dourada pequena	25	0,09	0,02	0,02	0,05
Peixe de espada preto	10	0,87	0,44	0,15	0,58
Lula	6	0,36	0,01	0,14	0,09
Perca do Nilo	14	0,30	0,04	0,08	0,17
Pescada	4	0,05	0,05	0,00	0,05
Robalo	17	0,12	0,02	0,03	0,06
Safio	6	0,68	0,11	0,26	0,33
Salmão	9	0,29	0,02	0,10	0,09
Sardinha	19	0,37	0,03	0,08	0,09
Truta	11	0,23	0,14	0,03	0,17

Cada amostra foi analisada em duplicado e a concentração foi aceite se a sua amplitude relativa for inferior a 20%; se necessário a análise foi repetida. As concentrações indicadas são as mínimas, médias, máximas obtidas para cada espécie e são indicados os respetivos desvios padrão.

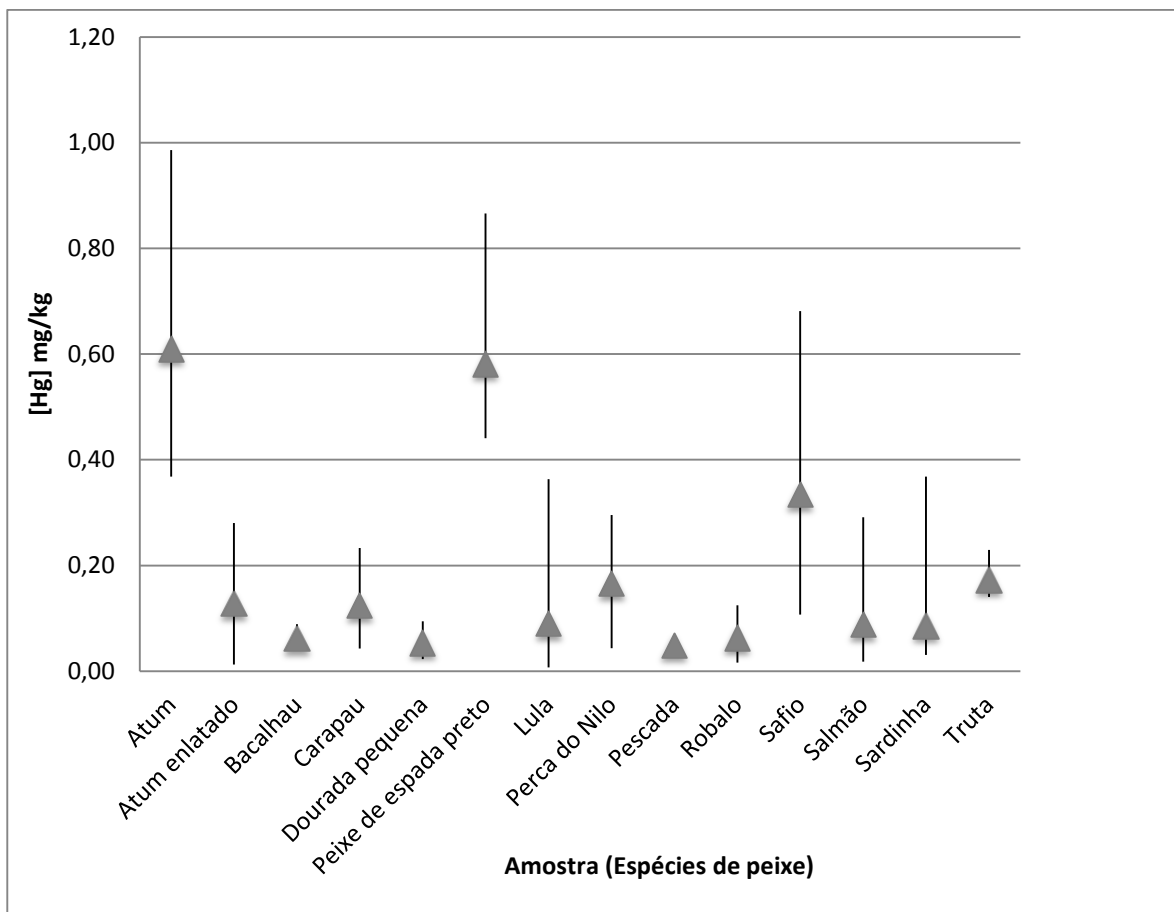


Figura14: Concentrações de Hg por espécie de peixe determinadas em amostras com o equipamento AMA 254. Gama de concentrações de Hg obtida para a espécie (|). Concentração média de Hg (▲).

Como previsto, os peixes predadores como o peixe-espada e o atum fresco foram os peixes a apresentar níveis mais elevados de mercúrio. A dourada, robalo, pescada e bacalhau foram as espécies com concentrações máximas mais baixas. No entanto, a sardinha e o carapau, apesar de serem peixes de porte inferior aos mencionados anteriormente, apresentaram valores de mercúrio superiores. O facto da dourada e robalo serem de aquicultura e a sardinha e carapau do Atlântico nordeste pode justificar estes resultados.

No gráfico abaixo (fig. 15) as amostras analisadas com o CV-AFS são amostras singulares de 9 espécies diferentes, digeridas e analisadas em duplicados independentes. É visível uma forte concordância entre os resultados obtidos com o A-AAS e o CV-AFS, com exceção da sardinha. Neste último caso provavelmente ocorreu uma contaminação do vaso de digestão ou do balão volumétrico.

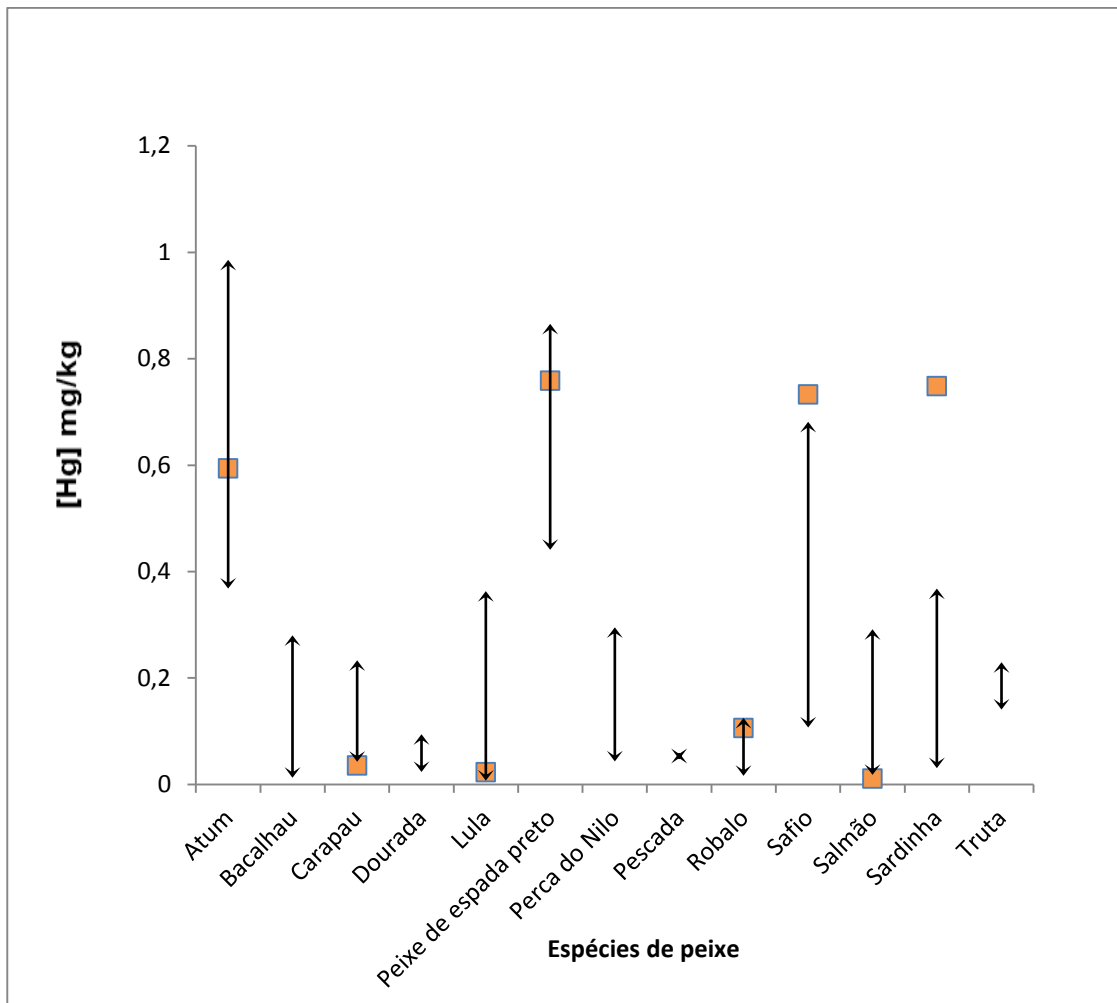


Figura15: Comparação de resultados de mercúrio obtidos no A-AAS e CV-AFS. Concentrações de amostras singulares obtidas a partir de duplicados independentes por CV-AFS (■). A gama de concentrações de Hg determinada por A-AAS e respetivo valor médio estão indicados por (↕).

A EFSA publicou na sua revista científica, uma compilação dos resultados de vários países europeus de análises efetuadas ao mercúrio dos peixes (EFSA, 2012). Na Fig. 16 os valores médios de Hg apurados pela EFSA em vários países da União Europeia e também os valores médios de mercúrio encontrados no pescado consumido em Portugal. A sua comparação não mostra discrepâncias muito relevantes mas nem todos os valores médios da EFSA estão incluídos na gama de concentrações encontrada no pescado comercializado em Portugal.

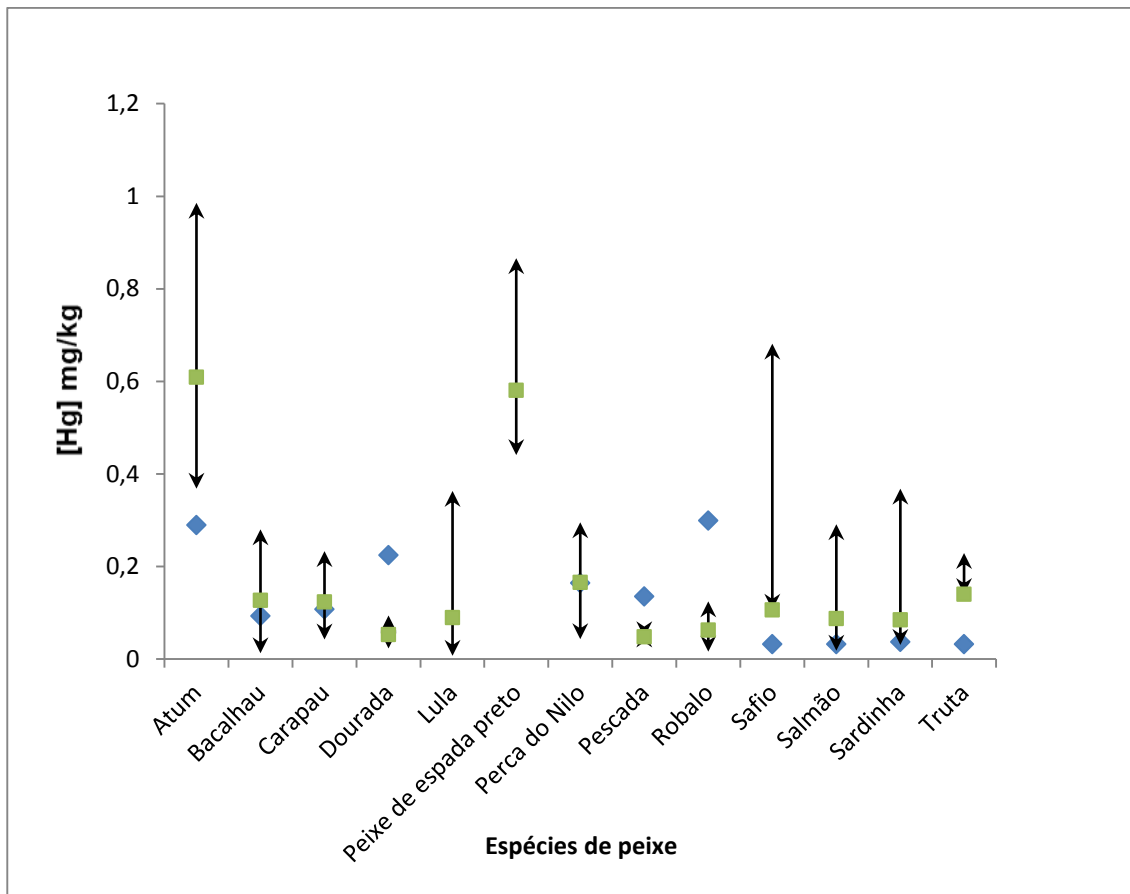


Figura16: Comparação dos valores analisados com os valores médios reportados pela EFSA (EFSA, 2012). Concentração média de Hg obtida pela EFSA (◆). Gama de concentrações obtidas por A-AAS provenientes de grandes superfícies (■). Concentração média por A-AAS (↑).

Nos resultados da EFSA, o atum apresenta uma concentração média de Hg semelhante ao da dourada e robalo, apesar de ser um peixe predador e de grande porte. No entanto, é possível que seu valor seja baixo por ser de atum em conserva (não são fornecidos dados da origem das amostras). Os valores do atum enlatado obtidos estão na mesma ordem de grandeza do valor apurado pela FDA (0,17mg/kg) na sua avaliação de exposição ao MeHg da população norte americana. (Carrington, 2008). A Agência de Proteção Ambiental norte americana, EPA, no seu sítio da internet na secção de aconselhamento acerca de que peixes devem ser evitados devido aos seus teores de mercúrio (EPA, 2013), refere que o atum branco fresco possui teores superiores ao atum em lata. A EPA aconselha também o salmão por ter teores baixos de Hg, e esses valores são concordantes com os teores de Hg apurados neste trabalho e apresentados pela EFSA (figura 16).

Os resultados da EFSA não incluem o peixe-espada mas na avaliação da exposição da população portuguesa efetuada por Carvalho *et al*, as amostras de peixe-espada analisadas tiveram um valor médio de 0,599 (Carvalho, et al., 2008), praticamente igual ao obtido com o A-AAS.

Os teores de mercúrio das amostras encontram-se todos dentro dos limites legislados no Regulamentos 1881/2006 e 629/2008, com a exceção do safio em que das 6 amostras analisadas, duas apresentaram valores acima do 0,5 mg/kg (ver anexo 2, tabela nº 11). As concentrações obtidas para atum e peixe-espada preto estão em conformidade dado que o limite legislado é 1,0 mg/kg (Figura 17).

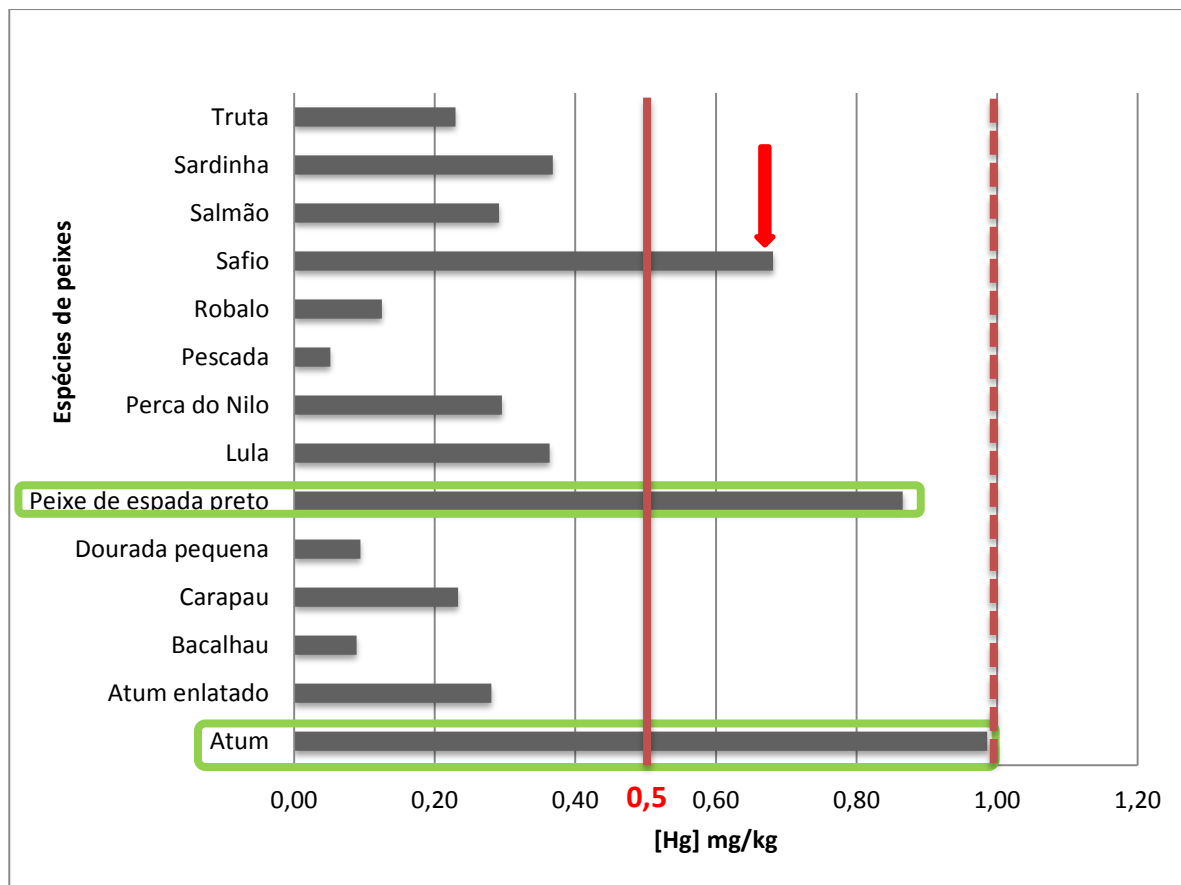


Figura 17: Comparação dos valores máximos por espécie de peixe obtidos com o seu respectivo limite legal. O atum e o peixe de espada preto estão assinalados em verde porque seu limite legal é 1mg/kg. De 6 amostras analisadas de safio, duas excederam o seu limite legal de 0,5 mg/kg.

3.5 Avaliação da exposição ao metilmercúrio e caracterização do risco

Para se efectuar uma avaliação do risco de exposição ao metilmercúrio por consumo de peixe, com base no cálculo de índices de risco (IR), foi necessário estimar as doses semanais ingeridas (DSI). Na estimativa da exposição foram necessários dados sobre o peso médio corporal da população, padrões alimentares, para além das concentrações do contaminante nos alimentos já descritas. A DSI foi comparada com a dose tolerável de ingestão semanal (DTS). A tabela 19 resume alguns dos dados utilizados no cálculo dos índices de risco, nomeadamente as 4 faixas etárias consideradas, os seus respectivos pesos médios e a quantidade de peixe ingerido por refeição (ver 2.6).

Tabela 19: Dados do peso corporal considerado e quantidade de peixe ingerido por faixa etária.

	Idade	Peso corporal (kg)	Quantidade de peixe /refeição (Kg)
Lactentes	0 - 2	10	0,02
Crianças	2 - 10	15	0,10
Adolescentes	10 - 18	40	0,15
Adultos	≥ 18	60	0,20

Peso para adulto de 60 kg (EFSA, 2012). Os pesos para os restantes grupos foram obtidos com base nas curvas de crescimento de peso para o sexo masculino no percentil 50% para as idades de 1, 4 e 12 anos.

De modo a obter índices de risco para subpopulações que comem pouco peixe, que comem muito e também para os que têm um consumo médio de peixe, foram considerados diferentes números de refeições de peixe semanais tal como se apresenta na tabela 20.

Tabela 20: Número de refeições semanais consoante o tipo de consumo: baixo, médio e elevado

	nº refeições/ semana		
	Baixo	Médio	Elevado
Lactentes	2	4	7
Crianças	2	4	7
Adolescentes	1	4	7
Adultos	1	3	7

A quantidade de mercúrio ingerido por refeição foi obtida multiplicando a concentração de mercúrio da espécie de peixe consumida pela quantidade de peixe ingerida nessa refeição, consoante a faixa etária. Para uma semana este cálculo foi efectuado como demonstra a tabela 21.

Tabela 21: Estimativa da quantidade de mercúrio ingerida por semana consoante o número e tipo de refeições de peixe consumidas.

Peixes	[Hg] ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	nº refeições / semana	Peixes consumidos	$Hg \text{ ingerido } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{semana}} \right)$ $= \sum_{n=1}^{n \text{ refeições}} \left(\text{quantidade de peixe ingerido numa refeição (kg)} \times [Hg] \frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right)$
Pescada	49	1	Pescada	$1 \times 49 \text{ ug/kg} \times \text{quantidade de peixe/refeição}$
Dourada	53	2	Pescada Bacalhau	$49 \text{ ug/kg} \times \text{peixe/refeição} + 86 \times \text{peixe/refeição}$
Bacalhau	86	3	Pescada Bacalhau Dourada	$49 \text{ ug/kg} \times \text{peixe/refeição} + 86 \text{ ug/kg} \times \text{peixe/refeição} + 53 \times \text{peixe/refeição}$
Carapau	124	4	Pescada Bacalhau Dourada Carapau	$49 \times \text{peixe/refeição} + 86 \times \text{peixe/refeição} + 53 \times \text{peixe/refeição} + 124 \times \text{peixe/refeição}$
Atum em lata	130	5	Pescada Bacalhau Dourada Carapau Salmão	$49 \times \text{peixe/refeição} + 86 \times \text{peixe/refeição} + 53 \times \text{peixe/refeição} + 124 \times \text{peixe/refeição} + 88 \times \text{peixe/refeição}$
Salmão	88	7	Pescada Bacalhau Dourada Carapau Salmão Atum Sardinha	$49 \times \text{peixe/refeição} + 86 \times \text{peixe/refeição} + 53 \times \text{peixe/refeição} + 124 \times \text{peixe/refeição} + 88 \times \text{peixe/refeição} + \text{atum} \times \text{peixe/refeição} + 86 \times \text{peixe/refeição}$
Sardinha	86			
Atum fresco	610			

Na tabela 22, os valores de DSI foram calculados dividindo as quantidades de mercúrio ingeridas numa semana (descrição na tabela 21) pelo peso corporal médio da respectiva faixa etária. Considerou-se que os lactentes consomem somente pescada. No consumo elevado, o cálculo da quantidade de mercúrio ingerido foi efetuado considerando o atum em lata (para população com consumo elevado).

Tabela 22: Dose de ingestão semanal (DSI) consoante o consumo para a respetiva faixa etária.

	Idade	peso corporal (kg)	quantidade de peixe /refeição (Kg)	µg Hg ingerido por semana			DSI (µg/Kg corpo/semana)		
				Baixo	Médio	Elevado	Baixo	Médio	Elevado
Lactente	0 - 2	10	0,02	2,0	3,9	6,9	0,2	0,4	0,7
Criança	2 - 10	15	0,1	13,5	31,3	61,6	0,9	2,1	4,1
Adolescente	10 - 18	40	0,15	7,4	46,9	92,4	0,2	1,2	2,3
Adulto	≥ 18	60	0,2	9,8	37,6	123,2	0,2	0,6	2,1

* Foi considerado que a sua exposição ao mercúrio se devia exclusivamente ao consumo de pescada. Consumo elevado calculado conforme descrito na tabela 21, com atum enlatado.

Foram calculados os índices de risco para as doses toleráveis semanais (DTS) propostas pela EPA e pela EFSA. O DTS da EFSA foi usado por ser uma referência europeia e o da EPA por ser atualmente o mais conservador e distinto do anterior. O índice de risco é obtido pela divisão do valor de DSI pelo valor de DTS (ver ponto 2.6. dos materiais e métodos).

Tabela 23: Índices de Risco calculados com base nos valores de DTS propostos pela EPA e pela EFSA para várias faixas etárias e diferentes consumos de peixe.

	IR (EPA)			IR (EFSA)		
	DTS= 0,7(µg/kg/semana)			DTS=1,3 (µg/kg/semana)		
	Baixo	Médio	Elevado	Baixo	Médio	Elevado
Lactentes*	0,3	0,6	1,0	0,2	0,3	0,5
Crianças	1,3	3,0	5,9	0,7	1,6	3,2
Adolescentes	0,3	1,7	3,3	0,1	0,9	1,8
Adultos	0,2	0,9	2,9	0,1	0,5	1,6

Foi considerado que a sua exposição ao mercúrio se devia exclusivamente ao consumo de pescada.

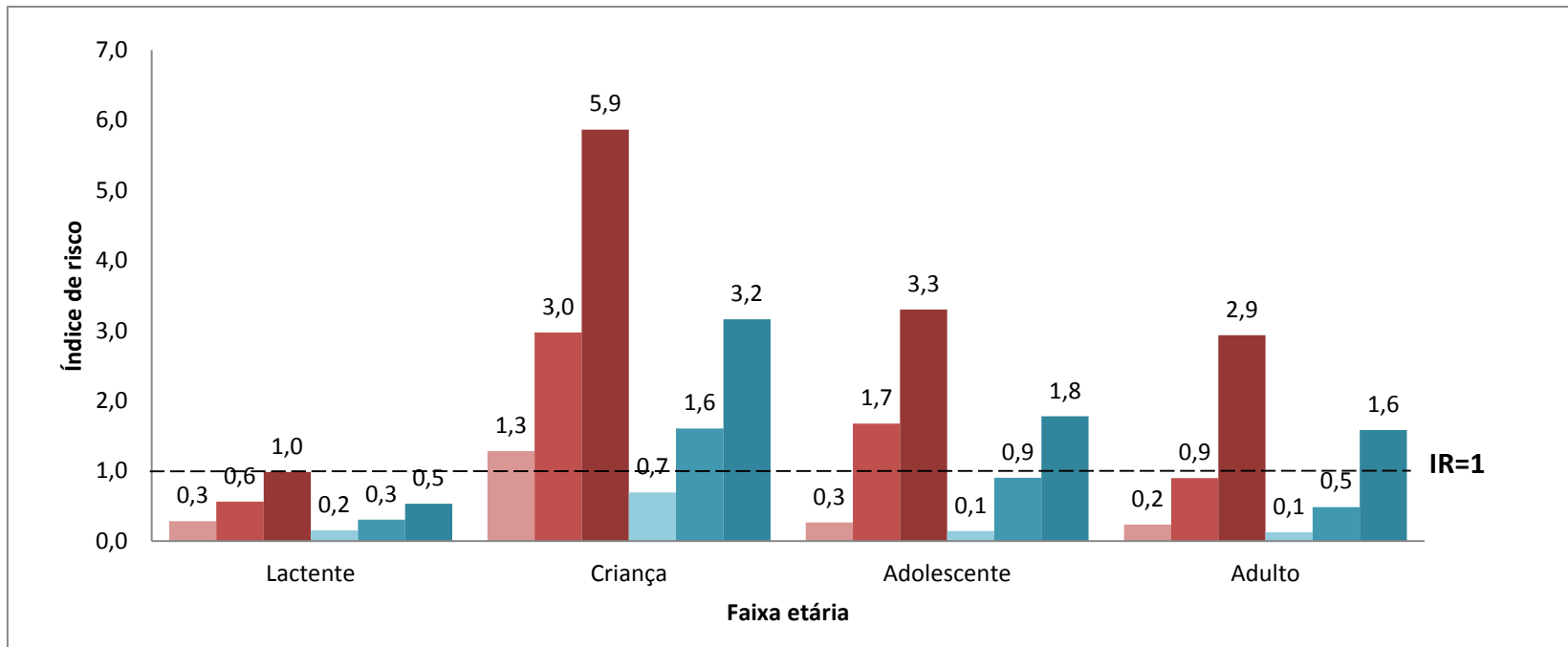


Figura 18: Representação gráfica dos índices de risco calculados para cada faixa etária tendo por base os valores de DTS propostos pela EPA e EFSA, e considerando para a população consumos: baixo, médio e alto de pescado. EPA Baixo (). EPA Médio (). EPA Elevado (). EFSA Baixo (). EFSA Médio (). EFSA Elevado ().

Com o intuito de salientar o aumento do risco pela opção de uma refeição de peixe com muito MeHg acumulado, na tabela 24 são apresentados os resultados dos índices de risco em que o consumo de atum em lata foi substituído pelo de atum fresco/congelado (espécie com maior teor de mercúrio).

Tabela 24: Índices de risco calculados utilizando os valores propostos como seguros (DTS) pela EPA e pela EFSA para consumo elevado e consumo baixo considerando o consumo de uma espécie de peixe com maior concentração de MeHg numa das refeições (consumo baixo* e consumo elevado).**

	IR (EPA)			IR (EFSA)		
	DTS= 0,7(µg/kg/semana)			DTS=1,3 (µg/kg/semana)		
	Elevado	Baixo*	Elevado**	Elevado	Baixo*	Elevado**
Crianças	5,9	6,3	10,4	3,2	3,4	5,6
Adolescentes	3,3	3,5	5,9	1,8	1,9	3,2
Adultos	2,9	3,1	5,2	1,6	1,7	2,8

*IR calculado com uma refeição de pescada e outra de atum fresco/congelado.

** Este IR foi calculado considerando que uma das 7 refeições é de atum fresco/congelado em oposição a uma refeição de atum enlatado. O IR do consumo elevado é igual ao anterior, colocado nesta tabela para efeitos comparativos.

Segundo os cálculos, para consumos elevados, todas as classes etárias estão em risco para ambos os DTS considerados, com excepção dos lactentes cujo IR com o DTS da EFSA é 0,5. Para consumos médios, encontram-se em risco as crianças e adolescentes para o DTS da EPA e para o da EFSA somente as crianças. De assinalar que os índices de risco para lactentes foram calculados somente para pescada, por este ser o peixe mais recomendado para bebés. Atendendo a que os pediatras aconselham a dar uma refeição de peixe e outra de carne, pelo que a ingestão de 7 refeições semanais de peixe num lactente com um ano de idade é comum. Quando é introduzida a alimentação familiar no cardápio do bebé, é frequente a sua exposição a outras espécies de peixe. Assim, se uma das refeições de peixe for de um peixe predador, a dose tolerável semanal poderá ser facilmente ultrapassada.

As subpopulações que acarretam maior preocupação são as das crianças e lactentes pela toxicidade do MeHg sobre o sistema nervoso central em desenvolvimento. O cérebro continua o seu desenvolvimento após o nascimento, pelo que lactentes e crianças expostas ao metilmercúrio de forma regular devem ser consideradas em risco de efeitos neurotóxicos (EFSA, 2015). O IR

com o DTS da EPA, atinge valores 6 vezes superiores ao valor aceitável para crianças e 3,3 vezes para adolescentes. Os índices de risco mais elevados obtiveram-se para as crianças, essencialmente pelo seu peso ser baixo e por já consumirem uma quantidade apreciável de peixe. Para proteger o feto de efeitos adversos do metilmercúrio no neurodesenvolvimento, também as mulheres em idade fértil não devem exceder as doses toleráveis.

Em 2015, a EFSA verificou que somente em alguns dos estudos europeus houve índices superiores a um para crianças com idade entre 1-10 anos, mas que para grande parte dos casos, a DTS era atingida com 2-3 refeições/semana (EFSA, 2015). O índice de risco apurado neste estudo para o consumo médio em crianças (IR= 1,6) está concordante com esta observação. Os índices de risco são aceitáveis para os consumos baixos de peixe, no entanto para consumos elevados ou até moderados de peixe pelas nossas crianças, os valores são mais preocupantes.

O peso considerado para lactentes, crianças e adolescentes foi o peso do percentil 50%, isto significa que há mais de 40% dos rapazes nessa idade com menos peso. As curvas de crescimento são diferentes para o sexo feminino porque tendem a ser menores que o sexo masculino para a mesma idade. Como o peso e o índice de risco são inversamente proporcionais, para um mesmo consumo, quanto menor o peso, maior o risco.

Se for considerado que uma das 7 refeições seja de uma espécie predadora como por exemplo atum fresco, peixe de espada ou tamboril, o índice de risco praticamente duplica. De modo a visualizar este efeito, na tabela 23 para consumo elevado, a diferença do cálculo de elevado e elevado** foi somente considerar que em elevado** a refeição de atum em vez de ser atum de lata foi atum fresco. Esta distinção foi feita para não sobrevalorizar a quantidade de mercúrio ingerido num consumo elevado mas também para realçar a importância de selecionar um peixe com um baixo nível de Hg. Se considerarmos outro exemplo, teria que se ingerir, 10 refeições de dourada para equivaler ao aporte de mercúrio de uma refeição de peixe de espada preto. Nesta sequência, uma criança que ingira só duas refeições de peixe por semana mas em uma seja de um peixe predador (por ex: filetes de peixe espada preto) e a outra pescada, pode ter um índice de risco de 3,2, idêntico ao consumo de 7 refeições anteriormente considerado.

Numa avaliação de risco da EFSA de 18 de Março de 2004, refere uma ingestão média para Portugal de 97,3 µg/ semana, inferior ao consumo elevado mas acima do médio estimado na

tabela 22, porque eles apuraram este valor com base na quantidade de peixe consumida *per capita* e num valor médio de mercúrio em peixe. Nota que nesta avaliação a EFSA considera os portugueses em risco porque $97,3 \mu\text{g}/\text{semana}$ a dividir por 60kg resulta num valor de DSI de $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{semana}$, superior ao valor de DTS recomendado atualmente (EFSA, 2015).

A EFSA, na sua opinião científica acerca do risco do MeHg para saúde pública 2012 relata que grupos que consomem muito peixe, excedem até 6 vezes o seu DTS. Esta avaliação está concordante com a apresentada na tabela 24 para consumo elevado** com o DTS da EFSA, IR de 5,6 para crianças. Nesta mesma avaliação, a EFSA refere que os peixes que mais contribuíram para a ingestão alimentar de MeHg foram o atum, bacalhau, pescada, perca e espadarte. Na tabela 21, três destas espécies foram consideradas na estimativa de peixes consumidos numa semana pelos portugueses. Devido às variações em quantidade e espécies de peixe consumidas existentes entre países europeus, a EFSA (2015) refere que o aconselhamento à população deve ser feito considerando os padrões alimentares para cada país. Por exemplo, o espadarte é um peixe pouco consumido em Portugal, mas muito apreciado em outros países e isso tem de ser tido em conta pelas entidades governamentais de cada país (EFSA, 2015).

O risco presumível pode ser confirmado com biomarcadores como análises de mercúrio em sangue ou cabelo. O painel de peritos da área de contaminantes alimentares da EFSA documenta uma biomonitorização, em qual concluiu que, para consumos médios, o DTS não é ultrapassado mas confirma exposição superior para consumos elevados. (EFSA, 2012).

Apesar do consumo de peixe implicar o consumo indesejável MeHg, não se deve evitar o seu consumo pois este possui nutrientes importantes para a alimentação como vitaminas, ómega 3 e selénio.

Com base em estudos epidemiológicos a EFSA concluiu que o consumo de peixe durante a gravidez teve efeitos benéficos para o desenvolvimento neurofuncional da criança e em adultos com doenças coronárias cardíacas, ou seja, o benefício do consumo de peixe supera seus riscos possíveis para 1 a 4 refeições semanais (EFSA, 2015). Deve-se continuar a consumir pescado mas é muito importante optar por espécies com teores mais baixos de MeHg, ou seja, evitar peixes de grande porte e predadores como peixe-espada, espadarte, tubarão entre outros.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a exposição da população portuguesa ao MeHg pelo consumo de pescado. Com este intuito, foi analisado o mercúrio total de 162 amostras de peixes tais como,atum fresco, salmão, sardinha, robalo, dourada, carapau, truta, lula, perca do Nilo, safio, peixe-espada preto, pescada congelada, atum enlatado e bacalhau demolido,obtidasem grandes superfícies.

Validaram-se dois métodos distintos de análise de mercúrio, CV-AFS e A-AAS, com o auxílio do material de referência certificado BCR 463 de peixe seco congelado pulverizado com o teor de 2,85 mg/kg de mercúrio para qual tiveram os respectivos erros relativos, -7,82 % e 9,16%. Os z-scores dos métodos foram -1,3 e 1,6 respectivamente, mostrando que ambos os métodos têm desempenhos adequados.

As amostras foram analisadas com o analisador direto (A-AAS) que por não requerer digestão ácida da amostra torna-se mais expedito. O teor de mercúrio obtido por espécie foi comparado com os obtidos pela EFSA onde não se observou discrepâncias relevantes. O teor de mercúrio das amostras estavam todas conformes para os seus limites legais excepto duas das seis amostras de safio analisadas.

Os valores obtidos das análises foram utilizados para estimar os índices de risco para lactentes, crianças, adolescentes e adultos. Segundo os índices de risco calculados considerando os teores de mercúrio apurados nos peixes mais apreciados pelos portugueses, relevando consumos baixos, médios e altos consoante o número de refeições semanais, conclui-se que para consumos elevados, todas as classes etárias estão em risco excepto os lactentes cujo IR atinge 0,5 com o DTS da EFSA. Para consumos médios considerando a dose semanal tolerável da EPA de 0,7 µg/kg peso corporal/semana e o DTS da EFSA de 1,3 µg/kg peso corporal/semana, encontram-se em risco ascrianças e adolescentes, classes preocupantes devido a toxicidade do MeHg no sistema nervoso central em desenvolvimento. Os índices de risco foram calculados com o DTS da EFSA por ser da autoridade europeia e com o DTS da EPA por este ser tão distinto dos outros valores propostos pelas agências reguladoras. Existe estas diferenças entre valores de DTS

propostos por agências terem uma visão mais conservadora que outras mesmo tendo todos a base comum dos estudos epidemiológicos das Seychelles e Ilhas Faroé.

O IR mais elevado é para as crianças, que tem um alto consumo de peixe, com o DTS da EPA atingindo 5,9 e com o da EFSA de 3,2. Se uma das refeições destas crianças for de um peixe como atum fresco em vez de atum enlatado, os seus índices de risco quase que duplicam, sendo de 10,4 com o DTS da EPA e de 5,6 com o DTS da EFSA. Aqui reside a importância de escolher peixes com pouco metilmercúrio acumulado.

O consumo de peixe acarreta a ingestão inconveniente de MeHg, no entanto, ao evitar o consumo de peixe, aumenta-se o consumo de carne, o que pode aumentar a exposição a outros possíveis contaminantes como resíduos de medicamentos veterinários, pesticidas, cádmio, chumbo entre outros.

Com uma alimentação variada, obtém-se um maior leque de nutrientes e reduz-se a possibilidade de se ingerir em excesso algum determinado contaminante. O pescado é um componente importante da dieta e fonte de nutrientes, tais como proteínas, ácidos gordos ómega-3 (UNEP, 2002), iodo, selénio, cálcio e vitaminas A e D (EFSA, 2015) entre outros, que não são facilmente substituídos. O benefício do consumo de peixe supera seus riscos possíveis para 1 a 4 refeições semanais (EFSA, 2015). O Conselho Científico da EFSA refere que, devido à variedade de espécies consumidas na Europa, não é possível elaborar uma recomendação única para o consumo de peixe. No entanto, aconselha cada país a considerar os seus padrões de consumo de peixe, especialmente as espécies mais consumidas, e avaliar de forma cuidadosa os riscos de exceder o valor de DTS, mantendo na mesma o consumo e os benefícios do pescado na alimentação. Assim, de modo a ingerir menos MeHg sem reduzir o consumo de peixe deve-se optar por espécies que apresentam teores baixos de mercúrio como robalo, dourada, salmão e evitar o peixe-espada, safio e atum fresco.

5 SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

Grande parte da população portuguesa não está sensibilizada para escolher peixes que não sejam predadores para sua alimentação. Esta sensibilização não é de fácil execução sem levantar medos irracionais porque por falta de conhecimento, a população considera que se não deve comer determinada espécie de peixe é porque esta se encontra em ambientes poluídos e não entende facilmente os conceitos de bioacumulação e bioconcentração.

Na sequência do trabalho já efetuado seria importante averiguar se as instituições educativas responsáveis pela seleção das refeições semanais de crianças e jovens com idades compreendidas entre 1 a 17 anos têm isto em consideração quando elaboram as ementas. Muitas crianças almoçam nos estabelecimentos escolares, ou seja, 5 das 14 refeições semanais são feitas na escola. Dada a sensibilidade desta faixa etária ao metilmercúrio, poder-se-ia começar por consultar as ementas dos infantários e escolas para perceber se dão prioridade a peixes não predadores e quantas refeições de peixe são administradas por semana.

Outra população-alvo poderia ser a dos estudantes universitários, muitos que estão deslocados de casa, e que comem frequentemente nas cantinas. Também aqui se pode averiguar que peixes são servidos e estimar o impacto que isso pode ter nas mulheres em idade fértil.

A obtenção de dados acerca dos volumes de vendas de peixarias de grandes superfícies auxiliaria no fornecimento acerca das espécies mais consumidas pelos portugueses e consequentemente acerca dos seus índices de risco.

6 BIBLIOGRAFIA

1. ATSDR. (1999). *Toxicological Profile for Mercury*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
2. ATSDR (2015). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/mrls/mrllist.asp>
3. Bisinoti, Márcia, & Jardim. (2004). *O comportamento do metilmercúrio no ambiente*. Obtido de *Quimica Nova*, Vol. 27, No. 4, 593-600: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000400014&script=sci_arttext]
4. Camões, M. F. (2001). *Quantificação das incertezas na medições analíticas - Versão em português do guia EURACHEM/CITAC*. Obtido de [http://www.eurachem.fc.ul.pt/Guia_Eurachem_P.pdf]
5. Carrington, C; Bolger. (2008). *An Exposure Assessment for Methylmercury from Seafood for Consumers in the United States*. FDA- U.S. Food and Drug Administration.
6. Carvalho, AINM, Matos, ML, Mateus., APM, Santos., & MCC, Batoréu. (2008). High-Fish Consumption and Risk Prevention: Assessment of Exposure to Methylmercury in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol 71, p 1279-1288.
7. Chan, H. C. (2000). The Influence of Nutrition on Methyl Mercury Intoxication. *Environmental Health Perspectives*, 108, pp. 29-56, Vol 108, Supplement 1.
8. CITAC/ EURACHEM. (2002). *Guide to Quality in Analytical Chemistry*.
9. Clarkson. (2002). Three Modern Faces of Mercury. *Environmental Health Perspectives*, pp. Vol 110, Supplement 1.

10. Clarkson, TW; Thurston; Pearson. (2009). Postnatal exposure to methyl mercury from fish consumption: A review and new data from Seychelles Child Development Study. *Elsevier, Neurotoxicology*, 30, 338-349.
11. Dart, R. C. (2003). *Medical Toxicology*. 3ª edição (p. 1806). Lippincott Williams and Wilkins.
12. Direção Geral de Saúde. (2005). *Saúde Infantil e Juvenil - Programa-tipo de Actuação*. Direção Geral de Saúde. Divisão de Saúde Materna, Infantil e dos Adolescentes: [<http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008188.pdf>]
13. Eduardo, C., & Nunes, M. L. *A Importância do Consumo de Produtos de Pesca em Portugal*. Instituto Portugues do Mar e da Atmosfera: [<http://www.fileiradopescado.com/attachments/article/10/Estudo-A-Importancia-do-Consumo-de-Produtos-da-Pesca-em-Portugal.pdf>]
14. EFSA. (18 de Março 2004). EFSA provides risk assessment on mercury in fish: precautionary advice given to vulnerable groups. *EFSA- Press Release and news stories*.
15. EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. *The EFSA Journal*, 34, 34, 1-14.
16. EFSA. (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 2012, 10(12):2985.
17. EFSA. (2015). Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal* 2015, 13(1):3982.
18. Encyclopedia Britannica. (2012). *Mercury (Hg)*. Obtido de [<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/375837/mercury>]

19. EPA. (2013). *United States Environmental Protection Agency*. Obtido de Fish and Shellfish:Outreach and Communication: [http://water.epa.gov/scitech/swguidance/fishshellfish/outreach/advice_index.cfm]
20. Farina, M. Aschner, M. Rocha, JBT (2011). Environmental Chemicals and Neurotoxicity Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166649/pdf/nihms295876.pdf: Toxicol Appl Pharm 256.]
21. Harris, D. Krabbenhoft, R. Manson, M. Murray, h. R. Reas, & T. Saltman. (2007). Ecosystem Responses to Mercury Contamination- Indicators of Change. Em. Florida - USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
22. Health Canada. (2007). Human Health Risk Assessment of Mercury in Fish and Health Benefits of Fish Consumption. *Bureau of Chemical Safety Food Directorate Health Products and Food Branch*, [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/nutrition/merc_fish_poisson-eng.pdf.]
23. INE, I. N. (2006). *População residente (N.º) por Local de residência (NUTS - 2002), Sexo, Grupo etário e Tipo de alimentos consumidos nas refeições principais no dia anterior à entrevista*; Instituto Nacional de Estatística: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0001716&contexto=bd&selTab=tab2]
24. IPAC. (2007). *Guia para a quantificação ea incerteza em ensaios químicos - OGC 007*. Instituto Português de Acreditação e Certificação: [http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC007.pdf]
25. IRMM. (2012). *ERM Application Notes*. Obtido de European Reference Materials site: [http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_portugese_rev3.pdf]

26. IUPAC. (1998). The determination of mercury species in environmental and biological samples (Technical Report). *Pure and Appl. Chem.*, vol 70, n° 8, p 1585-1615.
27. JEFCA. (2010). Health risks associated with fish consumption focus on methylmercury, dioxins and dioxin-like PCBS. *JOINT FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption*, [<http://www.fao.org/docrep/meeting/024/k7107e.pdf>.]
28. JOUE. (2006). Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.
29. JOUE. (2008). REGULAMENTO (CE) N.º 629/2008 DA COMISSÃO de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.
30. LECO. (s.d.). Mercury Analyser AMA 254 - Instruction Manual.
31. LECO. (s.d.). *User Manual AMA 254 Advanced Mercury Analyzer*. Obtido em 10 de Dezembro de 2011, de [http://www.leco.com/resources/articles_and_reference/pdf/WorldCoal.pdf]
32. Lem, A. Paquette. (2008). Seafood Market and Trades: A Global Perspective and an overview of EU Mediterranean Countries. *Options Méditerranéennes*, Series B, n.º2, p 43-55.
33. Nestle. (2013). *Tudo o que precisa de saber sobre a alimentação diversificada*. Obtido de Alimentação do bebé: [<http://www.nestlebebe.pt/alimentacao-do-bebe/alimentacao-diversificada-e-agora/tudo-o-que-precisa-de-saber-sobre>]
34. Nortje, J. (2010). *Determination of Total Mercury in Fish and Biological Tissue Using a Direct Mercury Analyzer*. American Laboratory: [<http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/502-Determination-of-Total-Mercury-in-Fish-and-Biological-Tissue-Using-a-Direct-Mercury-Analyzer/>]

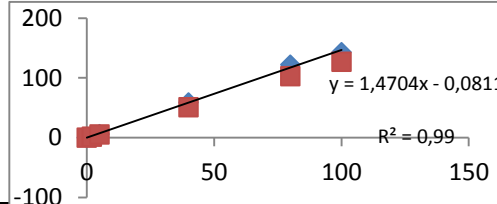
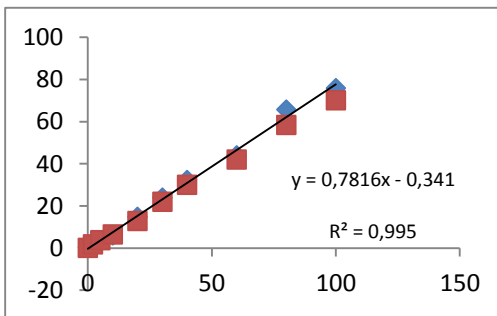
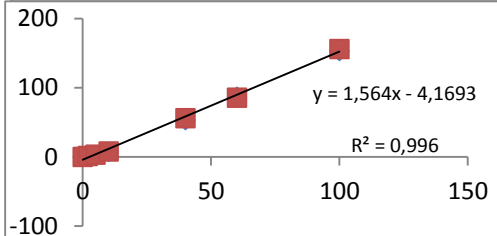
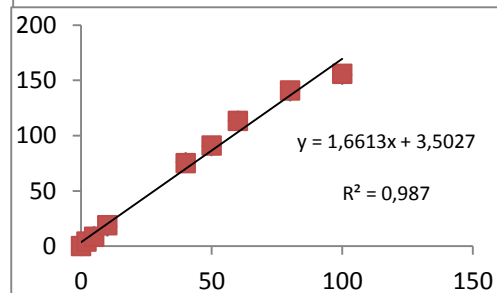
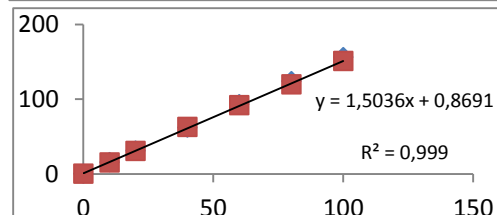
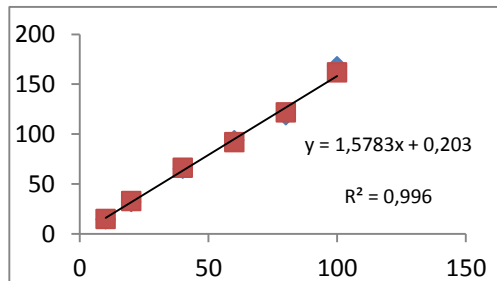
35. Nunes; A. Cavaco, & C. Carvalho (2014). Exposure assessment of pregnant portuguese women to methylmercury through the ingestion of fish: Cross sectional survey and biomarker validation. *Journal of Toxicology and Enviromental Health- Part A* 77:133-142.
36. Nunes, E. (2010). *Avaliação da exposição ao metilmercúrio por consumo de peixe em Portugal: Relação benefício- risco para a saúde infantil*. Faculdade de Farmácia; Universidade de Lisboa.
37. Nunes. E,A. Cavaco, & C. Carvalho (2014). Children health risk and benefits of fish consumption. Risk indices based on a diet diary follow-up of two weeks. *Journal of Toxicology and Enviromental Health - Part A* 77: 103-114.
38. PS Analytical Ltd. (2001). PSA 10.023 Merlin Fluorescence Detector - User Manual. Kent-England.PSA Mercury Analyser: [<http://mercuryanalyser.com/tag/atomic-fluorescence/>]
39. RELACRE (Associação de Laboratórios acreditados de Portugal). (2000). *Guia RELACRE 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Lisboa: RELACRE.
40. U.S. EPA. (2009). *Large Lakes and Forecasting Research Branch*. Obtido de U.S. Enviromental Protection Agency: [http://www.epa.gov/med/grosseile_site/LMMBP/mercury.html]
41. U.S. EPA. (2010). *Mercury*. de US Enviromental Protection Agency: [<http://www.epa.gov/hg/exposure.htm#1>]
42. UNEP. (2002). *Global Mercury Assesment*. Geneva Switzerland: United Nations Enviromental Programme.

43. UNEP. (2008). *Guidance for Identifying Populations at risk from Mercury Exposure*. Geneva, Switzerland: Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases.
44. USP. *Tabela estatística F- Snedecor*. Universidade de São Paulo: [<https://www.ime.usp.br/~yambar/MI404-Metodos%20Estatisticos/Tabelas/tabela-F.pdf>]
45. WHO. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 2007 Methylmercury
<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3083>
46. Yu, M. -H. (2005). *Environmental Toxicology- Biological and Health Effects of Pollutants (2 Edition)*. United States of America: CBR Press LLC.
47. Zaki, A. L. (1978). Methylmercury poisoning in Iraqi children; Clinical observations over two years. *British Medical Journal*, pp. 613-616.
-

ANEXO 1 – RESULTADOS DETALHADOS DA ANÁLISES DE PEIXE REALIZADAS POR CV-AFS

Tabela 25: Controlo das rectas de calibração do CV-AFS

Data	[padrão Hg]	Leitura (AU)		declive (b)	ordenada na origem (a)	R2
24/10/2011	10	14,7	15,2	1,578	0,203	0,996
	20	32	33			
	40	65,4	66,3			
	60	94	92			
	80	119	122			
	100	168	162			
31/10/2011	0	0,4	0,4	1,504	0,869	1,000
	10	15,8	15,3			
	20	31,2	30,7			
	40	62,2	62,8			
	60	93,1	92			
	80	124	120			
14/11/2011	0	0	0,1	1,661	3,503	0,987
	2	3,1	4,2			
	5	9,1	8,6			
	10	17,8	18,8			
	40	76	75			
	50	90,6	91			
	60	113,5	113,3			
	80	140	141			
25/11/2011	0	0	0,1	1,564	-4,169	0,997
	2	1,4	1,3			
	5	2,5	3,2			
	10	7,3	8,1			
	40	53	56			
	60	87	85,5			
27/02/2012	0	0,2	0,1	0,782	-0,341	0,996
	2	1,4	1,8			
	5	3,4	3,7			
	10	6	6,5			
	20	14,9	12,9			
	30	23,9	22			
	40	32,3	30,1			
	60	44	42			
	80	65,8	58,5			
100	75,9	70,1				
07/03/2012	0	0	0	1,470	-0,081	0,998
	2	2,7	1,9			
	5	6,1	5,3			
	40	59,1	50,7			
	80	122,4	102,8			



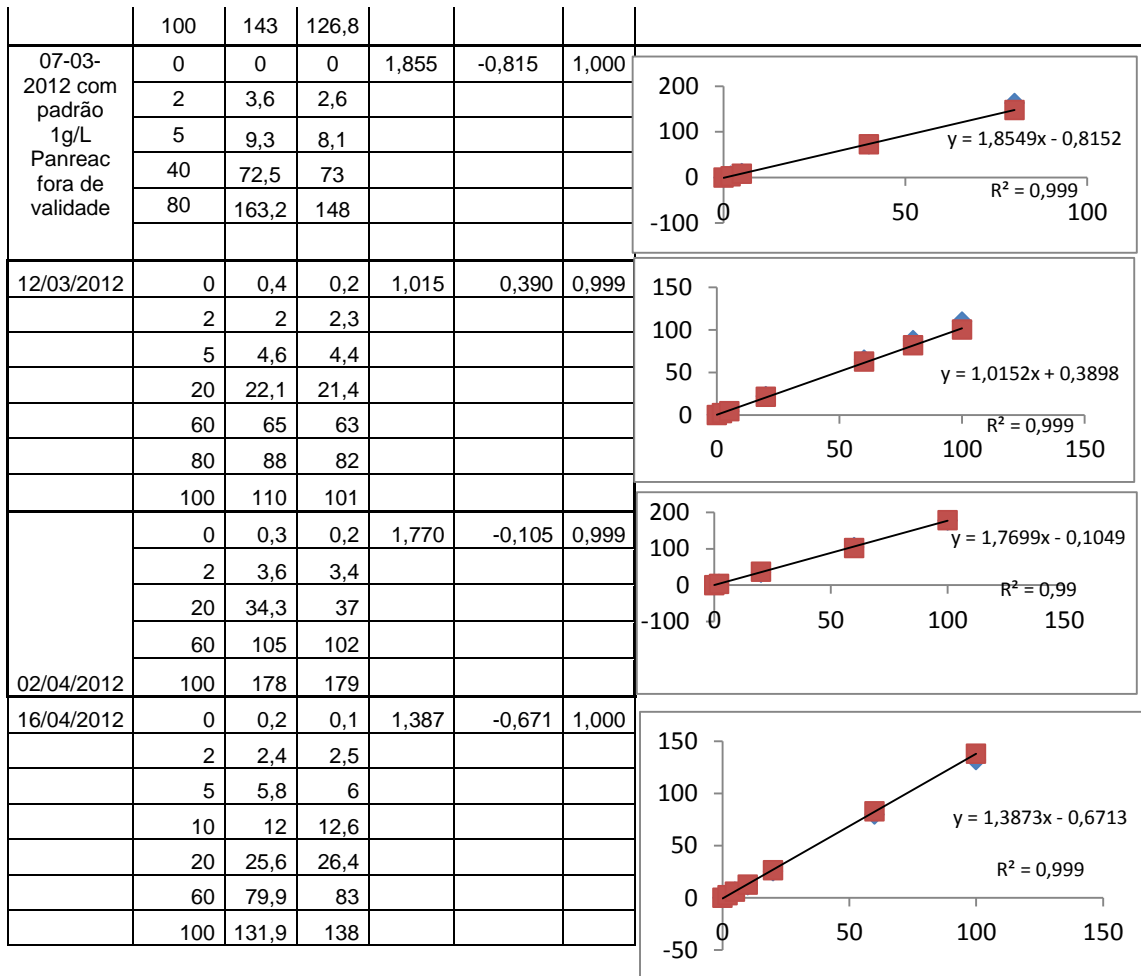


Tabela 26: Resultados práticos com o CV-AFS.

Data	ID amostra	Leitura (AU)		declive (b)	ordenada na origem (a)	ug/L	massa analisada	[amostra] ug Hg/ g peixe	[MRC com correção humidade] ug Hg/ g peixe		
31/10/2011	MRC (BCR 43)	10,7	10,8	1,5036	0,8691	6,57	0,0240	2,74	3,19		
		10,1	9,7			6,01	0,0245	2,45	2,85		
		7,2	7,2			4,21	0,0237	1,78	2,07		
		8,7	8,2			5,04	0,0246	2,05	2,39		
	73879 Robalo	2,7	2,9			1,28	0,1211	0,11	0,12		
		3,9	4			2,05	0,1103	0,19	0,22		
		3	2,9			1,38	0,1302	0,11	0,12		
						Recuperação %					
25/11/2011	Branco dig LMV	0	0	1,564	-4,1693	2,67	Recuperação %				
	10ppb+carapau 76448	1,6	1,6			3,69	36,9				
	10ppb+carapau 76448	1,7	1,7			3,75	37,5				
	10ppb+carapau 76448	1,8	1,9			3,85	38,5				
	30ppb+carapau 76448	3,8	3,8			5,10	17,0	Não satisfatório			
	30ppb+carapau 76448	3,4	4			5,03	16,8				
	30ppb+carapau 76448	5,7	4,9			6,05	20,2				
	70ppb+carapau 76448	20,7	18,7			15,26	21,8				
	70ppb+carapau 76448	16,7	23,7			15,58	22,3				

MRC= 2,85 ug/g

Valores abaixo do 1º padrão, introduzir padrões abaixo de 10ppb

Há perda de analito. Digestão tem que ser optimizada

	70ppb+carapau 76448	20,2	22			16,1 6	23,1			
	MRC	1,3	1,2			3,47	0,0218	1,59	1,85	2,85±0,17
		1,4	1,1			3,47	0,0223	1,55	1,81	
27/02/201 2	Branco dig LMV	0,9	1	0,781 6	-0,341	1,65				
	MRC-vaso 2	6,9	6,7			9,14	0,1220	0,75	0,87	
	MRC-vaso 3	17,3	10, 9			22,5 7	0,1940	1,16	1,35	2,85±0,17
	espada laranjinha-vaso 5	54	52			68,2 5	1,1550	0,59		Resultado
	espada laranjinha-vaso 6	71	74, 9			93,7 7	1,0110	0,93		0,59
	carapau laranjinha-vaso 7	2,4	2,7			3,70	0,9200	0,04		Resultado
	carapau laranjinha-vaso 8	2,4	2,1			3,31	1,0380	0,03		0,04
	cavala laranjinha-vaso 9	4	3,6 1			5,30	0,9880	0,05		Resultado
	cavala laranjinha-vaso 10	6,4	5,7			8,18	0,8300	0,10		0,08
07/03/201 2	Branco dig LMV-v1	0,3	0,4	1,854 9	-0,8152	0,79	Recuperação %			
	cavala+spike 200uL-v2	15,6				16,0 4	80,2			
	cavala+spike 200uL-v3	16,6				17,0 4	85,2			

	cavala+spike 400uL-v4	28,3				28,7 4	71,8	Não satisfatóri o	Digerido com NOX
	cavala+spike 400uL-v5	23,1				23,5 4	58,8	Não satisfatóri o	Digerido com NOX
	cavala+spike 600uL-v6	51,5				51,9 4	86,6		
	cavala+spike 600uL- v7	22,5				22,9 4	38,2	Não satisfatóri o	Digerido com NOX
	cavala+spike 800uL - v8	72,4				72,8 4	91,0		
	cavala+spike 800uL -v9	69,3				69,7 4	87,2		
	cavala+spike 800uL -10	71,9				72,3 4	90,4		
12/03/201 2	MRC BRC 463- v7	25,3	24, 2	1,015 2	0,3898	24,3 7	0,0990	2,46	2,87
	MRC BRC 463- v8	28,6	26			26,9 2	0,0970	2,77	3,23
	MRC BRC 463- v9	27,1	23, 6			24,9 7	0,0980	2,55	2,97
	MRC BRC 463- v10	29	27			27,6 2	0,0990	2,79	3,25
02/04/201 2	73699 salmão v1	0,4	0,3	1,769 9	-0,1049	0,41	0,501	0,01	
	73699 salmão v2	0,7	0,6			0,71	0,502	0,01	
	74716 safio v3	34,4	38, 1			36,3 1	0,512	0,71	
	74716 safio v4	34,1	43			38,6 1	0,510	0,76	

NOTA:
Como se
tinha
verificado
fracas
recuperaçõe
s nas
análises
anteriores,
suspeitei
das
digestões
no LMV
estarem a
libertar
vapor
durante a
digestão.
Optimizou-
se as
condições
de digestão
de modo a
melhorar a
recuperação
. Deixar a
amostra a
reagir a frio
duante
mínimo um
dia, baixar
T°C de
distão para
180°C e
apertar bem
os vasos.

	74540 atum v6	27,8	29,9			28,9 1	0,506	0,57
	74540 atum v7	34,5	28			31,3 1	0,507	0,62
	77382 chicharro v5	14,6	10,5			12,6 1	0,504	0,25
	77382 chicharro v8	13,3 1	13,4			13,4 1	0,511	0,26
	73935 lulas v9	1,6	1,1			1,41	0,514	0,03
	73935 lulas v10	0,9	0,8			0,91	0,464	0,02
16/04/2012	74138 robalo v1	15	18	1,387 3	-0,6713	16,9 8	0,507	0,33
	74138 robalo v2	12	10			11,4 8	0,504	0,23
	74671 cavala v3	1,6	2,4			2,48	0,505	0,05
	74671 cavala v4	2,3	2,3			2,78	0,501	0,06
	74679 sardinha v5	31,9	32			32,4 3	0,503	0,64
	74679 sardinha v6	41,9	43			42,9 3	0,503	0,85
	74702 carapau v7	1,1	1,7			1,88	0,501	0,04
	74702 carapau v8	1,5	2,1			2,28	0,507	0,05
	73761dourada v9	1,8	1,1			1,93	0,506	0,04
	73761dourada v10	1,1	1,2			1,63	0,503	0,03

Inferior ao LQ

ANEXO 2 – RESULTADOS DETALHADOS DAS ANÁLISES DE PEIXE REALIZADAS COM A-AAS

RESULTADOS PRATICOS COM O ANALISADOR DIRECTO DE MERCURIO

As amostras foram analisadas em duplicado e aceitaram-se os resultados das amostras cuja amplitude relativa fosse inferior a 21%.

Tabela 27: Teores de mercúrio em atum.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
28/07/2012	Atum	0,7377	0,8388	13	0,788	0,62	0,16	satisf	0,99	0,37	21
		0,6284	0,6302	0	0,629			satisf			
		0,9223	0,9062	2	0,914			satisf			
		0,4374	0,4862	11	0,462			satisf			
		0,5376	0,5313	1	0,534			satisf			
		0,9678	1,0039	4	0,986			satisf			
		0,6851	0,6614	4	0,673			satisf			
		0,5585	0,5395	3	0,549			satisf			
		0,4568	0,5302	15	0,494			satisf			
		0,5806	0,5564	4	0,569			satisf			
		0,5278	0,5625	6	0,545			satisf			
		0,5093	0,5282	4	0,519			satisf			
		0,5839	0,6105	4	0,597			satisf			
		0,5297	0,5409	2	0,535			satisf			
		0,5479	0,5464	0	0,547			satisf			
		0,3958	0,3407	15	0,368			satisf			
		0,8539	0,8331	2	0,844			satisf			
		0,7397	0,7179	3	0,729			satisf			
		0,4916	0,5262	7	0,509			satisf			
		0,6309	0,6293	0	0,630			satisf			
		0,5611	0,5656	1	0,563			satisf			

Tabela 28: Teores de mercúrio em atum em lata.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
30/01/2014	Atum lata	0,2611	0,2542	3	0,25765	0,13	0,13	satisf	0,28	0	5
		0,2844	0,2763		0,28035						
		0,0104	0,0195		0,01495						
		0,0103	0,0147		0,0125						
		0,073	0,0753		0,07415						

Tabela 29: Teores de mercúrio em bacalhau.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
30/01/2014	Bacalhau	0,0536	0,0475	12	0,05055	0,06	0,02	satisf	0,09	0,04	5
		0,0589	0,0597	1	0,0593			satisf			
		0,0667	0,0677	1	0,0672			satisf			
		0,0891	0,0888	0	0,08894			satisf			
		0,0411	0,0453	10	0,0432			satisf			

Tabela 30: Teores de mercúrio em carapau.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
18/11/2012	Carapau	0,0389	0,0468	18	0,0428	0,1243	0,06803	satisf	0,23	0,04	4
		0,0464	0,0469	1	0,0467			satisf			
		0,0475	0,0790	50	0,0633			n conforme			
		0,0475	0,0921	64	0,0698			n conforme			
		0,1172	0,1009	15	0,1090			satisf			
		0,1170	0,0965	19	0,1068			satisf			
		0,0503	0,0903	57	0,0703			n conforme			
		0,1850	0,2213	18	0,2031			satisf			
		0,1043	0,1513	37	0,1278			n conforme			
		0,2281	0,2381	4	0,2331			satisf			
		0,1156	0,3636	104	0,2396			n conforme			
		0,2406	0,2119	13	0,2262			satisf			
		0,0890	0,1116	22	0,1003			n conforme			
		0,0576	0,0675	16	0,0625			satisf			

Tabela 31: Teores de mercúrio em dourada pequena.

Data	Tipo amostra	ppm	Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras	
25/08/2012	Dourada pequena	0,0574	0,0653	13	0,061	0,05	0,02	satisf	0,09	0,02	25
		0,1032	0,0854	19	0,094			satisf			
		0,0671	0,0712	6	0,069			satisf			
		0,0559	0,0539	4	0,055			satisf			
		0,0508	0,0540	6	0,052			satisf			
		0,0675	0,0785	15	0,073			satisf			
		0,0218	0,0261	18	0,024			satisf			
		0,0929	0,0914	2	0,092			satisf			
		0,0283	0,0232	20	0,026			satisf			
		0,0253	0,0309	20	0,028			satisf			
		0,0267	0,0280	5	0,027			satisf			
		0,0778	0,0643	19	0,071			satisf			
		0,0230	0,0233	1	0,023			satisf			
		0,0642	0,0637	1	0,064			satisf			
		0,0281	0,0259	8	0,027			satisf			
		0,0602	0,0587	2	0,059			satisf			
		0,0623	0,0540	14	0,058			satisf			
		0,0711	0,0604	16	0,066			satisf			
		0,0609	0,0550	10	0,058			satisf			
		0,0522	0,0530	1	0,053			satisf			
		0,0624	0,0656	5	0,064			satisf			
		0,0576	0,0595	3	0,059			satisf			
		0,0738	0,0803	8	0,077			satisf			
		0,0272	0,0311	13	0,029			satisf			
		0,0283	0,0250	12	0,027			satisf			

Tabela 32: Teores de mercúrio em lula.

Data	Tipo amostra	ppm	Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras	
14/10/2012	Lula	0,0461	0,0556	19	0,0508			satisf			6
		0,0160	0,0166	4	0,0163	0,0899	0,13537	satisf	0,36	0,01	
		0,0069	0,0073	6	0,0071			satisf			
		0,0512	0,0434	16	0,0473			satisf			
		0,0491	0,0601	20	0,0546			satisf			
		0,3652	0,3614	1	0,3633			satisf			

Tabela 33: Teores de mercúrio em peixe de espada preto.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
20/07/2012	Peixe espada preto	0,6060	0,5540	9	0,580	0,58	0,15	satisf	0,87	0,44	10
		0,5666	0,4977	13	0,532			satisf			
		0,5491	0,4697	16	0,509			satisf			
		0,5533	0,4871	13	0,520			satisf			
		0,5360	0,6054	12	0,571			satisf			
		0,7971	0,8473	6	0,822			satisf			
		0,4862	0,4285	13	0,457			satisf			
		0,4446	0,4366	2	0,441			satisf			
		0,5384	0,4873	10	0,513			satisf			
		0,8615	0,8703	1	0,866			satisf			

Tabela 34: Teores de mercúrio em perca.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
29/09/2012	Perca	0,1374	0,1409	3	0,1392	0,1662	0,08032	satisf	0,30	0,04	14
		0,3080	0,2830	8	0,2955			satisf			
		0,0653	0,0631	4	0,0642			satisf			
		0,2722	0,2718	0	0,2720			satisf			
		0,1290	0,1399	8	0,1345			satisf			
		0,1666	0,1567	6	0,1616			satisf			
		0,1524	0,1458	4	0,1491			satisf			
		0,1015	0,0989	3	0,1002			satisf			
		0,2788	0,2464	12	0,2626			satisf			
		0,0393	0,0473	18	0,0433			satisf			
		0,1767	0,1713	3	0,1740			satisf			
		0,2616	0,2489	5	0,2552			satisf			
		0,0801	0,0935	15	0,0868			satisf			
		0,1959	0,1803	8	0,1881			satisf			

Tabela 35: Teores de mercúrio em pescada.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
30/01/2014	Pescada	0,0525	0,0503	4	0,05139	0,05	0,00	satisf	0,05	0,05	4
		0,0484	0,0491	1	0,04876			satisf			
		0,0476	0,0488	2	0,0482			satisf			
		0,0469	0,0496	6	0,04825			satisf			

Tabela 36: Teores de mercúrio em robalo.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
08/09/2012	Robalo	0,0607	0,0658	8	0,063	0,06	0,03	satisf	0,12	0,02	17
		0,0757	0,0748	1	0,075			satisf			
		0,0723	0,0640	12	0,068			satisf			
		0,0791	0,0715	10	0,075			satisf			
		0,0627	0,0681	8	0,065			satisf			
		0,1315	0,1181	11	0,125			satisf			
		0,0351	0,0288	20	0,032			satisf			
		0,0609	0,0565	7	0,059			satisf			
		0,0636	0,0600	6	0,062			satisf			
		0,0153	0,0173	12	0,016			satisf			
		0,0368	0,0348	6	0,036			satisf			
		0,0236	0,0245	4	0,024			satisf			
		0,0721	0,0665	8	0,069			satisf			
		0,0802	0,0765	5	0,078			satisf			
		0,0654	0,0659	1	0,066			satisf			
0,0743	0,0614	19	0,068	satisf							
0,0966	0,0847	13	0,091	satisf							

Tabela 37: Teores de mercúrio em safio.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
07/10/2012	Safio	0,3002	0,3109	4	0,3056	0,3344	0,26416	satisf	0,68	0,11	6
		0,1296	0,1250	4	0,1273			satisf			
		0,6576	0,6302	4	0,6439			satisf			
		0,6754	0,6872	2	0,6813			satisf			
		0,1103	0,1038	6	0,1071			satisf			
		0,1433	0,1389	3	0,1411			satisf			

Tabela 38: Teores de mercúrio em salmão.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
11/08/2012	Salmão	0,0541	0,0660	20	0,060	0,09	0,09	satisf	0,29	0,02	9
		0,0659	0,0573	14	0,062			satisf			
		0,0458	0,0415	10	0,044			satisf			
		0,3211	0,2619	20	0,292			satisf			
		2,6177	2,7690	6	2,693			satisf			
		0,0362	0,0607	51	0,048			n conforme			
		0,0495	0,0683	32	0,059			n conforme			
		0,1783	0,1748	2	0,177			satisf			
15/08/2012	Salmão	0,0374	0,0636	52	0,051	n conforme					
		0,0531	0,0214	85	0,037	n conforme					
		0,0308	0,0255	19	0,028	satisf					
		0,0242	0,0270	11	0,026	satisf					
		0,0213	0,0136	44	0,017	n conforme					
		0,0349	0,0212	49	0,028	n conforme					
		0,0164	0,0210	25	0,019	n conforme					
		0,0249	0,0166	40	0,021	n conforme					
		0,0301	0,0150	67	0,023	n conforme					
		0,0192	0,0172	11	0,018	satisf					

Tabela 39: Teores de mercúrio em sardinha.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
21/10/2012	Sardinha	0,0312	0,0302	3	0,0307	0,0856	0,0805	satisf	0,37	0,03	14
		0,0794	0,0652	20	0,0723			satisf			
		0,0594	0,0711	18	0,0653			satisf			
		0,0789	0,0821	4	0,0805			satisf			
		0,0446	0,0480	7	0,0463			satisf			
		0,0474	0,0526	10	0,0500			satisf			
		0,0645	0,0596	8	0,0620			satisf			
		0,0454	0,0387	16	0,0420			satisf			
		0,0667	0,0815	20	0,0741			satisf			
		0,0468	0,0386	19	0,0427			satisf			
		0,0580	0,0701	19	0,0640			satisf			
		0,0666	0,0568	16	0,0617			satisf			
		0,3323	0,4037	19	0,3680			satisf			
		0,0879	0,1010	14	0,0944			satisf			
		0,0872	0,1037	17	0,0954			satisf			
		2,3165	0,0601	190	1,1883			n conforme			
		3,4846	0,0912	190	1,7879			n conforme			
		0,0492	0,0452	9	0,0472			satisf			
		0,0530	0,0440	19	0,0485			satisf			
		0,0560	0,0459	20	0,0510			satisf			
0,3200	0,1022	103	0,2111	n conforme							
0,2177	0,2416	10	0,2297	satisf							

Tabela 40: Teores de mercúrio em truta.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
22/09/2012	Truta	0,1751	0,1502	15	0,1627	0,1728	0,0266	satisf	0,23		11
		0,2324	0,2266	3	0,2295			satisf			
		0,1964	0,1671	16	0,1818			satisf			
		0,1566	0,1462	7	0,1514			satisf			
		0,1508	0,1645	9	0,1576			satisf			
		0,1534	0,1458	5	0,1496			satisf			
		0,1420	0,1390	2	0,1405			satisf			
		0,1913	0,1658	14	0,1786			satisf			
		0,2057	0,2097	2	0,2077			satisf			
		0,1592	0,1654	4	0,1623			satisf			
		0,1966	0,1619	19	0,1792			satisf			

Tabela 41: Teores de mercúrio em várias espécies.

Data	Tipo amostra	ppm		Amplitude relativa	Media/ amostra	Media	Desvio padrão	Aceitação de resultado	Max	Min	Nº amostras
07/10/2012	Faneca	0,0300	0,0675	77	0,0488			n conforme			
	Tamboril	0,1616	0,1405	14	0,1510			satisf			
	Pargo	0,0627	0,0668	6	0,0647			satisf			
	Garoupa	0,2183	0,1895	14	0,2039			satisf			
	Garoupa	0,1324	0,1111	17	0,1218			satisf			
	Garoupa	0,0975	0,1186	20	0,1081			satisf			
	Tubarão	2,9409	2,9199	1	2,9304			satisf			

ANEXO 3 – TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Distribuição t de Student (Bicaudal e Unicaudal)



TABELA - Distribuição t de Student (Unicaudal e Bicaudal)

φ = graus de liberdade

α	25%	10%	5%	2,5%	1%	0,5%	α	25%	10%	5%	2,5%	1%	0,5%
1	1,0000	3,0777	6,3138	12,7062	31,8207	63,6574	46	0,6799	1,3002	1,6787	2,0129	2,4102	2,6870
2	0,8165	1,8856	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248	47	0,6797	1,2998	1,6779	2,0117	2,4083	2,6846
3	0,7649	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409	48	0,6796	1,2994	1,6772	2,0106	2,4066	2,6822
4	0,7407	1,5332	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041	49	0,6795	1,2991	1,6766	2,0096	2,4049	2,6800
5	0,7267	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0322	50	0,6794	1,2987	1,6759	2,0086	2,4033	2,6778
6	0,7176	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	51	0,6793	1,2984	1,6753	2,0076	2,4017	2,6757
7	0,7111	1,4149	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995	52	0,6792	1,2980	1,6747	2,0066	2,4002	2,6737
8	0,7064	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	53	0,6791	1,2977	1,6741	2,0057	2,3988	2,6718
9	0,7027	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	54	0,6791	1,2974	1,6736	2,0049	2,3974	2,6700
10	0,6998	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	55	0,6790	1,2971	1,6730	2,0040	2,3961	2,6682
11	0,6974	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	56	0,6789	1,2969	1,6725	2,0032	2,3948	2,6665
12	0,6955	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	57	0,6788	1,2966	1,6720	2,0025	2,3936	2,6649
13	0,6938	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	58	0,6787	1,2963	1,6716	2,0017	2,3924	2,6633
14	0,6924	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	59	0,6787	1,2961	1,6711	2,0010	2,3912	2,6618
15	0,6912	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	60	0,6786	1,2958	1,6706	2,0003	2,3901	2,6603
16	0,6901	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	61	0,6785	1,2956	1,6702	1,9996	2,3890	2,6589
17	0,6892	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	62	0,6785	1,2954	1,6698	1,9990	2,3880	2,6575
18	0,6884	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	63	0,6784	1,2951	1,6694	1,9983	2,3870	2,6561
19	0,6876	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	64	0,6783	1,2949	1,6690	1,9977	2,3860	2,6549
20	0,6870	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	65	0,6783	1,2947	1,6686	1,9971	2,3851	2,6536
21	0,6864	1,3232	1,7207	2,0796	2,5177	2,8314	66	0,6782	1,2945	1,6683	1,9966	2,3842	2,6524
22	0,6858	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	67	0,6782	1,2943	1,6679	1,9960	2,3833	2,6512
23	0,6853	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	68	0,6781	1,2941	1,6676	1,9955	2,3824	2,6501
24	0,6848	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969	69	0,6781	1,2939	1,6672	1,9949	2,3816	2,6490
25	0,6844	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	70	0,6780	1,2938	1,6669	1,9944	2,3808	2,6479
26	0,6840	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	71	0,6780	1,2936	1,6666	1,9939	2,3800	2,6469
27	0,6837	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	72	0,6779	1,2934	1,6663	1,9935	2,3793	2,6459
28	0,6834	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	73	0,6779	1,2933	1,6660	1,9930	2,3785	2,6449
29	0,6830	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	74	0,6778	1,2931	1,6657	1,9925	2,3778	2,6439
30	0,6828	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	75	0,6778	1,2929	1,6654	1,9921	2,3771	2,6430
31	0,6825	1,3095	1,6955	2,0395	2,4528	2,7440	76	0,6777	1,2928	1,6652	1,9917	2,3764	2,6421
32	0,6822	1,3086	1,6939	2,0369	2,4487	2,7385	77	0,6777	1,2926	1,6649	1,9913	2,3758	2,6412
33	0,6820	1,3077	1,6924	2,0345	2,4448	2,7333	78	0,6776	1,2925	1,6646	1,9908	2,3751	2,6403
34	0,6818	1,3070	1,6909	2,0322	2,4411	2,7284	79	0,6776	1,2924	1,6644	1,9905	2,3745	2,6395
35	0,6816	1,3062	1,6896	2,0301	2,4377	2,7238	80	0,6776	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387
36	0,6814	1,3055	1,6883	2,0281	2,4345	2,7195	81	0,6775	1,2921	1,6639	1,9897	2,3733	2,6379
37	0,6812	1,3049	1,6871	2,0262	2,4314	2,7154	82	0,6775	1,2920	1,6636	1,9893	2,3727	2,6371
38	0,6810	1,3042	1,6860	2,0244	2,4286	2,7116	83	0,6775	1,2918	1,6634	1,9890	2,3721	2,6364
39	0,6808	1,3036	1,6849	2,0227	2,4258	2,7079	84	0,6774	1,2917	1,6632	1,9886	2,3716	2,6356
40	0,6807	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	85	0,6774	1,2916	1,6630	1,9883	2,3710	2,6349
41	0,6805	1,3025	1,6829	2,0195	2,4208	2,7012	86	0,6774	1,2915	1,6628	1,9879	2,3705	2,6342
42	0,6804	1,3020	1,6820	2,0181	2,4185	2,6981	87	0,6773	1,2914	1,6626	1,9876	2,3700	2,6335
43	0,6802	1,3016	1,6811	2,0167	2,4163	2,6951	88	0,6773	1,2912	1,6624	1,9873	2,3695	2,6329
44	0,6801	1,3011	1,6802	2,0154	2,4141	2,6923	89	0,6773	1,2911	1,6622	1,9870	2,3690	2,6322
45	0,6800	1,3006	1,6794	2,0141	2,4121	2,6896	90	0,6772	1,2910	1,6620	1,9867	2,3685	2,6316
							100	0,677	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626
							120	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
							∞	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

Tabela 4. Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 10% de probabilidade.

GL V2	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	39.864	49.500	53.593	55.833	57.240	58.204	58.906	59.439	59.857	60.195	60.473	60.705	60.902	61.073	61.220	61.740	62.529	62.794	63.061	63.194
2	8.526	9.000	9.162	9.243	9.293	9.326	9.349	9.367	9.381	9.392	9.401	9.408	9.415	9.420	9.425	9.441	9.466	9.475	9.483	9.487
3	5.538	5.462	5.391	5.343	5.309	5.285	5.266	5.252	5.240	5.230	5.222	5.216	5.210	5.205	5.200	5.184	5.160	5.151	5.143	5.138
4	4.545	4.325	4.191	4.107	4.051	4.010	3.979	3.955	3.936	3.920	3.907	3.896	3.886	3.878	3.870	3.844	3.804	3.790	3.775	3.768
5	4.060	3.780	3.619	3.520	3.453	3.405	3.368	3.339	3.316	3.297	3.282	3.268	3.257	3.247	3.238	3.207	3.157	3.140	3.123	3.114
6	3.776	3.463	3.289	3.181	3.108	3.055	3.014	2.983	2.958	2.937	2.920	2.905	2.892	2.881	2.871	2.836	2.781	2.762	2.742	2.732
7	3.589	3.257	3.074	2.961	2.883	2.827	2.785	2.752	2.725	2.703	2.684	2.668	2.654	2.643	2.632	2.595	2.535	2.514	2.493	2.482
8	3.458	3.113	2.924	2.806	2.726	2.668	2.624	2.589	2.561	2.538	2.519	2.502	2.488	2.475	2.464	2.425	2.361	2.339	2.316	2.304
9	3.360	3.006	2.813	2.693	2.611	2.551	2.505	2.469	2.440	2.416	2.396	2.379	2.364	2.351	2.340	2.298	2.232	2.208	2.184	2.172
10	3.285	2.924	2.728	2.605	2.522	2.461	2.414	2.377	2.347	2.323	2.302	2.284	2.269	2.255	2.244	2.201	2.132	2.107	2.082	2.069
11	3.225	2.860	2.660	2.536	2.451	2.389	2.342	2.304	2.274	2.248	2.227	2.209	2.193	2.179	2.167	2.123	2.052	2.026	2.000	1.986
12	3.177	2.807	2.606	2.480	2.394	2.331	2.283	2.245	2.214	2.188	2.166	2.147	2.131	2.117	2.105	2.060	1.986	1.960	1.932	1.918
13	3.136	2.763	2.560	2.434	2.347	2.283	2.234	2.195	2.164	2.138	2.116	2.097	2.080	2.066	2.053	2.007	1.931	1.904	1.876	1.861
14	3.102	2.726	2.522	2.395	2.307	2.243	2.193	2.154	2.122	2.095	2.073	2.054	2.037	2.022	2.010	1.962	1.885	1.857	1.828	1.813
15	3.073	2.695	2.490	2.361	2.273	2.208	2.158	2.119	2.086	2.059	2.037	2.017	2.000	1.985	1.972	1.924	1.845	1.817	1.787	1.771
16	3.048	2.668	2.462	2.333	2.244	2.178	2.128	2.088	2.055	2.028	2.005	1.985	1.968	1.953	1.940	1.891	1.811	1.782	1.751	1.735
17	3.026	2.645	2.437	2.308	2.218	2.152	2.102	2.061	2.028	2.001	1.978	1.958	1.940	1.925	1.912	1.862	1.781	1.751	1.719	1.703
18	3.007	2.624	2.416	2.286	2.196	2.130	2.079	2.038	2.005	1.977	1.954	1.933	1.916	1.900	1.887	1.837	1.754	1.723	1.691	1.674
19	2.990	2.606	2.397	2.266	2.176	2.109	2.058	2.017	1.984	1.956	1.932	1.912	1.894	1.878	1.865	1.814	1.730	1.699	1.666	1.649
20	2.975	2.589	2.380	2.249	2.158	2.091	2.040	1.999	1.965	1.937	1.913	1.892	1.875	1.859	1.845	1.794	1.708	1.677	1.643	1.626
21	2.961	2.575	2.365	2.233	2.142	2.075	2.023	1.982	1.948	1.920	1.896	1.875	1.857	1.841	1.827	1.776	1.689	1.657	1.623	1.605
22	2.949	2.561	2.351	2.219	2.128	2.060	2.008	1.967	1.933	1.904	1.880	1.859	1.841	1.825	1.811	1.759	1.671	1.639	1.604	1.586
23	2.937	2.549	2.339	2.207	2.115	2.047	1.995	1.953	1.919	1.890	1.866	1.845	1.827	1.811	1.796	1.744	1.655	1.622	1.587	1.568
24	2.927	2.538	2.327	2.195	2.103	2.035	1.983	1.941	1.906	1.877	1.853	1.832	1.814	1.797	1.783	1.730	1.641	1.607	1.571	1.552
25	2.918	2.528	2.317	2.184	2.092	2.024	1.971	1.929	1.895	1.866	1.841	1.820	1.802	1.785	1.771	1.718	1.627	1.593	1.557	1.538
26	2.909	2.519	2.307	2.174	2.082	2.014	1.961	1.919	1.884	1.855	1.830	1.809	1.790	1.774	1.760	1.706	1.615	1.581	1.544	1.524
27	2.901	2.511	2.299	2.165	2.073	2.005	1.952	1.909	1.874	1.845	1.820	1.799	1.780	1.764	1.749	1.695	1.603	1.569	1.531	1.511
28	2.894	2.503	2.291	2.157	2.064	1.996	1.943	1.900	1.865	1.836	1.811	1.790	1.771	1.754	1.740	1.685	1.592	1.558	1.520	1.500
29	2.887	2.495	2.283	2.149	2.057	1.988	1.935	1.892	1.857	1.827	1.802	1.781	1.762	1.745	1.731	1.676	1.583	1.547	1.509	1.489
30	2.881	2.489	2.276	2.142	2.049	1.980	1.927	1.884	1.849	1.819	1.794	1.773	1.754	1.737	1.722	1.667	1.573	1.538	1.499	1.478
40	2.835	2.440	2.226	2.091	1.997	1.927	1.873	1.829	1.793	1.763	1.737	1.715	1.695	1.678	1.662	1.605	1.506	1.467	1.425	1.402
50	2.809	2.412	2.197	2.061	1.966	1.895	1.840	1.796	1.760	1.729	1.703	1.680	1.660	1.643	1.627	1.568	1.465	1.424	1.379	1.354
60	2.791	2.393	2.177	2.041	1.946	1.875	1.819	1.775	1.738	1.707	1.680	1.657	1.637	1.619	1.603	1.543	1.437	1.395	1.348	1.321
80	2.769	2.370	2.154	2.016	1.921	1.849	1.793	1.748	1.711	1.680	1.653	1.629	1.609	1.590	1.574	1.513	1.403	1.358	1.307	1.278
100	2.756	2.356	2.139	2.002	1.906	1.834	1.778	1.732	1.695	1.663	1.636	1.612	1.592	1.573	1.557	1.494	1.382	1.336	1.282	1.250
120	2.748	2.347	2.130	1.992	1.896	1.824	1.767	1.722	1.684	1.652	1.625	1.601	1.580	1.562	1.545	1.482	1.368	1.320	1.265	1.232
240	2.727	2.325	2.107	1.968	1.871	1.799	1.742	1.696	1.658	1.625	1.598	1.573	1.552	1.533	1.516	1.451	1.332	1.281	1.219	1.180

Tabela 5. Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.

GL	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7	245.4	245.9	248.0	251.1	252.2	253.3	253.8
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.446	19.471	19.479	19.487	19.492
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.660	8.594	8.572	8.549	8.538
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.803	5.717	5.688	5.658	5.643
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.558	4.464	4.431	4.398	4.382
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.874	3.774	3.740	3.705	3.687
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.445	3.340	3.304	3.267	3.249
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.150	3.043	3.005	2.967	2.947
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.936	2.826	2.787	2.748	2.727
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.774	2.661	2.621	2.580	2.559
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.646	2.531	2.490	2.448	2.426
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.544	2.426	2.384	2.341	2.319
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.459	2.339	2.297	2.252	2.230
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.388	2.266	2.223	2.178	2.155
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.328	2.204	2.160	2.114	2.090
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.276	2.151	2.106	2.059	2.035
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.230	2.104	2.058	2.011	1.986
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.191	2.063	2.017	1.968	1.943
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.155	2.026	1.980	1.930	1.905
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.124	1.994	1.946	1.896	1.870
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.096	1.965	1.916	1.866	1.839
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.071	1.938	1.889	1.838	1.811
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.048	1.914	1.865	1.813	1.785
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.027	1.892	1.842	1.790	1.762
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.007	1.872	1.822	1.768	1.740
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	1.990	1.853	1.803	1.749	1.720
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	1.974	1.836	1.785	1.731	1.702
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	1.959	1.820	1.769	1.714	1.685
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	1.945	1.806	1.754	1.698	1.669
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.932	1.792	1.740	1.683	1.654
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.839	1.693	1.637	1.577	1.544
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.784	1.634	1.576	1.511	1.476
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.748	1.594	1.534	1.467	1.430
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.703	1.545	1.482	1.411	1.370
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.676	1.515	1.450	1.376	1.333
120	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290	2.175	2.087	2.016	1.959	1.910	1.869	1.834	1.803	1.775	1.750	1.659	1.495	1.429	1.352	1.307
240	3.881	3.033	2.642	2.409	2.252	2.136	2.048	1.977	1.919	1.870	1.829	1.793	1.761	1.733	1.708	1.614	1.445	1.375	1.290	1.237

Tabela 6. Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 2,5% de probabilidade.

GL	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.6	963.3	968.6	973.0	976.7	979.8	982.5	984.9	993.1	1005.6	1009.8	1014.0	1016.1
2	38.506	39.000	39.166	39.248	39.298	39.331	39.356	39.373	39.387	39.398	39.407	39.415	39.421	39.427	39.431	39.448	39.473	39.481	39.489	39.494
3	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624	14.540	14.473	14.419	14.374	14.337	14.305	14.277	14.253	14.167	14.036	13.992	13.947	13.925
4	12.218	10.849	9.979	9.604	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.794	8.751	8.715	8.684	8.657	8.560	8.411	8.360	8.309	8.283
5	10.007	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.568	6.525	6.488	6.456	6.428	6.329	6.175	6.123	6.069	6.042
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.410	5.366	5.329	5.297	5.269	5.168	5.012	4.959	4.904	4.877
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.709	4.666	4.628	4.596	4.568	4.467	4.309	4.254	4.199	4.171
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.243	4.200	4.162	4.130	4.101	3.999	3.840	3.784	3.728	3.699
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.912	3.868	3.831	3.798	3.769	3.667	3.505	3.449	3.392	3.363
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.665	3.621	3.583	3.550	3.522	3.419	3.255	3.198	3.140	3.110
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.474	3.430	3.392	3.359	3.330	3.226	3.061	3.004	2.944	2.914
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.321	3.277	3.239	3.206	3.177	3.073	2.908	2.848	2.787	2.756
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.197	3.153	3.115	3.082	3.053	2.948	2.780	2.720	2.659	2.628
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.095	3.050	3.012	2.979	2.949	2.844	2.674	2.614	2.552	2.520
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	3.008	2.963	2.925	2.891	2.862	2.756	2.585	2.524	2.461	2.429
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.934	2.889	2.851	2.817	2.788	2.681	2.509	2.447	2.383	2.350
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.870	2.825	2.786	2.753	2.723	2.616	2.442	2.380	2.315	2.282
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.814	2.769	2.730	2.696	2.667	2.559	2.384	2.321	2.256	2.222
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.765	2.720	2.681	2.647	2.617	2.509	2.333	2.270	2.203	2.169
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.721	2.676	2.637	2.603	2.573	2.464	2.287	2.223	2.156	2.121
21	5.827	4.420	3.819	3.475	3.250	3.090	2.969	2.874	2.798	2.735	2.682	2.637	2.598	2.564	2.534	2.425	2.246	2.182	2.114	2.079
22	5.786	4.383	3.783	3.440	3.215	3.055	2.934	2.839	2.763	2.700	2.647	2.602	2.563	2.528	2.498	2.389	2.210	2.145	2.076	2.040
23	5.750	4.349	3.750	3.408	3.183	3.023	2.902	2.808	2.731	2.668	2.615	2.570	2.531	2.497	2.466	2.357	2.176	2.111	2.041	2.005
24	5.717	4.319	3.721	3.379	3.155	2.995	2.874	2.779	2.703	2.640	2.586	2.541	2.502	2.468	2.437	2.327	2.146	2.080	2.010	1.973
25	5.686	4.291	3.694	3.353	3.129	2.969	2.848	2.753	2.677	2.613	2.560	2.515	2.476	2.441	2.411	2.300	2.118	2.052	1.981	1.944
26	5.659	4.265	3.670	3.329	3.105	2.945	2.824	2.729	2.653	2.590	2.536	2.491	2.452	2.417	2.387	2.276	2.093	2.028	1.954	1.917
27	5.633	4.242	3.647	3.307	3.083	2.923	2.802	2.707	2.631	2.568	2.514	2.469	2.429	2.395	2.364	2.253	2.069	2.002	1.930	1.892
28	5.610	4.221	3.626	3.286	3.063	2.903	2.782	2.687	2.611	2.547	2.494	2.448	2.409	2.374	2.344	2.232	2.048	1.980	1.907	1.869
29	5.588	4.201	3.607	3.267	3.044	2.884	2.763	2.669	2.592	2.529	2.475	2.430	2.390	2.355	2.325	2.213	2.028	1.959	1.886	1.847
30	5.568	4.182	3.589	3.250	3.026	2.867	2.746	2.651	2.575	2.511	2.458	2.412	2.372	2.338	2.307	2.195	2.009	1.940	1.866	1.827
40	5.424	4.051	3.463	3.126	2.904	2.744	2.624	2.529	2.452	2.388	2.334	2.288	2.248	2.213	2.182	2.068	1.875	1.803	1.724	1.682
50	5.340	3.975	3.390	3.054	2.833	2.674	2.553	2.458	2.381	2.317	2.263	2.216	2.176	2.140	2.109	1.993	1.796	1.721	1.639	1.594
60	5.286	3.925	3.343	3.008	2.786	2.627	2.507	2.412	2.334	2.270	2.216	2.169	2.129	2.093	2.061	1.944	1.744	1.667	1.581	1.534
80	5.218	3.864	3.284	2.950	2.730	2.571	2.450	2.355	2.277	2.213	2.158	2.111	2.071	2.035	2.003	1.884	1.679	1.599	1.508	1.457
100	5.179	3.828	3.250	2.917	2.696	2.537	2.417	2.321	2.244	2.179	2.124	2.077	2.036	2.000	1.968	1.849	1.640	1.558	1.463	1.409
120	5.152	3.805	3.227	2.894	2.674	2.515	2.395	2.299	2.222	2.157	2.102	2.055	2.014	1.977	1.945	1.825	1.614	1.530	1.433	1.376
240	5.088	3.746	3.171	2.839	2.620	2.461	2.341	2.245	2.167	2.102	2.047	1.999	1.958	1.921	1.888	1.766	1.549	1.460	1.354	1.289

Tabela 7. Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 1,0% de probabilidade.

GL V2	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	4052.2	4999.3	5403.5	5624.3	5764.0	5859.0	5928.3	5981.0	6022.4	6055.9	6083.4	6106.7	6125.8	6143.0	6157.0	6208.7	6286.4	6313.0	6339.5	6352.6
2	98.502	99.000	99.164	99.251	99.302	99.331	99.357	99.375	99.390	99.397	99.408	99.419	99.422	99.426	99.433	99.448	99.477	99.484	99.491	99.495
3	34.116	30.816	29.457	28.710	28.237	27.911	27.671	27.489	27.345	27.228	27.132	27.052	26.983	26.924	26.872	26.690	26.411	26.316	26.221	26.173
4	21.198	18.000	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659	14.546	14.452	14.374	14.306	14.249	14.198	14.019	13.745	13.652	13.558	13.511
5	16.258	13.274	12.060	11.392	10.967	10.672	10.456	10.289	10.158	10.051	9.963	9.888	9.825	9.770	9.722	9.553	9.291	9.202	9.112	9.066
6	13.745	10.925	9.780	9.148	8.746	8.466	8.260	8.102	7.976	7.874	7.790	7.718	7.657	7.605	7.559	7.396	7.143	7.057	6.969	6.925
7	12.246	9.547	8.451	7.847	7.460	7.191	6.993	6.840	6.719	6.620	6.538	6.469	6.410	6.359	6.314	6.155	5.908	5.824	5.737	5.694
8	11.259	8.649	7.591	7.006	6.632	6.371	6.178	6.029	5.911	5.814	5.734	5.667	5.609	5.559	5.515	5.359	5.116	5.032	4.946	4.903
9	10.562	8.022	6.992	6.422	6.057	5.802	5.613	5.467	5.351	5.257	5.178	5.111	5.055	5.005	4.962	4.808	4.567	4.483	4.398	4.354
10	10.044	7.559	6.552	5.994	5.638	5.386	5.200	5.057	4.942	4.849	4.772	4.706	4.650	4.601	4.558	4.405	4.165	4.082	3.996	3.953
11	9.646	7.206	6.217	5.668	5.316	5.069	4.886	4.744	4.632	4.539	4.462	4.397	4.342	4.293	4.251	4.099	3.860	3.776	3.690	3.647
12	9.330	6.927	5.953	5.412	5.064	4.821	4.640	4.499	4.388	4.296	4.220	4.155	4.100	4.052	4.010	3.858	3.619	3.535	3.449	3.405
13	9.074	6.701	5.739	5.205	4.862	4.620	4.441	4.302	4.191	4.100	4.025	3.960	3.905	3.857	3.815	3.665	3.425	3.341	3.255	3.210
14	8.862	6.515	5.564	5.035	4.695	4.456	4.278	4.140	4.030	3.939	3.864	3.800	3.745	3.698	3.656	3.505	3.266	3.181	3.094	3.050
15	8.683	6.359	5.417	4.893	4.556	4.318	4.142	4.004	3.895	3.805	3.730	3.666	3.612	3.564	3.522	3.372	3.132	3.047	2.959	2.914
16	8.531	6.226	5.292	4.773	4.437	4.202	4.026	3.890	3.780	3.691	3.616	3.553	3.498	3.451	3.409	3.259	3.018	2.933	2.845	2.799
17	8.400	6.112	5.185	4.669	4.336	4.101	3.927	3.791	3.682	3.593	3.518	3.455	3.401	3.353	3.312	3.162	2.920	2.835	2.746	2.700
18	8.285	6.013	5.092	4.579	4.248	4.015	3.841	3.705	3.597	3.508	3.434	3.371	3.316	3.269	3.227	3.077	2.835	2.749	2.660	2.613
19	8.185	5.926	5.010	4.500	4.171	3.939	3.765	3.631	3.523	3.434	3.360	3.297	3.242	3.195	3.153	3.003	2.761	2.674	2.584	2.537
20	8.096	5.849	4.938	4.431	4.103	3.871	3.699	3.564	3.457	3.368	3.294	3.231	3.177	3.130	3.088	2.938	2.695	2.608	2.517	2.470
21	8.017	5.780	4.874	4.369	4.042	3.812	3.640	3.506	3.398	3.310	3.236	3.173	3.119	3.072	3.030	2.880	2.636	2.548	2.457	2.409
22	7.945	5.719	4.817	4.313	3.988	3.758	3.587	3.453	3.346	3.258	3.184	3.121	3.067	3.019	2.978	2.827	2.583	2.495	2.403	2.355
23	7.881	5.664	4.765	4.264	3.939	3.710	3.539	3.406	3.299	3.211	3.137	3.074	3.020	2.973	2.931	2.780	2.536	2.447	2.354	2.306
24	7.823	5.614	4.718	4.218	3.895	3.667	3.496	3.363	3.256	3.168	3.094	3.032	2.977	2.930	2.889	2.738	2.492	2.403	2.310	2.261
25	7.770	5.568	4.675	4.177	3.855	3.627	3.457	3.324	3.217	3.129	3.056	2.993	2.939	2.892	2.850	2.699	2.453	2.364	2.270	2.220
26	7.721	5.526	4.637	4.140	3.818	3.591	3.421	3.288	3.182	3.094	3.021	2.958	2.904	2.857	2.815	2.664	2.417	2.327	2.233	2.183
27	7.677	5.488	4.601	4.106	3.785	3.558	3.388	3.256	3.149	3.062	2.988	2.926	2.872	2.824	2.783	2.632	2.384	2.294	2.199	2.148
28	7.636	5.453	4.568	4.074	3.754	3.528	3.358	3.226	3.120	3.032	2.959	2.896	2.842	2.795	2.753	2.602	2.354	2.263	2.167	2.117
29	7.598	5.420	4.538	4.045	3.725	3.499	3.330	3.198	3.092	3.005	2.931	2.868	2.814	2.767	2.726	2.574	2.325	2.234	2.138	2.087
30	7.562	5.390	4.510	4.018	3.699	3.473	3.305	3.173	3.067	2.979	2.906	2.843	2.789	2.742	2.700	2.549	2.299	2.208	2.111	2.060
40	7.314	5.178	4.313	3.828	3.514	3.291	3.124	2.993	2.888	2.801	2.727	2.665	2.611	2.563	2.522	2.369	2.114	2.019	1.917	1.862
50	7.171	5.057	4.199	3.720	3.408	3.186	3.020	2.890	2.785	2.698	2.625	2.563	2.508	2.461	2.419	2.265	2.007	1.909	1.803	1.745
60	7.077	4.977	4.126	3.649	3.339	3.119	2.953	2.823	2.718	2.632	2.559	2.496	2.442	2.394	2.352	2.198	1.936	1.836	1.728	1.666
80	6.963	4.881	4.036	3.563	3.255	3.036	2.871	2.742	2.637	2.551	2.478	2.415	2.361	2.313	2.271	2.115	1.849	1.746	1.630	1.566
100	6.895	4.824	3.984	3.513	3.206	2.988	2.823	2.694	2.590	2.503	2.430	2.368	2.313	2.265	2.223	2.067	1.797	1.692	1.572	1.504
120	6.851	4.787	3.949	3.480	3.174	2.956	2.792	2.663	2.559	2.472	2.399	2.336	2.282	2.234	2.191	2.035	1.763	1.656	1.533	1.462
240	6.742	4.695	3.864	3.398	3.094	2.878	2.714	2.586	2.482	2.395	2.322	2.260	2.205	2.157	2.114	1.956	1.677	1.565	1.432	1.351

Tabela 8. Limites unilaterais da distribuição F de Fisher-Snedecor ao nível de 0,5% de probabilidade.

GL V2	V1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	40	60	120	240
1	16212	19997	21614	22501	23056	23440	23715	23924	24091	24222	24334	24427	24505	24572	24632	24687	25146	25254	25358	25414
2	198.5	199.0	199.2	199.2	199.3	199.3	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.4	199.5	199.5	199.5	199.5
3	55.552	49.800	47.468	46.195	45.391	44.838	44.434	44.125	43.881	43.685	43.525	43.387	43.270	43.172	43.085	42.779	42.310	42.150	41.990	41.910
4	31.332	26.284	24.260	23.154	22.456	21.975	21.622	21.352	21.138	20.967	20.824	20.705	20.603	20.515	20.438	20.167	19.751	19.611	19.469	19.397
5	22.785	18.314	16.530	15.556	14.939	14.513	14.200	13.961	13.772	13.618	13.491	13.385	13.293	13.215	13.146	12.903	12.530	12.402	12.274	12.209
6	18.635	14.544	12.917	12.028	11.464	11.073	10.786	10.566	10.391	10.250	10.133	10.034	9.950	9.878	9.814	9.589	9.241	9.122	9.001	8.941
7	16.235	12.404	10.883	10.050	9.522	9.155	8.885	8.678	8.514	8.380	8.270	8.176	8.097	8.028	7.968	7.754	7.422	7.309	7.193	7.135
8	14.688	11.043	9.597	8.805	8.302	7.952	7.694	7.496	7.339	7.211	7.105	7.015	6.938	6.872	6.814	6.608	6.288	6.177	6.065	6.008
9	13.614	10.107	8.717	7.956	7.471	7.134	6.885	6.693	6.541	6.417	6.314	6.227	6.153	6.089	6.032	5.832	5.519	5.410	5.300	5.244
10	12.827	9.427	8.081	7.343	6.872	6.545	6.303	6.116	5.968	5.847	5.746	5.661	5.589	5.526	5.471	5.274	4.966	4.859	4.750	4.695
11	12.226	8.912	7.600	6.881	6.422	6.102	5.865	5.682	5.537	5.418	5.320	5.236	5.165	5.103	5.049	4.855	4.551	4.445	4.337	4.281
12	11.754	8.510	7.226	6.521	6.071	5.757	5.524	5.345	5.202	5.085	4.988	4.906	4.836	4.775	4.721	4.530	4.228	4.123	4.015	3.960
13	11.374	8.186	6.926	6.233	5.791	5.482	5.253	5.076	4.935	4.820	4.724	4.643	4.573	4.513	4.460	4.270	3.970	3.866	3.758	3.703
14	11.060	7.922	6.680	5.998	5.562	5.257	5.031	4.857	4.717	4.603	4.508	4.428	4.359	4.299	4.247	4.059	3.760	3.655	3.547	3.492
15	10.798	7.701	6.476	5.803	5.372	5.071	4.847	4.674	4.536	4.424	4.329	4.250	4.181	4.122	4.070	3.883	3.585	3.480	3.372	3.317
16	10.576	7.514	6.303	5.638	5.212	4.913	4.692	4.521	4.384	4.272	4.179	4.099	4.031	3.972	3.920	3.734	3.437	3.332	3.224	3.168
17	10.384	7.354	6.156	5.497	5.075	4.779	4.559	4.389	4.254	4.142	4.050	3.971	3.903	3.844	3.793	3.607	3.311	3.206	3.097	3.041
18	10.218	7.215	6.028	5.375	4.956	4.663	4.445	4.276	4.141	4.030	3.938	3.860	3.793	3.734	3.683	3.498	3.201	3.096	2.987	2.931
19	10.073	7.093	5.916	5.268	4.853	4.561	4.345	4.177	4.043	3.933	3.841	3.763	3.696	3.638	3.587	3.402	3.106	3.000	2.891	2.834
20	9.944	6.987	5.818	5.174	4.762	4.472	4.257	4.090	3.956	3.847	3.756	3.678	3.611	3.553	3.502	3.318	3.022	2.916	2.806	2.749
21	9.829	6.891	5.730	5.091	4.681	4.393	4.179	4.013	3.880	3.771	3.680	3.602	3.536	3.478	3.427	3.243	2.947	2.841	2.730	2.673
22	9.727	6.806	5.652	5.017	4.609	4.322	4.109	3.944	3.812	3.703	3.612	3.535	3.469	3.411	3.360	3.176	2.880	2.774	2.663	2.605
23	9.635	6.730	5.582	4.950	4.544	4.259	4.047	3.882	3.750	3.642	3.551	3.474	3.408	3.351	3.300	3.116	2.820	2.713	2.602	2.543
24	9.551	6.661	5.519	4.890	4.486	4.202	3.991	3.826	3.695	3.587	3.497	3.420	3.354	3.296	3.246	3.062	2.765	2.658	2.546	2.488
25	9.475	6.598	5.462	4.835	4.433	4.150	3.939	3.776	3.645	3.537	3.447	3.370	3.304	3.247	3.196	3.013	2.716	2.609	2.496	2.437
26	9.406	6.541	5.409	4.785	4.384	4.103	3.893	3.730	3.599	3.492	3.402	3.325	3.259	3.202	3.151	2.968	2.671	2.563	2.450	2.391
27	9.342	6.489	5.361	4.740	4.340	4.059	3.850	3.687	3.557	3.450	3.360	3.284	3.218	3.161	3.110	2.927	2.630	2.522	2.408	2.348
28	9.284	6.440	5.317	4.698	4.300	4.020	3.811	3.649	3.519	3.412	3.322	3.246	3.180	3.123	3.073	2.890	2.592	2.483	2.369	2.309
29	9.230	6.396	5.276	4.659	4.262	3.983	3.775	3.613	3.483	3.376	3.287	3.211	3.145	3.088	3.038	2.855	2.557	2.448	2.333	2.273
30	9.180	6.355	5.239	4.623	4.228	3.949	3.742	3.580	3.451	3.344	3.255	3.179	3.113	3.056	3.006	2.823	2.524	2.415	2.300	2.239
40	8.828	6.066	4.976	4.374	3.986	3.713	3.509	3.350	3.222	3.117	3.028	2.953	2.888	2.831	2.781	2.598	2.296	2.184	2.064	1.999
50	8.626	5.902	4.826	4.232	3.849	3.579	3.376	3.219	3.092	2.988	2.900	2.825	2.760	2.703	2.653	2.470	2.164	2.050	1.925	1.858
60	8.495	5.795	4.729	4.140	3.760	3.492	3.291	3.134	3.008	2.904	2.817	2.742	2.677	2.620	2.570	2.387	2.079	1.962	1.834	1.764
80	8.335	5.665	4.611	4.028	3.652	3.387	3.188	3.032	2.907	2.803	2.716	2.641	2.577	2.520	2.470	2.286	1.974	1.854	1.720	1.646
100	8.241	5.589	4.542	3.963	3.589	3.325	3.127	2.972	2.847	2.744	2.657	2.583	2.518	2.461	2.411	2.227	1.912	1.790	1.652	1.573
120	8.179	5.539	4.497	3.921	3.548	3.285	3.087	2.933	2.808	2.705	2.618	2.544	2.479	2.423	2.373	2.188	1.871	1.747	1.606	1.524
240	8.027	5.417	4.387	3.816	3.447	3.187	2.991	2.837	2.713	2.610	2.524	2.450	2.385	2.329	2.278	2.093	1.770	1.640	1.488	1.396

ANEXO 4—CERTIFICADO DO MATERIAL DE REFERENCIA



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR[®] – 463

CERTIFICATE OF ANALYSIS

TUNA FISH			
	Mass fraction based on dry mass		Number of accepted sets of data p
	Certified value ¹⁾ [µg/g]	Uncertainty ²⁾ [µg/g]	
Total Hg	2.85	0.16	8
CH ₃ Hg ⁺	3.04	0.16	11

1) Unweighted mean value of the means of p accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The value is traceable to the International System of Units (SI).
2) Half-width of the 95 % confidence interval of the mean defined in ¹⁾.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date:

The minimum amount of sample to be used is 0.2 g.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The material consists of a freeze-dried fish powder in a glass bottle. The bottle contains about 15 g of powder. Additional information on the preparation and the certified values is given in the certification report.

NOTE

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

Brussels, June 1994
Revised: November 2007

Signed: _____

Prof. Dr. Hendrik Emons
Unit for Reference Materials
EC-JRC-IRMM
Retieseweg 111
2440 Geel, Belgium

ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

Cold vapour atomic absorption spectrometry
Cold vapour atomic fluorescence spectrometry
Electrothermal atomic absorption spectrometry
Gas chromatography/atomic fluorescence spectrometry
Gas chromatography/electron capture detection
Gas chromatography/Fourier transformation infrared spectroscopy
Gas chromatography/microwave induced plasma atomic emission spectrometry
Inductively coupled plasma mass spectrometry
Instrumental neutron activation analysis
Ion exchange/atomic absorption spectrometry
Neutron activation analysis with radiochemical separation

PARTICIPANTS

CNRS, Service Central d'Analyse, Vernaison (FR)
Ecoconsult, Gavirate (IT)
Energieonderzoek Centrum Nederland (NL)
FORCE Institute, Brøndby (DK)
Joint Research Centre, Ispra (IT)
Kernforschungsanlage, Jülich (DE)
National Food Administration, Uppsala (SE)
National Food Agency, Søborg (DK)
Presidio Multizionale di Prevenzione, La Spezia (IT)
Presidio Multizionale di Prevenzione, Venezia (IT)
Swedish Environment Research Institute, Göteborg (SE)
Universidad de Santiago de Compostela (ES)
Università di Genova (IT)
Universiteit Gent, INW (BE)
University of Umeå (SE)
Vrije Universiteit Brussel (BE)

SAFETY INFORMATION

The usual laboratory safety precautions apply.

INSTRUCTIONS FOR USE

The material is intended for quality control purposes, verification or validation of an analytical procedure. The material is not intended for use as a calibrant.

The sample can be used as it is from the bottle. Before a bottle is opened, it should be shaken manually for five minutes so that the material is re-homogenised. The correction to dry mass should be made on a separate portion of 100 mg which should be dried in an oven at 102 °C for 3-4 h until constant mass is attained. The material may be kept at ambient temperature in the dark for short term period (2-3 days).

STORAGE

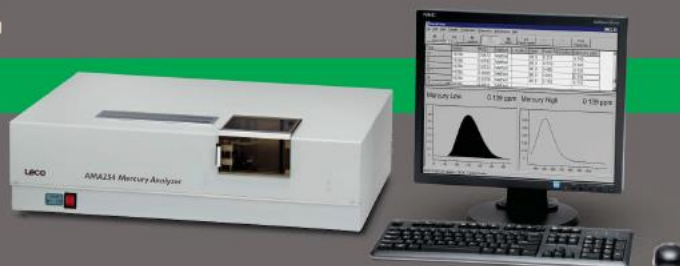
Storage should take place at 4 °C, in the dark.

However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

ANEXO 5 – ANALISADOR DE MERCÚRIO AMA 254

AMA254

Mercury Analysis



LECO's AMA254 determines trace amounts of mercury in various materials—including coal, combustion residues, soils, biological samples, and other solid/liquid samples.

The AMA254 technique of direct combustion features a combustion/catalyst tube that decomposes the sample in an oxygen-rich environment and removes interfering elements. A gold amalgamator trap collects all mercury from the evolved gases and a dual-path length cuvette/spectrophotometer specifically determines mercury over a wide dynamic range.

With method approvals by the EPA and ASTM, the AMA254 offers a fast, cost-effective alternative to conventional CVAAS or ICP. This unique system combusts various matrices without sample pre-treatment or concentration steps—saving you valuable time. The instrument requires no hazardous chemicals, providing a mercury determination in approximately five minutes.

Features Include



Amalgamator

Traps all mercury vapor on a gold-plated ceramic tube; doses the mercury to the cuvette system through flash heating.

Cuvette System

Detection system based on a standard atomic absorption spectrophotometer at a specific wavelength (253.7 nm). Dual-path length cuvette expands the dynamic range from the ppb level to the ppm level.

Direct Combustion System

Nickel boats hold up to 500 mg of various liquid and solid samples. The oxygen-rich combustion tube is heated to 750°C.



Optional Autoloader

Rotating carousel holds up to 45 nickel sample boats; boats are automatically inserted into the combustion/catalyst tube.



LECO[®]
Delivering the Right Results

1 BASIC TECHNICAL DATA

Mercury Analyser AMA 254

Principle	atomic absorption spectrometry
Arrangement:	single beam, serial arrangement of cuvettes
Control of instrument functions:	IBM compatible PC
Light source:	low pressure mercury lamp
Wavelength:	253.65 nm
Interference filter:	254 nm, half-width 9 nm
Detector:	silicon UV diode
Detection limit:	0.01 ng Hg (0.003 ng Hg with HS cuvette)
Working ranges:	automatic switching; switching point A = 0.8000
1st range:	0.05 - 40 [*] ng Hg (0.02 - 10 [*] with HS cuvette)
2nd range:	40 [*] - 600 ng Hg (10 [*] - 250 ng Hg with HS cuvette)
Reproducibility:	< 1.5%
Typical analysis time:	5 min's
Sample treatment:	programmable
drying period:	9 - 999 s
decomposition period:	1 - 999 s
waiting period:	1 - 999 s
Calibration:	solution, reference material
number of standards:	unlimited
Sample characteristics:	solution, solid material
Dosing volume:	
external sampling, max.:	500 µl, 1000 µl (big boat)
internal sampling:	depended on sampling device
Weight of sample, max.:	300 mg, 700 mg (big boat)
Possibility of preconcentration:	max. 10 times
Carrier gas:	oxygen
inlet pressure:	200 - 250 kPa
flow rate:	approx. 160 ml/min (approx. 90 ml/min HS version)
Power voltage:	220 V, 50 Hz
Power consumption, max.:	900 VA
standby:	100 VA
Operating conditions:	
temperature:	0 - 35 °C
pressure:	86 - 106 kPa
rel. humidity:	80 %
protection:	IP2X
Dimensions:	
width:	723 mm
height:	227 mm
depth:	460 mm
Weight:	46 kg
transport weight:	54 kg

* 2nd range is used when absorbance measured on 1st range is higher than 0.8000