

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE
MERCÚRIO EM PESCADO POR LC-ICP-MS**

DAIANE CIOATO

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes
Orientador

Porto Alegre, Agosto de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DAIANE CIOATO

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE
MERCÚRIO EM PESCADO POR LC-ICP-MS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes
Orientador

Porto Alegre, Agosto de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Cioato, Daiane
Validação de Método de Especificação Química de
Mercúrio em Pescado por LC-ICP-MS / Daiane Cioato. --
2022.
112 f.
Orientador: Diogo Pompéu de Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Especificação química de mercúrio. 2.
Metilmercúrio. 3. Contaminantes inorgânicos. 4.
LC-ICP-MS. 5. Validação de método. I. Moraes, Diogo
Pompéu de, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-RS), especialmente ao coordenador Dr. Fabiano Barreto, pelo apoio à execução deste projeto e fornecimento dos insumos e equipamentos necessários à elaboração do trabalho.

Agradeço também à equipe da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) e da Secretaria de Comércio e Relações Internacionais (SCRI) do MAPA em Brasília, que juntamente com a coordenação do LFDA-RS, possibilitou minha participação em um treinamento sobre especiação química de mercúrio em pescado, realizado em Singapura em 2019. Agradeço ao *Global Food Safety Partnership* (GFSP) que organizou o evento e à equipe do *National Centre for Food Science* que ministrou o treinamento. Agradeço à CRISC que autorizou o uso das amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) neste estudo.

Aos meus colegas do laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA), agradeço pelo apoio e incentivo em todas as etapas deste trabalho. Em especial ao meu amigo Lucas Barnet minha gratidão pelo auxílio nas etapas iniciais do trabalho, pela troca de ideias e sugestões ao longo de todo o projeto, e também pelo auxílio no estudo de reprodutibilidade intralaboratorial. Um carinhoso obrigada à minha colega Rosmari Hennigen pelo apoio nos momentos de inquietação.

Meus agradecimentos também ao meu orientador professor Dr. Diogo Pompéu de Moraes pela dedicação, por todos os ensinamentos e pela confiança que deposita no meu trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Química, e sobretudo ao corpo docente e aos técnicos envolvidos nas atividades de ensino, cujo trabalho permitiu a evolução da minha formação acadêmica e profissional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Mercúrio	4
3.2 Doença de Minamata	5
3.3 Outros casos envolvendo contaminação por compostos de mercúrio	6
3.4 Sintomas da contaminação por mercúrio e seus compostos	7
3.5 Mercúrio no meio ambiente	8
3.5.1 <i>Metilação química ou abiótica</i>	9
3.5.2 <i>Metilação biológica</i>	10
3.5.3 <i>Desmetilação</i>	11
3.6 Exposição humana ao Hg	11
3.7 Legislações	12
3.8 Análise de especiação química de mercúrio	14
3.8.1 <i>Extração das espécies químicas</i>	14
3.8.2 <i>Determinação por LC-ICP-MS</i>	15
3.9 Otimização e validação do método	16
3.9.1 <i>Seletividade e efeito de matriz</i>	16
3.9.2 <i>Linearidade</i>	16
3.9.3 <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	16
3.9.4 <i>Precisão</i>	17
3.9.5 <i>Exatidão / Recuperação</i>	18
3.9.6 <i>Robustez</i>	18
3.9.7 <i>Incerteza de medição</i>	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20

4.1	Equipamentos	20
4.2	Reagentes, soluções, materiais de referência e <i>softwares</i>	21
4.3	Descontaminação dos materiais	23
4.4	Amostras.....	23
4.4.1	<i>Amostras de pescado</i>	23
4.4.2	<i>Preparo das amostras</i>	23
4.4.3	<i>Decomposição das amostras para determinação da concentração total dos elementos</i>	24
4.5	Procedimento de extração para análise de especiação química	24
4.5.1	<i>Extração para especiação de Hg</i>	24
4.5.2	<i>Extração para especiação de As</i>	25
4.6	Determinação da concentração total	26
4.7	Análise de especiação química de Hg	27
4.8	Análise de especiação química de As	28
4.9	Validação do método	29
4.9.1	<i>Linearidade</i>	29
4.9.2	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	30
4.9.3	<i>Precisão e exatidão</i>	30
4.9.4	<i>Seletividade e efeito de matriz.....</i>	30
4.9.5	<i>Robustez</i>	31
4.9.6	<i>Incerteza de Medição</i>	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Otimização dos parâmetros instrumentais	32
5.1.1	<i>Vazão do gás de nebulização</i>	33
5.1.2	<i>Vazão do gás de make up</i>	33
5.1.3	<i>Vazão do gás de colisão</i>	35
5.1.4	<i>Tempo de integração</i>	36
5.1.5	<i>Vazão da fase móvel.....</i>	37
5.1.6	<i>Volume de injeção</i>	39
5.1.7	<i>Concentração da fase móvel</i>	42
5.2	Validação do método	43
5.2.1	<i>Linearidade</i>	43
5.2.2	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	46

5.2.3	<i>Precisão e exatidão: recuperação, repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial e análise de MRCs</i>	47
5.2.4	<i>Seletividade e efeito de matriz</i>	53
5.2.5	<i>Robustez</i>	54
5.2.6	<i>Incerteza de Medição</i>	59
5.3	Análise das amostras	63
5.3.1	<i>Análise de elementos totais</i>	63
5.3.2	<i>Análise de especiação química de mercúrio nas amostras de pescado</i>	66
5.3.3	<i>Análise de especiação química de arsênio nas amostras de pescado</i>	70
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO A	90
	ANEXO B	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da vazão do gás de nebulização no número de CPS de ^{202}Hg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	33
Figura 2: Efeito da vazão do gás de <i>make up</i> no número de CPS de ^{202}Hg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	34
Figura 3: Efeito da vazão do gás de colisão no número de CPS de ^{202}Hg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de iHg. Em preto (●), com cromatógrafo desacoplado, e em azul (■), com o cromatógrafo acoplado.....	36
Figura 4: Efeito do tempo de integração no número de CPS de MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	37
Figura 5: Efeito da vazão da fase móvel nos cromatogramas correspondentes a solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	38
Figura 6: Efeito da vazão de fase móvel no número de CPS para uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	39
Figura 7: Efeito do volume de injeção no número de CPS para uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	40
Figura 8: Efeito do volume de injeção nos cromatogramas correspondentes a uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	41
Figura 9: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos das curvas de calibração ponderadas conforme o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) utilizando o fator de ponderação $1/x^2$ para iHg (a) e MeHg (b); e das curvas de calibração não ponderadas usando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para iHg (c) e MeHg (d).	44
Figura 10: Curva de regressão linear ponderada para mercúrio inorgânico, empregando fator de ponderação $1/x^2$	45
Figura 11: Curva de regressão linear ponderada para metilmercúrio, empregando fator de ponderação $1/x^2$	45
Figura 12: Valores dos efeitos de cada fator na avaliação da robustez. A linha vertical (linha de significância) indica o limite máximo de variação aceitável para iHg (a) e MeHg (b).	57
Figura 13: Correlação de <i>Spearman</i> entre as concentrações de MeHg (■) e tHg (n = 30), e iHg (●) e tHg (n = 29).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites máximos para mercúrio em alimentos adotados por países e organizações. Abreviações: tHg – mercúrio total; MeHg – metilmercúrio.....	13
Tabela 2. Programa de aquecimento do forno micro-ondas para a decomposição das amostras de pescado para a determinação de As, Cd, Pb e Hg por ICP-MS.	24
Tabela 3. Parâmetros operacionais do ICP-MS utilizados na determinação da concentração de As, Cd, Pb e Hg.	26
Tabela 4. Parâmetros instrumentais definidos para determinação de metilmercúrio e mercúrio inorgânico por LC-ICP-MS.	28
Tabela 5. Parâmetros operacionais do sistema LC-ICP-MS utilizados na análise de especiação química de arsênio.	29
Tabela 6. Níveis de concentração adotados para LQ e TMC.	30
Tabela 7. Resumo das condições otimizadas e do método de referência da FDA para especiação de Hg em pescado.....	42
Tabela 8. Área dos picos cromatográficos correspondentes ao primeiro ponto da curva de calibração ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para soluções (em unidade $\mu\text{g L}^{-1}$) e amostras (em unidade $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	46
Tabela 9. Resultados de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para amostra fortificada, para mercúrio inorgânico.....	49
Tabela 10. Resultados de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para amostra fortificada, para metilmercúrio.....	50
Tabela 11. Critérios de aceitação para avaliação da precisão e recuperação. .	51
Tabela 12. Resultados da análise dos MRCs com concentração certificada para metilmercúrio. Os resultados, expressos em mg kg^{-1} , são a média e o desvio padrão de 3 replicatas.....	52
Tabela 13. Resultados das concentrações dos analitos em amostras não matrizadas e média das amostras matrizadas. Comparação entre as médias e avaliação do estudo do efeito de matriz.....	53
Tabela 14. Fatores avaliados no teste de Youden, respectivos valores nominais e variações empregadas no estudo de robustez.	54
Tabela 15. Combinações de variações nos ensaios do teste de Youden.	55
Tabela 16. Resultados do teste de Youden apurados no estudo de robustez, para duas replicatas.....	56

Tabela 17. Desvio-padrão dos efeitos avaliados no teste de Youden e desvio-padrão em condições de reprodutibilidade.	58
Tabela 18. Comparação estatística dos resultados obtidos no teste de Youden para condição nominal (letra maiúscula) e variação (letra minúscula). Os valores de $F_{\text{crítico}}$ e $t_{\text{crítico}}$ são 15,44 e 3,18, respectivamente.	58
Tabela 19. Incerteza estimada do método.	61
Tabela 20. Valores de α , para cada faixa de concentração, a serem utilizados no cálculo da incerteza padrão máxima.....	62
Tabela 21. Incerteza padrão máxima aceitável para cada analito.	62
Tabela 22. Resultado da análise dos MRCs para As, Cd, Pb e Hg (totais). Os resultados (mg kg^{-1}) são a média e desvio padrão ($n = 3$).	63
Tabela 23. Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e desvio padrão (número de replicatas de leitura da amostra no ICP-MS igual a 5) de As, Cd, Pb e Hg (totais) nas amostras. LQ: As: $2,97 \mu\text{g kg}^{-1}$; Cd: $0,29 \mu\text{g kg}^{-1}$; Pb: $5,59 \mu\text{g kg}^{-1}$; Hg: $6,92 \mu\text{g kg}^{-1}$	64
Tabela 24. Limites máximos permitidos pela ANVISA para cádmio em pescado.	65
Tabela 25. Concentração média e desvio padrão (número de replicatas de leitura da amostra no ICP-MS igual a 5) de mercúrio total determinada por ICP-MS, concentrações das espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico determinadas por LC-ICP-MS, soma das espécies de mercúrio determinadas, eficiência de extração e percentual de metilmercúrio nas amostras. As concentrações são expressas em ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	67
Tabela 26. Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de arsênio total (tAs) e arsênio inorgânico (iAs) (expresso pela soma das espécies As (III) + As (V)) nas amostras. LQ (iAs): $11,09 \mu\text{g kg}^{-1}$	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AES: Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês, *Atomic Emission Spectroscopy*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE: Comissão Europeia

CGAL: Coordenação Geral de Apoio Laboratorial

CGCRE: Coordenação Geral de Acreditação

CRM: do inglês, *Certified Reference Material*

CPS: Contagens por Segundo, do inglês, *Counts Per Second*

CRISC: Coordenação de Caracterização de Risco

CV-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio, do inglês, *Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy*

CV-AFS: Espectroscopia de Fluorescência Atômica com Vapor Frio, do inglês, *Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectroscopy*

DAD: Detector de Arranjo de Diodos, do inglês, *Diode-Array Detector*

ERM: do inglês, *European Reference Materials*

FAO: do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA: do inglês, *Food Drug and Administration*

GC: Cromatografia a Gás, do inglês, *Gas Chromatography*

GL: Número de Graus de Liberdade

iHg: Mercúrio inorgânico

iAs: Arsênio inorgânico

ICP-MS: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC: do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LC: Cromatografia a Líquido, do inglês, *Liquid Chromatography*

LC-ICP-MS: Cromatografia a Líquido associada à Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *Liquid Chromatography associated with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

LD: Limite de Detecção

LFDA-RS: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária no Rio Grande do Sul

LQ: Limite de Quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MeHg: Metilmercúrio

MMQO: Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MMQP: Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MRC: Material de Referência Certificado

MS: Espectrometria de Massas, do inglês, *Mass Spectrometry*

PDPR: Desvio-padrão Relativo Predito

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PVDF: Fluoreto de Polivinilideno

R²: Coeficiente de Determinação

RSD: Desvio-padrão Relativo

SCRI: Secretaria de Comércio e Relações Internacionais

TMC: Teor Máximo de Contaminante

UE: União Europeia

UV: Ultravioleta

VIM: Vocabulário Internacional de Metrologia

RESUMO

Neste trabalho foi otimizada e validada uma metodologia para a análise de especiação química de mercúrio em pescado. A técnica analítica empregada foi a cromatografia a líquido associada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS). A extração dos analitos foi executada utilizando solução de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada a 1% (m v⁻¹) sob aquecimento (60 °C) por 2 horas. A separação cromatográfica foi executada empregando coluna tipo C-18 e uma solução de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 0,1% (m v⁻¹) + L-cisteína 0,1% (m v⁻¹) como fase móvel, à vazão de 1 mL min⁻¹. Foi alcançada adequada separação de mercúrio inorgânico (iHg) e metilmercúrio (MeHg) no tempo de 4 minutos. A exatidão foi avaliada através de análise de três materiais de referência certificados, para os quais se obteve recuperação de 95,1% a 106%. Os limites de quantificação para iHg e MeHg foram 2,08 µg kg⁻¹ e 8,39 µg kg⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado para a análise de especiação de mercúrio em 30 amostras de pescado. O percentual médio de metilmercúrio nas amostras foi 96,2%. A eficiência de extração das espécies de Hg variou de 84,3% a 118 %, sendo a eficiência de extração média 100%. A concentração de arsênio inorgânico (iAs) também foi determinada nas 30 amostras. A análise foi executada por LC-ICP-MS e a extração foi realizada utilizando HNO₃ 0,28% (mol L⁻¹) contendo 3% (v v⁻¹) de H₂O₂ sob aquecimento a 90 °C por 1 hora. Apenas uma das amostras apresentou teor de iAs quantificável, na concentração de 17,25 µg kg⁻¹ na amostra, o que correspondeu a uma fração de 0,11% do As total. Adicionalmente, as concentrações totais de As, Cd, Pb e Hg foram determinadas por ICP-MS após decomposição das amostras assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado com uso de HNO₃ e H₂O₂. Os resultados foram comparados com a legislação vigente, a fim de caracterizar as amostras quanto aos contaminantes inorgânicos de interesse, sob o ponto de vista da segurança alimentar. A concentração total de Hg variou entre 33,4 µg kg⁻¹ e 1609 µg kg⁻¹, sendo que em 3 amostras foi superior ao limite máximo estabelecido pela ANVISA (1000 µg kg⁻¹, para espécies predadoras). Foi identificada forte correlação positiva entre as concentrações de iHg e MeHg em função da concentração total de Hg.

Palavras-chave: especiação química de mercúrio, metilmercúrio, contaminantes inorgânicos, LC-ICP-MS, validação de método.

ABSTRACT

In this work, a methodology for mercury speciation analysis in fish was optimized and validated. The analytical technique used was liquid chromatography associated with inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). Extraction of analytes was performed using 1% (w v⁻¹) L-cysteine hydrochloride monohydrate solution under heating (60 °C) for 2 hours. The chromatographic separation was performed using a C-18 column and a solution of 0.1% (w v⁻¹) L-cysteine hydrochloride monohydrate and 0.1% (w v⁻¹) L-cysteine as mobile phase, at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Suitable separation of inorganic mercury (iHg) and methylmercury (MeHg) was achieved within 4 minutes. Accuracy was assessed by analyzing three certified reference materials, for which recovery of 95.1% to 106% was obtained. The limits of quantification for iHg and MeHg were 2.08 µg kg⁻¹ and 8.39 µg kg⁻¹, respectively. The method was applied for mercury speciation in 30 fish samples. The average percentage of methylmercury in the samples was 96.2%. The extraction efficiency ranged from 84.3% to 118%, with an average extraction efficiency of 100%. The concentration of inorganic arsenic (iAs) was also determined in the 30 samples. Analysis was performed by LC-ICP-MS and extraction was carried out using 0.28% HNO₃ (mol L⁻¹) containing 3% (v v⁻¹) of H₂O₂ under heating at 90 °C for 1 hour. Only one of the samples exhibited a quantifiable iAs content, at a concentration of 17.25 µg kg⁻¹ in the sample, which corresponded to a ratio of 0.11% of the total As. Additionally, the total concentrations of As, Cd, Pb and Hg were determined by ICP-MS after microwave-assisted wet digestion in closed system using HNO₃ and H₂O₂. The results were compared to the current legislation, in order to characterize the samples regarding inorganic contaminants of interest, from the point of view of food safety. The total concentration of Hg varied between 33.4 µg kg⁻¹ and 1609 µg kg⁻¹, and in 3 samples it was higher than the maximum limit established by ANVISA (1000 µg kg⁻¹, for predatory species). A strong positive correlation was identified between iHg and MeHg concentrations as a function of total Hg concentration.

Keywords: chemical speciation of mercury, methylmercury, inorganic contaminants, LC-ICP-MS, method validation.

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio é um elemento químico tóxico naturalmente presente no solo, ar e água. A OMS (Organização Mundial da Saúde) classifica o mercúrio como uma das dez substâncias de maior preocupação no que se refere à saúde pública.¹ A exposição ao mercúrio pode causar sérios problemas de saúde, incluindo transtornos neurológicos e sintomas físicos, sendo extremamente prejudicial aos seres humanos, especialmente nas primeiras fases da vida (fetos e crianças em fase de desenvolvimento).²

Nos sistemas aquáticos residem as maiores preocupações quanto ao mercúrio, pois neste ecossistema ocorrem reações de conversão de espécies menos tóxicas a metilmercúrio, que possui elevada toxicidade.³ Após a conversão a metilmercúrio, os processos de bioacumulação e biomagnificação são favorecidos, levando à existência de concentrações elevadas da substância em peixes, principalmente em espécies de níveis tróficos superiores. A principal fonte de exposição humana ao mercúrio é a ingestão de peixes e outros frutos do mar contendo mercúrio, presente predominantemente em sua forma orgânica que apresenta elevada absorção no trato gastrointestinal, o que favorece a acumulação da substância.²

Todas as espécies de mercúrio apresentam algum grau de toxicidade, mas, devido às formas de exposição, absorção e toxicidade, os efeitos à saúde humana são mais relacionados ao metilmercúrio. Por esta razão, a identificação e quantificação das espécies presentes nos produtos destinados à alimentação é importante e se faz necessária. Atualmente uma das técnicas analíticas mais empregadas na análise de especiação química de mercúrio é a cromatografia a líquido hifenada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), difundida por suas vantagens como a ótima sensibilidade, ampla faixa linear e elevada seletividade.

Apesar do consenso quanto à importância do monitoramento da contaminação de alimentos por mercúrio, até o momento não existe harmonia quanto aos limites máximos da substância permitidos em alimentos nos diferentes países e organizações mundiais. Enquanto alguns órgãos reguladores estabelecem limites baseados em termos de concentração total de mercúrio⁴⁻⁸, outros baseiam suas regulações na concentração de metilmercúrio.⁹⁻¹²

No Brasil a atividade de fiscalização e controle de contaminantes em alimentos *in natura* (não industrializados), como é o caso do pescado, é executada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mediante o emprego de metodologias analíticas validadas. Nesse sentido, o desenvolvimento e validação de métodos para determinação das espécies de Hg é importante para subsidiar a atividade de fiscalização do órgão. Os limites para mercúrio em pescado vigentes atualmente no Brasil, definidos pela ANVISA⁷, são estabelecidos em termos da concentração total de mercúrio. O teor máximo permitido é de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes em geral, e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para peixes de espécies predadoras. Ainda assim, o estudo regular da distribuição das espécies de mercúrio em pescado é importante, pois pode subsidiar a adoção de regulamentações apropriadas, bem como fornecer embasamento a estudos visando o entendimento dos níveis de consumo seguro de pescado pela população.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visa otimizar e validar um método analítico para a análise de especiação química de mercúrio em pescado, empregando a cromatografia a líquido associada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS).

Os objetivos específicos do trabalho são:

1. Otimizar e validar uma metodologia para a análise de especiação química de mercúrio em pescado, seguindo os requisitos descritos no Manual de Garantia da Qualidade Analítica para a área de Resíduos e Contaminantes em Alimentos do MAPA,¹³ bem como a Orientação sobre Validação de Procedimentos Analíticos, do INMETRO,¹⁴ a fim de que o método possa ser empregado no LFDA-RS.
2. Utilizando o método validado, realizar a análise de especiação química de mercúrio em amostras de pescado, determinando a concentração de metilmercúrio e mercúrio inorgânico, e comparar os resultados com a legislação internacional aplicável (Codex Alimentarius,⁹ Estados Unidos,¹⁰ China¹¹ e Japão¹²).
3. Determinar a concentração total de Hg nas amostras de pescado e comparar os resultados com os limites estabelecidos pela ANVISA na Instrução Normativa (IN) nº 160/2022.⁷
4. Investigar a existência de correlação entre as concentrações das diferentes espécies de mercúrio e da sua concentração total.
5. Realizar a quantificação dos contaminantes As, Cd e Pb e comparar os resultados com os limites estabelecidos pela ANVISA.⁷
6. Realizar a análise de especiação química de arsênio nas amostras de pescado e comparar a concentração encontrada com a recomendada pela legislação internacional aplicável (China,¹¹ Austrália e Nova Zelândia¹⁵).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercúrio

O mercúrio é um elemento constituinte natural da crosta terrestre. Ele existe em três estados de oxidação: mercúrio elementar metálico Hg (0), Hg (I) e Hg (II). À temperatura ambiente o mercúrio elementar é um líquido prateado com alta pressão de vapor, logo raramente é encontrado neste estado, pois o líquido é rapidamente evaporado para a atmosfera. Na crosta terrestre ele está presente principalmente na forma de sulfeto de mercúrio II, o mineral cinábrio, ou na forma de sais ou óxidos.¹⁶

A liberação natural para a atmosfera ocorre principalmente através de erupções vulcânicas, incêndios florestais e erosão de rochas e solos contendo o mineral. Entretanto, as principais fontes de mercúrio na atmosfera são antropogênicas, e incluem a combustão de carvão e outros combustíveis fósseis, a mineração e beneficiamento de minérios, a produção de cimento, incineração de resíduos sólidos e cremação.¹⁶

O mercúrio ainda tem aplicação permitida em preenchimentos dentários, na forma de amálgama encapsulada para uso odontológico, mas o uso de mercúrio metálico para esta finalidade foi proibido em 2019.¹⁷ No mesmo ano, o uso de termômetros e esfigmomanômetros com coluna de mercúrio também foi proibido nos serviços de saúde.¹⁸ O mercúrio é ainda utilizado na produção de cloro e soda, embora o uso de células contendo o metal esteja em declínio. Esta tecnologia produtiva correspondia a 14% da produção brasileira, segundo dados de 2018,¹⁹ ou 2,1% da produção mundial, conforme dados de 2021.²⁰ A Convenção de Minamata intenta a eliminação do uso da tecnologia de células de mercúrio para fabricação de cloro e soda até 2025.²¹ O metal também é usado em produtos como baterias, pilhas, lâmpadas, e equipamentos eletrônicos.

Os sais de mercúrio, contendo o elemento na forma inorgânica, são empregados em cosméticos, desinfetantes, equipamentos elétricos e insumos para fotografia. Já formas orgânicas como o etilmercúrio e timerosal são empregadas em vacinas como fungicida e bactericida, e compostos contendo fenilmercúrio são utilizados em tintas como agente antifúngico. A fabricação de pesticidas e fungicidas contendo mercúrio foi proibida em importantes países fabricantes de defensivos agrícolas. Da mesma forma, o uso destes produtos no controle de pragas agrícolas é banido nos países em que a agricultura representa atividade econômica importante, como Brasil, Estados Unidos e Índia.²²

O mercúrio é utilizado na mineração de ouro em operações de pequena escala, que constitui a maior fonte antropogênica do contaminante no meio ambiente, correspondendo a 37,7% das emissões globais. A incineração de carvão contribui com outros 21,3% das emissões, a produção de cimento é responsável por 10,5% e a mineração e beneficiamento de minérios somam mais 10,3%.²³

O uso de mercúrio e seus compostos vem sendo reduzido e muitas aplicações vêm sendo substituídas ou drasticamente reduzidas.^{24,25} Embora o mercúrio esteja naturalmente presente no meio ambiente, estima-se que as atividades humanas aumentaram a quantidade de mercúrio mobilizado na terra, na atmosfera e no oceano por um fator de três a cinco.²⁶

3.2 Doença de Minamata

A doença causada pela contaminação por mercúrio foi denominada doença de Minamata, após o desastre ocorrido na década de 1950 na cidade de Minamata, no Japão. Nesta cidade localizava-se uma fabricante de produtos químicos chamada *Chisso Fertilizes* que empregava um catalisador contendo mercúrio inorgânico em um de seus processos, gerando metilmercúrio como subproduto da fabricação de acetaldeído. Os resíduos da produção foram despejados na baía de Minamata por mais de 30 anos (de 1932 a 1968).

Peixes e outros frutos do mar foram contaminados com metilmercúrio, e, como eram alimentos para a população local, muitas pessoas foram intoxicadas.^{27,28} Os primeiros indícios da contaminação surgiram no início dos anos 1950, quando foi observada alta mortalidade de ostras e peixes e a deficiência de crescimento de algas.²⁹ A primeira hospitalização ocorreu em maio de 1956, e até o final daquele ano 17 mortes foram registradas.²⁹

A contaminação prosseguiu até 1968, quando a produção de acetaldeído foi encerrada, após uma extensa investigação que desvendou que o metilmercúrio era a causa da doença.^{29,30} Estima-se que 488 toneladas de mercúrio tenham sido despejadas na baía de Minamata.²⁷ Iniciativas para restringir a pesca na área atingida, e posteriormente para descontaminar a baía, foram adotadas pelo governo, que também estipulou critérios para compensação das vítimas.³¹ Oficialmente 2271 vítimas foram reconhecidas, mas milhares de pessoas que apresentaram os sintomas característicos da doença não foram relacionadas como vítimas diretas do acidente ambiental.³²

3.3 Outros casos envolvendo contaminação por compostos de mercúrio

Embora a doença causada pela intoxicação por mercúrio tenha ganhado o nome de doença de Minamata, registros anteriores aos acontecimentos no Japão indicam que casos de intoxicação por mercúrio já haviam ocorrido no passado. Entre os séculos 17 e 19 o nitrato de mercúrio era empregado na fabricação de chapéus. As más condições ocupacionais dos trabalhadores, que desenvolviam este trabalho em ambientes com pouca ou nenhuma ventilação, levavam à exposição a altas quantidades de mercúrio na forma de vapor. Muitos dos trabalhadores envolvidos na fabricação de chapéus desenvolveram os sintomas neurológicos da doença, e surgiu a expressão “chapeleiro maluco”, ou “louco como um chapeleiro”.³³

Os primeiros registros de óbitos ocorridos em consequência da intoxicação ocorreram na Inglaterra em 1863, quando dois químicos que trabalharam com metilmercúrio morreram em decorrência da intoxicação. O caso foi esclarecido como intoxicação por metilmercúrio somente em 1940, e a condição foi denominada como síndrome de Hunter-Russel.³⁴

Na década de 1940 outros casos foram registrados, quando compostos contendo metilmercúrio eram empregados no tratamento de sementes, de madeira e de celulose como antifúngico. Trabalhadores das indústrias de fabricantes de metilmercúrio, bem como funcionários de empresas de beneficiamento de grãos tratados e de serrarias foram vitimados.³⁵ Na década de 70, casos de contaminação ocorreram no Iraque, Guatemala, Gana, Paquistão e Estados Unidos. O uso de grãos tratados com metilmercúrio, que deveriam ser destinados apenas ao plantio, na fabricação de pães e na alimentação de animais causou intoxicações, sobretudo em áreas rurais. O caso mais grave ocorreu no Iraque, em que pelo menos 459 pessoas morreram e mais de 6900 hospitalizações foram registradas.³⁶⁻³⁸

Outra substância organomercurial que merece destaque é o timerosal, ou tiosalicilato de etilmercúrio sódico. Este é um composto organometálico contendo mercúrio patentado em 1932 e comercializado sob o nome de Merthiolate.^{39,40} Devido à excelente característica antifúngica e bactericida, o timerosal foi amplamente empregado como conservante em cosméticos, medicamentos, vacinas e outros produtos farmacêuticos. Após registros de alergias e intoxicações pelo uso do medicamento, o organometálico foi retirado da formulação da maioria destes produtos.^{41,42} No entanto, o

uso como preservativo em vacinas multidoses ainda é permitido e motivou a realização de estudos buscando avaliar a segurança do uso desta substância. Os resultados divergem quanto à segurança da utilização do timerosal, de forma que não há consenso formado.^{40,43-45} No Brasil atualmente a ANVISA proíbe o uso de derivados mercuriais em medicamentos, mas o uso é permitido em vacinas.⁴⁶ Também há permissão para uso do timerosal e de fenilmercúrio em maquiagens e demaquilantes.⁴⁷ Nos Estados Unidos o produto ainda é utilizado por alguns laboratórios que produzem vacinas em recipientes multidoses.⁴⁸ Após a publicação da resolução limitando a utilização do timerosal, a composição do antisséptico Merthiolate foi alterada, de forma que o produto não contém mais a substância em sua formulação.

3.4 Sintomas da contaminação por mercúrio e seus compostos

A intoxicação por mercúrio pode ser difícil de diagnosticar devido ao seu início insidioso e ao fato de que muitas vezes os sintomas iniciam em algum lapso de tempo após a contaminação. Geralmente os primeiros sintomas da doença incluem o comprometimento da fala, da audição e do sistema visual, causando efeito de visão de túnel e perda da visão periférica. Observam-se também dificuldades motoras, de coordenação, de orientação e equilíbrio, bem como tremores, amortecimento das extremidades (mãos e pés).²

Entre os transtornos físicos e neurológicos causados pela exposição ao mercúrio estão insônia, perda de memória, timidez, alterações repentinas de humor, depressão, transpiração descontrolada, cefaleia, sensibilidade à luz e instabilidade emocional. Anorexia, perda de peso, fadiga, fraqueza muscular também são observadas. O mercúrio afeta os rins, causando a perda ou insuficiência da função renal, e os pulmões causando perda da capacidade respiratória e embolia – especialmente quando ocorre intoxicação por inalação. Podem também ocorrer danos à pele, perda de cabelo e aparecimento de erupções cutâneas.²

O metilmercúrio é classificado como possivelmente carcinogênico (grupo 2B).⁴⁹ Além disso, compostos de mercúrio são teratogênicos, especialmente as formas orgânicas de mercúrio, pois estas moléculas possuem grande capacidade de atravessar membranas hematoencefálicas e a placenta. Mulheres grávidas podem sofrer aborto espontâneo e podem ocorrer danos cerebrais ao feto, como retardo, cegueira, problemas de fala, surdez,

convulsões, paralisia e má formação. Em casos extremos a intoxicação por mercúrio causa paralisia, coma e morte.²

3.5 Mercúrio no meio ambiente

A partir da década de 70, o grande número de incidentes envolvendo a contaminação por metilmercúrio levou à redução do uso industrial desta substância.³⁷ No entanto, estudos mostravam que havia presença de metilmercúrio em peixes coletados em águas de regiões onde não havia registro de emprego da substância, mas apenas fontes de mercúrio inorgânico estavam conhecidamente presentes. Estudos foram realizados a fim de elucidar os mecanismos de transporte e migração de mercúrio no ambiente, e descobriu-se então a capacidade de certos organismos aquáticos de metilar o mercúrio inorgânico, produzindo formas mono e dimetiladas.⁵⁰

O ciclo biogeoquímico do mercúrio envolve a mobilização do mercúrio para a atmosfera, predominantemente em sua forma elementar, através de processos naturais e antropogênicos. O mercúrio elementar metálico gasoso corresponde a cerca de 95% do mercúrio total presente na atmosfera. As outras formas encontradas são: mercúrio orgânico, presente na proporção de cerca de 3% do mercúrio total; mercúrio inorgânico Hg (II), que corresponde a aproximadamente 1% do mercúrio total; e o mercúrio ligado a material particulado, que corresponde a em torno de 1%.⁵¹ Devido à elevada estabilidade do mercúrio elementar metálico, ele pode se deslocar por longas distâncias e se manter na atmosfera por longos períodos de tempo, de até 2 anos.⁵² Esta característica é crucial pois favorece a mobilidade do mercúrio, fazendo com que ele seja encontrado em ambientes afastados das fontes de contaminação. Uma vez na atmosfera, o mercúrio elementar pode se depositar no solo ou na água, mas por ser volátil, estima-se que de 5 a 60% do metal tende a se volatilizar novamente.^{26,51} Na atmosfera podem ocorrer reações de oxidação que convertem o Hg (0) a Hg (II). Tais mecanismos ainda não estão completamente desvendados, mas entre os possíveis mediadores desta reação de oxidação estão o ozônio⁵³, radicais hidroxila⁵⁴ e em especial o bromo, em uma reação possivelmente foto-catalisada.⁵⁵

A maior parte do mercúrio na superfície terrestre e aquática é depositada como Hg (II), oriundo da atmosfera.²⁶ A porção depositada em terra tende a se associar à vegetação e ao próprio solo, onde se liga fortemente aos compostos contendo enxofre.⁵⁶ A forte ligação entre mercúrio e enxofre pode ser explicada pela teoria de ácidos e bases

de Pearson. Enxofre é considerado uma base mole, e o mercúrio é um ácido mole, o que torna a ligação química entre enxofre e mercúrio bastante efetiva.⁵⁷ Outra reação possível é a redução do Hg (II) a Hg (0) e posterior volatilização. Parâmetros como temperatura, incidência de radiação solar e umidade do solo interferem no processo de redução e volatilização do mercúrio. O mercúrio também pode ser liberado para a atmosfera através da queima da matéria orgânica à qual está ligado.²⁶

Nos sistemas aquáticos Hg (II) e Hg (0) podem se converter a metilmercúrio, a espécie química que mais contribui para a exposição humana através da ingestão de peixes e frutos do mar contaminados.³ Uma fração do mercúrio depositado é convertido a metilmercúrio através da reação de metilação. Esta reação pode ocorrer através de dois mecanismos: o químico e o biológico.

3.5.1 Metilação química ou abiótica

A metilação química, também chamada abiótica, pode ocorrer por diversas rotas na presença de compostos doadores de metila apropriados. Há três vias principais: a reação com os ácidos fúlvico e húmico; a reação de transmetilação; e na presença de outros compostos orgânicos doadores do grupo metila.

Substâncias húmicas: os ácidos fúlvico e húmico estão presentes na matéria orgânica do solo e em sedimentos aquáticos. Tais substâncias são capazes de metilar o mercúrio inorgânico em ausência de luz e bactérias. A reação é dependente da temperatura – ocorre na faixa de 4 °C a 70 °C, e quanto maior a temperatura, maior a metilação; do pH – a metilação é observada entre pH 2 e 14; e das concentrações de mercúrio inorgânico e ácidos fúlvico e húmico – quanto maiores suas concentrações no meio, maior a produção de metilmercúrio.⁵⁸

Reação de transalquilação com compostos organometálicos: reações de transmetilação entre mercúrio e compostos organometálicos metilados, em especial compostos de estanho e chumbo, podem produzir metilmercúrio a partir de mercúrio inorgânico – Hg (II). Esta reação é favorecida em ambientes poluídos, como corpos hídricos em que há lançamento de efluentes contendo Hg (II) e presença das espécies organometálicas de trimetilchumbo, e mono-, di-, tri- e tetrametilestanho.⁵⁹

Reação não enzimática com a metilcobalamina: a metilcobalamina, uma coenzima derivada da vitamina B 12 (cobalamina), é um composto organometálico que

contém uma metila ligada a um átomo central de cobalto. Ela é produzida por micro-organismos e pode ser encontrada em sedimentos. Em solução aquosa, e na ausência de bactérias, foi observada a transferência da metila da metilcobalamina para íons Hg (II) produzindo metilmercúrio.⁶⁰⁻⁶²

Dentre os três mecanismos, provavelmente o que mais contribui para produção abiótica de metilmercúrio é o primeiro, pois matéria húmica é abundante no ambiente aquático em concentrações razoavelmente altas.⁶²

3.5.2 *Metilação biológica*

O processo de metilação do mercúrio inorgânico por organismos vivos foi demonstrado pela primeira vez no final dos anos 1960.⁵⁰ Atualmente é aceito que as bactérias redutoras de sulfato são importantes metiladoras de mercúrio, mas não são os únicos organismos a produzir o metilmercúrio a partir de Hg (II).^{63,64} Bactérias redutoras de ferro, metanogênicas, fermentativas e fungos também são organismos metiladores.³ A metilação ocorre em condições aeróbias e anaeróbias, mas predomina em sistemas anaeróbios.^{65,66}

A biometilação de mercúrio ocorre em água, sedimentos, solos, perifíton (algas e outros micro-organismos que crescem na superfície de corpos hídricos), liteira (ou serapilheira, a camada formada por restos de plantas e material orgânico no solo ou na água), áreas pantanosas, áreas cobertas de neve, e possivelmente em vários outros ambientes.³ A síntese biótica de metilmercúrio é um processo complexo, afetado por uma ampla variedade de fatores, como espécies microbianas, espécies e concentração de mercúrio, presença de compostos de ferro e enxofre, matéria orgânica dissolvida, salinidade, potencial redox, pH, temperatura, umidade, e propriedades do solo.⁶⁷⁻⁶⁹ Regiões pantanosas, terrenos alagados e lagos contendo grandes quantidades de sedimentos favorecem a reação.^{70,71}

O Hg (II) entra na célula microbiana através de difusão passiva (sem gasto energético, somente por gradiente de concentração), difusão facilitada (com auxílio de proteínas transmembrana, e na presença de gradiente de concentração) e também por transporte ativo (transporte através da membrana com consumo energético).⁷² Duas enzimas (HgcA e HgcB) catalisam a reação de metilação. Um importante estudo demonstrou que existe uma base genética para capacidade de metilação de mercúrio.⁷³ Foram identificados dois genes em comum em seis bactérias com capacidade de

metilação do mercúrio. A remoção de um ou de ambos os genes levou à interrupção da habilidade das bactérias em metilar mercúrio. Estes genes estavam presentes em todas as bactérias metiladoras de mercúrio cujo genoma estava sequenciado até momento em que o estudo foi publicado, sugerindo um mecanismo em comum para todos os micro-organismos.⁷³

A importância ambiental relativa dos processos abióticos e biológicos é difícil de mensurar devido à complexidade dos sistemas ambientais e ao grande número de fatores que afeta a produção de metilmercúrio por ambos os processos.⁷⁴ Entretanto, estudos indicam que a metilação biológica possui papel mais importante em condições naturais.^{3,75}

3.5.3 Desmetilação

Assim como a metilação, o processo de desmetilação é possível através de mecanismos químicos e biológicos.⁶⁴

A degradação abiótica do metilmercúrio ocorre através da fotodegradação mediada pela ação da luz ultravioleta.⁷⁶ A composição do meio influencia a velocidade da reação: o pH, a presença de matéria orgânica, nitratos, cloretos e ligantes orgânicos contendo enxofre afetam a taxa de fotodegradação.⁷⁷⁻⁷⁹

O processo de desmetilação biológico desenvolveu-se em micro-organismos presentes em locais contaminados, sendo que as primeiras espécies a apresentar tal capacidade surgiram em ambientes geotérmicos expostos a fontes naturais de mercúrio.⁸⁰ Micro-organismos residentes em locais com altas concentrações de mercúrio desenvolveram mecanismos de defesa e resistência à toxicidade do Hg (II), que prejudica o funcionamento das células ligando-se aos grupos sulfidrilas das proteínas, desestabilizando a estrutura proteica e prejudicando a atividade enzimática. O sistema de defesa e resistência é formado por enzimas capazes de converter e transportar as espécies de mercúrio, produzindo espécies com diferente mobilidade e solubilidade.^{81,82}

3.6 Exposição humana ao Hg

De acordo com a OMS, a exposição humana ao mercúrio ocorre principalmente por exposição ao mercúrio emitido em processos industriais e através do consumo de peixes, moluscos e crustáceos contaminados.¹ No primeiro caso, trata-se principalmente de mercúrio elementar e inorgânico, aos quais a exposição por inalação é a mais comum,

e em que cerca de 80% do mercúrio inalado é absorvido pelo organismo. Quando há ingestão de frutos do mar contaminados, nos quais predomina a presença de espécies orgânicas de mercúrio, a absorção no trato gastrointestinal chega a 95%.²

Os seres humanos e a vida selvagem são expostos ao metilmercúrio à medida que este se bioacumula na cadeia alimentar.⁸³ O processo de bioacumulação envolve o acúmulo de determinada substância absorvida por organismos vivos em seus tecidos.⁸⁴ Este processo pode ocorrer diretamente através da assimilação da substância a partir do meio ambiente, ou de forma indireta através da ingestão de alimentos em que a substância está presente.^{85,86} Assim, os organismos apresentam a substância absorvida em concentração superior à concentração ambiental.

A biomagnificação, ou magnificação trófica, é a transferência de substâncias presentes em alimentos para um organismo no qual serão encontradas concentrações mais altas em comparação com a concentração da fonte. Pode ser definida como um aumento progressivo na concentração de uma substância em organismos em níveis tróficos sucessivos em uma cadeia alimentar. A longevidade e o tamanho do organismo estudado são exemplos de fatores que provocam o aumento da concentração de contaminantes em níveis tróficos superiores, assim predadores têm maiores concentrações dessas substâncias que suas presas.⁸⁵

Na natureza os dois processos ocorrem concomitantemente. A concentração de mercúrio iônico em água frequentemente é muito baixa, ao nível de ng L^{-1} , sendo o metilmercúrio apenas cerca de 1% deste teor. Em contrapartida, as espécies predadoras de peixes chegam a acumular ao nível de mg kg^{-1} de mercúrio, sendo a maioria na forma de metilmercúrio.⁸⁷

3.7 Legislações

As maiores preocupações quanto à exposição ao mercúrio estão relacionadas à ingestão de peixes e outros frutos do mar contaminados.¹ Estudos vêm mostrando também uma crescente preocupação com a contaminação por mercúrio em arroz, principalmente decorrente do cultivo em áreas contaminadas.⁸⁸⁻⁹¹ Atualmente não há consenso nas regulações internacionais a respeito dos limites máximos de mercúrio em alimentos. Na Tabela 1 são mostrados os níveis adotados por países e organizações importantes ao redor do mundo e no Brasil.

Tabela 1. Limites máximos para mercúrio em alimentos adotados por países e organizações. Abreviações: tHg – mercúrio total; MeHg – metilmercúrio.

País / Organização	Alimento	Limite máximo (mg kg ⁻¹)
Brasil ⁷	Peixes (exceto predadores), moluscos cefalópodes, moluscos bivalves, crustáceos	0,50 tHg
	Peixes predadores	1,0 tHg
Codex Alimentarius ⁹	Atum	1,2 MeHg
	Alfonsino	1,5 MeHg
	Marlin	1,7 MeHg
	Cação	1,6 MeHg
	Água	0,001 tHg
Sal	0,1 tHg	
Estados Unidos ¹⁰	Peixes, mariscos, crustáceos e outros animais aquáticos	1,0 MeHg
União Europeia ^{4,5}	Produtos da pesca e parte comestível do peixe, com exceção das espécies referidas. Os teores máximos aplicam-se aos crustáceos, com exceção da carne escura do caranguejo e da carne da cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares	0,50 tHg
	Parte comestível dos seguintes peixes: tamboril, peixe- lobo riscado, bonito, enguia, ronquinhas, olho-de- vidro, olho-de-vidro laranja, lagartixa-da-rocha, alabote-do-atlântico, espadins, areiros, salmonetes, lúcio, palmeta, fanecão, carochó, raia, peixe-vermelho, veleiro-do-atlântico, peixe-espada, bicas e gorazes, tubarões (todas as espécies), escolares, esturjão, espadarte, atum	1,0 tHg
	Suplementos alimentares	0,10 tHg
Canadá ⁸	Todos os peixes comestíveis de varejo, exceto os listados abaixo	0,5 tHg
	Escolar, <i>orange rough</i> , marlin, atum, tubarão e espadarte	1,0 tHg
China ¹¹	Animais aquáticos e seus produtos (com exceção de peixes carnívoros e seus produtos)	0,5 MeHg
	Peixes carnívoros e seus produtos	1 MeHg
	Grãos e derivados (arroz, milho, trigo)	0,02 tHg
	Vegetais frescos	0,01 tHg
Japão ¹²	Peixes e mariscos, exceto atum, espadim, bonito e peixes de rios de águas interiores	0,4 tHg
		0,3 MeHg

Por sua elevada toxicidade e capacidade de acumulação, a determinação de metilmercúrio é mais adequada ao monitoramento da qualidade dos alimentos. Por outro lado, a determinação de mercúrio total é mais simples e em geral envolve menores custos de análise. Estima-se que 80 a 100% do mercúrio presente em peixes está na forma orgânica, enquanto em outros frutos do mar este percentual varie em cerca de 50 a 80%.⁹² Desta forma, regulações que estabelecem limites em termos de mercúrio total podem superestimar o nível efetivo de contaminação, pois considera-se que todo o mercúrio está presente na forma química mais tóxica. Com isso, pode ocorrer o descarte de alimentos que poderiam ser considerados próprios para consumo, caso fossem considerados os limites para metilmercúrio, uma vez que apenas uma fração do mercúrio está presente nesta forma química.

3.8 Análise de especiação química de mercúrio

A análise de especiação química é definida pela IUPAC⁹³ como sendo as atividades analíticas de identificação e/ou medição das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra. A espécie química, por sua vez, é definida como a forma específica de um elemento quanto à composição isotópica, estado eletrônico ou de oxidação e/ou estrutura complexa ou molecular.

A análise de especiação química tem fundamental importância, pois frequentemente a informação quanto à concentração total do elemento pode ser pouco útil na avaliação da implicação da presença do elemento, principalmente quando as formas químicas apresentam toxicidades muito diferentes, como é o exemplo de mercúrio, estanho, cromo, arsênio e outros.⁸⁷ A mobilidade, biodisponibilidade, ecotoxicidade, efeitos fisiológicos e toxicológicos são dependentes da forma química do elemento, portanto apenas o conhecimento da distribuição das espécies químicas de um dado elemento no material em estudo permite avaliar os efeitos da sua presença.⁹³

3.8.1 Extração das espécies químicas

Em todas as etapas envolvendo a análise de especiação química devem ser adotados cuidados visando conservar as espécies químicas na forma como elas se apresentam na amostra. A presença de uma matriz complexa, no caso de amostras biológicas, requer um procedimento de preparo de amostras capaz de remover ou minimizar a quantidade de interferentes, sem perdas do analito, contaminação ou conversão entre espécies.⁹⁴ Os métodos para preparo de amostras na análise de especiação

química usualmente empregam condições brandas de extração dos analitos para evitar a conversão entre as espécies. Assim, na maioria dos casos as amostras permanecem não decompostas ao final do processo de extração, ao contrário do que se requer na determinação da concentração total de um elemento, em que usualmente ocorre a decomposição completa da matriz e liberação dos elementos químicos para a solução.⁹⁵

Diversos métodos de extração podem ser utilizados na análise de especiação de mercúrio. Os mais comuns utilizam de ácido clorídrico diluído, empregando algumas vezes reagentes auxiliares como NaCl e também radiação micro-ondas e ultrassom.⁹⁶⁻⁹⁹ As misturas de ácido clorídrico e compostos contendo enxofre, como a L-cisteína,¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ mercaptoetanol^{106,107} e tiosulfato¹⁰⁸ também são estudadas e extrações quantitativas, bem como resultados concordantes com os valores certificados para MRC (Material de Referência Certificado) são obtidos mediante a sua utilização.

Extração alcalina pode também ser utilizada. Para determinação de metilmercúrio em arroz foi empregada uma mistura de hidróxido de potássio e metanol.^{88,109} Para amostras biológicas a extração com hidróxido de tetrametilamônio em concentrações de 5 a 30% permitiu a separação das espécies sem interconversão dos analitos e com resultados adequados em análises de MRC.^{110,111} A extração enzimática também pode ser empregada na determinação de metilmercúrio em pescado.^{112,113}

3.8.2 *Determinação por LC-ICP-MS*

Técnicas cromatográficas hifenadas na separação das espécies, especialmente a cromatografia a líquido (LC) seguida pela determinação por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), são as mais empregadas em análises de especiação química de mercúrio. A LC tem a vantagem de ser compatível com diversas técnicas analíticas, como ICP-MS, CV-AAS (espectrometria de absorção atômica com vapor frio), CV-AFS (espectroscopia de fluorescência atômica com vapor frio), DAD (detector de arranjo de diodos), AES (espectrometria de emissão atômica) e UV (ultravioleta). Além disso, a etapa de derivatização é desnecessária na LC, ao contrário da separação por GC (cromatografia a gás).¹¹⁴

Colunas de fase reversa tipo C18^{98,104,107,112,115,116} e C8¹¹⁷⁻¹¹⁹ são as mais empregadas para análise de especiação de mercúrio. Como fase móvel é comum o emprego de compostos contendo enxofre como L-cisteína e 2-mercaptoetanol quando a técnica de detecção é ICP-MS.¹¹⁴

3.9 Otimização e validação do método

Desenvolvimento e otimização de um método analítico são etapas que precedem a sua validação. Nestas etapas, geralmente partindo-se de um método existente utilizado para analitos e matrizes similares, são avaliados os efeitos dos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico. O objetivo desta etapa é estabelecer condições experimentais que otimizem a rotina analítica e conduzam a um resultado adequado ao uso pretendido.¹³

A validação de um método é a verificação de uma série de requisitos para determinados parâmetros, a fim de assegurar que o método proposto produz resultados confiáveis e é adequado ao uso pretendido.^{13,120,121} Os parâmetros avaliados no presente estudo serão: seletividade/efeito de matriz, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária/reprodutibilidade), exatidão / recuperação, robustez e incerteza de medição.

3.9.1 Seletividade e efeito de matriz

Seletividade é definida pelo INMETRO no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)¹²¹ como a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou vários mensurandos, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo. Seletividade é, portanto, a capacidade do método em determinar a substância a analisar entre outras substâncias presentes na amostra.¹³

3.9.2 Linearidade

O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA¹³ define linearidade como a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos como resposta instrumental são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

3.9.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. O LD será calculado de acordo com a Equação 1, conforme a orientação sobre validação de procedimentos analíticos, do

INMETRO.¹⁴ O LD deve ser inferior a 1/10 do TMC (Teor Máximo de Contaminante), de acordo com o MAPA.¹³

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com certeza estatística razoável (95% de confiança), apresentando um nível aceitável de precisão e exatidão. Segundo o Manual de Garantia de Qualidade Analítica do MAPA, o LQ deve ser inferior a 1/5 do TMC, e a sua concentração deve estar contemplada na curva de calibração. O LQ será calculado de acordo com a Equação 2.¹⁴ Este limite, após determinado, deve ser confirmado com amostras independentes, para averiguar se a exatidão e a precisão alcançadas são satisfatórias.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

s é o desvio-padrão da intensidade do sinal analítico correspondente ao branco ($n \geq 6$); se este não gerar sinal, deve-se utilizar o sinal do menor nível de concentração da curva de calibração;

b é o coeficiente angular da equação de regressão linear;

3.9.4 Precisão

A precisão é a dispersão de resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.¹³ Também é o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.¹²¹ A precisão será avaliada através da repetitividade e da reprodutibilidade intralaboratorial (ou precisão intermediária).

Repetitividade é a precisão intracorrída, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição – mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento em um curto espaço de tempo.¹³

Reprodutibilidade, também denominada precisão intermediária, refere-se à precisão de medição sob um conjunto de condições de reprodutibilidade. As condições

de reprodutibilidade são aquelas em que os fatores que podem alterar o resultado da medição são variados na maior extensão possível que se pode ter na rotina. As medições são feitas em dias diferentes, em intervalo de tempo abrangente, com analistas diferentes, lotes diferentes de reagentes, entre outros.¹³

3.9.5 *Exatidão / Recuperação*

A exatidão é o grau de concordância entre um valor medido e o valor tido como verdadeiro de um mensurando. A veracidade é definida como o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência.¹²¹ Na prática, é o grau de concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.¹³

A exatidão é determinada através de ensaios de recuperação do analito. Para tal, podem ser utilizados MRCs ou matriz fortificada da amostra, ou ambos. Neste trabalho serão utilizados os dados obtidos nos ensaios de precisão (matriz fortificada), calculando a recuperação média, e também MRCs.

3.9.6 *Robustez*

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A robustez fornece uma indicação da confiança do método em aplicação rotineira.¹⁴ O estudo da robustez procura avaliar a susceptibilidade do método a alterações das condições experimentais. Tais alterações podem englobar modificações em reagentes (quantidade e concentração), condições de armazenamento, condições ambientais e/ou de preparação da amostra.¹³

3.9.7 *Incerteza de medição*

A incerteza de medição é definida como um parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.¹²¹ Na prática, a incerteza de um método é estimada em quatro etapas:

1. Especificação do mensurando, mediante sua equação que relaciona as grandezas de entrada (obtidas de medições diretas) com a grandeza de saída, acrescida de um componente de dispersão oriunda da reprodutibilidade;

2. Identificação das fontes de incerteza, elencando os fatores que causam desvio do valor medido em relação ao valor tido como verdadeiro, contribuindo para a incerteza da medição;
3. Quantificação ou estimativa das incertezas de cada fonte e cálculo dos respectivos coeficientes de sensibilidade (derivada parcial da função que descreve o resultado analítico em relação a cada fator individual);
4. Cálculo da incerteza padrão combinada, que engloba os valores de todas as fontes individuais em um valor único.

A incerteza padrão combinada é utilizada para o cálculo da incerteza expandida, multiplicando a incerteza padrão combinada por um fator de abrangência, correspondente ao número de desvios-padrão relativo ao grau de confiança desejado. Por fim realiza-se a análise crítica para avaliar se a incerteza do método é adequada ao uso pretendido.¹²²

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Para todas as determinações foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) modelo 7900 da marca Agilent Technologies, dotado de célula de colisão com gás hélio. A câmara de nebulização empregada foi do tipo Scott de duplo passo e o nebulizador utilizado foi do tipo concêntrico de vidro (modelo *MicroMist*). Utilizou-se gás argônio com 99,999% de pureza mínima, fornecido pela Air Liquide, como gás do plasma, gás de nebulização, gás auxiliar e gás de *make up*. Foi utilizado gás hélio com 99,9999% de pureza mínima como gás de colisão, fornecido pela Air Liquide. As análises de especiação química por LC-ICP-MS foram executadas utilizando um cromatógrafo a líquido modelo 1260 *Infinity* da marca Agilent Technologies associado ao instrumento de ICP-MS. A coluna cromatográfica para análise de especiação de Hg foi do tipo C-18 da marca Phenomenex modelo Synergi Hydro-RP com dimensões 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4 µm e tamanho de poro 80 Å. Foi empregada pré-coluna tipo C18 da marca Phenomenex modelo KJ0-4282. Para análise de especiação química de As foi empregada coluna cromatográfica de troca aniônica da marca Hamilton modelo PRP X-100, com dimensões de 250 mm x 4,1 mm e tamanho de partícula 10 µm, e respectiva pré-coluna.

As pesagens de amostras e reagentes sólidos foram executadas em uma balança semi-analítica com precisão de 0,001 g, da marca Marte e do modelo AD500. Para avaliação da incerteza do volume do dispensador foi utilizada uma balança analítica com precisão de 0,0001 g da marca Marte, modelo AY220. O aquecimento das amostras na etapa de extração foi realizado em um forno de um cromatógrafo a gás desativado da marca Hewlett-Packard, modelo 5890 Série II. O controle da temperatura foi realizado com um termômetro digital tipo espeto da marca Incoterm.

No preparo das amostras de pescado foi utilizado liquidificador da marca Oster, modelo Osterizer, com mini jarras de plástico com capacidade para 200 mL e lâminas de 4 facas em aço inox. A decomposição das amostras de pescado para a determinação das concentrações totais de As, Cd, Hg e Pb foi realizada em um sistema de decomposição por micro-ondas da marca CEM, modelo MARS 6. Foram empregados tubos de TFM modelo Xpress Plus, com capacidade para 110 mL.

O ajuste de pH da fase móvel utilizada na análise de especiação de As foi realizado com pHmetro da marca Metrohm, modelo 913, empregando eletrodo de vidro combinado de Ag/AgCl. O pH foi ajustado empregando solução de HNO₃ 10% (v v⁻¹). Na etapa de extração das espécies de As foi utilizado um agitador tipo vórtex da marca Edutec para agitação dos tubos, e uma centrífuga refrigerada da marca Hettich, modelo Rotanta 460R, para a centrifugação dos extratos.

4.2 Reagentes, soluções, materiais de referência e softwares

Todas as soluções e diluições foram feitas utilizando água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹ fornecida por um purificador da marca Millipore, modelo Milli-Q Integral 5. Os reagentes sólidos empregados foram L-cisteína e L-cisteína hidrocloreídica monohidratada, ambos da marca Sigma-Aldrich com pureza mínima de 98,5%. Utilizou-se também fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂HPO₄) da marca Sigma-Aldrich com pureza mínima de 98%. Foram utilizados ácido nítrico grau analítico da marca Merck, com 65% (m m⁻¹) de concentração, peróxido de hidrogênio grau analítico da marca Cromoline, com 30% (m m⁻¹) de concentração, e ácido clorídrico grau analítico da marca LS Chemicals, com concentração de 37% (m m⁻¹), destilado abaixo de seu ponto de ebulição. Foram utilizados metanol e isopropanol, ambos de grau UV/HPLC da marca Dinâmica.

As soluções estoque de todos os analitos foram adquiridas prontas, sendo todas Materiais de Referência Certificados. O padrão de metilmercúrio utilizado foi da marca LGC Standards, com concentração certificada de 1001 mg L⁻¹ de cloreto de metilmercúrio. O padrão de mercúrio inorgânico utilizado foi da marca Perkinelmer e concentração certificada de 10 mg L⁻¹. Os padrões de As (III) e As (V) usados foram ambos da marca Merck, com concentração 995 mg L⁻¹ e 996 mg L⁻¹, respectivamente. Soluções padrão de Cd e Pb da marca LGC Standards foram usados na determinação destes elementos, e suas concentrações eram ambas de 1000 mg L⁻¹. Padrões de Ge, Au e Rh da marca Sigma-Aldrich também foram empregados na análise de elementos totais, e foram adquiridos nas concentrações de 1005 mg L⁻¹, 999 mg L⁻¹ e 1005 mg L⁻¹, respectivamente.

Para avaliar a exatidão do método foram utilizados os seguintes MRCs: ERM-CE 464, de peixe atum, com valores certificados para MeHg e tHg, da marca ERM (*European Reference Materials*); NRC-DORM-4, de proteína de peixe, com valores

certificados para As, Cd, Pb, tHg e MeHg, produzido pelo *National Research Council of Canada*; NRC-TORT-2, de hepatopâncreas de lagosta, com valores certificados para As, Cd, Pb, tHg e MeHg, do *National Research Council of Canada*.

As soluções intermediárias com concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de metilmercúrio e de mercúrio inorgânico foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque, com água ultrapura e contendo 0,02% (m v⁻¹) de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada. Estas soluções foram armazenadas em tubos de polipropileno e armazenadas em refrigerador, com validade de 5 dias. As demais soluções (de calibração, fortificação e checagem) foram preparadas no dia da análise, a partir da diluição com água ultrapura das soluções intermediárias em meio contendo 1% (m v⁻¹) de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada. Todas as soluções padrão foram mantidas ao abrigo da luz, sendo manipuladas pelo tempo mais breve possível, tomando o cuidado de apagar as luzes e fechar as cortinas do laboratório durante a manipulação.

A L-cisteína estabiliza o metilmercúrio em solução, mas, quando o período de armazenagem da solução aumenta, a L-cisteína sofre dimerização formando a cistina, que promove a desalquilação do metilmercúrio.¹⁰⁴ Em concentrações baixas, como 0,02% (m v⁻¹) de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada, as soluções são estáveis por até 5 dias, e por este motivo esta concentração foi utilizada para as soluções intermediárias. Nas soluções de calibração, fortificação e checagem, em que é necessário equalizar a concentração de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada das soluções à da solução de extração das amostras, a concentração deve ser 1% (m v⁻¹). Nesta concentração a L-cisteína dimeriza mais rapidamente formando a cistina, que desestabiliza o metilmercúrio, portanto estas soluções são preparadas no dia do uso.

Na determinação da concentração total dos elementos, todas as soluções padrão foram preparadas em HNO₃ 1% (v v⁻¹). As soluções padrão utilizadas na análise de especiação de As foram preparadas em água ultrapura.

A fase móvel para a análise de especiação de mercúrio foi uma mistura de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 0,1% (m v⁻¹) e L-cisteína 0,1% (m v⁻¹). A fase móvel foi preparada no dia de cada análise, utilizando água ultrapura como solvente.

Na análise de especiação de arsênio foi empregada como fase móvel uma solução de fosfato de amônio dibásico 10 mmol L^{-1} ajustada a pH $8,65 \pm 0,05$ e contendo 1% (v v⁻¹) de metanol.

Na a validação do método, os cálculos para avaliação dos parâmetros de validação foram executados empregando os *softwares* Microsoft Excel 2019 (versão 2201) e Minitab (versão 19.1). O *software* Mass Hunter 4.4 (versão C.01.04 2018), fornecido pelo fabricante do instrumento de ICP-MS, foi utilizado para o tratamento dos dados obtidos nas análises.

4.3 Descontaminação dos materiais

Todo o material utilizado nas análises foi previamente limpo e descontaminado conforme o seguinte procedimento: enxágue em água corrente; imersão em solução de sabão líquido neutro 0,5% (v v⁻¹) durante 24 horas; enxágue em água corrente; imersão em solução de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) por pelo menos 24 horas; enxágue com água purificada tipo II, com resistividade de 15 MΩ cm⁻¹, fornecida por um purificador da marca Millipore, modelo Milli-Q Integral 5. Após este procedimento o material foi seco em estufa em temperatura inferior a 45 °C e armazenado em recipiente fechado até sua utilização.

4.4 Amostras

4.4.1 Amostras de pescado

As amostras de pescado utilizadas neste trabalho foram selecionadas entre amostras analisadas previamente para quantificação de mercúrio (total), em ensaios de rotina do LFDA-RS, no escopo do PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes). Para os experimentos de validação foi selecionada uma amostra de pescado com baixa concentração de mercúrio, denominada “amostra branca”. O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA¹³ define como amostra branca a matriz isenta da substância a analisar ou cujo nível de concentração seja suficientemente baixo de modo a não interferir nos resultados de medição. As amostras analisadas com o método otimizado foram selecionadas entre aquelas previamente analisadas no laboratório, com concentrações superiores a 10 µg kg⁻¹ de mercúrio (total).

4.4.2 Preparo das amostras

As amostras de pescado foram primeiramente limpas, removendo-se escamas, pele, espinhas e vísceras. Em seguida foram cortadas em cubos e então trituradas em liquidificador até completa homogeneização e obtenção de uma textura pastosa. As

amostras assim preparadas foram guardadas em frasco de polipropileno e armazenadas congeladas até o dia da análise.

4.4.3 *Decomposição das amostras para determinação da concentração total dos elementos*

A decomposição das amostras para determinação das concentrações totais dos elementos foi executada em forno micro-ondas. O procedimento utilizado foi o mesmo empregado em análises de rotina do LFDA-RS. Pesou-se 1 g de amostra em frasco de TFM, que acompanha o forno micro-ondas, e adicionou-se 1 mL de água ultrapura. Então foram adicionados 6 mL de ácido nítrico concentrado, e os tubos foram deixados por um período de 20 minutos em capela de exaustão para pré-digestão da amostra, a frio. Após este tempo, foram adicionados 2 mL de peróxido de hidrogênio e os frascos foram fechados e colocados no rotor, que foi transferido para o forno micro-ondas. As amostras em seguida foram submetidas ao programa de aquecimento informado na Tabela 2. Após a etapa de arrefecimento, o conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para frascos de polipropileno com capacidade para 50 mL. Foram adicionados 250 µL de ácido clorídrico aos frascos, de modo a estabelecer uma concentração final de 0,5% (v v⁻¹) do ácido, a fim de estabilizar o Hg em solução, sendo por fim a solução aferida ao volume final de 50 mL com água ultrapura.¹²³

Tabela 2. Programa de aquecimento do forno micro-ondas para a decomposição das amostras de pescado para a determinação de As, Cd, Pb e Hg por ICP-MS.

Etapa	Tempo (minutos)	Potência (W)	Temperatura
Rampa	20	290 - 1800	Até 200 °C
Permanência	15	1200	200 °C
Arrefecimento	15	0	Ambiente

4.5 Procedimento de extração para análise de especiação química

4.5.1 *Extração para especiação de Hg*

A extração das espécies de Hg foi realizada empregando procedimento baseado no método proposto pela FDA (*Food and Drug Administration*),¹²⁴ com adaptações.

Pesou-se 0,5 g de amostra em *vial* de vidro âmbar com tampa de rosca e capacidade para 60 mL. Foram adicionados 50 mL de solução de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada a 1% (m v⁻¹), e os tubos foram agitados manualmente por cerca de 10 segundos. Em seguida os frascos foram colocados no forno de um cromatógrafo a gás desativado, adaptado para aquecimento de amostras. A temperatura do forno foi ajustada para 60 ± 4 °C e as amostras permaneceram sob aquecimento por 120 minutos. Na metade deste tempo (aos 60 minutos de aquecimento) os tubos foram agitados novamente por cerca de 10 segundos, manualmente. Então, os frascos foram retirados do forno e colocados em refrigerador até atingirem a temperatura ambiente (cerca de 45 minutos). Após o resfriamento foram utilizadas seringas descartáveis com capacidade para 10 mL para coletar a fração superior do conteúdo dos tubos, e então foi realizada a filtração através de membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com diâmetro de poro de 0,45 µm. Foi descartado 1 mL do primeiro filtrado e recolhido cerca de 1,5 mL do filtrado seguinte em *vial* de vidro âmbar compatível com o amostrador automático do cromatógrafo. As amostras foram, então, analisadas por LC-ICP-MS.

4.5.2 *Extração para especificação de As*

A extração das espécies de As foi executada empregando método desenvolvido e validado no LFDA-RS, de código MET RCA/021/001. O método baseia-se na conversão total do As (III) para As (V) mediante oxidação sob aquecimento em meio ácido. Empregando separação cromatográfica, determina-se a área do pico da espécie As (V), que corresponderá ao somatório das espécies inorgânicas As (III) + As (V) na amostra, e o resultado é expresso como arsênio inorgânico (iAs). Para esta determinação empregou-se o seguinte procedimento:

Pesou-se 1,0 g de amostra em tubo de polipropileno com tampa de rosca e capacidade para 50 mL. Foram adicionados 10 mL de uma solução de ácido nítrico 0,28 mol L⁻¹ contendo 3% (v v⁻¹) de peróxido de hidrogênio. Os tubos foram colocados em forno (o mesmo empregado na extração das espécies de Hg) e a temperatura foi ajustada para 90 ± 5 °C. As amostras permaneceram sob aquecimento por 60 minutos. Após este período de aquecimento, os tubos foram deixados à temperatura ambiente em capela com exaustão até o resfriamento, durante cerca de 40 minutos. Em seguida, cada tubo foi agitado em vórtex por aproximadamente 10 segundos. Então os tubos foram centrifugados a 5300 g de força centrífuga relativa (4000 rpm) por 10 minutos à

temperatura de 5 °C. A seguir, utilizando seringas descartáveis com capacidade para 10 mL, foi coletada a fração superior do conteúdo e realizada sua filtração através de membranas de PVDF com diâmetro de poro de 0,45 µm. Foi descartado o primeiro mililitro do filtrado e recolhido cerca de 3 mL do filtrado seguinte em frasco de polipropileno com capacidade para 15 mL e tampa de rosca. Após, foram pipetados 100 µL do filtrado e adicionados em *vial* de vidro compatível com o amostrador do cromatógrafo, previamente descontaminado. Na sequência, foram adicionados 900 µL de água ultrapura no *vial*, que foi fechado, homogeneizado e analisado por LC-ICP-MS.

4.6 Determinação da concentração total

As concentrações de As, Cd, Pb e Hg foram determinadas por ICP-MS, seguindo metodologia existente no LFDA-RS, código MET RCA/020/001. Os parâmetros instrumentais e de operação do ICP-MS estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros operacionais do ICP-MS utilizados na determinação da concentração de As, Cd, Pb e Hg.

Parâmetro	Valor
Potência do Plasma	1550 W
Vazão de gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	1,0 L min ⁻¹
Vazão gás de <i>make-up</i>	0,1 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,9 L min ⁻¹
Profundidade de amostragem	9,0 mm
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Isótopos monitorados ⁽¹⁾ (razão massa/carga) e tempo de integração	⁷⁵ As (0,5 s), ¹¹¹ Cd (0,3 s), ²⁰² Hg (0,8 s), ²⁰⁶ Pb (0,3 s), ²⁰⁷ Pb (0,3 s), ²⁰⁸ Pb (0,3 s), ⁷² Ge (0,1 s), ¹⁰³ Rh(0,1 s)
Célula de colisão	Hélio - 4,3 mL min ⁻¹

⁽¹⁾No caso do elemento Pb, são monitorados os isótopos 206, 207 e 208, pois o *software* que comanda o equipamento faz a correção automática de acordo com a seguinte equação: $Mc(208) = M(206)*1 + M(207)*1 + M(208)*1$. Sendo assim, o resultado de Pb é determinado pelo isótopo 208, que contempla os demais.

A curva de calibração para os elementos As e Cd contemplou as concentrações 0,2; 1; 5, 10 e 30 µg L⁻¹. Para Pb a curva de calibração incluiu as concentrações 0,6; 1,0;

5, 10 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva de calibração empregada para análise de Hg contém soluções de concentração 0,08; 0,2; 1; 2 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. As soluções da curva de calibração foram preparadas em HNO_3 5% (v v⁻¹) + HCl 0,5% (v v⁻¹).

Como padrão interno para determinação de As utilizou-se solução de Ge a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para Cd, Hg e Pb solução de Rh a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ como padrão interno, preparadas em meio HNO_3 1% (v v⁻¹) + HCl 0,5% (v v⁻¹) + Isopropanol 2% (v v⁻¹).

Utilizou-se, entre a análise de cada amostra, uma solução de limpeza do sistema de introdução da amostra contendo HNO_3 5% (v v⁻¹) + HCl 0,5% (v v⁻¹) + Au (1 mg L⁻¹), mediante aspiração da solução durante 5 segundos.

Os parâmetros de voltagens das lentes iônicas foram otimizados no dia de cada análise empregando solução de *tuning*, contendo uma mistura dos elementos Li, Mg, Y, Ce, Tl e Co à concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada. A otimização é feita automaticamente pelo *software* do instrumento, de modo a obter a maior sensibilidade e menor quantidade de íons de dupla carga e óxidos.

4.7 Análise de especiação química de Hg

Na Tabela 4 são apresentadas as condições operacionais empregadas para análise de especiação de Hg. As condições foram otimizadas neste trabalho, conforme será descrito no capítulo 5.1, e definidas com base em referências bibliográficas^{104,124} e protocolos de análises realizadas no LFDA-RS.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais definidos para determinação de metilmercúrio e mercúrio inorgânico por LC-ICP-MS.

Parâmetros do ICP-MS	Valor
Potência do plasma	1550 W
Vazão de gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás nebulizador	1,1 L min ⁻¹
Vazão do gás de <i>make up</i>	0,1 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,9 L min ⁻¹
Profundidade de amostragem do plasma	9,0 mm
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Isótopo monitorado (razão massa/carga)	202
Célula de colisão	Hélio - 3 mL min ⁻¹
Tempo de integração	1,5 s
Parâmetros do LC	Valor
Coluna cromatográfica	Fase reversa, C-18
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 µL
Fase móvel	0,10% (m v ⁻¹) de L-cisteína + 0,10% (m v ⁻¹) L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada, eluição isocrática
Temperatura	Ambiente, não controlada
Tempo de aquisição	4 min

4.8 Análise de especiação química de As

A determinação da concentração de arsênio inorgânico nas amostras foi executada através de metodologia validada no LFDA-RS, por LC-ICP-MS, de código MET RCA/021/001. Os parâmetros instrumentais e de operação do sistema de LC-ICP-MS estão citados na Tabela 5.

A curva de calibração foi preparada com soluções contendo 0,2; 0,5; 1; 5 e 10 µg L⁻¹ de As (V), em água ultrapura.

Tabela 5. Parâmetros operacionais do sistema LC-ICP-MS utilizados na análise de especiação química de arsênio.

Parâmetros do ICP-MS	Valor
Potência do plasma	1550 W
Vazão de gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização	1,0 L min ⁻¹
Vazão do gás de <i>make up</i>	0,1 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,9 L min ⁻¹
Profundidade de amostragem do plasma	8,5 mm
Temperatura da câmara de nebulização	2 °C
Isótopo monitorado (razão massa/carga)	75
Célula de colisão	Hélio - 2,0 mL min ⁻¹
Tempo de integração	0,8 s
Parâmetros do LC	Valor
Coluna cromatográfica	Coluna aniônica PRP X-110S Hamilton 4,1 mm x 250 mm x 7 µm ou similar, e respectiva pré-coluna
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	25 µL
Fase móvel	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 10 mmol L ⁻¹ (pH 8,65 ± 0,05) em 1% (v/v) de metanol, eluição isocrática
Temperatura	Ambiente, não controlada
Tempo de aquisição	10 min

4.9 Validação do método

4.9.1 Linearidade

Para a construção da curva de calibração foram utilizados padrões de mercúrio inorgânico e metilmercúrio nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 µg L⁻¹. Para o estudo da linearidade foram elaboradas seis replicatas da curva de calibração.

Foram avaliadas a homoscedasticidade (homogeneidade das variâncias dos resíduos) dos dados aplicando-se o teste de Levene; a independência dos resíduos

empregando o teste de Durbin-Watson; e a normalidade da distribuição dos resíduos através do teste de Anderson Darling. Também foi avaliado o coeficiente de determinação da curva de calibração (R^2).

4.9.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi estimado de acordo com a Equação 2.¹⁴ Este limite, após determinado, foi verificado através de fortificação da amostra branca, para avaliar os parâmetros de validação do método. O LD foi calculado de acordo com a Equação 1,¹⁴ utilizando o sinal analítico do primeiro ponto da curva de calibração ($0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.9.3 Precisão e exatidão

Os testes para avaliação da precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e exatidão (recuperação) foram conduzidos mediante fortificação de amostra branca em seis vias e em dois níveis de concentração. O nível mais baixo foi $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e correspondeu ao LQ do método e o nível mais alto foi de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e correspondeu ao TMC. Os níveis de concentração adotados como LQ e TMC foram baseados na Tabela 1 e estão apresentados na Tabela 6. A exatidão também foi avaliada através da análise de três MRCs, citados na seção 4.2.

Tabela 6. Níveis de concentração adotados para LQ e TMC.

Espécie	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	TMC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
iHg	10	1000
MeHg	10	1000

4.9.4 Seletividade e efeito de matriz

A avaliação da seletividade foi realizada em seis vias e em dois níveis de concentração, correspondentes ao LQ e ao TMC. Foram comparados os sinais dos analitos para grupos de amostras:

- I. Amostra não matrizada: analitos em solvente puro (branco de reagentes);
- II. Amostra matrizada: analitos em matriz branca fortificada. Utiliza-se os mesmos dados obtidos no ensaio de precisão.

As amostras matrizadas e não matrizadas foram submetidas ao processo completo de extração, e as concentrações dos analitos foram determinadas de acordo com o método otimizado.

4.9.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método foi aplicado o teste de Youden, selecionando-se os fatores a serem avaliados de acordo com as possíveis alterações do método em análises de rotina, seus valores nominais (descritos no método) e os respectivos valores de variação. Os testes foram feitos em duplicata na concentração correspondente ao TMC.

4.9.6 Incerteza de Medição

A incerteza de medição foi estimada através da abordagem *bottom up*, calculada através da combinação das incertezas de múltiplas fontes, resultando em um valor de incerteza padrão combinada. As fontes de variações consideradas para o cálculo da incerteza padrão combinada foram:

- a. Incerteza da repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial;
- b. Incerteza da massa da amostra;
- c. Incerteza correspondente à curva de calibração;
- d. Incerteza no volume de diluição da amostra.

A avaliação da incerteza foi efetuada para o nível de concentração correspondente ao TMC, pois o método será empregado em controle oficial para avaliar se uma amostra está ou não em conformidade com os requisitos de concentração máxima permitida. Desta forma, o TMC é a concentração em que o resultado da análise (considerando sua incerteza) deve indicar com um intervalo de confiança definido se a amostra está ou não em conformidade com os requisitos da legislação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais

A primeira etapa do trabalho consistiu em avaliar os parâmetros instrumentais e a concentração da fase móvel utilizada na separação cromatográfica, a fim de identificar a condição que resultasse em um sinal analítico otimizado, com adequada separação das espécies e sem causar excessivo efeito de memória. O estudo foi iniciado a partir das condições estabelecidas no método desenvolvido pela FDA¹²⁴ para determinação de metilmercúrio e mercúrio total, e também levou-se em consideração o método atualmente utilizado no LFDA-RS para determinação de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Pb e Hg) em pescado.

A otimização dos parâmetros foi executada em duas etapas, sendo a primeira delas utilizando o ICP-MS com o cromatógrafo desacoplado, a fim de avaliar os parâmetros instrumentais intrínsecos daquele instrumento: vazão do gás de nebulização, vazão do gás de *make up* e vazão do gás de colisão. Na segunda etapa foi realizado o acoplamento do cromatógrafo com o instrumento de ICP-MS, a fim de estudar parâmetros associados à cromatografia: vazão da fase móvel, volume de injeção, tempo de integração e concentração da fase móvel. Na primeira etapa da avaliação foi utilizada uma solução de concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio inorgânico, contendo 0,2% de HCl (v v^{-1}), que aproximadamente corresponde à concentração de HCl oriunda da L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 1% (m v^{-1}). Na segunda etapa, envolvendo a separação cromatográfica, foi utilizada uma solução aquosa contendo metilmercúrio e mercúrio inorgânico, ambos à concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, e contendo 1% (m v^{-1}) de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada.

Em todas as análises foi monitorado o isótopo 202, pois é o mais abundante na natureza, com abundância relativa de 29,74%¹²⁵ e que sofre pouca interferência considerando-se a análise por ICP-MS.¹²⁶⁻¹²⁸ Desta forma, o isótopo 202 é geralmente o preferido na determinação de mercúrio por ICP-MS.^{98,100,124,129,101,102,104-106,110,116,118}

Para cada estudo foram fixadas as seguintes condições (exceto para o experimento em que o respectivo parâmetro foi avaliado): vazão de gás de nebulização $1,10 \text{ L min}^{-1}$; vazão de gás de *make up* $0,1 \text{ L min}^{-1}$; vazão do gás de colisão 3 mL min^{-1} ; número de determinações igual a 5; tempo de integração 1,5 s; vazão da fase móvel

1,0 mL min⁻¹; volume de injeção 50 µL; e fase móvel L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 0,1% (m v⁻¹) + L-cisteína 0,1% (m v⁻¹).

5.1.1 Vazão do gás de nebulização

A vazão do gás de nebulização foi avaliada na faixa de 0,90 a 1,25 L min⁻¹. Observa-se na Figura 1 que o número de contagens por segundo (CPS) aumenta em função da vazão do gás de nebulização até o limite de 1,15 L min⁻¹. Isto se deve à maior eficiência de transporte do analito para o ICP. Em vazões acima deste valor observa-se queda do sinal analítico, decorrente da diluição do analito no aerossol produzido, bem como esfriamento do plasma e deslocamento da zona crítica no mesmo. Assim sendo, a vazão do gás de nebulização selecionada foi 1,10 L min⁻¹. O desvio-padrão das medidas foi inferior a 3 CPS.

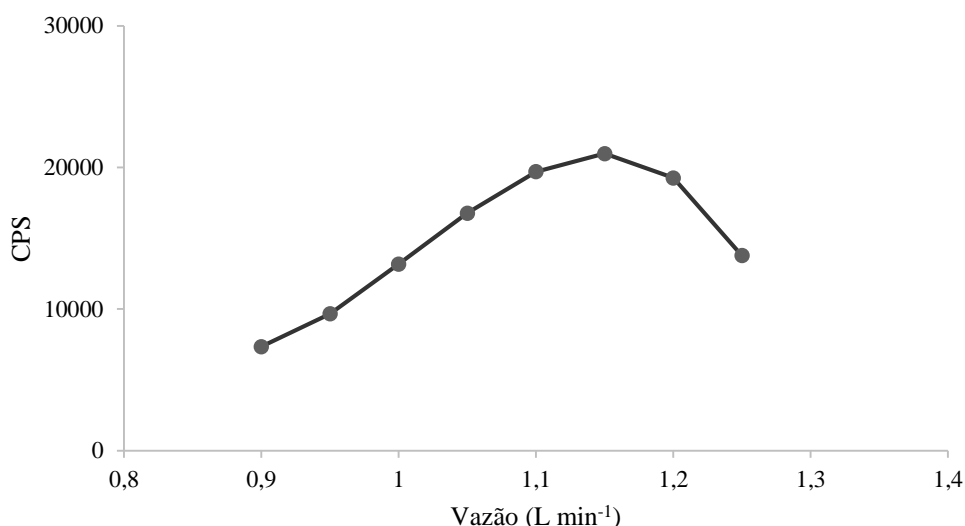


Figura 1: Efeito da vazão do gás de nebulização no número de CPS de ²⁰²Hg na concentração de 1 µg L⁻¹.

5.1.2 Vazão do gás de make up

O gás de *make up* é utilizado na saída do fluxo de gás do nebulizador para auxiliar a manter a estabilidade e homogeneidade do fluxo gasoso, compensando oscilações na vazão do gás de nebulização e também auxiliando no transporte do aerossol. O efeito da vazão do gás de *make up* foi avaliado no intervalo de 0 a 0,2 L min⁻¹. Os resultados são mostrados na Figura 2, sendo o desvio-padrão das medidas inferior a 3 CPS.

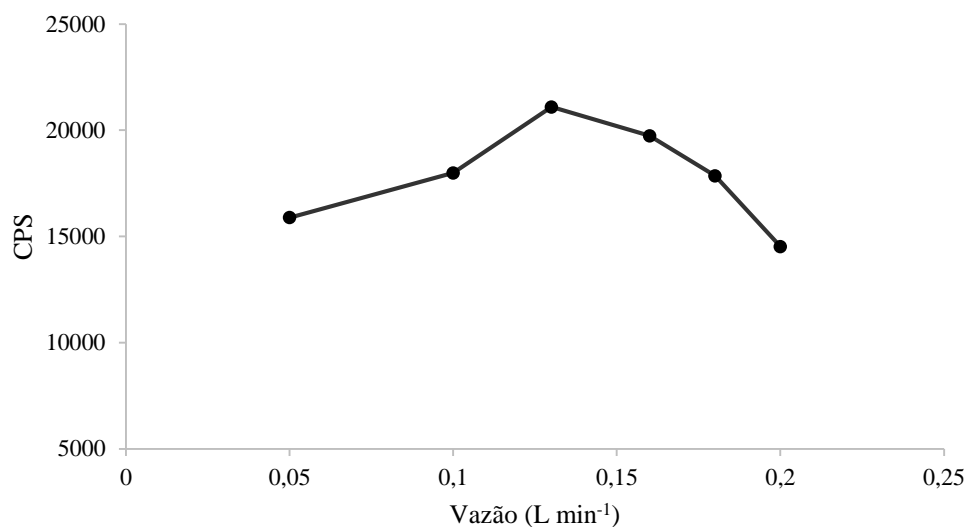


Figura 2: Efeito da vazão do gás de *make up* no número de CPS de ²⁰²Hg na concentração de 1 µg L⁻¹.

Observa-se um incremento do número de CPS quando a vazão do gás de *make up* é aumentada de zero até 0,13 L min⁻¹. Este efeito é decorrente da estabilização do aerossol produzido pelo nebulizador, bem como do aumento da eficiência de transporte do analito. Para vazões maiores que 0,13 L min⁻¹ observa-se o efeito contrário, resultante da diluição do analito no aerossol e conseqüentemente reduzindo o número de CPS. Assim, a vazão definida para o gás de *make up* foi de 0,10 L min⁻¹.

O ajuste das condições operacionais partiu das condições empregadas no método da FDA,¹²⁴ que especifica a vazão de gás de nebulização em 1,2 L min⁻¹, explicitando apenas o primeiro dígito decimal, e sem o uso de gás de *make-up*. Em uma avaliação inicial foram feitos incrementos na vazão do gás de nebulização e de *make-up* a cada 0,10 L min⁻¹. Em tais condições, um máximo de sensibilidade foi alcançado à vazão de 1,10 L min⁻¹ do gás de nebulização, e de 0,10 L min⁻¹ do gás de *make-up*. Então estas vazões foram selecionadas para a execução dos experimentos de validação. Posteriormente, em uma análise mais minuciosa, vislumbrou-se a possibilidade de executar o ajuste centesimal dessas vazões. Observou-se, então, o comportamento apresentado nas Figuras 1 e 2. Como os experimentos de validação já haviam sido executados, e os critérios de aceitação foram atendidos com as condições utilizadas, optou-se por manter as condições definidas através da avaliação inicial.

5.1.3 Vazão do gás de colisão

A vazão do gás de colisão (hélio) foi avaliada entre 0 e 4,5 mL min⁻¹. O estudo foi realizado em duas condições. Inicialmente, em preto na Figura 3, as contagens foram medidas sem o acoplamento do cromatógrafo. Em azul na mesma figura são mostrados os resultados de medição da mesma solução, após o acoplamento do cromatógrafo. A avaliação foi executada nas duas condições para avaliar se a vazão de gás de colisão que proporciona o maior número de contagens permanece inalterada após o acoplamento do cromatógrafo e a presença da fase móvel, ou seja, se a condição de maior sensibilidade para o isótopo monitorado é equivalente antes e após o acoplamento. Os resultados mostraram que a vazão de gás de colisão que proporciona maior sensibilidade (3 mL min⁻¹) se manteve inalterada após o acoplamento e a introdução da fase móvel no ICP. O sinal analítico aumentou com o incremento da vazão de hélio na faixa de zero até 3 mL min⁻¹. Para vazões superiores a este valor o sinal decaiu.

Resultado similar foi encontrado por Panova e colaboradores¹³⁰ em um estudo sobre determinação de Hg em urina por ICP-MS. Os pesquisadores atribuíram o efeito a uma melhor focalização do feixe de íons, ponderando também que, pela elevada massa atômica, a perda de energia cinética dos íons de ²⁰²Hg na célula de colisão é desprezível. Constataram também que o ruído instrumental medido com o uso de gás hélio na célula de colisão é menor, portanto a razão sinal/ruído aumenta. O sinal analítico mais elevado foi registrado a uma vazão de 3,2 mL min⁻¹, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Com o aumento da vazão de hélio acima de 3,2 mL min⁻¹, o número de colisões também se eleva, diminuindo a quantidade de íons com energia cinética suficiente para ultrapassar a barreira energética da célula de colisão, causando a queda no número de contagens.

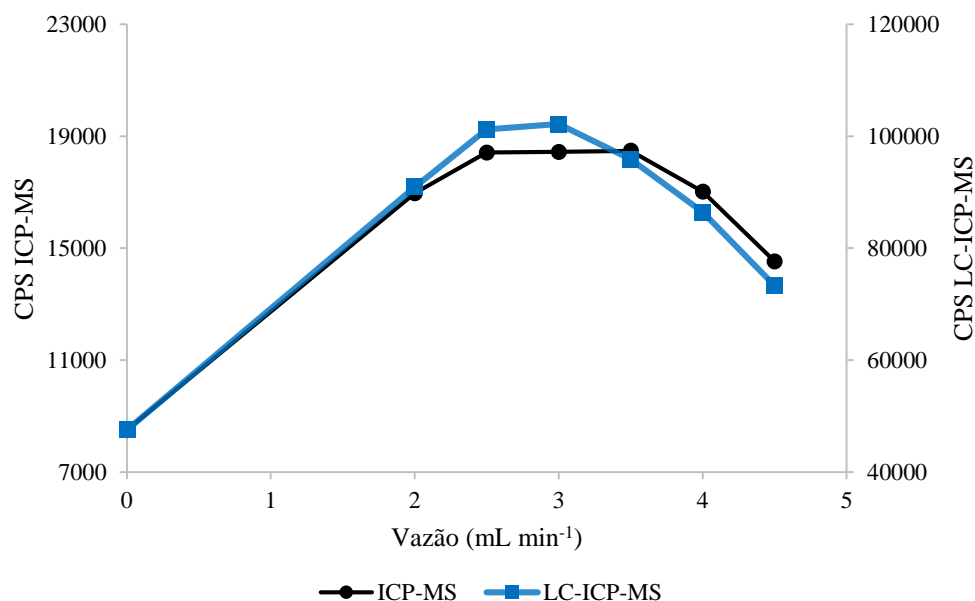


Figura 3: Efeito da vazão do gás de colisão no número de CPS de ^{202}Hg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de iHg. Em preto (●), com cromatógrafo desacoplado, e em azul (■), com o cromatógrafo acoplado.

O uso da célula de colisão é indicado para eliminar interferências espectrais. Os íons poliatômicos são espacialmente maiores que os íons do analito de mesma massa, logo, ao passar pela célula preenchida com um gás inerte, colidem com maior frequência que os íons do analito, perdendo energia cinética. Na saída da célula de colisão aplica-se uma diferença de potencial que cria uma barreira energética, de forma que os íons de baixa energia são excluídos do feixe por uma tensão de polarização. Apesar de incomum, uma vez que o isótopo 202 do mercúrio sofre poucas interferências, o uso de gás hélio na célula de colisão na determinação de mercúrio já foi mencionado por outros pesquisadores.^{96,130-134} Desta forma, a partir dos resultados mostrados na Figura 3, ficou definida a vazão do gás de colisão em 3 mL min^{-1} . Foi observado um desvio-padrão inferior a 4 CPS para todas as condições avaliadas.

5.1.4 Tempo de integração

O tempo de integração do sinal analítico, após o acoplamento do cromatógrafo ao instrumento de ICP-MS, foi avaliado entre 0,7 e 1,75 segundos. Os resultados são apresentados na Figura 4.

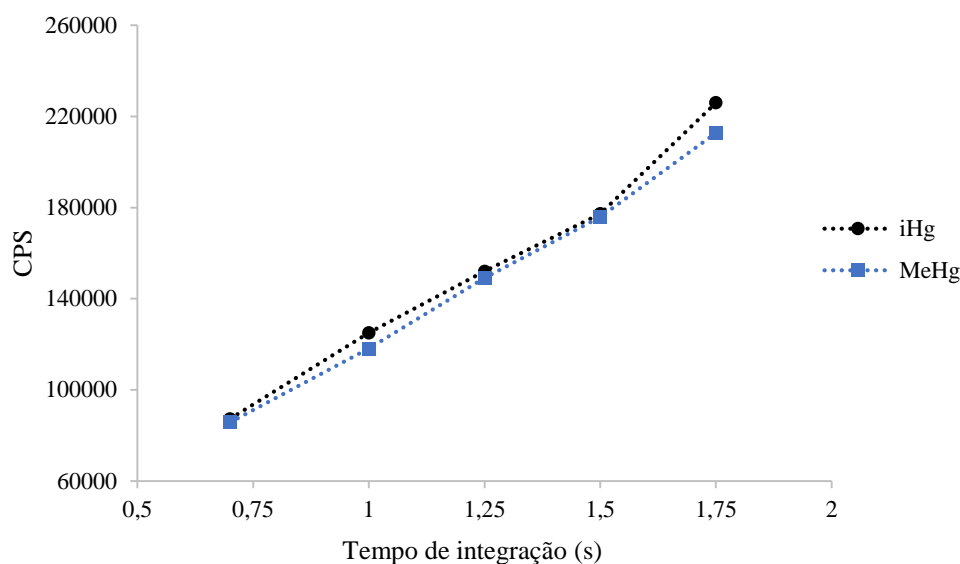


Figura 4: Efeito do tempo de integração no número de CPS de MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

O número de CPS aumentou proporcionalmente e de maneira linear com o aumento do tempo de integração, pois um maior número de íons foi quantificado pelo detector. Apesar de não ser a condição de maior sinal analítico, o tempo de 1,5 segundos foi selecionado para a continuação do trabalho. Esta escolha foi feita para prevenir uma possível saturação do detector, pois na continuidade do trabalho, e de acordo com o método otimizado, serão analisadas soluções de concentração 10 vezes maiores que as empregadas neste teste. Considerou-se que o sinal obtido por 1,5 segundos era suficientemente alto para proporcionar a sensibilidade desejada, sem prejudicar o sistema de detecção.

5.1.5 Vazão da fase móvel

A avaliação da vazão de fase móvel foi conduzida empregando a fase móvel consistindo de uma mistura de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 0,1% (m v⁻¹) e L-cisteína 0,1% (m v⁻¹), conforme o método proposto pela FDA¹²⁴. Foram avaliadas vazões de 0,8 a 1,4 mL min⁻¹. Os cromatogramas obtidos neste estudo são mostrados na Figura 5.

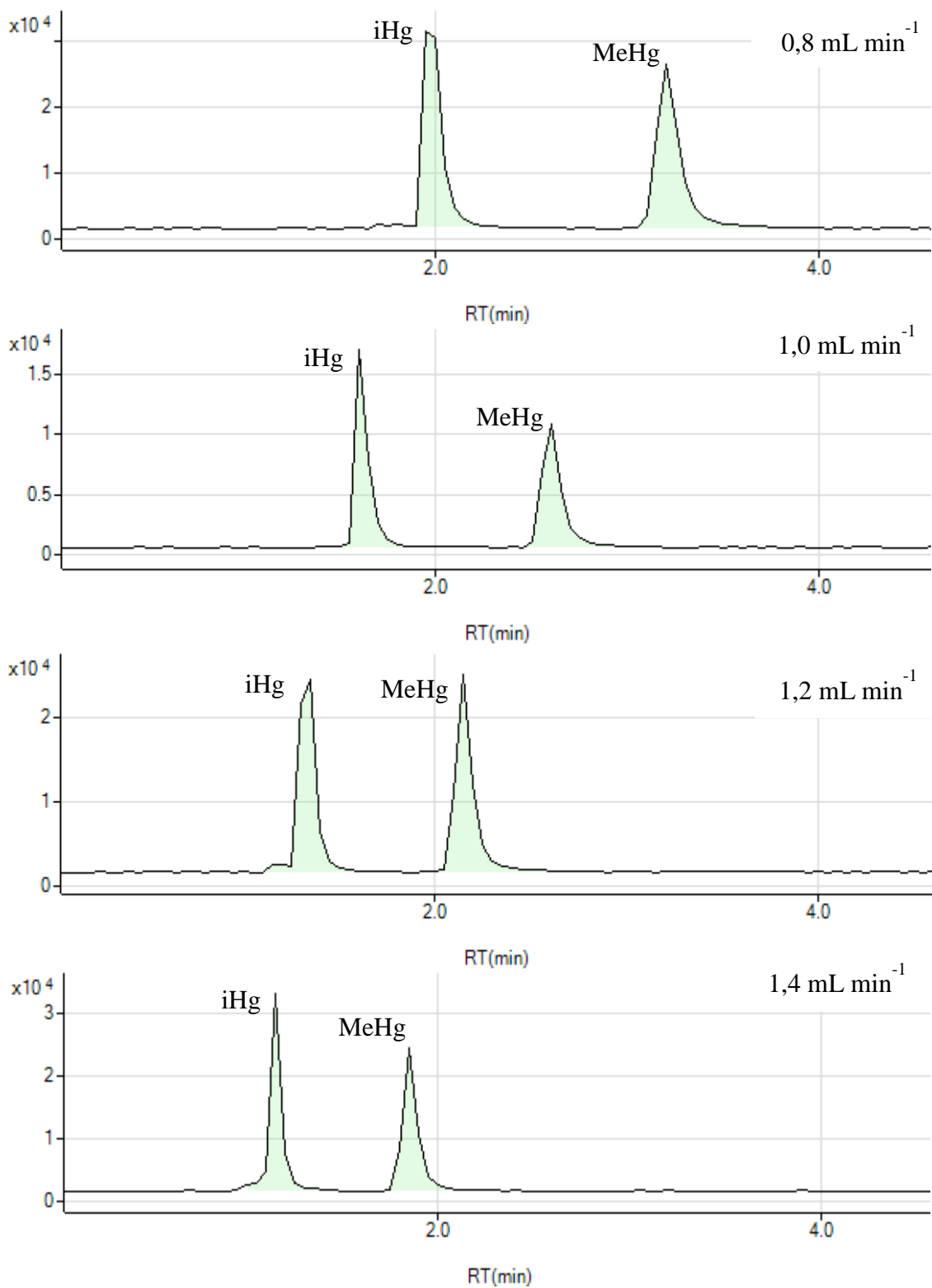


Figura 5: Efeito da vazão da fase móvel nos cromatogramas correspondentes a solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os cromatogramas mostram que o aumento da vazão da fase móvel levou à redução no tempo de retenção dos analitos, sem prejudicar a separação cromatográfica. Isto possibilita reduzir o tempo de análise, e conseqüentemente reduzir o custo operacional. Entretanto, o número de CPS apresentou redução importante em função do aumento da vazão da fase móvel, como pode ser observado na Figura 6.

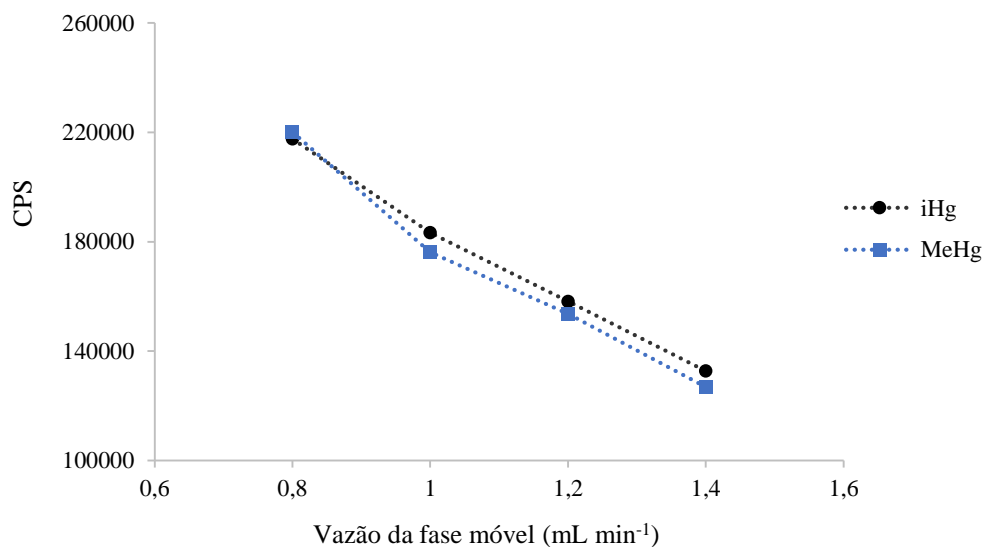


Figura 6: Efeito da vazão de fase móvel no número de CPS para uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

A maior vazão da fase móvel provoca diluição do analito no eluato e conseqüente redução do sinal analítico. Dessa forma, foi estabelecida uma condição de compromisso considerando a sensibilidade e o tempo de retenção dos analitos e, portanto, foi selecionada a vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

5.1.6 Volume de injeção

Foram avaliados volumes de injeção variando entre 25 e $100 \mu\text{L}$. O número de CPS observadas em cada condição é mostrado na Figura 7.

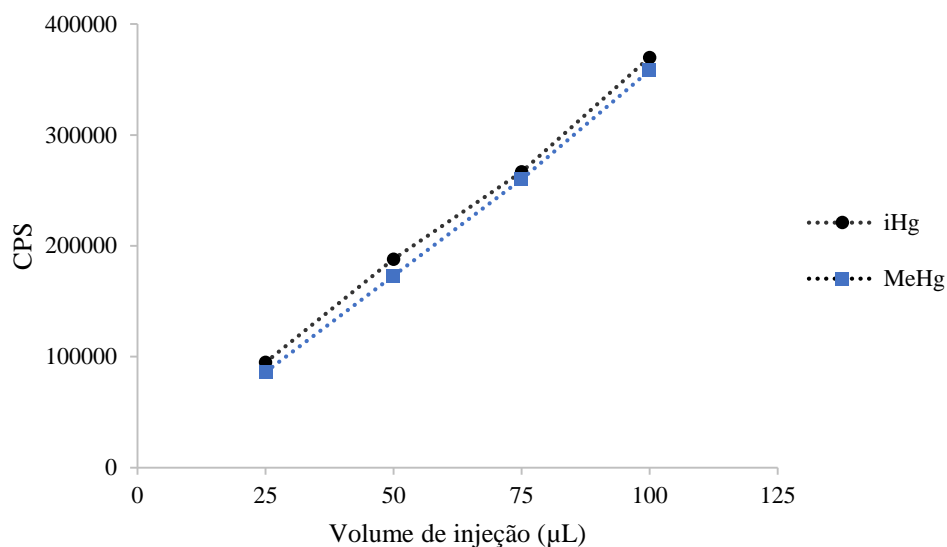


Figura 7: Efeito do volume de injeção no número de CPS para uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

O número de CPS aumentou com o incremento do volume de injeção, pois uma maior quantidade de analito é injetada no sistema. Para volumes de injeção de $75 \mu\text{L}$ e principalmente $100 \mu\text{L}$, entretanto, o formato dos picos mostrou sinais de alargamento e formação de cauda. Por este motivo, e apesar de não ser a condição de maior sinal analítico, o volume de $50 \mu\text{L}$ foi selecionado para a continuação do trabalho. Esta condição foi escolhida também para preservar a vida útil da coluna cromatográfica, bem como evitar efeitos de memória. Considerou-se também a posterior análise de soluções com concentrações maiores dos analitos, podendo ocorrer saturação do detector. Na Figura 8 são apresentados os cromatogramas obtidos para diferentes volumes de injeção.

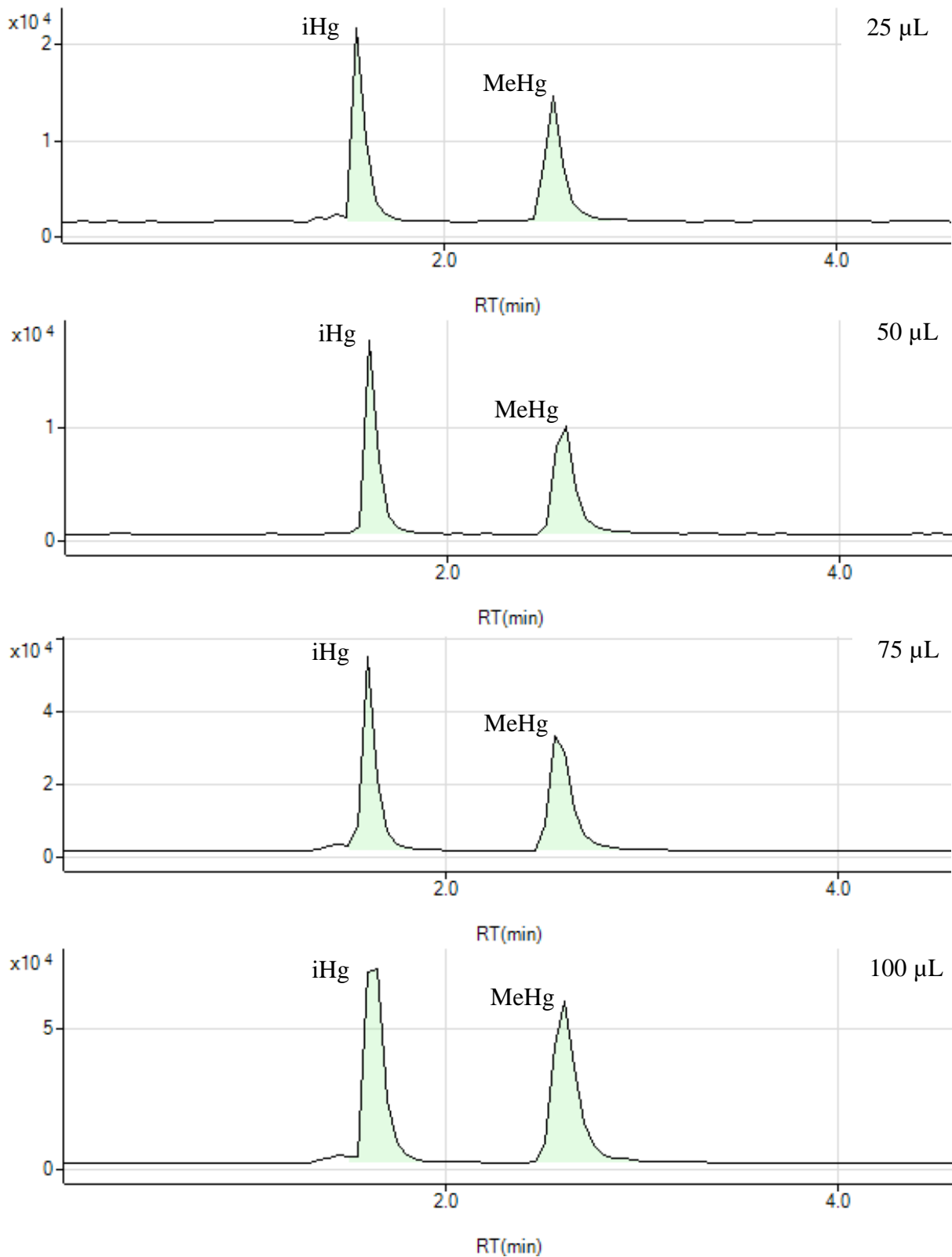


Figura 8: Efeito do volume de injeção nos cromatogramas correspondentes a uma solução com MeHg e iHg na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.1.7 Concentração da fase móvel

O último parâmetro avaliado foi a concentração da fase móvel. A composição da fase móvel foi extensivamente discutida em estudos anteriores^{104,124} e definiu-se a condição estabelecida pelo método da FDA¹²⁴ como ponto de partida. Desta forma, foram avaliadas concentrações em torno do valor de 0,10% (m v⁻¹) de L-cisteína + 0,10% (m v⁻¹) de L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada. Foram avaliadas concentrações variando de 0,08% a 0,11% (m v⁻¹).

Na faixa de concentração avaliada houve pouca variação no número de CPS e nos tempos de retenção. A separação dos picos no cromatograma tampouco foi afetada. Desta forma optou-se pela fase móvel 0,10% (m v⁻¹) de L-cisteína + 0,10% (m v⁻¹) L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada, a mesma condição adotada no método proposto pela FDA.¹²⁴

Um resumo das condições operacionais otimizadas definidas para a validação do método e a comparação com aquelas definidas no método da FDA são apresentados na Tabela 7. A otimização dos parâmetros instrumentais permitiu a redução do tempo de aquisição de 5 min para 4 min, resultando em aumento da frequência analítica, e consequentemente um menor consumo de argônio por amostra, o que leva a uma redução no custo operacional.

Tabela 7. Resumo das condições otimizadas e do método de referência da FDA para especificação de Hg em pescado.

Parâmetro	Presente trabalho	FDA ¹²⁴
Vazão do gás nebulizador	1,10 L min ⁻¹	1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de <i>make up</i>	0,10 L min ⁻¹	Não utiliza
Gás de colisão	Hélio – 3,0 mL min ⁻¹	Não utiliza
Tempo de integração	1,5 s	1 s
Tempo de aquisição	4 min	5 min

5.2 Validação do método

5.2.1 Linearidade

Foram elaboradas seis réplicas da curva de calibração, englobando 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio inorgânico e metilmercúrio. Os valores de CPS obtidos para as leituras de cada nível de concentração e para cada analito são apresentados no Anexo A. Foi empregado o teste estatístico de Grubbs para avaliação da presença de valores discrepantes (*outliers*). Os valores discrepantes estão apresentados em itálico na tabela, e não foram utilizados nos cálculos posteriores.

Foi avaliada a homoscedasticidade (homogeneidade das variâncias) dos resíduos das curvas de calibração empregando o teste estatístico de Levene. Para um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) assumiu-se, como hipótese nula, que as variâncias dos resíduos eram equivalentes. A hipótese alternativa era de que pelo menos uma variância é diferente. Foram calculados os p-valores para ambos os analitos, os quais foram inferiores a 0,05 (para iHg $p = 0,014$ e para MeHg $p = 3,72 \times 10^{-8}$) e desta forma rejeitou-se a hipótese nula. A hipótese alternativa, de que pelo menos uma das variâncias dos resíduos das curvas de calibração eram estatisticamente diferentes, foi considerada. Desta forma foi necessário ajustar a reta de calibração pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), pois o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) não é, neste caso, adequado para modelar matematicamente os dados.

Para o ajuste através do MMQP utiliza-se um fator de ponderação ou normalização (k_{norm}), ou também denominado peso. Utilizou-se como fator de ponderação o inverso do quadrado da concentração ($1/x^2$, sendo x a concentração) para calcular os parâmetros ponderados da curva de calibração (coeficiente linear, coeficiente angular, resíduos e coeficiente de determinação).

A avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos foi realizada para avaliar se o fator de ponderação utilizado é adequado, e para isto foi aplicado o teste estatístico de Anderson-Darling. Assume-se que os resíduos da curva de calibração possuem uma distribuição normal, como hipótese nula. Na Figura 9 podemos observar que os gráficos de probabilidade normal para os resíduos padronizados (considerando o fator de ponderação $1/x^2$), apresentados nas Figuras 9 (a) e 9 (b), mostram que para ambos os analitos os resíduos da curva possuem distribuição normal. Nesta condição os p-valores calculados foram $p = 0,783$ para iHg – curva (a); e $p = 0,744$ para MeHg – curva

(b). Como ambos eram maiores que 0,05, pode-se aceitar a hipótese nula. Para comparação, na mesma figura são apresentados os gráficos equivalentes para os resíduos das curvas de calibração não ponderadas (curva (c) para iHg e (d) para MeHg). A avaliação visual do gráfico já antecipa que o teste estatístico de Anderson-Darling não é atendido, o que se confirma pelos p-valores inferiores a 0,05. Neste caso, rejeita-se a hipótese nula e considera-se a hipótese alternativa de que os resíduos não possuem distribuição normal quando o MMQO é utilizado.

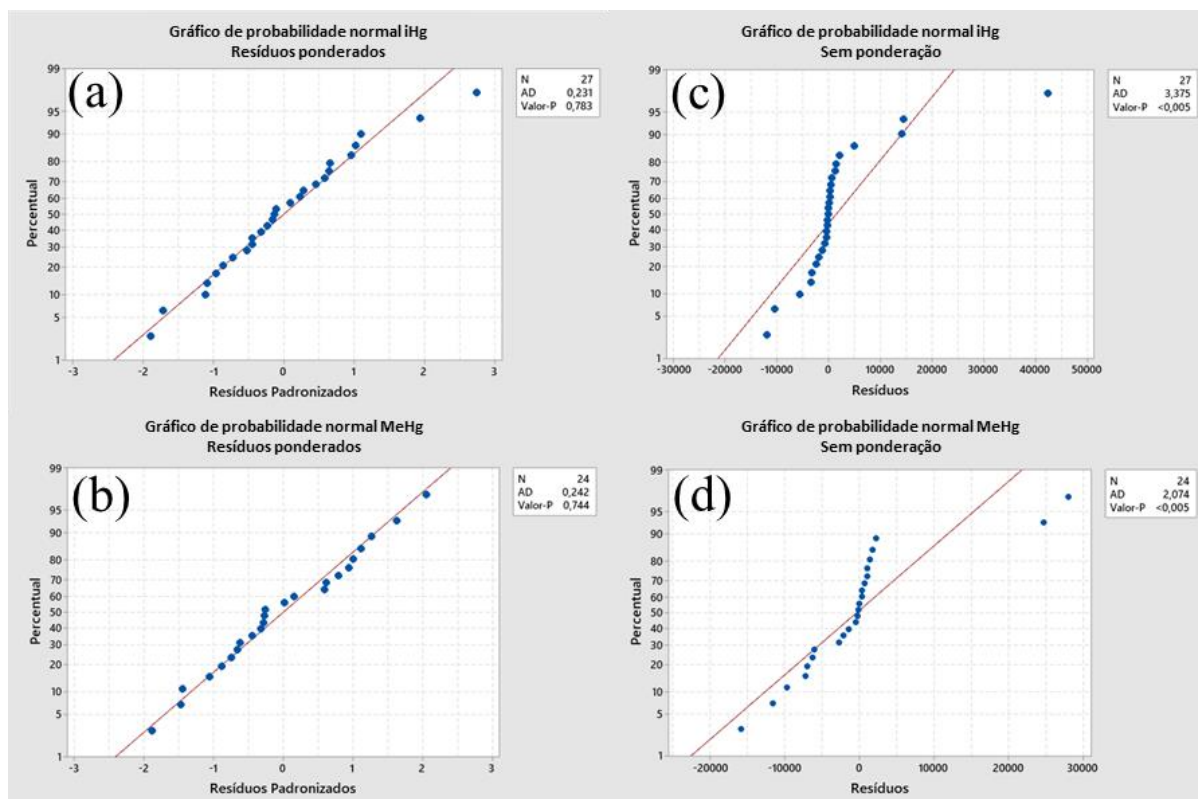


Figura 9: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos das curvas de calibração ponderadas conforme o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) utilizando o fator de ponderação $1/x^2$ para iHg (a) e MeHg (b); e das curvas de calibração não ponderadas usando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) para iHg (c) e MeHg (d).

A independência dos resíduos foi avaliada empregando o teste estatístico de Durbin-Watson (D). O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA estabelece que os resíduos serão considerados independentes quando o valor calculado $D \geq 1,5$.¹³ Para ambos os analitos os resíduos padronizados foram considerados independentes: para mercúrio inorgânico o D calculado foi 2,18 e para metilmercúrio o resultado para D foi 2,02.

As equações de regressão linear ponderada e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) são apresentados na Figura 10 para mercúrio inorgânico e Figura 11 para metilmercúrio. Para os dois analitos o coeficiente de determinação foi igual a 1, os quais estão de acordo com os critérios adotados pelo MAPA,¹³ que estabelecem que $R^2 \geq 0,995$.

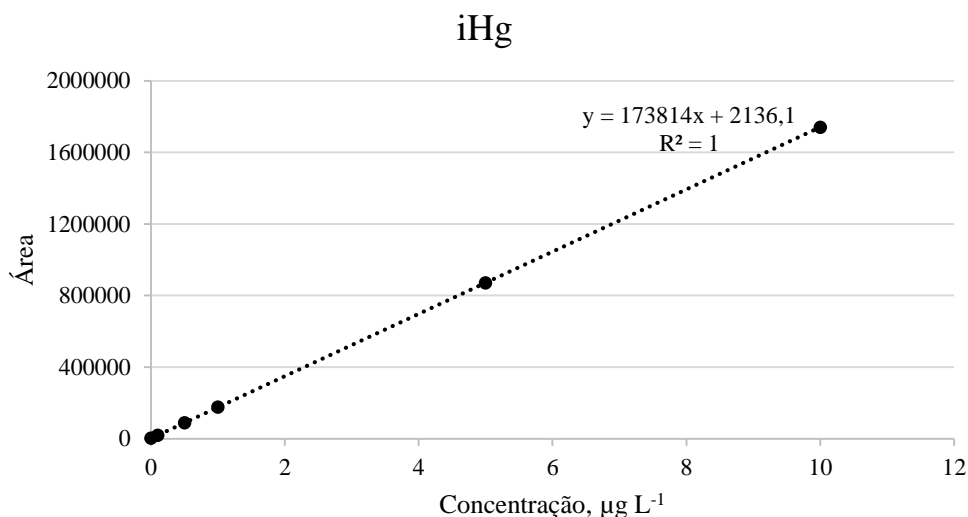


Figura 10: Curva de regressão linear ponderada para mercúrio inorgânico, empregando fator de ponderação $1/x^2$.

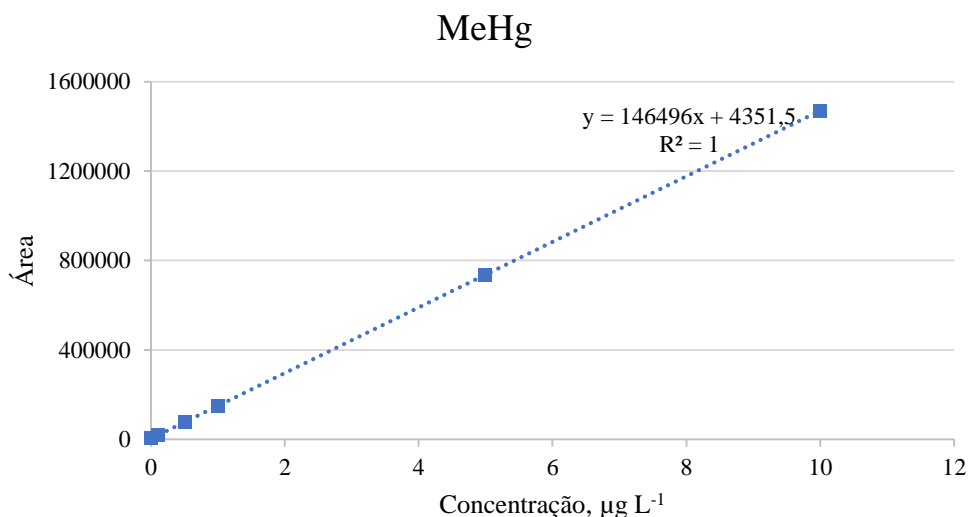


Figura 11: Curva de regressão linear ponderada para metilmercúrio, empregando fator de ponderação $1/x^2$.

5.2.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD foi calculado de acordo com a Equação 1, considerando-se o sinal analítico correspondente ao primeiro ponto da curva de calibração ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$), pois o branco analítico produziu sinal indistinguível do ruído para ambos os analitos. O LQ teórico do método foi calculado de acordo com a Equação 2, também considerando-se o ponto de menor concentração da curva de calibração. Este limite, após determinado, serviu como subsídio para estabelecer o LQ do método, que deve ser confirmado através da fortificação de amostra branca nesta respectiva concentração, na validação do método.

A Tabela 8 apresenta as áreas dos picos cromatográficos correspondentes ao primeiro ponto da curva de calibração, de concentração $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio inorgânico e metilmercúrio. Os limites de detecção na amostra (em unidade $\mu\text{g kg}^{-1}$) consideram a massa de 0,5 g de amostra e o volume final de 50 mL, resultando em um fator de diluição igual a 100.

Tabela 8. Área dos picos cromatográficos correspondentes ao primeiro ponto da curva de calibração ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para soluções (em unidade $\mu\text{g L}^{-1}$) e amostras (em unidade $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Replicata	Área Integrada	
	iHg	MeHg
1	19161	18274
2	20078	19930
3	19421	18410
4	19125	20964
5	19608	17610
6	19725	18855
Desvio-padrão	362	1229
Coefficiente angular	173814	146495
Fator de Diluição	100	100
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,007	0,028
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,021	0,084
LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,69	2,77
LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	2,08	8,39

Os valores calculados para o LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para ambos os analitos são inferiores ao limite de validação proposto para o método, informado na Tabela 6. Desta forma, a curva de calibração é adequada para quantificação na faixa determinada. O LD obtido também atende ao critério adotado pelo MAPA, uma vez que deve ser menor que 1/10 do TMC. O LQ do MeHg determinado pelo presente método foi mais baixo em relação ao apresentado pela metodologia de referência do FDA,¹²⁴ que é $28 \mu\text{g kg}^{-1}$. O método da FDA não apresenta o LQ para a espécie iHg.

5.2.3 Precisão e exatidão: recuperação, repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial e análise de MRCs

Os testes para avaliar a precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e a exatidão (recuperação) foram conduzidos em seis vias através da análise de uma amostra de pescado *in natura* com concentração baixa de Hg, denominada amostra branca, fortificada em dois níveis de concentração, correspondentes ao LQ e ao TMC apresentados na Tabela 6.

A fortificação no nível do LQ foi executada adicionando à matriz branca *in natura* uma alíquota de 500 μL de uma solução contendo metilmercúrio e mercúrio inorgânico, ambos à concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a fortificação no nível no TMC foi tomada uma alíquota de 500 μL de uma solução contendo $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de metilmercúrio e de mercúrio inorgânico. A fortificação foi realizada após a pesagem das amostras, antes da etapa de extração.

As recuperações foram determinadas descontando as concentrações de metilmercúrio e mercúrio inorgânico medidas na amostra branca não fortificada. A repetitividade foi avaliada comparando o desvio-padrão relativo (DPR_r) obtido no experimento com os valores calculados para o desvio-padrão relativo teórico ($\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$) para cada nível de concentração utilizando a Equação 3 e com o valor de HORRAT_r em condições de repetitividade (Equação 4).

$$\text{RSD}_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{HORRAT}_r = \frac{\text{DPR}_r}{\text{PDPR}_R} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

C é a concentração em $\mu\text{g kg}^{-1} \times 10^{-9}$;

$$\text{PDPR}_R (\text{desvio-padrão relativo predito}) = 2 \times C^{-0,15}.$$

A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada repetindo-se o experimento em outros dois dias, totalizando 3 lotes analisados. Buscando avaliar a influência de oscilações nas condições de análise, no terceiro lote analisado um segundo analista foi responsável pela execução dos experimentos. Igualmente foram comparados os valores do desvio-padrão relativo (DPR_R) com os valores de $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ e HORRAT_R , calculados em condições de reprodutibilidade – indicadas pelo sub-índice em letra maiúscula.

A Tabela 9 e a Tabela 10 apresentam os resultados obtidos para concentrações medidas da amostra branca e fortificações nos 3 dias do estudo, as respectivas recuperações médias, desvios-padrão relativos em condições de repetitividade (RSD_r) e de reprodutibilidade intralaboratorial (RSD_R), e os valores de HORRAT_r e HORRAT_R , para os dois níveis de fortificação, para mercúrio inorgânico e metilmercúrio, respectivamente.

Tabela 9. Resultados de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para amostra fortificada, para mercúrio inorgânico.

Replicata	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de iHg			1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de iHg			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
1	11,6	10,5	9,1	1042	995	991	
2	11,2	10,4	9,2	1013	972	1025	
3	11,1	11,8	9,8	1065	959	949	
4	13,1	10,3	10,2	1020	995	968	
5	11,3	10,6	9,4	1052	962	1022	
6	11,4	10,1	9,4	1084	994	1025	
Repetitividade	Concentração média no branco, n = 6 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1,7	1,1	0,0	1,7	1,1	0,0
	Concentração Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	11,6	10,6	9,5	1046	980	997
	Recuperação Média (%)	99,2	94,5	94,3	104,7	98,1	99,5
	Desvio padrão	0,75	0,59	0,42	27,05	17,1	32,6
	RSD _r	6,4%	5,6%	4,4%	2,6%	1,7%	3,3%
	$\frac{2}{3}$ RSD _{Horwitz}		21,3			10,7	
	HORRAT _r	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002
Reprodutibilidade Intralaboratorial	Concentração Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		9,6		1006		
	Recuperação Média (%)		96,0		100,8		
	Desvio padrão		1,05		38,1		
	RSD _R		10,9%		3,8%		
	RSD _{Horwitz}		32,0		16,0		
	PDPR _R		31,7		15,9		
	HORRAT _R		0,003		0,002		

Tabela 10. Resultados de recuperação, repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para amostra fortificada, para metilmercúrio.

Replicata	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de MeHg			1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de MeHg			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
1	9,9	9,6	10,3	1042	1002	982	
2	10,6	10,0	10,9	1021	972	1013	
3	10,7	9,5	10,4	1085	957	935	
4	10,2	9,3	10,4	1041	1001	961	
5	10,2	9,3	10,3	1063	965	1009	
6	10,2	9,3	11,0	1083	997	1016	
Repetitividade	Concentração média no branco, n = 6 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,5	0,2	0,4	0,5	0,2	0,4
	Concentração Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10,3	9,5	10,6	1056	982	986
	Recuperação Média (%)	98,5	91,7	100,7	105,8	98,5	98,4
	Desvio padrão	0,31	0,28	0,29	25,4	20,2	32,7
	RSD _r	3,0%	3,0%	2,8%	2,4%	2,1%	3,3%
	$\frac{2}{3}$ RSD _{Horwitz}		21,3		10,7		
	HORRAT _r	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
Reprodutibilidade Intralaboratorial	Concentração Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	9,7			1008		
	Recuperação Média (%)	97,3			100,8		
	Desvio padrão	0,54			42,9		
	RSD _R	5,6%			4,3%		
	RSD _{Horwitz}	32,0			16,0		
	PDPR _R	31,7			15,9		
HORRAT _R	0,002			0,003			

Os critérios de aceitação da precisão são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Critérios de aceitação para avaliação da precisão e recuperação.

Precisão	
Repetitividade	
Parâmetro	Critério ¹³
RSD _r	< 2/3 RSD _{Horwitz}
HORRAT _r	< 1
Reprodutibilidade Intralaboratorial	
Parâmetro	Critério ¹³
RSD _R	< RSD _{Horwitz}
HORRAT _R	< 1
Recuperação	
Concentração	Critério ¹³⁵
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50% a 120%
$1 \mu\text{g kg}^{-1} < C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70% a 120%
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	80% a 120%

Como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10, os resultados obtidos para repetitividade, reprodutibilidade intralaboratorial e recuperação atendem aos critérios de aceitação citados na Tabela 11 para ambos os analitos nas duas concentrações avaliadas.

A exatidão do método otimizado também foi avaliada através da análise de MRCs, cujos resultados podem ser observados na Tabela 12. Os critérios de aceitação da recuperação na análise dos MRCs são os mesmos mostrados na Tabela 11. Além das médias das medições (\bar{x}), também são considerados os desvios-padrão das medições realizadas na comparação com o valor tido como verdadeiro. Para isso, deve-se calcular a incerteza do processo de medição (expressa pelo seu desvio-padrão), σ_D , conforme a Equação 5:

$$\sigma_D = \sqrt{\sigma_L^2 + \frac{s^2}{n}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

σ_L é a incerteza da concentração do analito no MRC informada;

n é o número de replicatas;

s é o desvio-padrão das medidas.

O critério para aceitação da exatidão empregando MRC é:

$$|\bar{x}-\mu| \leq 2 \sigma_D$$

Onde μ é o valor certificado do analito no MRC.¹³

Tabela 12. Resultados da análise dos MRCs com concentração certificada para metilmercúrio. Os resultados, expressos em mg kg^{-1} , são a média e o desvio padrão de 3 replicatas.

MRC	ERM-CE-464	NRC-DORM-4
Analito	MeHg	MeHg
Valor certificado (μ)	5,5	0,355
Incerteza relativa ao MRC (σ_L)	0,17	0,028
Valor médio encontrado (\bar{x})	5,3	0,338
Recuperação (%)	95,06	95,15
Erro Relativo (%)	-4,94	-4,85
$ \bar{x}-\mu $	0,27	0,017
s	0,109	0,007
s^2/n	0,004	0,00002
σ_D	0,181	0,028
$2 \sigma_D$	0,363	0,057

Pode-se verificar, nas Tabelas 11 e 12, que ambos os critérios para aceitação da exatidão e precisão na análise dos MRCs foram aprovados, uma vez que tanto a recuperação como o desvio-padrão das medidas foram adequados.

Foi analisado também o MRC NRC-TORT-2, mas, devido à limitada quantidade do material de referência, apenas uma replicata pôde ser analisada. Foi encontrada a concentração de $0,162 \text{ mg kg}^{-1}$ de metilmercúrio. Comparando-se com o valor certificado para este analito ($0,152 \pm 0,013 \text{ mg kg}^{-1}$) é possível calcular uma recuperação de 106,3%, que atende ao critério de aceitação do MAPA.

5.2.4 Seletividade e efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada através da comparação entre as concentrações obtidas através de processamento da matriz branca fortificada (amostra matrizada), em que se utilizam os mesmos resultados obtidos no ensaio de precisão (Tabela 9 e Tabela 10), e as concentrações do analito puro em solvente (amostra não matrizada), submetidos ao procedimento analítico do método. Os resultados desta comparação estão descritos na Tabela 13. Foram executadas seis vias em cada nível de concentração, 10 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A tabela mostra os resultados de concentração obtidos para o analito em solvente (L-cisteína hidrocloreídrica monohidratada 1% (m v⁻¹) – amostra não matrizada) e os resultados da comparação com as amostras matrizadas, apresentados anteriormente.

Tabela 13. Resultados das concentrações dos analitos em amostras não matrizadas e média das amostras matrizadas. Comparação entre as médias e avaliação do estudo do efeito de matriz.

Replicatas	iHg		MeHg	
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$
1	10,6	996,8	10,7	952,7
2	10,5	994,3	10,9	951,5
3	10,8	991,9	10,5	961,3
4	10,6	995,9	10,8	960,3
5	10,4	990,6	10,9	952,6
6	10,7	992,7	10,5	952,4
Média amostra não matrizada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,6	993,7	10,7	955,1
Média amostra matrizada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	9,6	1006,3	9,7	1007,5
Erro Relativo	9,7%	1,3%	9,8%	5,2%

O critério de aceitação para o efeito de matriz adotado pelo MAPA¹³ estabelece que a variação máxima, expressa como o erro relativo percentual, permitida entre as médias das amostras brancas fortificadas e das amostras não matrizadas não deve ser superior a 10% em módulo para cada nível. A avaliação da Tabela 13 permite concluir que o critério foi satisfeito, pois o erro relativo foi inferior a 10% para todas as condições

avaliadas. Desta forma, pode-se concluir que a curva de calibração preparada em solvente (curva não matrizada) é adequada para quantificação dos analitos.

5.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método foi empregado o teste de Youden. Foram selecionados 7 fatores, descritos na Tabela 14, correspondentes a possíveis alterações da rotina analítica. Os testes foram feitos em duplicata e em ordem aleatória, fortificando a mesma amostra branca empregada nos testes de precisão e exatidão na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondente ao TMC.

Tabela 14. Fatores avaliados no teste de Youden, respectivos valores nominais e variações empregadas no estudo de robustez.

Fator	Nominal	Variação
Massa de amostra	A 0,50 g	a 0,45 g
Agitação durante a extração	B 2 vezes (início e metade do tempo)	b 3 vezes (início, metade e final do tempo)
Volume de solução de extração	C 50 mL	c 45 mL
Recipiente da amostra na extração	D <i>Vial</i> de vidro âmbar	d Frasco de polipropileno envolto com alumínio
Tempo de aquecimento	E 120 min	e 135 min
Temperatura do forno	F 60 °C	f 55 °C
<i>Vial</i>	G Vidro âmbar	g Vidro comum

Foram preparadas 8 amostras em duplicata, totalizando 16 experimentos, com as combinações entre fatores em valores nominais (letra maiúscula) e variações (letra minúscula) como mostrado na Tabela 15.

Tabela 15. Combinações de variações nos ensaios do teste de Youden.

Fator	Combinação para os ensaios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A / a	A	A	A	A	a	a	a	a
B / b	B	B	b	b	B	B	b	b
C / c	C	c	C	c	C	c	C	c
D / d	D	D	d	d	d	d	D	D
E / e	E	e	E	e	e	E	e	E
F / f	F	f	f	F	F	f	f	F
G / g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado observado (média das 2 replicatas)	S	T	U	V	W	X	Y	Z

O efeito da variação de cada fator é determinado através da Equação 6, em que foram somados os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e subtraídos os valores correspondentes às letras minúsculas. Os efeitos calculados são plotados em um gráfico de barras (Figura 12). O exemplo (Equação 6) mostra o cálculo para o efeito D/d:

$$Efeito \frac{D}{d} = \left(\frac{S+T+Y+Z}{4} \right) - \left(\frac{U+V+W+X}{4} \right) \quad \text{Equação 6}$$

A variância global do conjunto de todos os efeitos é calculada através da Equação 7.

$$S^2 = \frac{\nu_1 s_1^2 + \nu_2 s_2^2 + \nu_3 s_3^2 + \nu_4 s_4^2 + \nu_5 s_5^2 + \nu_6 s_6^2 + \nu_7 s_7^2 + \nu_8 s_8^2}{\nu_1 + \nu_2 + \nu_3 + \nu_4 + \nu_5 + \nu_6 + \nu_7 + \nu_8} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

s_i^2 é a estimativa da variância do i-ésimo ensaio;

$\nu_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 .

Calcula-se então o erro padrão do conjunto de efeitos através da Equação 8.

$$Erro = \frac{\sqrt{S^2}}{2} \quad \text{Equação 8}$$

O erro padrão máximo, que delimita a linha de significância traçada no gráfico dos efeitos, é calculado multiplicando o erro padrão (calculado através da Equação 8) por 2,306, que é o valor do t de *Student* para 8 graus de liberdade com 95% de confiança realizados em duplicata.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos nas combinações avaliadas no teste de Youden. São apresentadas as médias dos resultados das duas replicatas, bem como as respectivas variâncias, a variância global calculada por meio da Equação 7, e o erro padrão, calculado através da Equação 8, para ambos os analitos.

Tabela 16. Resultados do teste de Youden apurados no estudo de robustez, para duas replicatas.

Resultado Observado	iHg		MeHg	
	Conc. Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Variância	Conc. Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Variância
S	952	648	960	882
T	1021	8712	1025	9800
U	1051	5	1062	8
V	1018	7938	1025	8844
W	1049	200	1059	242
X	1002	6050	1007	6050
Y	1017	2312	1024	2245
Z	984	722	989	648
Variância global	3323,3		3589,9	
Erro padrão	28,82		29,96	
Erro padrão x 2,306	66,47		69,08	

A Figura 12 mostra os gráficos elaborados plotando-se os valores dos efeitos calculados para cada fator, segundo a Equação 6, e a linha de significância que indica a variação máxima aceitável para que se considere que o fator não afeta significativamente o resultado analítico, traçada a partir da multiplicação do resultado da Equação 8 pelo valor t de *Student* (2,306; gl = 8, $\alpha = 0,05$). É possível verificar que os valores individuais dos efeitos são inferiores ao erro padrão máximo para todos os efeitos. Isto indica que o método é robusto, não sendo afetado por alterações nos valores nominais nas condições avaliadas.

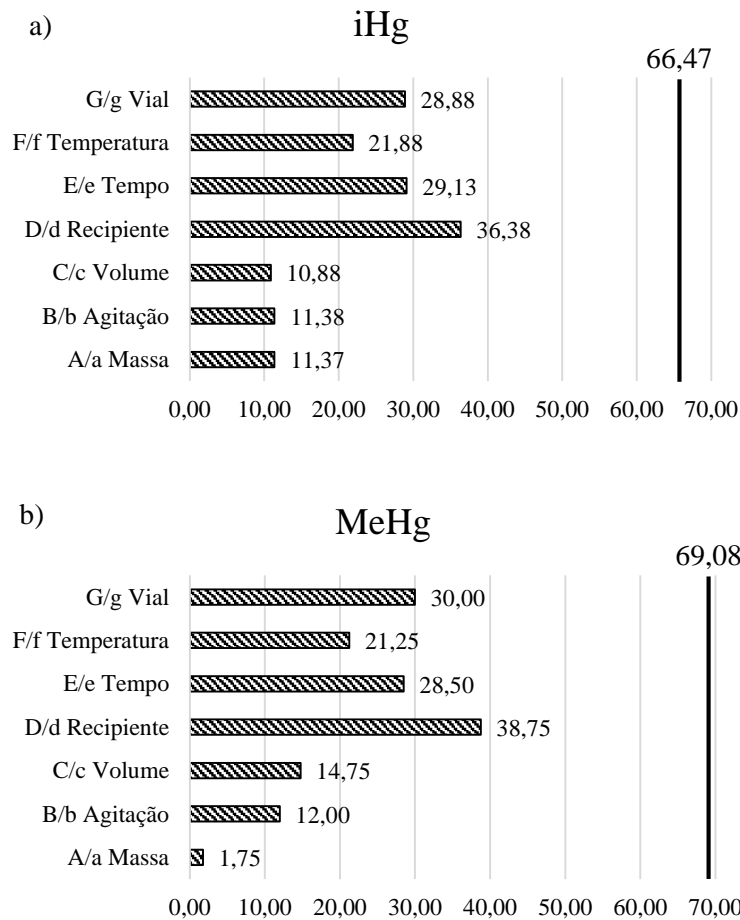


Figura 12: Valores dos efeitos de cada fator na avaliação da robustez. A linha vertical (linha de significância) indica o limite máximo de variação aceitável para iHg (a) e MeHg (b).

O desvio-padrão dos efeitos (s_{Di}) foi calculado através da Equação 9:

$$s_{Di} = \sqrt{2 \times \sum \frac{D_i^2}{7}} \quad \text{Equação 9}$$

Onde D_i é o valor do efeito, calculado de acordo com a Equação 6.

Para o conjunto de fatores analisado o valor de s_{Di} deve ser inferior ao desvio-padrão obtido em condições de reprodutibilidade (RSD_R). A Tabela 17 apresenta os desvios-padrão calculados através da Equação 9, bem como os resultados de RSD_R , apresentados nas Tabelas 9 e 10. O desvio-padrão dos efeitos foi inferior ao desvio-padrão calculado para os experimentos realizados em condições de reprodutibilidade, portanto pode-se concluir que o conjunto de fatores não influencia o resultado, e o método como um todo é robusto.

Tabela 17. Desvio-padrão dos efeitos avaliados no teste de Youden e desvio-padrão em condições de reprodutibilidade.

	iHg	MeHg
S_{Di}	33,21	33,93
RSD_R	37,64	42,91

Foram avaliadas também as médias e variâncias dos valores obtidos para letras maiúsculas e minúsculas, através do teste t e do teste F, para verificar se existiam diferenças significativas entre os grupos, considerando 95% de confiança. A Tabela 18 mostra a comparação entre as condições nominais (letra maiúscula) e as variações (letra minúscula).

Tabela 18. Comparação estatística dos resultados obtidos no teste de Youden para condição nominal (letra maiúscula) e variação (letra minúscula). Os valores de $F_{crítico}$ e $t_{crítico}$ são 15,44 e 3,18, respectivamente.

	A	a	B	b	C	c	D	d
Concentração	960	1059	960	1062	960	1025	960	1062
	1025	1007	1025	1025	1062	1025	1025	1025
	1062	1024	1059	1024	1059	1007	1024	1059
	1025	989	1007	989	1024	989	989	1007
Média	1018	1020	1013	1025	1026	1011	999	1038
Variância	1797	888	1702	889	2249	293	966	720
F calculado	2,02		1,91		7,69		1,34	
t calculado	0,07		0,47		0,59		1,89	
	E	e	F	f	G	g		
Concentração	960	1025	960	1025	960	1025		
	1062	1025	1025	1062	1025	1062		
	1007	1059	1059	1007	1007	1059		
	989	1024	989	1024	1024	989		
Média	1005	1033	1008	1029	1004	1034		
Variância	1844	301	1846	540	915	1172		
F calculado	6,13		3,42		1,28			
t calculado	1,23		0,87		1,31			

Para o conjunto de dados avaliados, considerando-se o número de graus de liberdade (GL) igual a 3, pode-se afirmar que as variâncias das condições são estatisticamente equivalentes, com 95% de confiança, pois para todas as condições o valor de F calculado foi inferior ao F crítico (15,44, distribuição bicaudal, $\alpha = 0,05$, $GL_1 = GL_2 = 3$). Adicionalmente, pode-se afirmar, através do teste t, que as médias dos resultados nas condições comparadas podem ser consideradas equivalentes, com 95% de confiança, pois os valores calculados de t são inferiores ao t crítico (3,18, $GL = 3$, $\alpha = 0,05$). Todas estas avaliações demonstram que o método otimizado é robusto frente às condições avaliadas, e que tanto alterações individuais dos fatores, como oscilações no conjunto completo de fatores como um todo não influenciam significativamente o resultado.

5.2.6 Incerteza de Medição

A incerteza de medição foi estimada considerando os procedimentos adotados pelo MAPA¹³ e pelo Guia EURACHEM¹²² para determinação da incerteza.

O mensurando (a concentração do analito) é determinado através da Equação 10, que relaciona as grandezas medidas.

$$C (\mu g kg^{-1}) = \frac{L \times V}{m} + C_{r\&R} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

L é a concentração do analito prevista pela curva de calibração, em $\mu g L^{-1}$;

V é o volume de diluição da amostra, em mL;

m é a massa da amostra, em g;

$C_{r\&R}$ é o componente de incerteza oriundo da repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial.

Para cada componente da Equação 10 foram elencadas as fontes de incerteza que podem contribuir para que ocorra algum desvio do valor medido em relação ao valor considerado verdadeiro. Cada fonte teve sua contribuição estimada e os valores foram combinados para compor a incerteza de cada componente. Foram consideradas:

- I. Massa
 - a. Erro máximo admissível da balança, determinado de acordo com a classe de balança utilizada e a faixa de pesagem;
 - b. Efeito da resolução da balança, resultante da incerteza na última casa decimal mostrada no visor;
 - c. Erro de excentricidade da balança, de acordo com o certificado de calibração.
- II. Volume
 - a. Erro médio do volume dispensado pelo dispensador, obtido através da diferença entre o volume dispensado e o volume ajustado (nominal);
 - b. Efeito da variação da temperatura, levando em consideração a dilatação volumétrica do líquido e uma variação de $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
 - c. Repetibilidade do volume dispensado pelo dispensador, correspondente ao desvio-padrão de um grande número de medidas ($n = 30$).
- III. Leitura
 - a. Variações aleatórias na medição da resposta instrumental (y);
 - b. Alteração sistemática das concentrações (x) e respostas instrumentais (y) decorrentes de diluições sucessivas de uma solução concentrada;
 - c. Efeitos aleatórios resultando em erro nos valores de referência da curva de calibração (x);
 - d. Desvios provenientes de uma correlação imperfeita.

Obs: Considerando uma curva caracterizada pela equação $y = a + bx$:

IV. R&r

Este componente corresponde à incerteza oriunda da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. São englobados todos os fatores que podem ser alterados durante a execução rotineira do método, considerando-se a medição do analito em um número significativo de replicatas. Neste trabalho o analista e os dias da análise foram variados e a incerteza foi calculada considerando-se o desvio-padrão de todas as medições.

Os coeficientes de sensibilidade para cada componente foram calculados e as incertezas padrão dos componentes individuais foram combinadas. A incerteza padrão expandida foi calculada empregando um fator de abrangência k igual a 2, que corresponde a uma probabilidade de 95,5% de o valor verdadeiro da medição estar compreendido no intervalo especificado. As planilhas completas detalhando os cálculos da incerteza estão disponíveis no Anexo B. Os valores de incerteza estimados para cada um dos analitos estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Incerteza estimada do método.

	iHg	MeHg
Incerteza U_{exp} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	37,7	38,9
Incerteza U_{exp} relativa (%)	3,75	3,86

Para que o método analítico seja considerado adequado, o MAPA¹³ estabelece limites máximos para a incerteza padrão, que são calculados através da Equação 11:

$$U_f = \sqrt{\left(\frac{LD}{2}\right)^2 + (\alpha \times C)^2} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

U_f é a incerteza de medição padrão máxima, $\mu\text{g kg}^{-1}$;

LD é o limite de detecção do método, $\mu\text{g kg}^{-1}$;

C é a concentração, $\mu\text{g kg}^{-1}$;

α é um fator numérico adimensional tabelado relacionado à concentração.

Os valores de α utilizados no cálculo da incerteza padrão máxima são informados na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de α , para cada faixa de concentração, a serem utilizados no cálculo da incerteza padrão máxima.

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	α
≤ 50	0,2
51 a 500	0,18
501 a 1000	0,15
1001 a 10000	0,12
> 10000	0,1

Na Tabela 21 são mostrados os valores de incerteza padrão máxima aceitável para cada analito na concentração de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, calculados a partir da Equação 11 e dos dados mostrados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 21. Incerteza padrão máxima aceitável para cada analito.

	iHg	MeHg
LD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,69	2,78
α	0,15	0,15
U_f , $\mu\text{g kg}^{-1}$	150	150

Observando-se os dados apresentados nas Tabelas 19 e 21, pode-se constatar que a incerteza do método é adequada ao uso pretendido, pois as incertezas para ambos os analitos são inferiores ao valor máximo permitido, atendendo aos critérios estabelecidos.

Comparando-se a incerteza do método de referência da FDA¹²⁴, que apresenta o valor de incerteza expandida de 20% (com 95% de confiança), com a incerteza calculada no presente trabalho, verifica-se que esta é inferior, e portanto, o método otimizado apresenta uma melhora neste parâmetro.

5.3 Análise das amostras

5.3.1 Análise de elementos totais

A determinação da concentração total dos elementos investigados foi executada conforme o procedimento descrito no item 4.4.3. Esta análise foi executada para medir a concentração total de mercúrio, através de método oficial, a fim de possibilitar o cálculo da eficiência de extração; bem como para caracterizar as amostras analisadas quanto aos outros contaminantes inorgânicos de interesse, sob o ponto de vista da segurança alimentar. Os resultados são apresentados na Tabela 22 para os MRC, e na Tabela 23 para as amostras.

Tabela 22. Resultado da análise dos MRCs para As, Cd, Pb e Hg (totais). Os resultados (mg kg^{-1}) são a média e desvio padrão ($n = 3$).

Analito	Encontrado		Certificado		Recuperação (%)
NRC-DORM-4					
As	6,23	± 0,25	6,87	± 0,44	90,7
Cd	0,301	± 0,023	0,299	± 0,018	100,8
Hg	0,433	± 0,017	0,412	± 0,036	105,1
Pb	0,392	± 0,030	0,404	± 0,062	97,0
NRC-TORT-2					
As	19,2	± 1,0	21,6	± 1,8	88,8
Cd	27,8	± 1,3	26,7	± 0,6	104,0
Hg	0,30	± 0,02	0,27	± 0,06	110,9
Pb	0,40	± 0,06	0,35	± 0,13	114,7
ERM CE-464					
Hg	5,48	± 0,07	5,24	± 0,10	104,6

A recuperação dos elementos investigados nos MRCs variou de 88,8% a 114,7%, que atende aos critérios de recuperação adotados pelo MAPA, apresentados na Tabela 11.

Tabela 23. Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e desvio padrão (número de replicatas de leitura da amostra no ICP-MS igual a 5) de As, Cd, Pb e Hg (totais) nas amostras. LQ: As: $2,97 \mu\text{g kg}^{-1}$; Cd: $0,29 \mu\text{g kg}^{-1}$; Pb: $5,59 \mu\text{g kg}^{-1}$; Hg: $6,92 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Amostra	As	Cd	Pb	Hg
1	1786 \pm 31	4,22 \pm 0,27	<LQ	86,5 \pm 0,9
2	2953 \pm 18	11,1 \pm 0,4	<LQ	38,2 \pm 0,2
3	1980 \pm 28	105 \pm 6	5,94 \pm 0,29	34,5 \pm 1,8
4	1178 \pm 62	5,83 \pm 0,32	<LQ	179 \pm 36
5	2026 \pm 158	8,41 \pm 0,98	<LQ	174 \pm 16
6	4357 \pm 318	5,48 \pm 0,40	<LQ	476 \pm 102
7	4049 \pm 34	0,50 \pm 0,12	<LQ	88,9 \pm 0,8
8	1725 \pm 18	16,2 \pm 1,9	<LQ	212 \pm 3
9	1420 \pm 68	4,15 \pm 0,45	<LQ	128 \pm 7
10	162 \pm 19	0,66 \pm 0,19	47,5 \pm 7,8	114 \pm 19
11	789 \pm 5	5,38 \pm 0,18	8,92 \pm 0,19	555 \pm 8
12	1070 \pm 84	5,19 \pm 0,58	<LQ	360 \pm 4
13	748 \pm 17	4,41 \pm 0,10	<LQ	221 \pm 5
14	1568 \pm 20	5,58 \pm 0,14	<LQ	387 \pm 6
15	8,65 \pm 1,17	2,07 \pm 0,58	<LQ	425 \pm 55
16	1514 \pm 56	2,70 \pm 0,68	<LQ	358 \pm 74
17	1282 \pm 14	5,99 \pm 0,19	<LQ	451 \pm 29
18	2201 \pm 179	4,65 \pm 0,65	<LQ	155 \pm 27
19	3,80 \pm 0,23	0,78 \pm 0,10	5,65 \pm 0,22	608 \pm 8
20	1712 \pm 164	26,9 \pm 2,6	<LQ	360 \pm 30
21	7077 \pm 630	3,30 \pm 0,17	<LQ	244 \pm 23
22	3690 \pm 27	15,3 \pm 1,4	<LQ	929 \pm 10
23	6917 \pm 613	1,84 \pm 0,09	<LQ	243 \pm 26
24	2822 \pm 66,5	21,9 \pm 0,41	<LQ	1194 \pm 31
25	6944 \pm 78,6	11,9 \pm 1,1	<LQ	1160 \pm 15
26	15918 \pm 996	2,60 \pm 0,08	8,76 \pm 1,40	106 \pm 23
27	207 \pm 20,5	1,63 \pm 0,38	<LQ	1609 \pm 18
28	4843 \pm 81,7	3,33 \pm 0,47	<LQ	102 \pm 8
29	2776 \pm 323	10,4 \pm 2,3	<LQ	33,4 \pm 4,2
30	2613 \pm 279	3,17 \pm 0,74	<LQ	901 \pm 60

Nota: Destacadas as concentrações superiores aos limites máximos estabelecidos pela ANVISA⁷ – As: $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$; Cd: 50 a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ (limite máximo varia de acordo com a espécie); Pb: $300 \mu\text{g kg}^{-1}$; Hg: $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para pescado em geral, $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para espécies predadoras.

Pode-se observar na Tabela 23 que a concentração total média de mercúrio nas amostras variou entre 33,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1609 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A comparação destas concentrações com os limites estabelecidos pela ANVISA,⁷ que determina limites diferentes para pescado de espécies predadoras e não predadoras, é limitada pela falta de informação da espécie de cada amostra. Considerando-se que todas as amostras são provenientes de espécies predadoras, em três delas a concentração de mercúrio está acima do limite máximo permitido, que é 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Por outro lado, considerando-se que as amostras são provenientes de espécies não predadoras, em 7 delas a concentração de mercúrio está acima do limite. A distribuição de concentrações das diferentes espécies de Hg será abordada no decorrer deste capítulo.

Para cádmio também há diferentes limites máximos estabelecidos, de acordo com a espécie de pescado, variando de 50 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, conforme mostra a Tabela 24. Considerando o menor limite, de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, apenas uma das amostras teria concentração de cádmio (105 $\mu\text{g kg}^{-1}$) superior ao limite máximo estabelecido.

Tabela 24. Limites máximos permitidos pela ANVISA para cádmio em pescado.

Espécie de pescado	Limite Máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ⁷
Peixe espada e anchova	300
Peixe melva	200
Peixes bonito, carapeba, enguia, tainha, jurel, imperador, cavala, sardinha, atum e linguado	100
Outros peixes	50

Quanto ao chumbo, cuja concentração limite é 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em todas as amostras a concentração encontrada do elemento foi inferior ao limite máximo permitido.

Já para arsênio, apenas 6 das 30 amostras apresentaram concentração inferior ao limite máximo de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, isto não é alarmante, pois conforme reportado extensivamente,^{87,95,136–138} a maior parte do arsênio presente em pescado está na forma de arsenobetaína, uma espécie não tóxica para os seres humanos. A concentração de arsênio presente nas formas inorgânicas – As (III) e As (V) – que apresentam a maior toxicidade, correspondem a uma pequena fração do arsênio total,¹³⁹ como será demonstrado através da análise de especiação química apresentada no decorrer deste trabalho.

É importante salientar que as amostras selecionadas para este estudo foram escolhidas entre aquelas que já haviam sido analisadas e que tinham concentrações consideráveis de Hg, distribuídas ao longo de uma ampla faixa de valores. Estas amostras foram selecionadas ao longo de 3 anos, de forma que não se pode inferir que os elevados teores de contaminantes apresentados sejam equivalentes a uma amostragem aleatória. Pelo contrário, buscou-se selecionar amostras com um grau de contaminação apreciável. Os relatórios que apresentam os resultados do PNCRC, publicados anualmente, mostram que o percentual de amostras com concentração de Hg acima dos limites máximos permitidos é baixo, geralmente inferior a 1%.¹⁴⁰

5.3.2 *Análise de especiação química de mercúrio nas amostras de pescado*

A análise de especiação química de mercúrio nas amostras e nos MRCs foi executada com o método otimizado e validado. A concentração de mercúrio total foi estimada pela soma das espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico, e comparada com a concentração determinada pelo método de quantificação de elementos totais. A eficiência de extração foi calculada dividindo-se a soma das espécies de mercúrio obtidas na análise de especiação pela concentração de mercúrio determinada na análise de elementos totais, após decomposição da amostra por micro-ondas e quantificação por ICP-MS. Os resultados das análises dos MRCs foram apresentados na Tabela 12 e os resultados das amostras podem ser apreciados na Tabela 25.

Os resultados da análise das amostras revelaram que a maior parte do mercúrio presente está na forma de metilmercúrio, uma vez que o percentual médio desta espécie em relação ao mercúrio total (determinado pela soma das concentrações de MeHg e iHg na análise cromatográfica) foi 96,2% nas amostras, variando de 88,2% a 98,5%. Levantamentos realizados pelo comitê do Codex Alimentarius registraram que a fração de metilmercúrio em pescado é de aproximadamente 85%, mas apresenta grande variação entre espécies.⁹ Estudos mais recentes apontam que em peixes predadores 94% do mercúrio presente se encontra na forma de metilmercúrio,¹⁴¹ resultados concordantes com os encontrados neste trabalho. A eficiência de extração variou entre 84,3% e 117,8%, sendo que a média foi 100,0%.

Tabela 25. Concentração média e desvio padrão (número de replicatas de leitura da amostra no ICP-MS igual a 5) de mercúrio total determinada por ICP-MS, concentrações das espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico determinadas por LC-ICP-MS, soma das espécies de mercúrio determinadas, eficiência de extração e percentual de metilmercúrio nas amostras. As concentrações são expressas em ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Amostra	Hg	iHg	MeHg	Soma (iHg + MeHg)	Eficiência de Extração (%)	% MeHg
1	86,5 ± 0,9	2,13 (<LQ)	99,7	102	117,8	97,9
2	38,2 ± 0,2	2,89 (<LQ)	38,8	41,7	109,2	93,1
3	34,5 ± 1,8	3,37 (<LQ)	35,1	38,5	111,7	91,2
4	179 ± 36	4,36 (<LQ)	196	201	111,9	97,8
5	174 ± 16	17,2	151	169	96,6	89,8
6	476 ± 102	13,5	457	470	98,7	97,1
7	88,9 ± 0,8	1,64 (<LQ)	97,0	98,7	111,0	98,3
8	212 ± 3	11,4	210	222	104,5	94,9
9	128 ± 7	3,71 (<LQ)	123	126	98,3	97,1
10	114 ± 19	1,56 (<LQ)	104	106	92,7	98,5
11	555 ± 8	11,4	527	539	97,1	97,9
12	360 ± 4	5,39 (<LQ)	349	354	98,3	98,5
13	221 ± 5	7,97 (<LQ)	225	233	105,6	96,6
14	387 ± 6	17,9	399	417	107,8	95,7
15	425 ± 55	8,22 (<LQ)	466	474	111,5	98,3
16	358 ± 74	10,5	361	371	103,6	97,2
17	451 ± 29,2	14,5	430	445	98,7	96,7
18	155 ± 27	2,95 (<LQ)	132	135	87,2	97,8
19	608 ± 8	13,5	574	587	96,6	97,7
20	360 ± 30	10,7	293	303	84,3	96,5
21	244 ± 23	3,77 (<LQ)	224	228	93,6	98,3
22	929 ± 10	25,8	813	838	90,3	96,9
23	243 ± 26	5,43 (<LQ)	227	232	95,4	97,7
24	1194 ± 31	25,7	1020	1046	87,6	97,5
25	1160 ± 15	23,8	1241	1264	109,0	98,1
26	106 ± 23	3,56 (<LQ)	93,7	97,2	92,0	96,3
27	1609 ± 18	145	1409	1554	96,6	90,7
28	102 ± 8	2,71 (<LQ)	85,1	87,8	86,0	96,9
29	33,4 ± 4,2	4,42 (<LQ)	33,2	37,6	112,7	88,2
30	901 ± 60	18,9	821	840	93,3	97,8
Média					100,0	96,2
Desvio padrão					9,2	2,8

O perfil de distribuição das espécies de mercúrio determinadas no presente trabalho sugere que uma triagem prévia de amostras mediante determinação de mercúrio total, que é mais simples e de menor custo, se comparada com a análise de especiação química, é viável. Esta prática é sugerida pelo Codex Alimentarius⁹, e neste caso considera-se que 100% do mercúrio está presente na forma orgânica. Contudo, a realização da análise de especiação química de mercúrio em amostras com concentração de mercúrio total acima do limite máximo é importante para avaliar a qualidade destes produtos e a necessidade de descarte de alimentos inadequados para consumo.

A elevada proporção de metilmercúrio em relação ao mercúrio total sugere a existência de forte correlação entre as concentrações das duas espécies. Na Figura 13 é possível observar que o coeficiente de correlação de *Spearman* (r) é positivo e próximo a 1 ($r = 0,9927$, $p < 0,05$) para MeHg em relação a tHg. As concentrações de iHg e tHg também apresentaram correlação forte. Quando a concentração de iHg na amostra n° 27 (145,06 $\mu\text{g kg}^{-1}$, concentração mais elevada entre todas as amostras) foi considerada *outlier*, o coeficiente de correlação foi de 0,8850 ($p < 0,05$). Caso a concentração de iHg encontrada na amostra no 27 fosse incluída, o coeficiente de correlação (considerando as 30 amostras) seria de 0,7625 ($p < 0,05$).

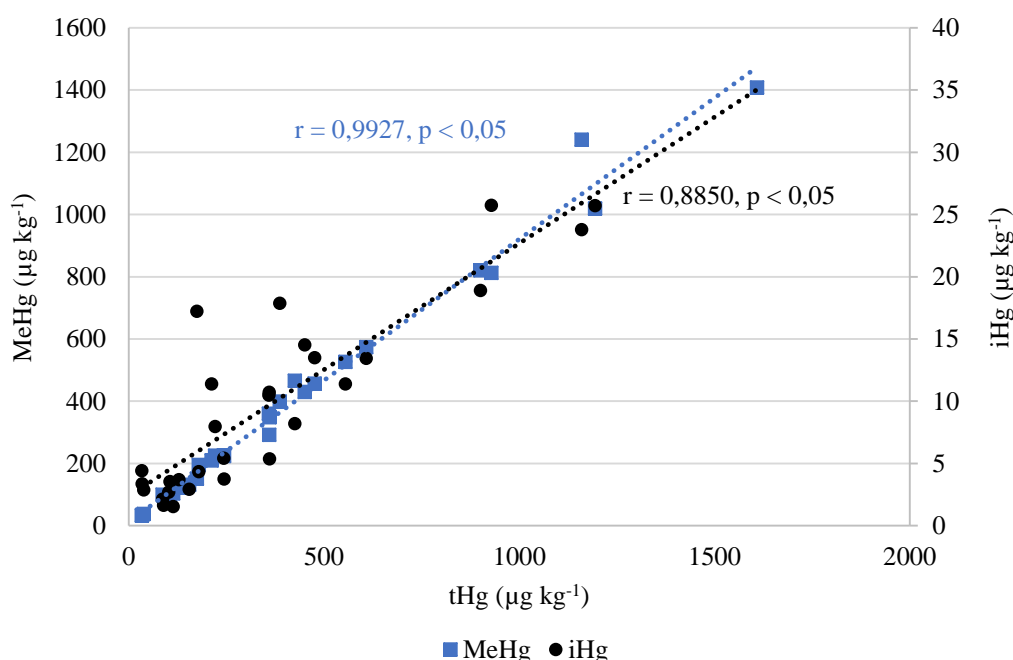


Figura 13: Correlação de *Spearman* entre as concentrações de MeHg (■) e tHg ($n = 30$), e iHg (●) e tHg ($n = 29$).

Ao considerar as diversas legislações aplicadas a pescado quanto à concentração de metilmercúrio, diferentes conclusões são obtidas. A legislação dos Estados Unidos¹⁰ estabelece que o limite máximo para metilmercúrio em pescado de quaisquer tipos é de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, logo 3 amostras que apresentaram concentração de mercúrio total acima deste valor também apresentando concentração de metilmercúrio superior ao limite. A legislação adotada pela China¹¹ leva a conclusão similar, considerando que as amostras pertencem a espécies carnívoras de peixes, uma vez que o limite máximo de metilmercúrio permitido para este tipo de pescado também é de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. O Japão adota legislação mais restritiva entre os países citados, estabelecendo um limite de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ para MeHg e $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ para tHg (com algumas exceções). Neste caso, 17 das 30 amostras atendem ao primeiro critério (máximo de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ de MeHg) e 19 amostras atendem ao segundo (máximo de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de tHg).

A falta de um consenso na legislação internacional estabelecendo o limite máximo para concentração de mercúrio em pescado dificulta a análise e classificação dos resultados. Outra questão importante refere-se aos diferentes limites máximos adotados para diferentes espécies de peixes. Tais limites são definidos considerando os níveis de contaminação presentes em cada espécie, analisando a posição da espécie na cadeia alimentar. Esta definição visa ajustar a regulamentação à situação que leve a rejeição de produtos da pesca a níveis aceitáveis. Entretanto, à luz da segurança alimentar, o consumidor final raramente tem conhecimento para entender e subsidiar as escolhas de consumo, de forma que a adoção de diferentes limites máximos deste contaminante parece contraditória, pois produtos com concentrações elevadas de mercúrio podem estar disponíveis no mercado e serem considerados adequados pelos órgãos de controle. É importante que a discussão sobre as regulamentações avance, subsidiada por estudos de ocorrência e biodisponibilidade, a fim de que sejam estabelecidos níveis seguros de consumo. Além dos aspectos discutidos acima, a exposição ao contaminante também está diretamente relacionada aos diferentes hábitos e costumes alimentares, como por exemplo, a taxa de consumo de peixes e derivados por habitante e a forma de preparo dos alimentos. Portanto, é importante que estudos científicos sejam conduzidos no sentido de promover a discussão e o debate acerca da segurança alimentar.

5.3.3 Análise de especiação química de arsênio nas amostras de pescado

As amostras de pescado foram submetidas à análise de especiação química de arsênio visando a quantificação de arsênio inorgânico, expresso pela soma das espécies As (III) e As (V). Os resultados são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de arsênio total (tAs) e arsênio inorgânico (iAs) (expresso pela soma das espécies As (III) + As (V)) nas amostras. LQ (iAs): $11,09 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Amostra	tAs	iAs
1	1786 \pm 31	<LQ
2	2953 \pm 18	<LQ
3	1980 \pm 28	<LQ
4	1178 \pm 62	<LQ
5	2026 \pm 158	<LQ
6	4357 \pm 318	<LQ
7	4049 \pm 34	<LQ
8	1725 \pm 18	<LQ
9	1420 \pm 68	<LQ
10	162 \pm 19	<LQ
11	789 \pm 5	<LQ
12	1070 \pm 84	<LQ
13	748 \pm 17	<LQ
14	1568 \pm 20	<LQ
15	8,65 \pm 1,17	<LQ
16	1514 \pm 56	<LQ
17	1282 \pm 14	<LQ
18	2201 \pm 179	<LQ
19	3,80 \pm 0,23	<LQ
20	1712 \pm 164	<LQ
21	7077 \pm 630	<LQ
22	3690 \pm 27	<LQ
23	6917 \pm 613	<LQ
24	2822 \pm 67	<LQ
25	6944 \pm 79	<LQ
26	15918 \pm 996	17,25
27	207 \pm 21	<LQ
28	4843 \pm 82	<LQ
29	2776 \pm 323	<LQ
30	2613 \pm 279	<LQ

É possível observar que, apesar de 24 amostras terem concentração de arsênio total superior ao limite de $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, a concentração das espécies inorgânicas do elemento é muito baixa. Apenas na amostra de número 26 a concentração de iAs estava acima do LQ. Nesta amostra a concentração de arsênio total era $15918 \mu\text{g kg}^{-1}$, de forma que a concentração de iAs correspondeu a apenas 0,11%. Considerando as regulamentações internacionais que estabelecem limites para As em função de iAs, este resultado estaria em conformidade: o teor máximo de iAs em pescado adotado pela China¹¹ é $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e pela Austrália e Nova Zelândia¹⁴² é de $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Este resultado corrobora conclusões obtidas em estudos já publicados, que apontam que apenas uma pequena fração do arsênio total corresponde à espécie mais tóxica¹⁴³⁻¹⁴⁶. Gao e colaboradores¹⁴⁷ observaram que raramente a fração de iAs supera 2% do tAs, e mostraram a existência de correlação entre estas concentrações em um estudo envolvendo 79 amostras de pescado. Resultados similares foram reportados por Mania *et al.*¹⁴⁸ em outro estudo contemplando 55 amostras, em que os pesquisadores concluíram que o teor de iAs é baixo e não representa um risco à saúde.

Países da União Europeia têm continuamente discutido este tema. O último relatório elaborado pela autoridade de segurança alimentar europeia indica que a proporção relativa de iAs em relação ao tAs em peixes e frutos do mar é pequena, e tende a diminuir à medida que a concentração de tAs aumenta.¹³⁸ Neste sentido, o grupo vem realizando avaliações da exposição alimentar ao arsênio inorgânico, e concluiu que os alimentos que mais contribuem para a ingestão são arroz e derivados, grãos e água, sendo que pescado ficaram de fora desta lista.¹³⁹

Considerando a segurança alimentar com respeito ao consumo de pescado, uma especificação de limites baseada em concentração de iAs, como já é adotado pela China¹¹, Austrália e Nova Zelândia¹⁴², parece mais adequada. Entretanto, a complexidade e o custo elevado da análise de especiação química fazem com que a execução rotineira desta análise ainda seja pouco difundida, e conseqüentemente restringem a adoção de regulamentações baseadas em iAs. Existe, ainda, uma lacuna de conhecimento neste contexto, e algumas questões seguem em discussão. É necessário aprofundar os estudos de ocorrência das espécies de arsênio nos diferentes produtos da pesca, buscando construir modelos que correlacionem as concentrações das diferentes espécies em cada

produto. Desse modo, a necessidade e o valor de um limite máximo de As poderão ser avaliados, bem como em termos de qual espécie deverá ser estabelecido.

6 CONCLUSÕES

O método para especiação química de mercúrio por LC-ICP-MS foi otimizado e validado, permitindo a quantificação de metilmercúrio e mercúrio inorgânico em pescado conforme os procedimentos adotados pelo Ministério da Agricultura preconizados no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e na Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO. O método tem sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e incerteza de medição adequados, atendendo a todos os requisitos estabelecidos para sua utilização.

Os parâmetros de validação foram avaliados em dois níveis de concentração, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para o nível mais baixo foram obtidas recuperações médias de 96,0% e 97,3% para mercúrio inorgânico e metilmercúrio, respectivamente. Para o nível mais alto a recuperação média foi 100,8% para ambas as espécies. A exatidão foi avaliada através da análise de três MRCs, sendo obtidas recuperações 95,1% a 106,3%. O método apresentou o LQ de $2,08 \mu\text{g kg}^{-1}$ para iHg e $8,39 \mu\text{g kg}^{-1}$ para MeHg, que representam valores adequados ao uso pretendido. A incerteza de medição estimada para o método foi de $37,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $38,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ para mercúrio inorgânico e metilmercúrio, respectivamente, valores estimados no nível correspondente ao limite máximo permitido.

A otimização dos parâmetros instrumentais permitiu a redução do tempo de análise de 5 min para 4 min, quando se compara o método estabelecido pela FDA com o presente trabalho. O LQ determinado neste trabalho foi mais baixo que o apresentado pela metodologia do FDA para MeHg, que é $28 \mu\text{g kg}^{-1}$, e também foi estimada uma incerteza inferior àquela informada pelo método de referência para esta espécie. O método de referência não apresentou os valores de LQ e incerteza para a espécie iHg.

Na análise de 30 amostras de pescado foi encontrada concentração de mercúrio variando de $33,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ até cerca de $1600 \mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando-se que o limite máximo permitido pela ANVISA⁷ para mercúrio em pescado de espécies predadoras é $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$, em três amostras a concentração de mercúrio era superior a este limite. O percentual médio de metilmercúrio em relação ao mercúrio total nas amostras foi 96,2%. A eficiência de extração das espécies de mercúrio foi de 84,3% a 117,8%, sendo a eficiência de extração média igual a 100,0%. Foi observada forte correlação positiva entre as espécies metilmercúrio e mercúrio inorgânico em função da concentração total de

mercúrio, indicando que a concentração de ambas as espécies aumenta à medida que a de mercúrio total aumenta.

Para análise de arsênio, apesar de 24 das 30 amostras terem apresentado concentração superior ao limite máximo ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$) estabelecido pela ANVISA⁷ na análise de elementos totais, a concentração de arsênio inorgânico foi inferior ao limite de quantificação ($11,09 \mu\text{g kg}^{-1}$) para 29 das 30 amostras. A única amostra que exibiu teor de arsênio inorgânico quantificável apresentou a concentração de $17,25 \mu\text{g kg}^{-1}$, o que equivale a uma fração de 0,11% do arsênio total da respectiva amostra. Isto indica que a contaminação por arsênio não representa um risco à segurança alimentar, uma vez que as espécies menos tóxicas de arsênio são predominantes em pescado.

Uma das amostras apresentou concentração de Cd de $105 \mu\text{g kg}^{-1}$, concentração que pode estar acima do limite máximo estabelecido, uma vez que o teor máximo varia de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $300 \mu\text{g kg}^{-1}$, a depender da espécie. Em nenhuma das amostras analisadas a concentração de Pb foi superior ao limite máximo permitido pela ANVISA⁷, que é $300 \mu\text{g kg}^{-1}$.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Mercury and health. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (2017).
2. Broussard, L. A., Hammett-Stabler, C. A., Winecker, R. E. & Roper-Miller, J. D. The Toxicology of Mercury. *Lab. Med.* **33**, 614–625 (2002).
3. Ma, M., Du, H. & Wang, D. Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **49**, 1893–1936 (2019).
4. CE. Regulamento (CE) n° 1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* vol. 2006 L 364/5-L 364/24 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32006R1881> (2006).
5. CE. Regulamento (CE) n° 1881/2006 Revisado em 01.01.2022. *Jornal Oficial da União Europeia* vol. 50 1–54 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=celex:32006R1881> (2022).
6. Westman, W. *China Releases the Standard for Maximum Levels of Contaminants in Foods.* (2009).
7. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). IN N° 160, de 1° de julho de 2022 - Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. *Diário Of. da República Fed. do Bras.* (2022).
8. Canada, G. of. Health Canada's Maximum Levels for Chemical Contaminants in Foods. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html> (2016).
9. Joint Fao/Who Food Standards Programme. *Proposed Draft Maximum Levels For Methylmercury In Fish Including Associated Sampling Plans.* *Fao Who* vol. 12 (2018).
10. FDA. CPG Sec. 540.600 Fish, Shellfish, Crustaceans and other Aquatic Animals - Fresh, Frozen or Processed - Methyl Mercury. <https://www.fda.gov/regulatory->

- information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-540600-fish-shellfish-crustaceans-and-other-aquatic-animals-fresh-frozen-or-processed-methyl (2007).
11. China Ministry of Health. National Food Safety Standard of Maximum Levels of Contaminants in Foods. 19 https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Maximum Levels of Contaminants in Foods _Beijing_China - Peoples Republic of_12-11-2014.pdf (2014).
 12. MHLW. Sobre o valor da regulamentação provisória de mercúrio em peixes e mariscos - Japão. vol. 21 1154–1157 (1973).
 13. BRASIL. *Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos*. (2011).
 14. INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. **Revisão 9**, 30 (2020).
 15. FSANZ. Maximum levels of contaminants and natural toxicants. *Aust. New Zeal. Food Stand. – Sched. 19* **1991**, 7 (1991).
 16. Bernhoft, R. A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *J. Environ. Public Health* **2012**, 1–10 (2012).
 17. (ANVISA), B. A. N. de V. S. RDC N° 173 DE 15 DE SETEMBRO DE 2017. *Diário Of. da União Seção 1*, 46 (2017).
 18. (ANVISA), B. A. N. de V. S. RDC N° 145 DE 21 DE MARÇO DE 2017. *Diário Of. da União Seção 1*, 71 (2017).
 19. Pereira, H. Cloro-álcalis: origem, evolução da indústria e valor para a sociedade. 268 https://issuu.com/abicllorebook/docs/af-abiclor-single__1_?embed_cta=embed_badge&embed_context=embed&embed_domain=www.abiclor.com.br&utm_medium=referral&utm_source=www.abiclor.com.br (2018).
 20. Council, W. C. WCC-CA-Manufacturing-Processes-brochure.pdf. *How is Chlorine made?* 2 <https://www.eurochlor.org/wp-content/uploads/2021/09/WCC-CA-Manufacturing-Processes-brochure.pdf> (2021).

21. WCC. Sustainable Progress. *World Chlorine Counc.* **3**, 1–24 (2017).
22. Schneider, L. When toxic chemicals refuse to die - An examination of the prolonged mercury pesticide use in Australia. *Elementa* **9**, 1–18 (2021).
23. Nations, U. *Technical Background Report to the Global Mercury Assessment 2018*. (2018).
24. Simon, M., Jönk, P., Wühl-Couturier, G. & Halbach, S. Mercury, Mercury Alloys, and Mercury Compounds. *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **22**, 559–590 (2006).
25. Jensen, G. & Ruzickova, K. Halting the Child Brain Brain. 44 (2006).
26. Selin, N. E. Global biogeochemical cycling of mercury: A review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **34**, 43–63 (2009).
27. Yorifuji, T., Tsuda, T. & Harada, M. Minamata disease: A challenge for democracy and justice. *Late lessons from early Warn. Sci. precaution, Innov.* 92–130 (2013).
28. Tamashiro, H., Akagi, H., Arakaki, M., Futatsuka, M. & Roht, L. H. Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **54**, 135–146 (1984).
29. Yokoyama, H. *Mercury pollution. In Minamata, mercury still divides. Science (New York, N.Y.)* vol. 341 (2013).
30. Eto, K. Minamata Disease. *Neuropathology* **20**, S14–S19 (2000).
31. ENVIRONMENTAL HEALTH DEPARTMENT. Minamata Disease: The history and measures. *Ministry of the Environment, Government of Japan* <http://www.env.go.jp/en/chemi/hs/minamata2002/ch4.html> (2002).
32. Yorifuji, T. & Tsuda, T. Minamata. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* **3**, 340–344 (2014).
33. Waldron, H. A. Did the Mad Hatter have mercury poisoning? *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **287**, 1961 (1983).
34. Hunter, D., Bomford, R. R. & Russel, D. S. Poisoning by Methyl Mercury Compounds. *An Int. J. Med.* **9**, 193–226 (1940).
35. Ahlmark, A. Poisoning by Methyl Mercury Compounds. *Br. J. Ind. Med.* **5**, 117–119 (1948).

36. Elhassani, S. B. The many faces of methylmercury poisoning. *Clin. Toxicol.* **19**, 875–906 (1982).
37. Clarkson, T. W. Mercury: Major issues in environmental health. *Environ. Health Perspect.* **100**, 31–38 (1993).
38. Bisinoti, M. C. & Jardim, W. F. O comportamento do metilmercúrio no ambiente. *Quim. Nova* **27**, 593–600 (2004).
39. Kharasch, M. S. Stabilized Bactericide and Process of Stabilizing It. 1–3 (1932).
40. Baker, J. P. Mercury, vaccines, and autism: One Controversy, Three Histories. *Am. J. Public Health* **98**, 244–253 (2008).
41. Rohyans, J. A., Walson, P. D., Wood, G. A. & MacDonald, W. A. Mercury toxicity following merthiolate ear irrigations. *J. Pediatr.* **104**, 311–313 (1984).
42. Suneja, T. & Belsito, D. V. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic contact reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**, 23–27 (2001).
43. King, K., Paterson, M. & Green, S. K. Global justice and the proposed ban on thimerosal-containing vaccines. *Pediatrics* **131**, 154–156 (2013).
44. Sharpe, M. A., Livingston, A. D. & Baskin, D. S. Thimerosal-Derived Ethylmercury Is a Mitochondrial Toxin in Human Astrocytes: Possible Role of Fenton Chemistry in the Oxidation and Breakage of mtDNA. *J. Toxicol.* **2012**, 1–12 (2012).
45. Geier, D. A. *et al.* Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies. *Clin. Chim. Acta* **444**, 212–220 (2015).
46. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RE Nº 528, de 17 de abril de 2001. *Diário Of. da República Fed. do Bras.* **111**, 230 (2001).
47. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 29, de 1º de Junho de 2012 - Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre "Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes e dá outras providências. *Diário Of. da República Fed. do Bras.* (2012).

48. FDA. Thimerosal and Vaccines | FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines> (2018).
49. IARC. Mercury and Mercury Compounds. *International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations* 4 <https://inchem.org/documents/iarc/vol58/mono58-3.html> (1997).
50. Jensen, S. & Jernelöv, A. Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms. *Nature* **223**, 753–754 (1969).
51. Pandey, S. K., Kim, K. H. & Brown, R. J. C. Measurement techniques for mercury species in ambient air. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 899–917 (2011).
52. Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J. & Pirrone, N. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 4967–4983 (2013).
53. Hall, B. The gas phase oxidation of elemental mercury by ozone. *Water, Air, Soil Pollut.* **80**, 301–315 (1995).
54. Pal, B. & Ariya, P. A. Gas-phase HO•-initiated reactions of elemental mercury: Kinetics, product studies, and atmospheric implications. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5555–5566 (2004).
55. Donohoue, D. L., Bauer, D., Cossairt, B. & Hynes, A. J. Temperature and pressure dependent rate coefficients for the reaction of Hg with Br and the reaction of Br with Br: A pulsed laser photolysis-pulsed laser induced fluorescence study. *J. Phys. Chem. A* **110**, 6623–6632 (2006).
56. Skyllberg, U., Qian, J., Frech, W., Xia, K. & Bleam, W. F. Distribution of mercury, methyl mercury and organic sulphur species in soil, soil solution and stream of a boreal forest catchment. *Biogeochemistry* **64**, 53–76 (2003).
57. Skyllberg, U. Competition among thiols and inorganic sulfides and polysulfides for Hg and MeHg in wetland soils and sediments under suboxic conditions: Illumination of controversies and implications for MeHg net production. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **113**, n/a-n/a (2008).
58. Nagase, H., Ose, Y., Sato, T. & Ishikawa, T. Methylation of mercury by humic substances in an aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **25**, 133–142 (1982).

59. Howell, G. N. *et al.* Methylmercury Generation in Seawater by Transmethylation Reactions of Organo-lead and -tin Compounds with Inorganic Mercury as Monitored by Multinuclear Magnetic Resonance and Electrochemical Techniques. *Aust. J. Chem.* **39**, 1167–75 (1985).
60. Bertilsson, L. & Neujahr, H. Y. Methylation of Mercury Compounds by Methylcobalamin. *Biochemistry* **10**, 2805–2808 (1971).
61. Menegasso, J. L. M. Vitaminas e Coenzimas. <https://www.ufrgs.br/vitaminas-b/index.php> (2017).
62. Weber, J. H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. *Chemosphere* **26**, 2063–2077 (1993).
63. Benoit, J. M., Gilmour, C. C., Heyes, A., Mason, R. P. & Miller, C. L. Geochemical and Biological Controls over Methylmercury Production and Degradation in Aquatic Ecosystems. *ACS Symp. Ser.* **835**, 262–297 (2002).
64. Segade, S. R., Dias, T. & Ramalhosa, E. Mercury methylation versus demethylation: Main processes involved. in *Methylmercury: Formation, Sources and Health Effects* (2011).
65. Bisogni, J. J. & Lawrence, A. W. Kinetics of mercury methylation in aerobic and anaerobic aquatic environments. *J. Water Pollut. Control Fed.* **47**, 135–152 (1975).
66. Gilmour, C. C. & Henry, E. A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ. Pollut.* **71**, 131–169 (1991).
67. Ullrich, S. M., Tanton, T. W. & Abdrashitova, S. A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **31**, 241–293 (2001).
68. Frohne, T. *et al.* Biogeochemical factors affecting mercury methylation rate in two contaminated floodplain soils. *Biogeosciences* **9**, 493–507 (2012).
69. Merritt, K. A. & Amirbahman, A. Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments - A critical review. *Earth-Science Rev.* **96**, 54–66 (2009).
70. Rudd, J. W. M. Sources of methyl mercury to freshwater ecosystems: A review.

- Water, Air, Soil Pollut.* **80**, 697–713 (1995).
71. Gilmour, C. C., Henry, E. A. & Ralph, M. Sulfate Stimulation of Mercury Methylation in Freshwater Sediments. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 2281–2287 (1992).
 72. Schaefer, J. K. *et al.* Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 8714–8719 (2011).
 73. Parks, J. M. *et al.* The genetic basis for bacterial mercury methylation. *Science* (80-). **339**, 1332–1335 (2013).
 74. Morel, F. M. M. & Amyot, M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 543–566 (1998).
 75. Barkay, T., Miller, S. M. & Summers, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 355–384 (2003).
 76. Seller, P., Kelly, C. A., Rudd, J. W. M. & MacHutchon, A. R. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature* vol. 380 694–697 (1996).
 77. Zhang, T. & Hsu-Kim, H. Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands. *Nat. Geosci.* **3**, 473–476 (2010).
 78. Zhang, D., Yin, Y., Li, Y., Cai, Y. & Liu, J. Critical role of natural organic matter in photodegradation of methylmercury in water: Molecular weight and interactive effects with other environmental factors. *Sci. Total Environ.* **578**, 535–541 (2017).
 79. Hammerschmidt, C. R. & Fitzgerald, W. F. Photodecomposition of methylmercury in an arctic Alaskan lake. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 1212–1216 (2006).
 80. Boyd, E. S. & Barkay, T. The mercury resistance operon: From an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front. Microbiol.* **3**, 1–13 (2012).
 81. Stein, E. D. *et al.* Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Environ. Sci. Technol.* **17**, 37–41 (2013).
 82. Marvin-Dipasquale, M. *et al.* Methyl-mercury degradation pathways: A comparison among three mercury impacted ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4908–4916 (2000).

83. O'Connor, D. *et al.* Mercury speciation, transformation, and transportation in soils, atmospheric flux, and implications for risk management: A critical review. *Environ. Int.* **126**, 747–761 (2019).
84. EPA. Solid waste and emergency response glossary. <https://www.epa.gov/report-environment/roe-glossary> (2010).
85. Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P. & Carere, M. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* **133**, 378–387 (2014).
86. Neumann, R. M. & Ward, S. M. Bioaccumulation and biomagnification of mercury in two warmwater fish communities. *J. Freshw. Ecol.* **14**, 487–497 (1999).
87. Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H. & Heumann, K. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology. Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology* (John Wiley & Sons Ltd, 2003). doi:10.1002/0470868384.
88. Zhang, H., Feng, X., Larssen, T., Shang, L. & Li, P. Bioaccumulation of methylmercury versus inorganic mercury in rice (*Oryza sativa* L.) grain. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4499–4504 (2010).
89. Aslam, M. W. *et al.* Mercury contamination status of rice cropping system in Pakistan and associated health risks. *Environ. Pollut.* **263**, 114625 (2020).
90. Lin, Y., Vogt, R. & Larssen, T. Environmental mercury in China: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 2431–2444 (2012).
91. Jackson, B. P. & Punshon, T. Recent Advances in the Measurement of Arsenic, Cadmium, and Mercury in Rice and Other Foods. *Curr. Environ. Heal. Reports* **2**, 15–24 (2015).
92. EFSA. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA J.* **13**, 1–36 (2015).
93. Templeton, D. M. *et al.* Clinical Chemistry Section, Commission on Toxicology Guidelines for Terms Related To Chemical Speciation and Fractionation of Elements. Definitions, Structural Aspects, and Methodological Approaches. *Pure Appl. Chem.*, **72**, 1453–1470 (2000).

94. Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P. & Horvat, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **24**, 383–393 (2005).
95. Marcinkowska, M. & Barańkiewicz, D. Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique – HPLC/ICP-MS: A review. *Talanta* **161**, 177–204 (2016).
96. Spanu, D. *et al.* Selective organomercury determination by ICP-MS made easy. *Anal. Chim. Acta* 339553 (2022) doi:10.1016/j.aca.2022.339553.
97. Zhu, S., Chen, B., He, M., Huang, T. & Hu, B. Speciation of mercury in water and fish samples by HPLC-ICP-MS after magnetic solid phase extraction. *Talanta* **171**, 213–219 (2017).
98. Londonio, A., Hasuoka, P. E., Pacheco, P., Gil, R. A. & Smichowski, P. Online solid phase extraction-HPLC-ICP-MS system for mercury and methylmercury preconcentration using functionalised carbon nanotubes for their determination in dietary supplements. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 1737–1744 (2018).
99. Reyes, L. H., Rahman, G. M. M. & Kingston, H. M. S. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Anal. Chim. Acta* **631**, 121–128 (2009).
100. Chen, X. *et al.* Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1314**, 86–93 (2013).
101. Cheng, H. *et al.* Ion-pairing reversed-phase chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry as a tool to determine mercurial species in freshwater fish. *J. Chromatogr. A* **1531**, 104–111 (2018).
102. Cheng, H., Zhang, W., Wang, Y. & Liu, J. Graphene oxide as a stationary phase for speciation of inorganic and organic species of mercury, arsenic and selenium using HPLC with ICP-MS detection. *Microchim. Acta* **185**, 4–11 (2018).
103. Deng, D. *et al.* Online solid sampling platform using multi-wall carbon nanotube assisted matrix solid phase dispersion for mercury speciation in fish by HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 882–887 (2015).

104. Hight, S. C. & Cheng, J. Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation. *Anal. Chim. Acta* **567**, 160–172 (2006).
105. Schmidt, L., Bizzi, C. A., Duarte, F. A., Dressler, V. L. & Flores, E. M. M. Evaluation of drying conditions of fish tissues for inorganic mercury and methylmercury speciation analysis. *Microchem. J.* **108**, 53–59 (2013).
106. Souza, S. S. de, Campiglia, A. D. & Jr, F. B. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography - cold vapor - inductively coupled plasma massspectrometry. *Anal. Chim. Acta* **761**, 11–17 (2013).
107. Campos, R. C. *et al.* Methylmercury determination using a hyphenated high performance liquid chromatography ultraviolet cold vapor multipath atomic absorption spectrometry system. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **64**, 506–512 (2009).
108. Masbou, J. *et al.* Carbon stable isotope analysis of methylmercury toxin in biological materials by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry To cite this version : HAL Id: hal-01450034 Carbon stable isotope analysis of methylmercury toxin in biological material. *Anal. Chem.* **87**, 11732–11738 (2015).
109. Liang, L., Horvat, M., Cernichiari, E., Gelein, B. & Balogh, S. Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **43**, 1883–1888 (1996).
110. Narukawa, T., Iwai, T., Chiba, K. & Feldmann, J. A Method for Methylmercury and Inorganic Mercury in Biological Samples Using High Performance Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* **34**, 1329–13 (2018).
111. Tao, G., Willie, S. N. & Sturgeon, R. E. Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1929–

- 1931 (1999).
112. Jagtap, R., Krikowa, F., Maher, W., Foster, S. & Ellwood, M. Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS. *Talanta* **85**, 49–55 (2011).
 113. Mohammadi, H., Amine, A., Ouarzane, A. & El Rhazi, M. Screening of fish tissue for methyl mercury using the enzyme invertase in a solvent interface. *Microchim. Acta* **149**, 251–257 (2005).
 114. Amde, M., Yin, Y., Zhang, D. & Liu, J. Methods and recent advances in speciation analysis of mercury chemical species in environmental samples: A review. *Chem. Speciat. Bioavailab.* **28**, 51–65 (2016).
 115. Gao, Z. & Ma, X. Speciation analysis of mercury in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **702**, 50–55 (2011).
 116. Morton, J., Carolan, V. A. & Gardiner, P. H. E. The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, 377–381 (2002).
 117. Lin, L. Y., Chang, L. F. & Jiang, S. J. Speciation analysis of mercury in cereals by liquid chromatography chemical vapor generation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6868–6872 (2008).
 118. Zou, H. *et al.* Speciation analysis of mercury in wild edible mushrooms by high-performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 2829–2840 (2020).
 119. Yao, C. H., Jiang, S. J., Sahayam, A. C. & Huang, Y. L. Speciation of mercury in fish oils using liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchem. J.* **133**, 556–560 (2017).
 120. INMETRO. DOQ-CGCRE-008. *Inmetro* 20 (2011).
 121. INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). *Inmetro* 1–95 (2012).

122. EURACHEM. Guia Eurachem-CITAC - Determinação da Incerteza da Medição Analítica. 166 (2002).
123. Louie, H., Wong, C., Huang, Y. J. & Fredrickson, S. A study of techniques for the preservation of mercury and other trace elements in water for analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal. Methods* **4**, 522–529 (2012).
124. Gray, P. J., Mindak, W. R. & Cheng, J. Elemental Analysis Manual for Food and Related Products 4.8 High Performance Liquid Chromatographic- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Methylmercury and Total Mercury in Seafood. *Elem. Anal. Man. Food Relat. Prod.* **0**, 17 (2008).
125. IUPAC & CIAAW. Atomic weight of Mercury. 1 <https://ciaaw.org/mercury.htm> (2022).
126. May, T. W., Wiedmeyer, R. H., Survey, U. S. G. & Division, B. R. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *At. Spectrosc.* **19**, 150–155 (1998).
127. Analytik Jena Application Note - Ultra-trace determination of mercury in environmental waters using the PlasmaQuant MS. 5 <https://www.spectroscopyonline.com/view/ultra-trace-determination-of-mercury-in-environmental-waters-using-the-plasmaquant-ms-v3> (2015).
128. Passariello, B., Barbaro, M., Quaresima, S., Casciello, A. & Marabini, A. Determination of mercury by inductively coupled plasma - Mass spectrometry. *Microchem. J.* **54**, 348–354 (1996).
129. Zhang, D., Yang, S., Cheng, H., Wang, Y. & Liu, J. Speciation of inorganic and organic species of mercury and arsenic in lotus root using high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in one run. *Talanta* **199**, 620–627 (2019).
130. Panova, M., Kmetov, V., Davcheva, D., Tomova, T. & Tomov, D. Optimizing the determination of mercury in human urine by ICP-MS with a collision cell mode. *Bulg. Chem. Commun.* **49**, 88–92 (2017).
131. Jung, W. *et al.* ICP-MS Analysis of Mercury in Fish: Exploration of Method Validation, Matrix Effect, and Kinetic Energy Discrimination. *J. Chem. Educ.* 1–

- 16 (2021) doi:<http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv-2021-f7rhr>.
132. Pinheiro, F. C., Lorençatto, R., Barros, A. I., Amaral, C. D. B. & Nóbrega, J. A. Fit-for-purpose ICP-MS procedure supporting brazilian regulations on inorganic constituents in fresh and saline waters. *J. Braz. Chem. Soc.* **29**, 1570–1578 (2018).
 133. Fleischer, H. Determination of Total Mercury Content in Wood Materials , Part 2: ICP-MS — A Multielement Method. *American Laboratory* 2–5 <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/144309-Determination-of-Total-Mercury-Content-in-Wood-Materials-Part-2-ICP-MS-A-Multielement-Method/> (2013).
 134. Strekopytov, S. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify chemical hazards in natural history collections: Arsenic and mercury in taxidermy bird specimens. *Nat. Hist. Museum* **27**, 11–13 (2015).
 135. CE. REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2021/808 DA COMISSÃO. *Jornal Oficial da União Europeia* 31 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32021R0808> (2021).
 136. Nearing, M. M., Koch, I. & Reimer, K. J. Complementary arsenic speciation methods: A review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **99**, 150–162 (2014).
 137. Tao, S. S. & Bolger, P. M. Arsenobetaine. *Encycl. Food Saf.* (2015).
 138. Panel, E. & Chain, F. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA J.* **7**, (2009).
 139. Arcella, D., Cascio, C. & Ruiz, J. Á. G. Chronic dietary exposure to inorganic arsenic. *EFSA J.* **19**, 6380 (2021).
 140. BRASIL. Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC. 11/03/2022 <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes> (2022).
 141. Riva-Murray, K., Bradley, P. M. & Brigham, M. E. Methylmercury—total mercury ratios in predator and primary consumer insects from Adirondack streams (New York, USA). *Ecotoxicology* **29**, 1644–1658 (2020).
 142. Australian Government. Australia and New Zealand Food Standards Code. F2021C00628 8 <https://www.legislation.gov.au/Details/F2021C00628> (2021).

143. Julshamn, K. *et al.* Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **5**, 229–235 (2012).
144. Leermakers, M. *et al.* Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **25**, 1–10 (2006).
145. Lin, H. T., Chen, S. W., Shen, C. J. & Chu, C. Arsenic speciation in fish on the market. *J. Food Drug Anal.* **16**, 70–75 (2008).
146. Rajaković, L. V., Todorović, Ž. N., Rajaković-Ognjanović, V. N. & Onjia, A. E. Analytical methods for arsenic speciation analysis. *J. Serbian Chem. Soc.* **78**, 1461–1479 (2013).
147. Gao, Y. *et al.* Arsenic speciation in fish and shellfish from the North Sea (Southern bight) and Açu Port area (Brazil) and health risks related to seafood consumption. *Chemosphere* **191**, 89–96 (2018).
148. Mania, M. *et al.* Total and inorganic arsenic in fish, seafood and seaweeds--exposure assessment. *Rocz. Państwowego Zakładu Hig.* **66**, 203–210 (2015).

ANEXOS

ANEXO A

Concentrações das soluções de calibração e área dos picos cromatográficos correspondentes, em CPS, para mercúrio inorgânico (iHg) e metilmercúrio (MeHg), para 6 curvas de calibração.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,1	0,5	1	5	10
iHg	19161	88990	176349	861768	1756954
	20078	89450	178254	868828	1785033
	19421	90348	175924	869839	1747511
	19125	88335	174263	866648	1739255
	19608	88635	144330	1020824	1756644
	19725	87905	177447	860390	1883656
MeHg	18274	75019	150675	726282	1492762
	19930	78169	152078	728747	1496130
	18410	77781	148951	733212	1461857
	20964	76624	150366	724358	1461072
	17610	78228	135390	860559	1462050
	18855	79403	151686	720096	1586274

ANEXO B

Estimativa da incerteza do método de especiação química de mercúrio em pescado por LC-ICP-MS.

Estimativas de entrada	iHg	MeHg
$L (\mu\text{g L}^{-1})$	10,08	10,10
m (g)	0,501	0,501
$V (\text{mL})$	50	50
Concentração calculada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1006,3	1007,5
Incerteza ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	37,7	38,9
Incerteza relativa (%)	3,7	3,9

Equação do mensurando:

$$C (\mu\text{g kg}^{-1}) = \frac{L \times V}{m} + C_{r\&r}$$

Onde:

L é a leitura de concentração do analito prevista pela curva de calibração, em $\mu\text{g L}^{-1}$;

V é o volume de diluição da amostra, em mL;

m é a massa da amostra, em g;

$C_{r\&r}$ é o componente de incerteza oriundo da repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial.

Planilha de Incerteza para Pesagem da Amostra

Símb.	Descrição da contribuição de incerteza	Estimativa de Variação (\pm)	Unidade de medida	Distrib. de Probab.	Divisor	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade	Contribuição para incerteza (g)	v_i ou v_{eff}
m_i	Erro máximo admissível da balança	0,0150	g	retangular	1,73	0,00866	1,0000	0,00866	∞
R	Efeito da resolução da balança	0,0005	g	retangular	1,73	0,00029	1,0000	0,00029	∞
E	Erro de excentricidade da balança	0,0020	g	triangular	2,45	0,00082	1,0000	0,00082	∞
m	Massa da amostra	0,0175	g	<i>t-Student</i>	k =	2,00	u(m) = U =	0,009 0,017	∞

Planilha de Incerteza para Diluição da Amostra

Símb.	Descrição da contribuição de incerteza	Estimativa de variação (\pm)	Unidade de medida	Distrib. de Probab.	Divisor	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade	Contribuição para incerteza (mL)	v_i ou v_{eff}
V_i	Erro médio do dispensador	0,033	mL	Retangular	1,73	0,01899	1,0000	0,0190	∞
T	Efeito da variação da temperatura ($\pm 5^\circ\text{C}$)	0,0525	mL	Retangular	1,73	0,03033	1,0000	0,0303	∞
S	Desvio padrão do erro médio do volume do dispensador	0,0155	mL	Normal	1,00	0,01550	1,0000	0,0155	29
V	Volume da amostra	0,1009	mL	<i>t-Student</i>	k =	2,00	u(V) = U =	0,039 0,078	∞

Incerteza da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Replicata	iHg			MeHg		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	1041,69	995,16	1013,53	1041,49	1001,68	999,36
2	1033,17	971,81	991,25	1043,75	971,47	982,04
3	1012,89	958,99	1024,95	1021,11	956,72	1012,64
4	1019,48	994,69	1022,28	1041,19	1001,27	1014,48
5	1052,09	962,30	1021,49	1063,14	964,54	1009,12
6	1031,17	992,72	1024,57	1048,56	994,43	1015,58
Média		1009,12			1010,14	
Desvio Padrão (s)		26,59			29,97	
CV (%)		2,63			2,97	
n		18			18	
Incerteza Tipo A $\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)$		6,27			7,06	

Incerteza da Curva de Calibração, com ajuste pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP)

Equações de Cálculo

$$u(x_{pred}, y) = \sqrt{var(x_{pred})}$$

$$s^2 = \frac{\sum w_i (y_i - y_{fi})^2}{(n - 2)}$$

$$var(x_{pred}) = \frac{var(y_{obs})}{b_1^2 + \frac{s^2}{b_1^2} \times \left(\frac{1}{\sum w_i} + \frac{(x_{pred} - \bar{x})^2}{\left(\frac{\sum (w_i x_i^2) - (\sum w_i x_i)^2}{\sum w_i} \right)} \right)}$$

Onde:

y é o sinal analítico (área do cromatograma)

x_{pred} é a concentração da amostra interpolada na curva de calibração

b_0 e b_1 são os coeficientes linear e angular da curva de calibração, respectivamente

w_i é o fator de ponderação (peso)

x_i é a concentração de cada nível da curva de calibração

\bar{x} é a concentração média de cada nível da curva de calibração

$(y_i - y_{fi})$ é o resíduo da curva para o i-ésimo ponto

**Incerteza da Curva de Calibração, com ajuste pelo Método dos Mínimos
Quadrados Ponderados (MMQP) – iHg**

Padrões	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Média	Fator de ponderação ($w_i=1/x_i^2$)	Área Calculada	Resíduo	Concentração Calculada
Padrão 1	0,0	0	0,00	2136	2136,127	-0,0123
Padrão 2	0,1	19520	100,0	19518	-2,103	0,1000
Padrão 3	0,5	88944	4,00	89043	99,478	0,4994
Padrão 4	1,0	176349	1,00	175950	-398,504	1,0023
Padrão 5	5,0	861768	0,04	871208	9439,969	4,9457
Padrão 6	10,0	1756954	0,01	1740280	-16674,189	10,0959

Equação linear	$y = b_0 + b_1 x$
Coefficiente angular (b_1)	173814
Coefficiente linear (b_0)	2136,1
Erro Padrão	8745,3

Nº de pontos	5
$S^2 =$	2181213

$x_{\text{pred}} (\mu\text{g L}^{-1})$	10,08
$u(x_{\text{pred}}) = u(L)$	0,03156
$\text{var}(x_{\text{pred}})$	0,00100
$\sum(w_i x_i^2)$	5,00
$\sum w_i$	105,0500
$(\sum w_i x_i)^2 / \sum w_i$	1,6839
$(\sum(w_i x_i)^2 - (\sum w_i x_i)^2 / \sum w_i)$	3,32
$1 / \sum w_i$	0,009519
$(x_{\text{pred}} - \bar{x})^2$	45,6976
$\text{var}(y_{\text{obs}})$	706,9

**Incerteza da Curva de Calibração, com ajuste pelo Método dos Mínimos
Quadrados Ponderados (MMQP) – MeHg**

Padrões	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Média	Fator de ponderação ($w_i=1/x_i^2$)	Área Calculada	Resíduo	Concentração Calculada
Padrão 1	0,0	0	0,00	4352	4351,510	-0,0297
Padrão 2	0,1	19007	100,0	19001	-6,079	0,1000
Padrão 3	0,5	77537	4,00	77599	62,062	0,4996
Padrão 4	1,0	150675	1,00	150847	172,279	0,9988
Padrão 5	5,0	726282	0,04	736830	10548,355	4,9280
Padrão 6	10,0	1492762	0,01	1469309	-23452,801	10,1601

Equação linear	$y = b_0 + b_1 x$
Coefficiente angular (b_1)	146496
Coefficiente linear (b_0)	4351,5
Erro Padrão	10888,6

Nº de pontos	5
$S^2 =$	3333278

$x_{\text{pred}} (\mu\text{g L}^{-1})$	10,10
$u(x_{\text{pred}}) = u(L)$	0,04642
$\text{var}(x_{\text{pred}})$	0,002155081
$\sum(w_i x_i^2)$	5,00
$\sum w_i$	105,0500
$(\sum w_i x_i)^2 / \sum w_i$	1,683864826
$(\sum(w_i x_i)^2 - (\sum w_i x_i)^2 / \sum w_i)$	3,32
$1 / \sum w_i$	0,009519277
$(x_{\text{pred}} - \bar{x})^2$	45,9684
$\text{var}(y_{\text{obs}})$	898,2

Coefficientes de Sensibilidade

Equação do mensurando:

$$C(\mu g \text{ kg}^{-1}) = \frac{L \times V}{m} + C_{R\&r}$$

Dados	Estimativas de Entrada		Unidade
	iHg	MeHg	
<i>L</i>	10,08	10,10	μg/kg
<i>m</i>	0,501	0,501	g
<i>V</i>	50	50	mL

	Derivadas parciais	Coeficiente de Sensibilidade	
		iHg	MeHg
Leitura	$\frac{\partial C}{\partial L} = \frac{V}{m}$	99,8	99,8
Volume	$\frac{\partial C}{\partial V} = \frac{L}{m}$	20,1	20,2
Massa	$\frac{\partial C}{\partial m} = -\frac{LV}{m^2}$	-2008,0	-2011,9
$C_{R\&r}$	$\frac{\partial C}{\partial C_{R\&r}} = 1$	1	1

Planilha global de Incerteza – iHg

Símb.	Descrição da contribuição de incerteza	Estimativa de Variação (\pm)	Unidade de Medida	Distrib. de Probab.	Divisor	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade	Contribuição para incerteza em $\mu\text{g kg}^{-1}$	v_i ou v_{eff}
<i>L</i>	Incerteza da leitura na curva de calibração	0,032	$\mu\text{g/kg}$	<i>t-Student</i>	1,00	0,032	99,800	3,150	25
<i>C_{r&R}</i>	Incerteza da Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial	6,267	-	<i>t-Student</i>	1,00	6,267	1,000	6,267	23
<i>m</i>	Incerteza da massa da amostra	0,018	g	<i>t-Student</i>	2,00	0,009	-2008,0	-17,476	∞
<i>V</i>	Incerteza do volume de diluição final da amostra	0,101	mL	<i>t-Student</i>	2,00	0,039	20,1	0,785	∞
Concentração			$\mu\text{g/kg}$	<i>t-Student</i>	k =	2,00	u(C) =	18,847	∞
							U =	37,696	

Resultado final:	1006,3	\pm	37,7	$\mu\text{g kg}^{-1}$
		\pm	3,7	%

Planilha Global da Incerteza – MeHg

Símb.	Descrição da contribuição de incerteza	Estimativa de Variação (\pm)	Unidade de Medida	Distrib. de Probab.	Divisor	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade	Contribuição para incerteza em $\mu\text{g kg}^{-1}$	v_i ou v_{eff}
<i>L</i>	Incerteza da leitura na curva de calibração	0,046	$\mu\text{g/kg}$	t-Student	1,00	0,046	99,800	4,633	25
<i>C_{r&R}</i>	Incerteza da Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial	7,064	-	t-Student	1,00	7,064	1,000	7,064	23
<i>m</i>	Incerteza da massa da amostra	0,018	g	t-Student	2,00	0,009	-2011,944	-17,511	∞
<i>V</i>	Incerteza do volume de diluição final da amostra	0,101	mL	t-Student	2,00	0,039	20,160	0,786	∞
Concentração			$\mu\text{g/kg}$	t-Student	k =	2,00	u(C) =	19,458	∞
							U =	38,922	

Resultado final:	1007,5	\pm	38,9	$\mu\text{g kg}^{-1}$
		\pm	3,9	%