

Protocolo para análise e quantificação de metais em pescado e produtos da aquicultura

Coordenador: João Felipe Matias

Pesquisadores: Isabelle Bezelga Caracas

Moisés Fernandes Bezerra

Luiz Drude de Lacerda



Fortaleza, Março de 2022

Governador do Estado do Ceará

Camilo Sobreira de Santana

Vice-Governadora do Estado do Ceará

Maria Izolda Cela de Arruda Coelho

Secretário da Ciência, Tecnologia e Educação Superior

Carlos Décimo

Presidente da Funcap

Tarcísio Pequeno

Diretora administrativa-financeira

Paula Lenz

Diretor científico

Luiz Drude de Lacerda

Diretor de inovação

Jorge Soares



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
*Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior*



CONTATOS

✉ Fundacaofuncap@gmail.com

🌐 www.funcap.ce.gov.br

📘 /Funcap

📷 @funcapce

📺 /Funcap CE

Telefone: (85) 3275 - 9124

Av. Oliveira Paiva, nº 94 - Cidade dos Funcionários
Fortaleza - CE | CEP: 60822 - 130

INDICE	
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 O pescado para consumo humano.....	6
1.2 Segurança alimentar e consumo de pescado.....	6
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivos específicos.....	7
3. ESTRATÉGIA DE MONITORAMENTO	
3.1 Critério de seleção de espécies marinhas.....	8
3.2 Seleção de análises.....	9
3.3 Analitos de estudo.....	9
3.3.1 MERCÚRIO (Hg).....	9
3.3.2 CÁDMIO (Cd).....	10
3.3.3 CHUMBO (Pb).....	11
3.3.4 SULFITO.....	11
4. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS.....	12
4.1 Coleta de amostras.....	13
4.2 Requisitos de manuseio e Custódia de amostras.....	14
5. PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES DAS AMOSTRAS	
5.1 Análise de mercúrio.....	16
5.2 Análise de Cádmio e Chumbo.....	17
5.3 Análise de sulfito (método Monier-Williams).....	18
6. ANÁLISE DE DADOS.....	19
6.1 Calibração e suas verificações.....	20
6.2 Limite de detecção e quantificação.....	21
6.3 Coeficiente de Variação nas amostras.....	23
6.4 Recuperação do padrão certificado.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Medição dos peixes coletados: <i>Ophistonema oglinum</i> (A), <i>Lutjanussyn agris</i> (B) e <i>Panulirus argus</i> (C).....	13
FIGURA 2. Peixes coletados: <i>Scomberomorus brasiliensis</i> (A), <i>Rhizoprionodon porosus</i> (B), <i>Hypanus sp.</i> (C) e amostras liofilizadas.....	14
FIGURA 3. Registro de campo para amostras de peixes.....	15
FIGURA 4. Formulário de Custódia de Amostra.....	16
FIGURA 5. Fluxograma do protocolo operacional de análise de mercúrio.....	17
FIGURA 6. Equipamento de Espectrometria de Absorção Atômica com sistema de geração de vapor frio (CVAAS).....	17
FIGURA 7. Fluxograma do protocolo operacional de análise de chumbo e cádmio.....	18
FIGURA 8. A) Equipamento de micro-ondas. B) Equipamento de Absorção Atômica por Chama.....	18
FIGURA 9. Equipamento de digestão e destilação de dióxido de enxofre.....	19
FIGURA 10. Curva de Calibração para Cd, Pd e Hg.....	21
FIGURA 11. Variabilidade da recuperação do Material Certificado de Referência (ERM BB422 – <i>Fish Muscle</i>) com n=37.....	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Faixa de linearidade das curvas de calibrações determinadas para cada um dos analitos de interesse. Para Cd e Pb a faixa está em $\mu\text{g/mL}$ e para Hg a faixa é apresentação em massa (ng).....21

TABELA 2. Valores de Limites de Detecção e Limites de Quantificação obtidos em análises de peixes e mariscos no Laboratório de Biogeoquímica Costeira, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC).....22

1. INTRODUÇÃO

1.1. O pescado para consumo humano

A produção de pescado vem crescendo gradativamente ao longo dos anos. Uma nova abordagem centrada na produção sustentável, que é coerente com a proteção e promoção da saúde humana e do bem-estar social, foi aceita pela maioria dos painéis internacionais e multilaterais envolvidos, culminando com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) (OECD, 2017). Entre eles, o Objetivo 14 refere-se especificamente a: "Conservar e utilizar de forma sustentável os oceanos, mares e recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável", que reconhece os impactos cada vez mais adversos da poluição marinha e da mudança climática comprometendo ganhos na proteção de ecossistemas significativos dos oceanos do mundo.

A saúde e o bem-estar resultam das interações de diferentes fatores determinantes de natureza social, econômica, cultural e política. A população tem procurado consumir alimentos mais saudáveis e deste modo, os peixes são os mais valiosos de todos os alimentos para a nutrição humana, uma vez que eles têm uma das maiores densidades de nutrientes entre animais destinados à alimentação (Smil, 2002).

1.2. O consumo de pescado e a exposição à poluentes

Uma questão relevante a ser abordada é a constatação de que a concentração de metais e outros poluentes persistentes aumentaram consideravelmente nos compartimentos ambientais, mesmo considerando o fortalecimento das políticas de controle de emissões, novas tecnologias industriais limpas e conscientização pública sobre saúde ambiental (Lacerda, 2007).

Concentrações de metais traço de origens continentais e atmosféricas nesta biota podem atingir concentrações que são potencialmente prejudiciais à saúde humana através de seu consumo (UN, 2016) e levantam sérias questões sobre a saúde dos ecossistemas aquáticos e eventual aumento do risco a exposição humana, com impactos diretos sobre a segurança alimentar.

O mercúrio pode provocar no homem, quando exposto em concentrações tóxicas, distúrbios neurológicos, gastrointestinais, renais, dermatológicos, cardiovasculares e imunitários (Zahir et al., 2005). A intoxicação aguda de cádmio caracteriza-se por causar febre, irritação nos olhos, nariz e garganta, tosse, dispneia, fraqueza, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, podendo causar edema agudo de pulmão. A exposição crônica acarreta o aparecimento de problemas respiratórios, cáries, amarelecimento dos dentes, anorexia, fadiga, perda de peso, palidez, anemia, proteinúria e dano tubular renal (Brito Filho, 1988).

Os sulfitos estão presentes naturalmente em vários alimentos e são utilizados há séculos como potentes agentes redutores para vários produtos alimentícios (Telles Filho, 2004). Em 1958, o *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, responsável pela regulamentação dos preservativos e aditivos alimentares nos EUA, considerou os sulfitos como seguros, recebendo a sigla GRAS (*generally recognized as safe* ou, “usualmente recomendado com seguro”). Em 1973 foi descrita pela primeira vez uma possível correlação entre sulfitos e asma. Em 1982 o *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA iniciou uma reavaliação do status GRAS dos sulfitos após a notificação de numerosas manifestações de hipersensibilidade relacionadas a estes compostos. Tornou-se então indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos para minimizar os riscos à saúde humana.

Em 2017, membros do Diretório Geral do núcleo de segurança alimentar da União Europeia – DG-SANTE apontaram serias deficiências associadas à cadeia produtiva do pescado no Brasil (DG-SANTE, 2017). Entre as nove notificações registradas pela comissão, três referem-se à contaminação do pescado por poluentes. Em particular, o uso inadequado e irrestrito do metabissulfito como aditivo de preservação e níveis excessivos de mercúrio e cádmio encontrados em amostras de pescado brasileiro.

2. OBJETIVOS

A proposta deste manual é fornecer orientação geral sobre métodos de amostragem e análise de contaminantes em tecidos de peixes que promovam a consistência nos dados que são utilizados para determinar a necessidade de divulgação de alertas de consumo de pescado. Este manual fornece apenas orientação e não constitui um requisito regulatório. São descritos e avaliados métodos cientificamente consistentes para coleta de amostras, tratamento, preservação, análises químicas e tratamento estatístico dos dados gerados sobre a quantificação de contaminantes em pescado para uso em programas de monitoramento.

Os métodos e procedimentos descritos no presente manual seguem as recomendações do *Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume I: Fish Sampling and Analysis* da Agência americana de proteção ambiental – USEPA (USEPA, 2000).

2.1. Objetivos específicos

- Descrever critérios para seleção de espécies- alvo de acordo com características locais de produção e consumo.
- Descrever procedimentos para aquisição e armazenamento de amostras incluindo:

- a) Seleção do local

- b) Tempo de amostragem
 - c) Tipo de amostra e número de réplicas
 - d) Procedimentos de coleta de amostras, incluindo equipamentos de amostragem.
 - e) Manutenção de registros de campo e cadeia de custódia
 - f) Processamento, preservação e envio de amostras ao laboratório.
- Descrever os métodos de análises de Mercúrio, Cádmio e Sulfitos de acordo com padrões internacionais
 - Descrever o controle de qualidade e Garantia de Qualidade associados, incluindo a identificação de:
 - a) Métodos analíticos para analitos alvo com limites de detecção capazes de medir concentrações de tecido.
 - b) Fontes de materiais de referência certificados recomendados
 - c) Agências federais atualmente conduzindo programas de comparação inter-laboratorial com Garantia de Qualidade
 - Descrever procedimentos para análise de dados e relatórios de dados de contaminantes de peixes e mariscos.

3. ESTRATÉGIA DE MONITORAMENTO

3.1. Critério de seleção de espécies marinhas

Alguns dos critérios mais importantes para a seleção de espécies de peixes, mariscos para o monitoramento de contaminantes são os níveis de consumo e comercialização de pescado. Dois outros critérios de grande importância são o potencial de bioacumulação, relacionado com características biológicas e ecológicas das espécies, e a extensão da distribuição geográfica (USEPA, 2000).

Além desses três critérios fundamentais para a seleção de espécies-alvo, também é importante que as espécies-alvo sejam corretamente identificadas taxonomicamente evitando problemas de classificação nas categorias de consumo (e.g. “baixa restrição”, “restrição moderada”, “alta restrição”) (USEPA, 1991).

A USEPA recomenda que a coleta seja realizada com uma espécie de marisco (de preferência um molusco bivalve) e uma espécie de peixe ou duas espécies de peixe em cada local de triagem estuarino/marinho. O ideal seria que fossem amostradas uma espécie de marisco e uma espécie de peixe, porém se nenhuma espécie de marisco da lista de espécies-alvo não atender ao critério principal, recomenda-se que se usem duas espécies da lista de peixe estuarino/marinho, sendo um deles uma espécie que se alimenta de fundo.

3.2. Seleção de análises

Nesta seção serão apresentados quais procedimentos utilizados para selecionar os analitos de estudo e quais análises adequadas. A seleção da análise apropriada em programas de monitoramento de contaminantes de peixes e mariscos é essencial para a proteção adequada da saúde dos consumidores de peixes e mariscos (USEPA, 2000).

A concentração de metais e outros poluentes persistentes aumentaram consideravelmente nos compartimentos ambientais, mesmo considerando o fortalecimento das políticas de controle de emissões, novas tecnologias industriais limpas e conscientização pública sobre saúde ambiental.

A disponibilidade e a consequente toxicidade desse legado de contaminantes dependerão, não só da quantidade do poluente liberado, mas do efeito das mudanças ambientais sobre a mobilidade do poluente, biodisponibilidade e toxicidade, que são altamente influenciadas por mudanças nas condições físico-químicas e microbiológicas dos ecossistemas aquáticos.

Sobre a sustentabilidade das cadeias produtivas, e em última análise sobre a economia regional, relatório produzido pela *European Commission Directorate-General for Health and Food Safety - Health and food Audits and Analysis* (DG-SANTE, 2017) lista problemas associados à qualidade e a cadeia produtiva do pescado originado no Brasil, foram relatadas pela *Rapid Alert System For Food and Feed (RASFF) Notifications*. Dentre as nove (9) notificações emitidas, duas (2) estão relacionadas a metais, particularmente cádmio e mercúrio, e uma (1) aos teores de sulfitos, cuja concentrações estariam acima dos limites admissíveis pela União Européia (EU) para essas substâncias em pescado.

Sendo assim, dois metais – cádmio e mercúrio e um analito – sulfito, são recomendados para análises em estudo de triagem. A partir de 1998, os alertas de peixes estavam em vigor para cádmio e mercúrio em vários estados americanos (USEPA, 1999). Esses metais foram identificados como tendo o maior potencial de toxicidade resultante da ingestão de peixes e mariscos contaminados (Ahmed, 1991).

3.3 Analitos de estudo

3.3.1 MERCÚRIO (Hg)

A fonte mais importante de exposição não ocupacional ao Hg é a ingestão dietética de peixe e produtos à base de peixe. O mercúrio da atividade geológica e humana entra no ambiente principalmente como vapor de Hg, é convertido em metilmercúrio em ambientes aquáticos por bactérias e fitoplâncton, e é retido por grupos sulfidríla em tecidos de animais aquáticos. O mercúrio está presente em concentrações mais

altas em espécies no alto da cadeia alimentar, como atum, tubarão e peixe-espada (ATSDR, 2022).

A *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA é responsável por garantir que os frutos do mar vendidos no comércio interestadual dos EUA não contenham níveis excessivos de Hg (FDA, 2018) e monitora os níveis de Hg em frutos do mar e outros alimentos desde a década de 1970. Na década de 1970, os químicos da FDA desenvolveram vários métodos analíticos para a determinação do Hg total em amostras regulatórias. A concentração mais baixa que pode ser determinada com boa precisão (± 5 desvio padrão relativo, RSD) por esses métodos, calculada a partir da concentração da solução padrão mais baixa, volume da solução em decomposição e peso do peixe decomposto, é de aproximadamente 0,2 mg/kg .

Praticamente todo o mercúrio no tecido do peixe está na forma de metilmercúrio, que é tóxico para os seres humanos, com a porcentagem de metilmercúrio em relação ao mercúrio total no tecido muscular aumentando à medida que o peixe envelhece. Vários estudos mostraram que as concentrações de mercúrio no tecido dos peixes geralmente aumentam com a idade e, portanto, com o tamanho (comprimento ou peso), devido ao acúmulo de metilmercúrio com o aumento da duração da exposição; no entanto esta relação não é tão fortemente correlacionada em todas as situações ambientais ou para todas as espécies de peixes (Bache et al., 1971; Bloom, 1992; Kannan et al., 1998; Spry and Wiener, 1991).

A USEPA classificou o metilmercúrio como um grupo C, possível carcinógeno humano, com base em dados inadequados em humanos e evidências limitadas em animais. O mercúrio foi encontrado em peixes e mariscos de estuarinos/marinhos (NOAA, 1987, 1989) e de águas doces (Schmitt e Brumbaugh, 1990) em diversos locais em todo o país.

3.3.2 CÁDMIO (Cd)

O cádmio é um metal tóxico acumulativo; demonstrou causar disfunção renal e uma doença óssea degenerativa, em populações japonesas expostas ao consumo de arroz, peixe e água contaminados. Como o cádmio é retido no rim, os indivíduos mais velhos (com mais de 40-50 anos de idade) normalmente apresentam as maiores concentrações renais de cádmio e a maior prevalência de disfunção renal (USEPA, 1979).

O cádmio é comumente encontrado em minérios de zinco, chumbo e cobre (May e McKinney, 1981). É liberado no meio ambiente por diversas fontes antrópicas: fundição e refino de minérios, galvanoplastia, aplicação de fertilizantes fosfatados, drenagem superficial de minas (Farag et al., 1998; USEPA, 1978) e operações de descarte de resíduos (incineração municipal e pedido) (USEPA, 1979, 1987). O cádmio

também é usado na fabricação de tintas, ligas, baterias e plásticos e tem sido usado no controle de toupeiras e doenças de plantas em gramados.

O cádmio é um carcinógeno conhecido em animais, e há evidências limitadas da carcinogenicidade de cádmio ou compostos de cádmio em humanos. Foi classificado pela EPA como um provável carcinógeno humano por inalação (B1) (USEPA, 1987).

3.3.3 CHUMBO (Pb)

O chumbo presente na carne de pescado em baixas concentrações e considerado tóxicos e pode causar problemas sérios na saúde humana (Mckelvey et al., 2007). Esse contaminante entra nos ambientes aquáticos principalmente de forma antrópica através da contaminação causada por indústrias, extração de minérios, emissão de gases, entre outras formas que poluem o meio ambiente.

O chumbo é encontrado em baixas concentrações na crosta terrestre e sua dispersão no ambiente é resultante da atividade antropogênica como a mineração e transporte e amplo uso na indústria de tintas, baterias e tubulações e, embora o seu uso em aditivos na gasolina tenha sido banido a décadas, traços deste metal podem ser ainda detectados no ambiente (Mikac et al., 2001). O excesso de chumbo nos organismos pode causar efeitos cardiovasculares e reprodutivos adversos além de danos neurológicos e doenças renais (Garza et al., 2006). As formas inorgânicas e orgânicas do chumbo são encontradas no pescado, sendo a primeira mais freqüente e a última mais tóxica e absorvida pelos organismos. Grande variedade de peixes pode assimilar e acumular níveis elevados desse elemento (Repula et al., 2012). Peixes de água doce no Missouri, Estados Unidos apresentaram níveis de chumbo no sangue acima de 0,3 mg/kg nos locais próximos ao despejo desse elemento ocorrido por rompimento de barragem (Manson, 1991).

O conhecimento sobre o potencial risco do consumo de peixes que possam apresentar teores de cádmio e chumbo acima dos LMT (Limites Máximos Toleráveis) é de suma importância para subsidiar as agências de saúde e de vigilância sanitária sobre as recomendações dos níveis seguros de consumo em particular para crianças, mulheres grávidas e lactantes.

3.3.4 SULFITO

O pescado é o alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração devido a seu pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água, alto teor de nutrientes facilmente disponíveis a microrganismos, além da destruição causada pelas próprias enzimas presentes e habitat natural (Huss, 1995; Soares, 2012).

O metabissulfito de sódio tem sido o mais empregado anti-melanótico no pescado, por ser de fácil acesso, ter notáveis qualidades por efeito sanitizante, antioxidante, antimicrobiano e inibidor de escurecimento, além de apresentar um maior rendimento em dióxido de enxofre e estabilidade quando comparado aos outros compostos a base de sulfito, normalmente empregados (Favero et al., 2011; Andrade et al., 2015b).

Desta forma, o dióxido de enxofre não causa efeitos adversos na maioria das pessoas, se usados dentro das quantidades permitidas. Os limites máximos para sulfitos foram inclusos nas normas gerais para aditivos alimentares, desenvolvido pelo *Codex Committee*, sobre aditivos alimentares e contaminantes, e aprovado pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0-0,7mg/kg por peso corporal (WHO, 2000). A legislação brasileira, seguindo o Codex Stan 192-1995, estipula o limite máximo do teor residual de dióxido de enxofre, em camarão para consumo, de 100ppm para camarão cru e 30ppm para produto cozido (FAO/WHO 1995) (BRASIL, 1988). Porém, o uso dos sulfitos como inibidor da melanose, apesar de ser comum, pode causar sérios riscos à saúde humana devido à ingestão ou uso de sulfitos reportados por alguns autores (Warner, 1990; Andrade et al., 2015b).

No Brasil, os estudos acerca do metabissulfito de sódio em camarão seguem diversas linhas relacionadas a seu uso, efeitos na qualidade do camarão (Cintra et al., 1999; Gama, 2015), relação entre quantidade e tempo de exposição (Goés, 2006; Andrade et al., 2015), métodos alternativos ao sulfito (Yokoyama, 2007; Fossati et al., 2014), a pesquisa do teor médio residual de dióxido de enxofre na comercialização por região e os métodos de análise.

4. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS

Esta seção fornece orientação sobre o procedimento de coleta de campo, preservação e envio de amostras para um laboratório de processamento para análise. O planejamento e a documentação de todos os procedimentos de campo são enfatizados para garantir que as atividades de coleta sejam econômicas e que a integridade da amostra seja preservada durante todas as atividades de campo. Problemas como o uso de número desigual de amostras compostas, números desiguais de amostras replicadas coletadas em diferentes estações e tamanhos de peixes dentro de uma amostra composta excedendo a recomendação para amostras compostas, devem ser solucionados.

4.1. Coleta de amostras

Para definir as espécies de pescado a serem amostradas é necessária que um inventário seja elaborado para garantir que as espécies de maior interesse econômico e para o consumo humano seja identificada e incluída. Esse levantamento deve ser

baseado em dados de produção pesqueira locais, incluindo volume desembarcado por espécie, volume exportado por espécie e espécies que compõem a produção aquícola local. Levantamentos nos pontos de comercialização de pescado também devem ser considerados importantes, especialmente em regiões onde a pesca artesanal contribui com uma grande parcela da produção pesqueira e, portanto, com o fornecimento de pescado para o consumo humano local.

Os dados de comprimento total (CT) e peso (kg) devem ser coletados de cada indivíduo (Figuras 1 e 2). No entanto, sabe-se que muitas vezes a aquisição de pescado se dá em mercados e pontos de desembarque onde o produto pode ou não ser encontrado inteiro. Amostras de tecido muscular devem ser coletadas e analisadas preferencialmente, visto que esse é o principal tecido consumido do pescado. Durante todo o processo de manuseio das amostras (coleta, preparo e análises), luvas de nitrila limpas devem ser usadas durante todo o processo de manuseio da amostra. Indivíduos das espécies selecionadas devem ser enxaguados em água ambiente para remover qualquer material estranho da superfície externa.

Amostras compostas devem ser preparadas quando não houver quantidade suficiente de tecido muscular por indivíduo coletado. O método de amostragem composta permite que uma quantidade maior de material muscular seja analisada, garantindo que o método analítico será capaz de quantificar os contaminantes presentes em concentrações traço. Após o processamento inicial para determinar a espécie e o tamanho cada um dos cinco peixes considerados adequados para a amostra composta será embrulhado individualmente em placa de Petri e levado ao congelador para posterior liofilização.

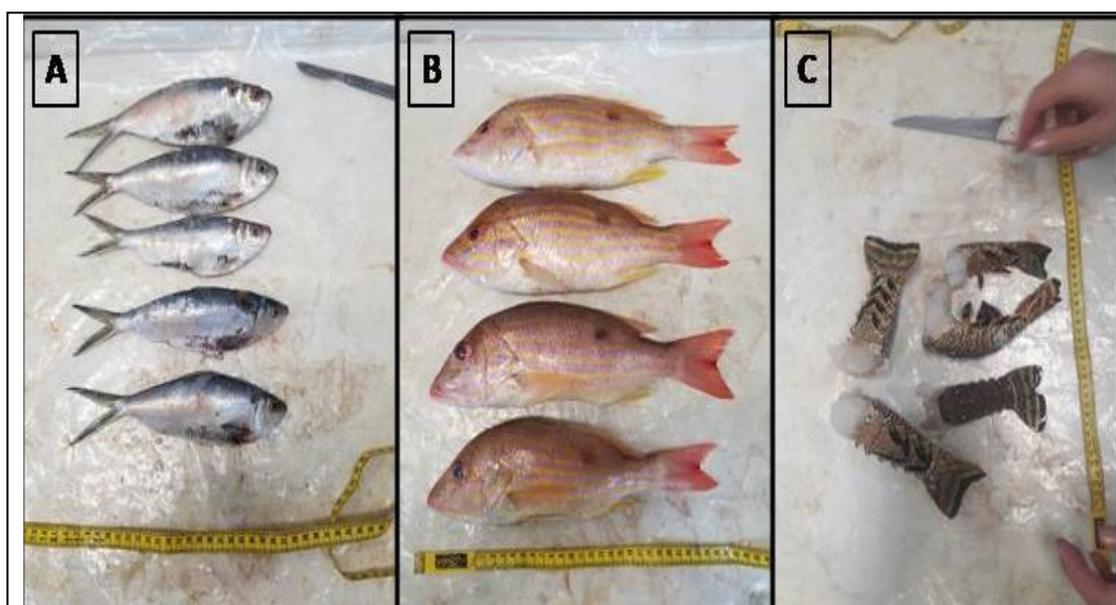


Figura 1. Medição dos peixes coletados: *Ophistonema oglinum* (A), *Lutjanus synagris* (B) e *Panulirus argus* (C)

A amostragem dos indivíduos deve ser realizada nos pontos de comercialização de pescado ou diretamente com os pescadores artesanais, no momento de desembarque. Aproximadamente, 10 a 20 gramas do tecido comestível (geralmente tecido muscular) devem ser coletados para quantificação de metais traço e sulfitos.



Figura 2. Peixes coletados: *Scomberomorus brasiliensis* (A), *Rhizoprionodon porosus* (B), *Hypanus sp.* (C) e amostras liofilizadas (D).

4.2 Requisitos de manuseio e Custódia de amostras

Assim que possível após a coleta, a equipe de amostragem inicia o processo de identificação, rotulagem, embalagem e armazenamento da(s) amostra(s). Cada amostra é identificada e rastreada com um código composto por caracteres e números seguido por um número de amostra de dois dígitos, que identificará cada em toda a documentação e registros, incluindo o seguinte:

- Formulário de Registro de Campo;
- Etiqueta de Identificação da Amostra;
- Formulário de Cadeia de Custódia.

Cada amostra (ou seja, peixe individual) é rotulada afixando uma Etiqueta de Identificação da Amostra, bem como é registrada todas as informações no Formulário de Registro de Campo (Figura 2) com as seguintes informações:

- Nome do projeto
- Identificação do local
- Número da amostra
- Código composto
- Data da amostra (mês/dia/ano),
- Hora da coleta
- Conservante utilizado (gelo seco ou congelado)
- Nome do coletor (líder da equipe de campo).

REGISTRO DE CAMPO PARA ESTUDO EM TECIDO DE PEIXE E PESCADO EM GERAL

Identificação da amostra: _____

Data de Amostragem: _____

Método de coleta: _____

Nome do responsável pela coleta: _____

Localização do site		Cidade: _____		
Descrição do local:				
Nome do Local: _____				
Descrição da Amostra		Número total de indivíduos: _____		
Espécies de Peixes: _____				
Amostra	Comprimento (mm)	Localização	Data/Hora	Observações
01	_____	_____	_____	_____
02	_____	_____	_____	_____
03	_____	_____	_____	_____
04	_____	_____	_____	_____

Figura 3. Registro de campo para amostras de pescado.

Todas as amostras são transferidas para o laboratório de preparação de amostras sob cadeia de custódia. O Formulário de Cadeia de Custódia (Figura 4) funciona como um registro de remessa de amostra e um catálogo do conteúdo de cada remessa (coincidindo com as informações do registro de campo). Todas as entradas do Formulário de Cadeia de Custódia são feitas contendo as seguintes informações:

- Nome, endereço e número de telefone do Gerente de Projeto
- Nome e número de telefone do responsável pela coleta
- Nome do projeto
- Número de página

- Local de amostragem
- Data e hora da coleta
- Tipo de conservante (gelo seco ou congelado)
- Tipo de análise necessária
- Código de cada amostra
- Assinatura do responsável pela coleta
- Data e hora de recebimento no laboratório
- Assinatura do destinatário responsável

Formulário de identificação de amostras para quantificação de contaminantes							
Responsável:			Situação da amostra (úmida / seca)	Analitos de interesse			
Fone:							
Email:							
Descrição de amostras		Lat./Long.:					
Origem:		Forma de preservação:					
Tipo de amostra:		Espécie:	OBS.:				
Data	Hora	Identificação da amostra / número lote	Hg	Cd	Pb	outros	
Entregue por (assinatura):				Data:			
Recebido por (assinatura):				Data:			

Figura 4. Formulário de Custódia de Amostra de pescado.

5. PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES DAS AMOSTRAS

5.1. Análise de mercúrio

A quantificação de Hg total deve seguir recomendação da USEPA (2000). Pesa-se cerca de 0,5 g do material a ser analisado e a digestão do material coletado segue a metodologia descrita por Costa e Lacerda (2014), a qual consiste em dissolução da musculatura liofilizada em ácido nítrico (HNO₃) 65% e, por seguinte, acréscimo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A concentração de Hg é mensurada utilizando Espectrômetro de Absorção Atômica com sistema de geração de vapor frio (CVAAS – NIPPON RA3 – Figura 6), conforme mostra o fluxograma da Figura 5. A determinação

das concentrações de Hg em material de referência (BB-422, Fish Muscle) e a verificação do limite de detecção, junto a cada análise, são utilizadas para validação das análises de Hg.

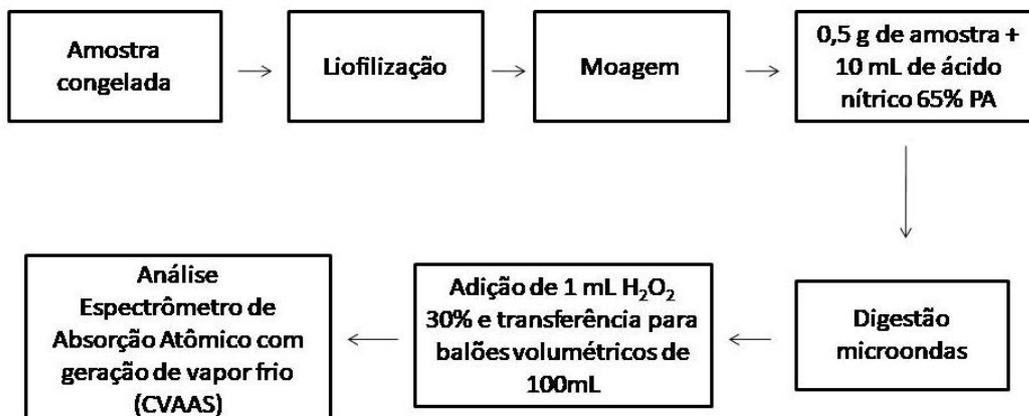


Figura 5. Fluxograma do protocolo operacional de análise de mercúrio.



Figura 6. Equipamento de Espectrometria de Absorção Atômica com sistema de geração de vapor frio (CVAAS).

5.2. Análise de Cádmi e Chumbo

Foram quantificados nas amostras coletadas os metais cádmio e chumbo através da metodologia recomendada pela USEPA (2000). Pesa 0,5 a 2 gramas da amostra liofilizada diretamente em tubos de Teflon, livre de contaminantes e em seguida, é adicionado em cada tubo 10 mL de ácido nítrico 65%. A digestão do material é baseada na metodologia adaptada de Costa e Lacerda (2014), utilizando um equipamento de micro-ondas da marca CEM MARS modelo MD 1744 (Figura 8) e a

concentração dos metais (Cd e Pb) é medida através da técnica de Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama (AA 7000), utilizando uma mistura gasosa de Acetileno/Ar Sintético, conforme mostra o fluxograma da figura 7.A determinação das concentrações de Cd e Pb em material de referência (BCR 60 – *Aquatic Plant*) e a verificação do limite de detecção, junto a cada análise, são utilizadas para validação das análises de Cd e Pb.

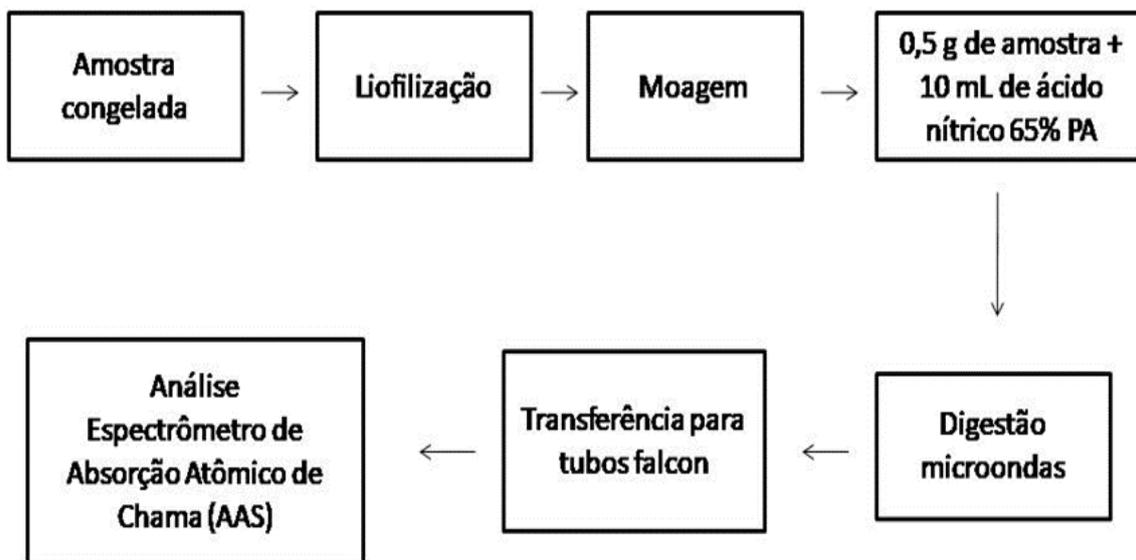


Figura 7. Fluxograma do protocolo operacional de análise de chumbo e cádmio.

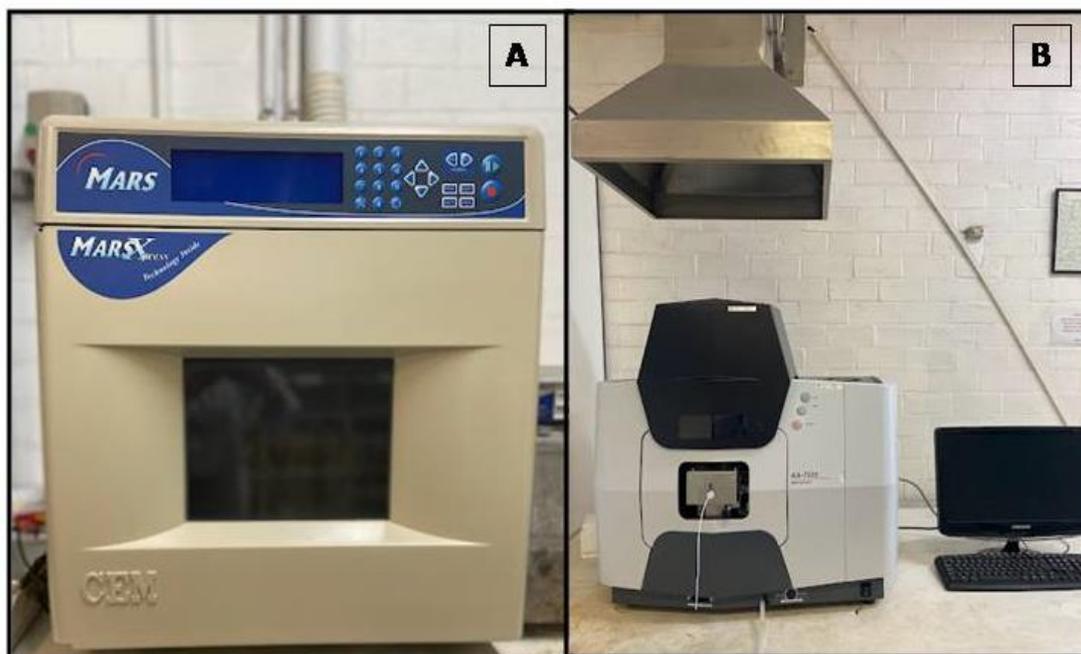


Figura 8. A) Equipamento de micro-ondas. B) Equipamento de Absorção Atômica por Chama.

5.3. Análise de sulfito (método Monier-Williams)

O método Monier-Williams otimizado mede o sulfito livre mais a porção reproduzível de sulfitos ligados, como produtos de adição de carbonila, em alimentos. A porção de teste é aquecida com refluxo de HCl (ca 1M) para converter sulfito em SO₂. O fluxo de N₂ introduzido abaixo da superfície da solução em refluxo varre SO₂ através do condensador resfriado a água e, via borbulhador ligado ao condensador, com solução de H₂O₂ a 3%, onde SO₂ é oxidado para H₂SO₄. O teor de sulfito está diretamente relacionado ao H₂SO₄ gerado, que é determinado por titulação com solução padronizada de NaOH. Para verificação, o sulfato pode ser determinado por gravimetria como BaSO₄ (Figura 9).

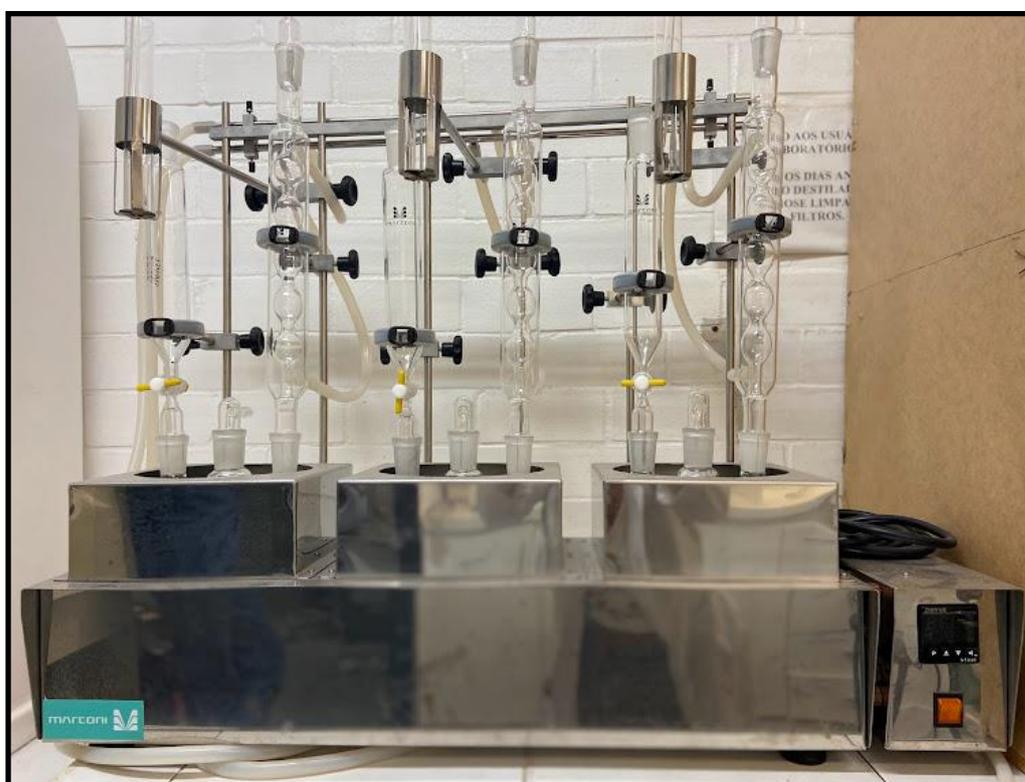


Figura 9. Equipamento de digestão e destilação de dióxido de enxofre.

6. ANÁLISE DE DADOS

Esta seção irá descrever os requisitos gerais de controle de qualidade (CQ) e garantia de qualidade (GQ). A garantia de qualidade e o controle de qualidade devem ser partes integrantes de cada programa de análise química. O processo de controle de qualidade consiste na revisão e supervisão da gestão nos estágios de planejamento, implementação e conclusão da atividade de coleta de dados analíticos para garantir que os dados fornecidos tenham a qualidade necessária. O processo de CQ inclui as atividades necessárias durante a coleta de dados para produzir a qualidade de dados desejada e documentar a qualidade dos dados coletados (USEPA, 2000).

Durante a implementação da coleta de dados, as atividades de Garantia de Qualidade garantem que o sistema de Controle de Qualidade esteja funcionando de forma eficaz e que as deficiências descobertas pelo sistema de Controle de Qualidade sejam corrigidas. Depois que os dados analíticos são coletados, as atividades de Garantia de Qualidade se concentram na avaliação da qualidade dos dados obtidos para determinar sua adequação para apoiar decisões de monitoramento adicional, avaliações de risco ou emissão de avisos.

6.1 Calibrações e suas verificações

É responsabilidade de cada analista garantir que os procedimentos de calibração adequados sejam desenvolvidos e seguidos para cada método analítico para garantir a precisão dos dados de medição. Os procedimentos de calibração devem incluir provisões para documentar frequências de calibração, condições, padrões e resultados para descrever adequadamente o histórico de calibração de cada sistema de medição.

Padrões de calibração de precisão conhecida e documentada devem ser usados para garantir a precisão dos dados analíticos. Cada laboratório deve ter um programa para verificar a precisão e rastreabilidade dos padrões de calibração em relação aos mais altos padrões de qualidade disponíveis. Se possível, NIST-SRMs ou outros padrões de referência certificados devem ser usados para padrões de calibração. Condições de armazenamento apropriadas (ou seja, especificações do recipiente, prazo de validade, temperatura, umidade, condição de luz) devem ser documentadas e mantidas.

Antes de iniciar as análises de rotina de amostras, deve-se construir uma curva de calibração para cada analito de interesse, de preferência com cinco padrões de calibração, cobrindo a faixa de trabalho normal do instrumento ou a faixa de concentração de analito de interesse esperada das amostras a ser analisado. O padrão de calibração de concentração mais baixa deve estar próximo ao limite de detecção do método estimado. Os padrões de calibração devem ser preparados na mesma matriz (ou seja, solvente) que o extrato ou digerido da amostra final. Critérios para calibração aceitável, como por exemplo, limites aceitáveis para R^2 , inclinação, interceptação, porcentagem de recuperação, fatores de resposta, devem ser estabelecidos para cada método analítico. Se esses limites de controle forem excedidos, a origem do problema, por exemplo, padrões imprecisos, instabilidade do instrumento ou mau funcionamento, deve ser identificado e as ações corretivas apropriadas devem ser tomadas. Nenhuma análise será realizada até que uma calibração aceitável tenha sido alcançada e documentada.

Nas análises realizadas para este protocolo, foi realizada calibração externa, pois se trata de análises de metais (consulte a Figura 10). Na calibração externa, os padrões de calibração com concentrações conhecidas dos analitos de interesse são analisados, independentemente das amostras, para estabelecer a relação entre a

resposta do instrumento e a concentração do analito. A calibração externa para análise de metais é considerada aceitável se a porcentagem de recuperação de todos os padrões de calibração estiver entre 95 e 105 por cento (USEPA, 2000). A Tabela 1 mostra as faixas de linearidade para os metais (Hg, Cd e Pb) de interesse descritos neste protocolo.

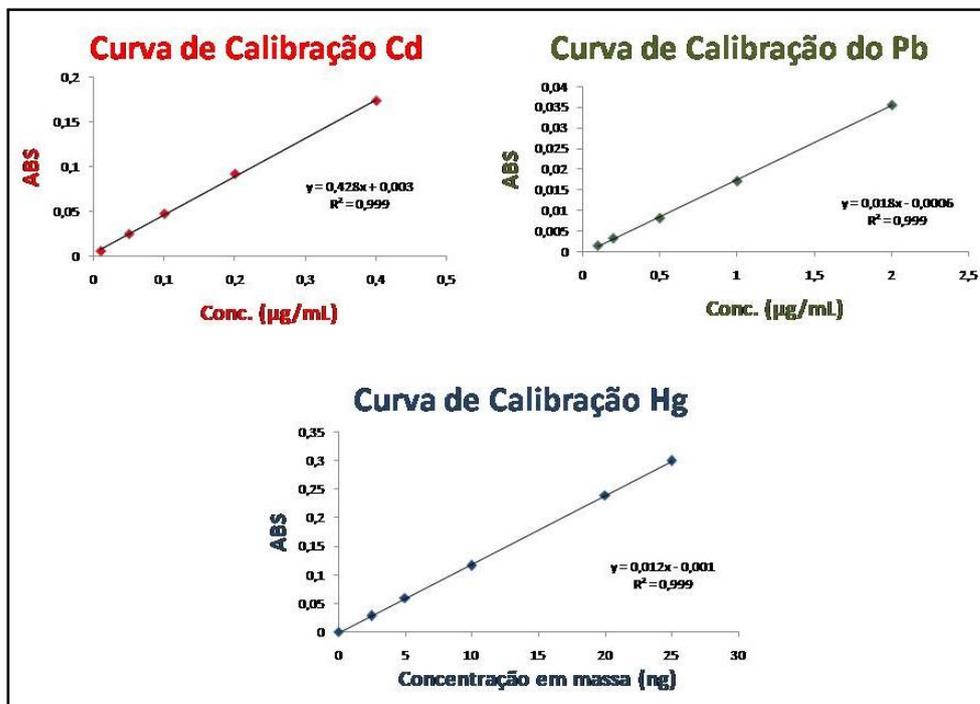


Figura 10. Curvas de Calibração para Cd, Pb e Hg.

Tabela 1. Faixa de linearidade das curvas de calibrações determinadas para cada um dos analitos de interesse, de acordo com o procedimento descrito e equipamentos utilizados. Para Cd e Pb a faixa está em µg/mL e para Hg a faixa é apresentação em massa (ng).

Metal	Faixa de Linearidade
Cádmio (Cd)	0,05 – 0,4
Chumbo (Pb)	0,2 – 2,0
Mercúrio (Hg)	0 - 25

6.2 Limite de detecção e limite de Quantificação

É responsabilidade de cada laboratório determinar os limites de detecção e quantificação apropriados para cada método analítico de cada analito em uma matriz de tecido de peixe ou marisco. Os limites de detecção e quantificação devem ser determinados antes do uso de qualquer método para análises de rotina e caso haja alteração significativa no método durante a análise. Vários fatores influenciam os limites de detecção e quantificação alcançáveis, independentemente do procedimento

analítico específico. Estes incluem a quantidade de amostra disponível, interferências de matriz e estabilidade da instrumentação.

O Limite de Detecção (LD) é a concentração mais baixa que pode ser determinada estatisticamente diferente de um método em branco em um nível de confiança especificado. O valor recomendado para o LD é três vezes o desvio padrão do branco em análises replicadas (mínimo sete brancos), correspondendo a um nível de confiança de 99%. O LD considera os contaminantes em branco, mas não os efeitos ou interferências da matriz.

O Limite de Quantificação (LQ) é a concentração acima da qual os resultados quantitativos podem ser obtidos com um determinado grau de confiança. É a concentração mínima permitida a ser relatada em um nível de confiança especificado sem qualificações que deve ser derivado para cada analito. O valor recomendado para o LQ é 10 vezes o desvio padrão de um método em branco em análises replicadas (mínimo sete brancos). O LOQ é o limite de quantificação recomendado no Programa EPA EMAP-NC (USEPA, 1991). O LQ deve levar em conta os efeitos e interferências da matriz. Atualmente, não há orientação consistente na literatura científica para determinar LQ, porém o Comitê de Melhoramento Ambiental da *American Chemical Society* (Keith et al. 1983), definiu um tipo de limite de quantificação.

O laboratório analítico não tem responsabilidade ou autoridade para censurar dados. Portanto, todos os dados devem ser relatados com documentação completa de limitações e problemas. Os limites de detecção e quantificação do método devem ser usados para qualificar os dados relatados para cada amostra composta da seguinte forma (Keith, 1983):

- A concentração "zero" (sem resposta observada) deve ser relatada como não detectada (ND) com o LD anotado, por exemplo, "ND (LD= "valor")".
- Concentrações abaixo do LD devem ser relatadas com a qualificação de que estão abaixo do LD.
- As concentrações entre o LD e o LQ devem ser relatadas com a qualificação de que estão abaixo do limite de quantificação.
- Concentrações iguais ou superiores ao LQ podem ser relatadas e usadas sem qualificação.

Tabela2. Valores de Limites de Detecção e Limites de Quantificação obtidos em análises de peixes e mariscos no Laboratório de Biogeoquímica Costeira, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC).

	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
Cádmio	0,002 µg/mL	0,007 µg/mL
Chumbo	0,04 µg/mL	0,145 µg/mL
Mercúrio	0,05 ng	0,23 ng

6.3 Coeficiente de Variação nas amostras

A precisão de cada método analítico deve ser avaliada e documentada para cada analito de interesse antes da realização das análises de rotina e regularmente durante as análises de rotina. A precisão é definida como a concordância entre um conjunto de medições replicadas sem a suposição de conhecimento do valor verdadeiro. É estimada por meio das análises de amostras homogêneas de tecido duplicado ou replicado contendo concentrações do analito de interesse. Todas as amostras utilizadas para avaliação da precisão total do método devem ser submetidas ao procedimento analítico completo, incluindo extração ou digestão.

A estimativa de precisão mais comumente usada é o coeficiente de variação (CV) para várias amostras quando apenas duas amostras estão disponíveis. Este é definido da seguinte forma:

$$CV = \frac{S}{\bar{x}_i} \times 100$$

Onde:

S = Desvio padrão das medidas das amostras em replicata.

\bar{x}_i = Média aritmética das medidas das amostras em replicata.

O número de réplicas que devem ser analisadas para a avaliação inicial da precisão do método deve ser determinado por cada laboratório para cada procedimento analítico com a concordância do gerente do programa (USEPA, 2000). Como a precisão pode depender da concentração, as avaliações iniciais de precisão em toda a faixa de trabalho estimada devem ser obtidas, sendo o valor de CV adotado para este protocolo no valor de 10% entre duplicatas das amostras.

6.4 Recuperação do padrão certificado

O uso apropriado de materiais de referência é uma parte essencial das boas práticas de GQ e CQ para química analítica. Material de Referência Certificado (CRM - *Certified Reference Material*) é um material de referência cujos valores de uma ou mais propriedades foram certificados por uma variedade de procedimentos tecnicamente válidos. Os CRMs são acompanhados ou rastreáveis a um certificado ou outra documentação emitida pela organização certificadora.

Materiais de referência podem ser usados tanto fornecer informações sobre a precisão do método e, quando analisado em replicação, sobre a precisão, quanto para obter estimativas de comparabilidade intermétodos e/ou interlaboratoriais. Algumas diretrizes devem ser seguidas para garantir o uso adequado de materiais de referência:

- Quando é utilizada para avaliar a precisão de um método analítico, a matriz do material de referência deve ser o mais semelhante possível à das amostras de interesse. Se forem usados materiais de referência em matrizes diferentes de tecido de

peixe ou marisco, os possíveis efeitos da matriz devem ser abordados na análise ou interpretação final dos dados.

- As concentrações dos materiais de referência devem cobrir a faixa de concentrações possíveis nas amostras de interesse.

- Os materiais de referência devem ser analisados antes do início das análises de amostras de campo para avaliar a capacidade do laboratório e depois regularmente para detectar e documentar quaisquer mudanças no desempenho do laboratório ao longo do tempo.

- Os resultados das análises de materiais de referência são essenciais para avaliar a comparabilidade interlaboratorial ou entre métodos. Os resultados reportados devem incluir os resultados de amostras não corrigidos e recuperações percentuais de materiais de referência.

A precisão é calculada como porcentagem de recuperação da análise do Material Certificado de Referência, de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{Rec.CRM} = \left(\frac{C_{\text{amostra}}}{C_{\text{certificado}}} \right) \times 100$$

Onde:

C_{amostra} = Concentração média do analito alvo;

$C_{\text{certificado}}$ = Concentração do Material Certificado de Referência do analito alvo.

Os valores percentuais de recuperação devem estar dentro dos limites de controle estabelecidos. De acordo com USEPA (2000) os valores de referência para recuperação do SRMs ou CRMs em metais é de 85-115%. Se a porcentagem de recuperação estiver fora do limite de controle, as análises devem ser descontinuadas, ações corretivas apropriadas devem ser tomadas e, se possível, as amostras associadas ao pico devem ser reanalisadas. Se a reanálise não for possível, todos os dados suspeitos devem ser claramente identificados.

O baixo desempenho na análise de materiais de referência ou a baixa recuperação podem ser causados pela homogeneização inadequada da amostra, digestão inconsistente ou procedimentos de extração inadequados, interferências de matriz ou problemas de instrumentação. Se as análises replicadas forem aceitáveis (consulte a Seção 8.3.3.5), são indicadas interferências de matriz ou perda de analitos alvo durante a preparação da amostra. Para verificar a perda de analitos alvo durante a preparação da amostra, deve ser realizado um exame passo a passo do procedimento usando brancos enriquecidos. A Figura 11 mostra a evolução da variabilidade na recuperação do material de referência ERM BB422 – *Fish Muscle* e se enquadram dentro dos valores estabelecidos pela USEPA.

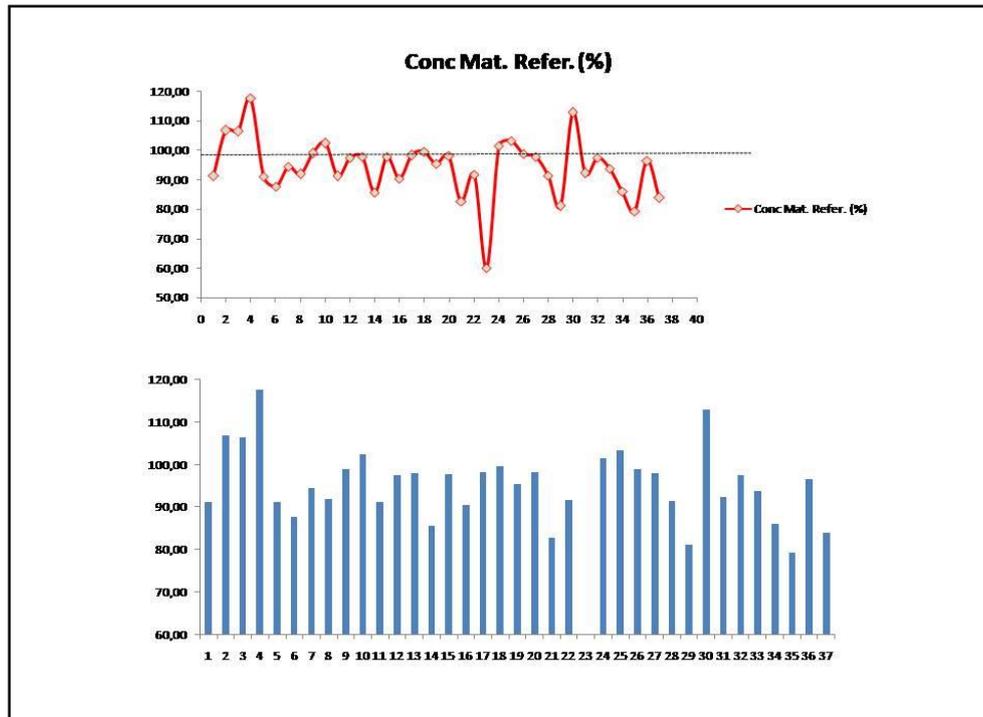


Figura 11. Variabilidade da recuperação do material certificado de referência (ERM BB422 – Fish Muscle) com n = 37.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2022. *Toxicological Profile for Mercury (Draft for Public Comment)*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>

ANDRADE, L. T.; ARAÚJO, N. G.; VENTURA, A. P. M.; LIRA, A. L.; MAGNANI, M.; CAVALHEIRO, J. M. O. 2015a. Standardization of sodium metabisulfite solution concentrations and immersion time for farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ciência Rural* 45(3): 499-504. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84925015184&origin=inward&txGid=4e650e933fdcce6b84d5f9999cf836b0>

ANDRADE, L. T.; VENTURA, A. P. M. 2015b. Uso do dióxido de enxofre na despesca e beneficiamento de camarão. *Revista Principia* 1(28): 66-77. <https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/viewFile/423/332#:~:text=Na%20produ%C3%A7%C3%A3o%20do%20camar%C3%A3o%20marinho,de%20%C3%A1gua%2C%20gel%20e%20conservante.>

BACHE, C.A., W.H. GUTENMANN, AND D.J. LISK. 1971. Residues of total Mercury and methylmercuric salts in lake trout as a function of age. *Science* 172: 951. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.172.3986.951>

BLOOM, N.S. 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(5): 1010-1017. <https://doi.org/10.1139/f92-113>

BRASIL 1988. Ministério da Saúde. Conselho Nacional da Saúde. *Resolução Nº4 de 24 de novembro de 1988*. Brasília, DF. https://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1988/res0004_24_11_1988.html

BRITO FILHO, D. 1988. *Toxicologia Humana e Geral*. 2. ed. Rio de Janeiro e São Paulo: Livraria Atheneu, 678 p.

CINTRA, H. A; OGAWA, N. B. P; SOUZA, M. R.; DINIZ, F. M.; OGAWA, M. 1999. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use of sulfites in shrimp. *Food Science and Technology* 19(3): 314-317. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000300003>

CONDEX STAN 192-1995. *General standard for food additives. Codex Alimentarius*. FAO: Roma: 2018. Disponível em: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf Acessado em: Outubro 2022.

DG-SANTE. 2017. *Fishery products. European Commission Directorate-General (ECDG) for Health and Food Safety - Health and Food Audits and Analysis*. DG(SANTE) 2017-6278. Ref. Ares (2018) 3086594. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/audits-analysis/audit_reports/details.

FARAG, A.M., D.F. WOODWARD, J. N. GOLDSTEIN, W. BRUMBAUGH, and J.S. MEYER. 1998. Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur D'Alene River Basin, Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34: 119-127. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002449900295>

FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. S. G.; AQUINO, A. D. 2011. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. *Segurança Alimentar e Nutricional* 18(1):11-20. <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634684>

FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2018. *An Exposure Assessment for Methylmercury from Seafood for Consumers in the United States*. <https://wayback.archive-it.org/7993/20170404230636/https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM114740.pdf>

FOSSATI, A. M. N. 2014. Influência de aditivos alimentares sobre as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do camarão *Xyphopenaeus kroyeri*. Porto Alegre, 90p. Dissertação – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/97879>

GAMA, L. G. 2015. Influência do teor residual de sulfito sobre a qualidade do camarão marinho. João Pessoa. 86p. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba. https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/7905?locale=pt_BR

GARZA, A.; VEGA, R.; SOTO, E. 2006. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor* 12(3): 57-65. <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/447121>

GÓES, L. M. N. B.; MENDES, P. P.; MENDES, E. S.; RIBEIRO, C. M. F.; SILVA, R. P. P. 2006. Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Biological Sciences* 28(2): 153-157. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v28i2.1039>

HUSS, H. H. 1995. *Quality and quality changes in fresh fish*. Rome: FAO, *Fisheries Technical paper* 348. <https://www.fao.org/3/v7180e/v7180e00.htm>.

KANNAN, K., SMITH JR., R.G., LEE, R.F., WINDOM, H.L., HEITMULLER, P.T., MACAULEY, J.M., SUMMERS, J.K. 1998. Distribution of total mercury and methyl mercury in water, sediment, and fish from south Florida estuaries. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34: 109-118. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002449900294>

KEITH, L.H., W. CROMMETT, J. DEEGAN, JR., R.A. LIBBY, J.K. TAYLOR, AND G. WENTLER. 1983. Principles of environmental analysis. *Analytical Chemistry*. 55: 1426-1435. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac00264a003>

LACERDA, L.D. 2007. Biogeoquímica de contaminantes no Antropoceno. *Oecologia Brasiliensis* 11: 297-301. <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/download/5672/4259>

MANSON, C. F. 1991. *Biology of freshwater pollution*. 2ed. New York: John Willey and Sons. 351 p.

MAY, T.W., AND G.L. MCKINNEY. 1981. Cadmium, lead, mercury, arsenic and selenium concentrations in freshwater fish, 1976-1977 — National Pesticide Monitoring Program. *Pesticides Monitoring Journal* 15(1):1 4-38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7279594/>

MCKELVEY, W.; GWYNN, R. C.; JEFFERY, N.; KASS, D.; THORPE, L. E.; GARG, R. K.; PALMER, C. D.; PARSONS, P. J. 2007. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environmental Health Perspective*, 115: 1435-1441. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938732/>

MIKAC, N.; BRANICAA, M.; HARRISON, R.M. 2001. Total and organic lead distribution in water, sediment and organisms from eastern Adriatic coast. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 13:121-128. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3184/095422901782775381>

AHMED, F.E. 1991. *Seafood Safety*. Institute of Medicine (US) Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products, National Academy Press, Washington, DC. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25144082/>

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 1987. National Status and Trends Program for Marine Environmental Quality—Progress Report: A Summary of Selected Data on Chemical Contaminants in Tissues Collected During 1984, 1985 and 1986. *NOAA Technical Memorandum NOS OMA* 38. U.S. Department of Commerce, Rockville, MD. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/2826>

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 1989. *National Status and Trends Program for Marine Environmental Quality – Progress Report: A Summary of Selected Data on*

Tissue Contamination from the First Three Years (1986-1988) of the Mussel Watch Project.
<https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/2852>

OECD. 2017. The Organization for Economic Cooperation and Development. OECD and the Sustainable Development Goals: Delivering on universal goals and targets.<https://www.oecd.org/dac/sustainable-development-goals.htm>

REPULA, C. M. M.; CAMPOS, B. K.; GANZAROLLI, E. M.; LOPES, M. C.; QUINÁIA, S. P. 2012. Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. *Química Nova* 35(5): 905-909.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500008>

SMIL, V. 2002. Nitrogen and food production: proteins for human diets. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 31(2): 126-131. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.126>

SCHMITT, C.J., & W.G. BRUMBAUGH.1990. National Contaminant Biomonitoring Program: Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, selenium, and zinc in U.S. freshwater fish, 1978-1984. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 19:731-747. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21318505/>

SOARES, K.M.P; GONÇALVES, A.A. 2012. Qualidade e segurança do pescado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 71(1): 1-10.<https://doi.org/10.53393/rial.2012.v71.32384>

SPRY, D.S., & J.G. WIENER. 1991. Metal availability and toxicity to fish in low alkalinity lakes: a critical review. *Environmental Pollution*. 71(2-4):243-304. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90034-T](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90034-T)

TELLES FILHO, P. A. 2004. *Asma brônquica – Tipos de asma – Asma por sulfitos*. Disponível em: https://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_classifica.html

UN (United Nations). 2016. The First Global Integrated Marine Assessment. United Nations, http://www.un.org/depts/los/global_reporting/WOA_RPROC/Chapter_36B.pdf

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1978. *Metal Bioaccumulation in Fish and Aquatic Invertebrates*. EPA-600/3-78-103. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Springfield, VA.
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=91013RP8.TXT>

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1979. *Health Assessment Document for Cadmium*. EPA-600/8-79-003. Environmental Standards and Criteria, Office of Research and Development, Research Triangle Park, NC.
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=200089NA.TXT>

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1987. Cadmium Health Advisory Draft. Office of Drinking Water, Washington, DC. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/cadmium-compounds.pdf>

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1991. Environmental Monitoring and Assessment Program (EMAP) Near Coastal Virginian Province Quality Assurance Project Plan. Draft. Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Narragansett, RI. <https://archive.epa.gov/emap/archive-emap/web/pdf/91qaplan.pdf>

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1995. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories, Volume 1: Fish Sampling and Analysis, Second Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/volume1.pdf>

U.S. EPA (Environmental Protection Agency) 1999. EPA Fact Sheet -Update: National Listing of Fish and Wildlife Advisories. EPA-823-F-99-005. Office of Water, Washington DC. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-04/documents/nlfa-factsheet-1999.pdf>

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) 2000. Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories. Vol. 2 Risk assessment and fish consumption limits. Environmental Protection Agency, Washington DC. EPA 823-B-00-008. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=20003P11.TXT>

WARNER, C.R.; FAZIO, T. 1990. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Additives & Contaminants* 7(4): 433-454. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2203650/>

WHO (World Health Organization)2010. Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42245>

YOKOYAMA, V.A. Qualidade do camarão da espécie *Xyphopenaeus kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanóticos. Piracicaba, 2007. 126p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-28022008-154048/publico/vivianeyokohama.pdf>

ZAHIR, F. 2005. Low dose Mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 351–360. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21783611/>