



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Utilização de cães e gatos como sentinelas para a exposição a mercúrio

Rafael Francisco Abrantes Barros

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Ramiro Dias Pastorinho

Co-orientador: Doutora Ana Catarina Almeida Sousa

Covilhã, outubro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores o Professor Ramiro Pastorinho e à Professora Ana Sousa pela orientação nesta dissertação, agradecer pela disponibilidade e paciência que demonstraram ao longo deste ano em que me ajudaram a crescer enquanto pessoa e investigador.

Agradecer à Clínica Veterinária da Covilhã, com a colaboração da Dra. Egídia Guerreiro e do Dr. Hugo Brancal e ao Hospital Veterinário do Baixo Vouga com a colaboração do Dr. Hugo Vilhena o facto de terem disponibilizado as amostras para a realização deste trabalho.

Quero agradecer a todos os meus amigos que me acompanharam ao longo destes 6 anos e que fizeram com que este percurso se tornasse muito mais fácil e que me deram forças para chegar onde cheguei. A eles muito obrigado pela amizade verdadeira que tiveram comigo durante este percurso.

Não quero deixar de agradecer a todas aquelas pessoas que me criticaram e disseram que nunca iria conseguir entregar uma tese, a elas um muito obrigado por me terem tornado mais forte e ainda com mais vontade de cumprir este grande passo na minha vida.

Quero também agradecer a toda a minha família que apesar de muitas vezes estar longe sempre me ajudou em tudo o que precisei, nomeadamente os meus avós e tios.

Agradeço ao padrinho que a praxe me deu, o Sérgio Rodrigues, que ao longo destes anos passou a ser como um irmão para mim, ajudou-me sempre que precisei, criticou-me quando tinha de criticar e acreditou sempre que eu ia conseguir chegar onde cheguei hoje.

Não podia deixar de agradecer também a uma pessoa muito especial que esteve sempre a meu lado nos bons e maus momentos nestes 6 anos, sem ela a universidade não teria sido a mesma coisa, sei que acreditou em mim desde o dia que nos conhecemos. Sofia entramos juntos, saímos juntos. Amizade para toda a vida.

Gostaria de agradecer à minha maninha Margarida por toda a paciência que teve comigo e por me ter dado sempre apoio ao longo de toda a vida, mas principalmente ao longo deste ano onde demonstrou que não é como se começa, mas sim como se acaba.

Ao meu mano André o meu muito obrigado por me teres acompanhado em todos os anos desde que me lembro, discutimos, brincámos juntos, mas o mais importante foi os teus passos que tentei seguir ou não fosses tu o irmão mais velho.

Por último, mas os mais importantes, quero agradecer aos meus pais por me terem dado a oportunidade que eles não tiveram, sei dos sacrifícios que fizeram para me poderem proporcionar a vinda para a universidade, obrigado por me terem dado sempre o melhor mesmo quando isso parecia praticamente impossível, obrigado por me terem educado e passado princípios que mais ninguém poderia passar, obrigado por serem os melhores pais do mundo.

Resumo

A presença de contaminantes ambientais no ar, água, alimentos e ambiente doméstico pode representar riscos significativos para a população humana. Cada vez mais, os humanos dispõem o seu tempo em ambientes interiores e, de forma geral, passam em média mais de 12 horas por dia em casa, ficando expostos a vários tipos de contaminantes presentes no ambiente doméstico. Os animais domésticos, ao partilharem a habitação com os donos ficam sujeitos ao mesmo tipo de contaminantes. O principal objetivo deste trabalho é monitorizar os níveis de mercúrio em cães e gatos de companhia, na região Centro de Portugal (Aveiro e Covilhã), através da análise do seu pelo e sangue. Como objetivo secundário, pretende-se validar a utilização de pelo dos animais de estimação como matriz não invasiva para quantificar as concentrações de mercúrio a que estão expostos. Adicionalmente, pretende-se verificar se estes animais podem actuar como sentinelas para o ser humano, sendo para tal também analisadas amostras de cabelo dos respetivos donos. Para atingir estes objectivos, e em colaboração com médicos veterinários, foram recrutados cães, gatos e respectivos donos para o presente estudo. Foi possível obter amostras de 45 cães, 17 gatos e 18 humanos a fim de analisar a concentração de mercúrio em pelo/cabelo e sangue.

Nos cães analisados foi possível quantificar mercúrio em todas as amostras de pelo com valores entre 11,01 ng/g e 662,08 ng/g. Para as amostras de sangue, foi possível quantificar mercúrio no sangue de 28 animais com valores entre 0,021 ng/g até 21,39 ng/g. Para os restantes 15 cães as concentrações de mercúrio no sangue estavam abaixo do limite de deteção do equipamento. Nos gatos foi possível quantificar mercúrio em todas as amostras de pelo e sangue com valores entre 66,28 ng/g a 887,74 ng/g no pelo e 0,68 ng/g a 33,41 ng/g no sangue. Em geral, os níveis de mercúrio em ambos animais de companhia foram sempre superiores no pelo do que no sangue tendo sido registadas correlações significativas entre as concentrações de mercúrio no pelo e no sangue dos cães e entre as concentrações de mercúrio entre o pelo e o sangue dos gatos. Desta forma, a utilização do pelo foi validada e em estudos futuros esta matriz pode ser utilizada para monitorizar os níveis de mercúrio.

No cabelo humano as concentrações de mercúrio variaram desde 372 ng/g a 3815,42 ng/g, com uma concentração média acima do valor de referência para esta matriz. A concentração de mercúrio no cabelo humano foi superior à concentração de mercúrio registada no pelo dos respetivos animais, no entanto não existe nenhuma correlação significativa entre os níveis de mercúrio nos cães e nos seus donos ($r=-0,6429$, $p=0,0962$) nem entre os gatos e os seus donos ($r=0,4286$, $p=0,3536$). Face aos resultados obtidos não foi possível validar a utilização dos cães e gatos como sentinelas para a exposição de humanos a mercúrio.

Palavras-chave: animais domésticos, cabelo, cães, gatos, mercúrio, pelo, sangue, sentinelas.

Abstract

The presence of environmental contaminants in air, water, food and indoor environment can pose significant risks to human health. Humans spend most of their time in indoor environments and, in general, they spend on average more than 12 hours per day at home, being exposed to several contaminants present in the domestic environment. By sharing the house with their owners, domestic animals are subject to the same type of contaminants.

The main objective of this work is to evaluate mercury levels in dogs and cats, in central Portugal (Aveiro, Covilha), through the analysis of their hair and blood. As a secondary objective, we intend to validate the use of the pets' hair as noninvasive matrix to quantify mercury exposure. In addition, we intend to verify if pets' cats and dogs can act as sentinels for humans, and therefore we also analyzed hair samples of their respective owners. To achieve these objectives, and in collaboration with veterinarians, dogs, cats and their owners were recruited for this study. It was possible to obtain samples of 45 dogs, cats 17 human and 18 in order to analyze the concentration of mercury in the / hair and blood.

Mercury was detected in all dog hair samples with values between 11.01 ng/g and 662.08 ng/g. For blood samples, mercury was below detection limit in 15 dogs, being quantified in 28 dogs with values between 0.021 ng/g and 21.39 ng/g. In cats, mercury was detected in all hair samples with values between 66.28 ng/g to 887.74 ng/g and in all blood samples with values ranging from 0.68 ng/g to 33.41 ng/g. In general, mercury hair levels in both pets were always higher than in blood significant correlations were established between mercury concentrations in the hair and in the blood of dogs and between mercury concentrations between the hair and blood of cats. Thus, the use of hair in cats and dogs has been validated, and therefore this matrix can be used to monitor the levels of mercury in future studies.

In human hair the mercury concentrations ranged from 372 ng/g to 3815.42 ng/g, with an average concentration above the reference value for this matrix. The concentration of mercury in human hair was higher than the concentration of mercury in registered in the respective animals, however there were no significant correlations between the levels of mercury in dogs and their owners ($r = -0.6429$, $p = 0, 0962$) or between cats and their owners ($r = 0.4286$, $p = 0.3536$). In view of the obtained results it was not possible to validate the use of cats and dogs as sentinels for human exposure to mercury.

Key-words: blood, cats, dogs, hair, mercury, pets, sentinels.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Mercúrio: Caracterização geral	1
1.2.	Mercúrio elementar (Hg ⁰).....	4
1.2.1.	Efeitos adversos da exposição a compostos inorgânicos de mercúrio	5
1.2.2.	Efeitos adversos da exposição a mercúrio elementar	6
1.3.	Compostos inorgânicos de mercúrio	6
1.4.	Compostos orgânicos de mercúrio	7
1.5.	O mercúrio no meio ambiente	8
1.5.1.	Atmosfera	8
1.5.2.	Hidrosfera	8
1.5.3.	Solo e Plantas	9
1.5.4.	Peixes	9
1.6.	Fontes de mercúrio para humanos.....	10
1.6.1.	Exposição ocupacional.....	11
1.7.	Efeitos do mercúrio na saúde	12
1.7.1.	Efeitos neurológicos	12
1.7.2.	Efeitos nos rins	13
1.7.3.	Efeitos cardiovasculares	13
1.7.4.	Efeitos reprodutivos	13
1.7.5.	Efeitos epigenéticos	13
1.8.	Animais domésticos como sentinelas	14
2.	Objetivo	17
3.	Materiais e métodos.....	19
3.1.	Amostragem	19
3.1.1.	Seleção dos participantes	19
3.1.2.	Recolha das amostras	20
3.1.3.	Processamento das amostras	21

3.2.	Quantificação de mercúrio	22
3.2.1.	Preparação da curva de calibração	23
3.2.2.	Controlo de qualidade	23
3.3.	Tratamento estatístico	24
4.	Resultados e discussão.....	25
4.1.	QA/QC e Otimização do método de análise de pelo e cabelo	25
4.1.1.	Materiais de referência	25
4.1.2.	Otimização da quantidade de cabelo e pelo a usar	25
4.2.	Concentrações de mercúrio total nas amostras de sangue e pelo de cães	26
4.3.	Concentrações de mercúrio total nas amostras de sangue e pelo de gatos	31
4.4.	Comparação com a literatura	34
4.5.	Níveis de mercúrio em humanos	36
4.5.1.	Comparação dos níveis de mercúrio nos animais e nos respetivos donos	39
5.	Conclusões e perspetivas futuras.....	41
6.	Bibliografia	43
7.	Anexos	49
7.1.	Anexo I - Autorização da DGAV e Autorização ad Comissão de Ética da FCS-UBI.....	49
7.2.	Anexo II - Folheto de Divulgação do projeto PETTO	53
7.3.	Anexo III - Consentimento informado	55
7.4.	Anexo IV- Questionário relativo ao dono do animal	57
7.5.	Anexo V- Questionário relativo ao animal	59
7.6.	Anexo VI- Tabelas com as concentrações de mercúrio total quantificado nos CRMs	61
7.7.	Anexo VII - Características gerais dos cães que participaram no estudo	63
7.8.	Anexo VIII - Características gerais dos gatos que participaram no estudo	65
7.9.	Anexo IX - Características gerais dos humanos que participaram no estudo	67

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração do ciclo global do mercúrio. Adaptado de UNEP (2013)	2
Figura 2. Emissões antropogénicas globais de mercúrio em 2010. Adaptado de UNEP (2013b) .	3
Figura 3. Emissões regionais de mercúrio em 2010. Adaptado de UNEP (2013b)	4
Figura 4. Esquematização do fenómeno de biomagnificação.	9
Figura 5. Esquema representativo das principais fontes de mercúrio para humanos e possíveis órgãos alvo. Adaptado de UNEP (2013b).....	10
Figura 6. Esquema dos efeitos provocados pela exposição ao mercúrio na saúde humana. Adaptado de Kim et al. (2015).	12
Figura 7. Representação esquemática do local onde foi recolhida a amostra de pelo.	20
Figura 8. Etapas do processamento de uma amostra de pelo.	21
Figura 9. Esquema de funcionamento do equipamento NIC-MA-3000 (Nippon Instruments Corporation, Japan).	22
Figura 10. Boxplot com as concentrações de mercúrio (ng/g) no pelo (n=39) e sangue (n=43) dos cães e no cabelo dos respetivos donos (n=9).	29
Figura 11. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no sangue e pelo dos cães elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: género (A); dieta (B); doenças (C); medição (D); Localização (E) e habitat (F). M: macho; F: Fêmea; Comm: Dieta Comercial; Mix: Mistura de dieta comercial e caseira; N (não): sem doença; S (sim): com doença; U: Urbano; R: Rural; A: ambos (casa+rua); C: Casa; R: Rua.....	30
Figura 12. Boxplot com as concentrações de mercúrio (ng/g) no pelo (n=17) e sangue (n=17) dos gatos e no cabelo dos respetivos donos (n=9).....	32
Figura 13. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no sangue e pelo dos gatos elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: género (A); doenças (B); medicação (C); localização (D) e habitat (E). M: macho; F: Fêmea; N (não): sem doença; S (sim): com doença; U: Urbano; R: Rural; A: Ambos (casa+rua); C: Casa.	33
Figura 14. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no cabelo humano elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: presença de amálgamas dentárias (A) e Género (B).	38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos cães recrutados e resultados dos valores de mercúrio em amostras de sangue e pelo dos cães e no cabelo dos respectivos donos ((-) amostra não disponível; (< LD) inferior ao limite de detecção do equipamento; (SRD) sem raça definida).	26
Tabela 2. Características dos gatos recrutados e resultados dos valores de mercúrio em amostras de sangue e pelo dos gatos e no cabelo dos respectivos donos ((-) amostra não disponível; (SRD) sem raça definida).	31
Tabela 3. Compilação dos níveis de mercúrio total detetados em amostras de cães e gatos ((< LD) inferior ao limite de detecção do equipamento).	34
Tabela 4. Comparação dos valores de mercúrio detetados em estudos com cabelo humano ((n) número de amostras; (-) informação não disponível).	36
Tabela 5. Consumo de peixe de acordo com as categorias propostas por Hond et al. (2015) dos donos dos animais (cães + gatos) que aceitaram participar neste estudo.	38

Lista de Acrónimos

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

CRMs - materiais de referência

CV - coeficiente de variação

DGAV - Direção geral de alimentação e veterinária

DNA - ácido desoxirribonucleico

FDA - *Food and Drug Administration*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MAC - *Maximum allowable concentration*

OMS - Organização mundial de saúde

SDR - Sem raça definida

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

UNEP - *United Nations Environment Programme*

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

1. Introdução

1.1. Mercúrio: Caracterização geral

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico que pode ser encontrado no ambiente sobre variadas formas (elementar, orgânica e não orgânica) e que pode ser acumulado ao longo da cadeia alimentar (Sousa et al., 2013). A circulação no ecossistema, as vias de exposição, os efeitos biológicos e a toxicidade dependem das diferentes características e formas químicas de mercúrio (Ye et al., 2016).

De uma forma geral, são consideradas as seguintes espécies químicas de mercúrio: (i) compostos voláteis (Hg^0 ; $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$); (ii) espécies reativas, onde se incluem: Hg^{2+} ; HgX_2 , HgX_3^- e HgX_4^{2-} com $=\text{OH}^-$, Cl^- e Br^- ; HgO em partículas de aerossol; complexos de Hg^{2+} com ácidos orgânicos, metilmercúrio (CH_3Hg^+ , CH_3HgOH) e outros compostos organomercúricos; e (iii) espécies não reativas: $\text{Hg}(\text{CN})_2\text{HgS}$; e Hg^{2+} ligados a átomos de enxofre em matéria húmica (Issaro, Abi-Ghanem, & Bermond, 2009). As várias espécies de mercúrio podem apresentar diferentes volatilidades, solubilidades, biodisponibilidades, reatividades e toxicidades (Guney, Welfringer, Repentigny, & Zagury, 2013).

A especiação é um fator importante, na medida em que influencia o transporte de mercúrio no meio ambiente, determinando a distância que o mercúrio pode percorrer através da litosfera, hidrosfera e crosta terrestre (UNEP, 2013a) e conseqüentemente afetar organismos que vivem em locais distantes da fonte emissora de mercúrio.

A emissão para a atmosfera de vapor de mercúrio pode ocorrer através de fontes naturais e antropogénicas, tal como representado no esquema da Figura 1.

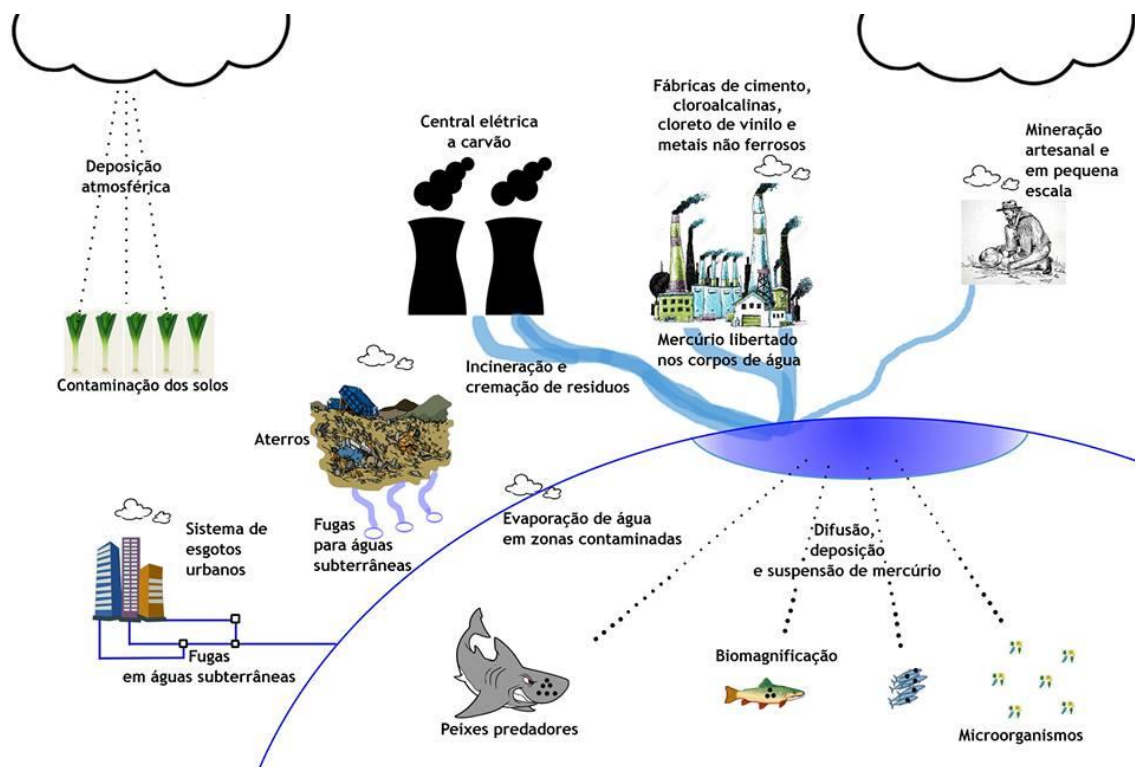


Figura 1. Ilustração do ciclo global do mercúrio. Adaptado de UNEP (2013)

Inúmeras atividades humanas são responsáveis pela libertação de mercúrio para o meio ambiente, nomeadamente a combustão de combustíveis fósseis, principalmente de carvão, vários tipos de incineração de resíduos, assim como os incêndios florestais e também a mineração de ouro, por exemplo. Após ser emitido para a atmosfera, o vapor de mercúrio (Hg^0) permanece nesta cerca entre 6 meses a dois anos, sendo que este tempo de residência permite que o mercúrio libertado a partir de qualquer fonte industrial seja transportado, percorrendo todo o hemisfério (W. C. Li & Tse, 2015). Foi recentemente demonstrado que uma vez na atmosfera o mercúrio elementar é oxidado o que permite a sua deposição à superfície terrestre (Lyman & Jaffe, 2011). De uma forma geral, os compostos de mercúrio voltam à superfície terrestre através da chuva, mas uma determinada fração desta quantidade de mercúrio é reduzida a vapor e volta a entrar na atmosfera completando assim o ciclo. Contudo, alguns compostos ficam depositados nos sedimentos aquáticos e outros são depositados na vegetação.

De acordo com a “United Nations Environment Programme - UNEP” as fontes de mercúrio para o ar, água e solos podem ser divididas em 4 categorias:

- As atividades vulcânicas e erosão das rochas libertam o mercúrio de forma natural para o meio ambiente, sendo estas denominadas de **fontes naturais**;
- **Fontes antropogênicas atuais**: Todo o tipo de atividade humana como por exemplo a produção de energia através da combustão de petróleo, gás e carvão; a mineração e a produção e reciclagem de minerais;
- **Fontes antropogênicas não intencionais**: que resultam na libertação de Hg de forma não intencional a partir de diversos produtos, quer seja durante o seu processo de fabrico quer seja durante a sua utilização e/ou final de vida (por exemplo incineração);
- **Remobilização de mercúrio** a partir de reservatórios históricos como por exemplo: solos, sedimentos, lençóis freáticos, aterros sanitários e escombreliras.

Relativamente à contribuição relativa de emissões, as fontes naturais são responsáveis por aproximadamente 10% das cerca de 5500-8900 toneladas de mercúrio emitidas e reemitidas para a atmosfera, quando considerando a globalidade das emissões de todas as fontes. As fontes antropogênicas são responsáveis pela emissão de 30% de mercúrio, enquanto as reemissões representam cerca de 60% das emissões globais de mercúrio para a atmosfera (UNEP, 2013a) (Figura 2).

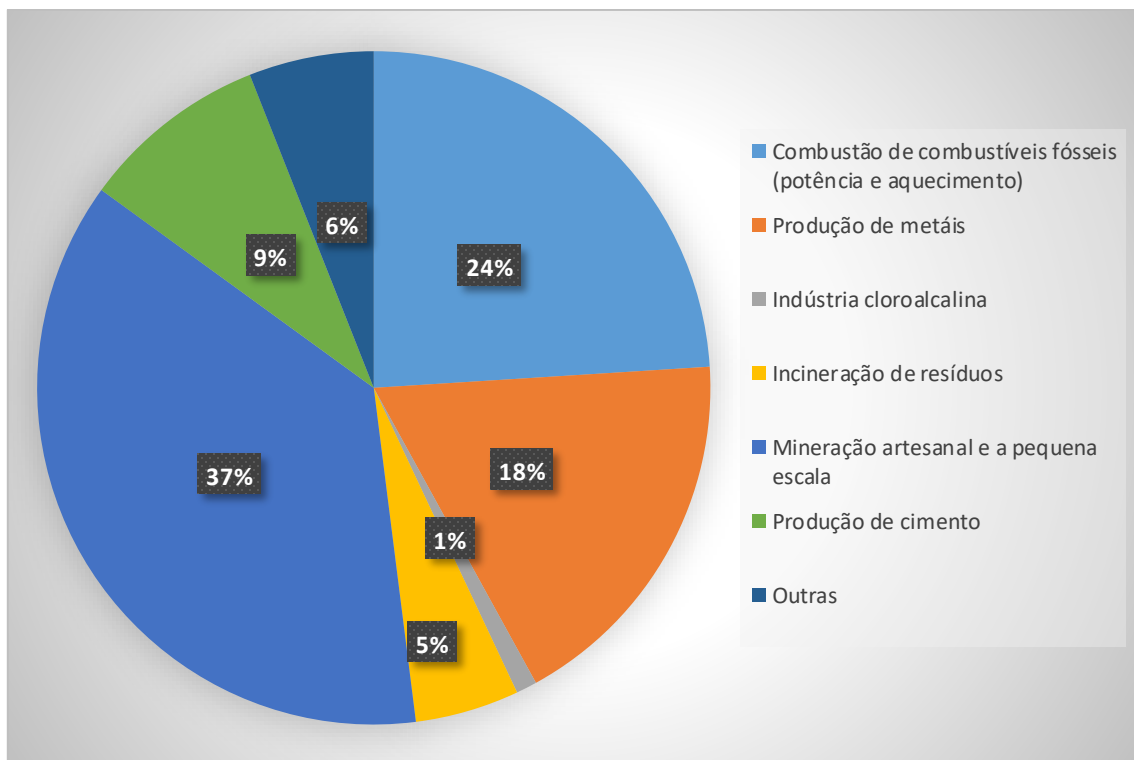


Figura 2. Emissões antropogênicas globais de mercúrio em 2010. Adaptado de UNEP (2013b)

1.2. Mercúrio elementar (Hg⁰)

À temperatura ambiente o mercúrio elementar encontra-se no estado líquido ou gasoso. As emissões globais de mercúrio para a atmosfera ocorrem maioritariamente através da combustão de combustíveis fósseis, especialmente de carvão (Goldman & Shannon, 2001). Existem mais fontes de emissão onde são incluídas a produção de alcalinos (um processo que utiliza mercúrio para produzir ácido clorídrico e hidróxido de sódio, cloro, soda cáustica, lixívia e outros produtos), mineração, incineração de resíduos (especialmente resíduos médicos), crematórios e atividade vulcânica (Goldman & Shannon, 2001). Uma fonte de mercúrio importante que tem sido utilizada há mais de 150 anos são as amálgamas dentárias, as quais possuem na sua composição mercúrio (Hoover & Goldwater, 2013).

A Figura 3 representa as percentagens de mercúrio emitidas para a atmosfera no mundo em 2010. Estima-se que neste ano tenham sido emitidas cerca de 1960 toneladas de origem antropogénica. Os padrões regionais têm sido alterados e o crescimento económico das regiões asiáticas levou a um aumento significativo das emissões antropogénicas nessas regiões. Também as emissões na África Subsariana e América do Sul têm vindo a aumentar substancialmente, representando em conjunto cerca de 30 % das emissões. Concomitantemente, as emissões na América do Norte e na Europa têm vindo a decrescer (UNEP, 2013b).

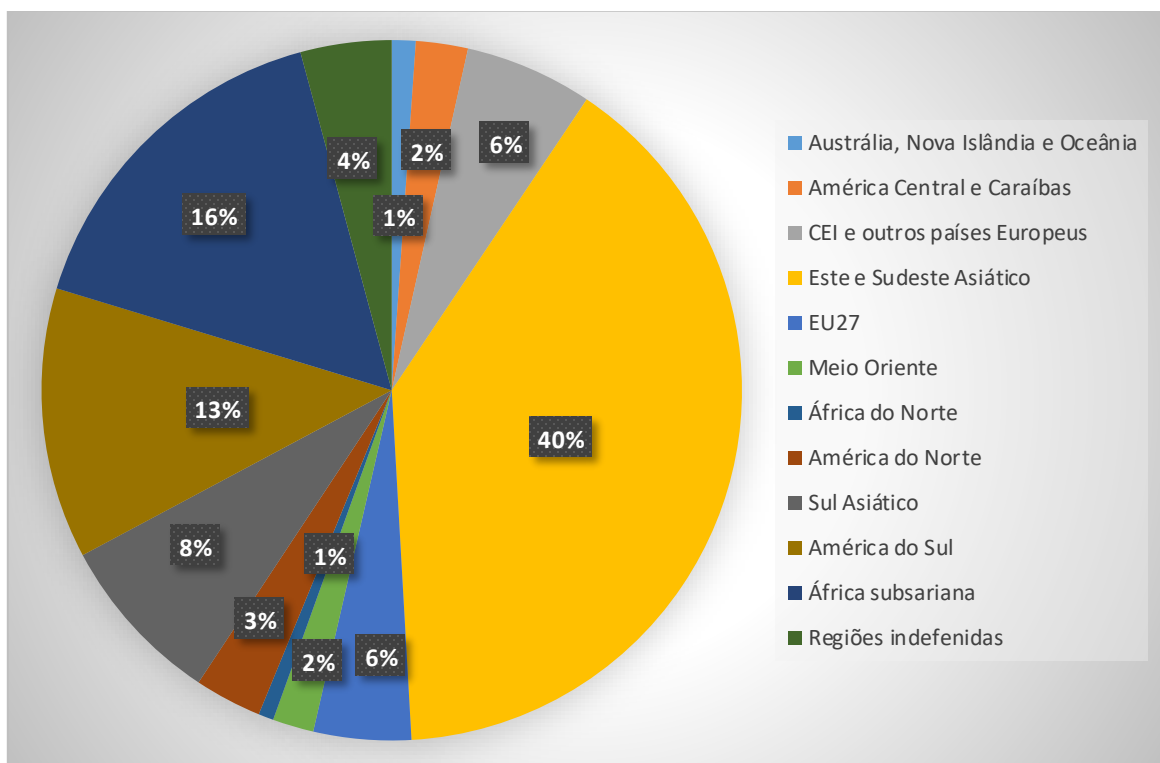


Figura 3. Emissões regionais de mercúrio em 2010. Adaptado de UNEP (2013b)

O mercúrio na forma elementar líquida foi utilizado ao longo das últimas décadas em vários produtos de uso quotidiano, nomeadamente em termómetros, barómetros, aparelhos elétricos

e eletrônicos, interruptores (incluindo termostatos), equipamentos de medição e controle, lâmpadas fluorescentes eficientes em termos energéticos, baterias, máscaras faciais, cremes de branqueamento de pele e outros cosméticos, e, foi igualmente utilizado em conservantes de vacinas (Goldman & Shannon, 2001; UNEP, 2013b). Foi também muito utilizado em remédios caseiros e muitas vezes em rituais de comunidades indígenas, sendo que esta prática acarreta riscos uma vez que o mercúrio acaba por volatilizar expondo crianças e adultos (Goldman & Shannon, 2001).

O mercúrio elementar volatiliza à temperatura ambiente pelo que pode ser inalado, entrando facilmente nos alvéolos e, de seguida, na corrente sanguínea, distribuindo-se posteriormente aos glóbulos vermelhos, sistema nervoso central (SNC) e rins. Por sua vez, se for ingerido não é tão tóxico pois menos de 0,1% é absorvido a partir do trato gastrointestinal. No entanto, problemas no trato gastrointestinal podem alterar a barreira mucosa gástrica e permitir uma maior biodisponibilidade. A nível de exposição dérmica a absorção é mínima e limitada (Clarkson, 1997; J. Park & Zheng, 2012).

O mercúrio elementar, num organismo adulto, tem um tempo de meia-vida de aproximadamente 30 a 60 dias. No entanto, no cérebro estima-se que o período de meia-vida seja muito superior (aproximadamente 20 anos). Após oxidação no cérebro o mercúrio elementar liga-se fortemente ao selénio ou a grupos SH, o que contribuiu para que permaneça depositado no cérebro por longos períodos de tempo (J. Park & Zheng, 2012).

A urina e fezes são as principais vias de excreção de mercúrio elementar. Por vezes, o mercúrio inalado pode ser também eliminado através da respiração, suor e saliva (J. Park & Zheng, 2012).

1.2.1. Efeitos adversos da exposição a compostos inorgânicos de mercúrio

Uma elevada exposição a estes compostos pode provocar dores no peito, sintomas gastrointestinais graves, alteração no funcionamento renal e descoloração ou escurecimento da mucosa oral. Podem ainda causar dermatites ou até mesmo queimaduras corrosivas, no entanto, é pouco provável serem inalados pois, à temperatura ambiente, são sólidos e não voláteis (ATSDR, 1999b; Von Burg, 1995)

A intoxicação crónica por mercúrio inorgânico ocorre muito esporadicamente, mas quando acontece afeta principalmente os rins, sobretudo os túbulos renais. Após a intoxicação, podem ser detetados vários tipos de sintomas ou sinais clínicos, tais como poliúria e proteinúria que em casos mais graves pode evoluir para síndrome nefrótica (Goyer & Clarkson, 2001). A exposição a calomel (constituído por cloreto de mercúrio) provoca acrodinia (também conhecida “doença rosa” ou “doença de Feer”) em crianças. O calomel foi utilizado a partir do Séc. XVI como tratamento para variadas patologias como por exemplo malária e febre-amarela e já na década de 50 do século XX em problemas de dentição nas crianças (Davis, 2000). As crianças foram, no passado, alvos importantes de contaminação por mercúrio uma vez que este

era também usado como fungicida na lavagem das fraldas por forma a diminuir a sua frequência da lavagem (Warkany, J, Hubbard, 1951). O mercúrio era ainda usado sob a forma fenilmercúrio em tintas interiores de latex, o que mais uma vez contribuiu para a exposição das crianças a este composto (Hirschman, Feingold, & George, 1963).

1.2.2. Efeitos adversos da exposição a mercúrio elementar

A exposição aguda a vapor de mercúrio pode produzir bronquite necrotizante aguda, pneumonia, provocando possível hipoxia, e conseqüentemente, a morte. A exposição a longo prazo pode afetar o SNC e provocar tremores, parestesias, perda de memória, hiperexcitabilidade, eretismo e reflexo retardado, sintomas estes que são geralmente reversíveis (Goyer & Clarkson, 2001).

Por outro lado, a exposição crônica a este vapor, afeta o SNC e os rins. Os sinais precoces de intoxicação neurológica são os tremores, depois surge o eretismo, isto é, uma psicose tóxica que apresenta inúmeras características desde timidez, inibição, até à irritabilidade mórbida, hiperatividade mental e explosões de raiva, juntamente com a diminuição da memória, dificuldade de concentração, depressão e sonolência. A proteinúria (perda excessiva de proteínas) é o sinal mais comum dos efeitos renais devido a um dano tubular, em casos mais graves pode ocorrer síndrome nefrótico (ATSDR, 1999b).

Os vapores de mercúrio elementar podem também afetar o sistema imunitário humano, provocando uma diminuição da resistência à infecção, cancros, ou desregulação imunitária que pode induzir o desenvolvimento de alergias ou doenças autoimunes (J. Park & Zheng, 2012).

1.3. Compostos inorgânicos de mercúrio

A maioria dos compostos inorgânicos de mercúrio são sais e têm propriedades antibacterianas, antissépticas e diuréticas, sendo alguns exemplos destes sais o cloreto de mercúrio e o óxido de mercúrio (Goldman & Shannon, 2001; Goyer & Clarkson, 2001). Estes sais são aplicados em variados tipos de produtos, como por exemplo em pomadas para aplicação dérmica, em cremes de branqueamento da pele, e em produtos relacionados com a higiene dentária. Os produtos de absorção dérmica constituem os casos clínicos mais frequentes de intoxicação por mercúrio inorgânico. Esta espécie de mercúrio pode ser absorvida através da pele, e transpor a epiderme através das glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos capilares (Chan, 2011). Cerca de 7% a 15% das doses de compostos inorgânicos de mercúrio ingeridos pelo ser humano são absorvidos pelo trato gastrointestinal (Goldman & Shannon, 2001; Goyer & Clarkson, 2001).

A toxicidade dos sais de mercúrio varia consoante a sua solubilidade. Normalmente, compostos de mercúrio Hg^+ por serem menos solúveis em água afetam menos o organismo do que os compostos de mercúrio Hg^{2+} (J. Park & Zheng, 2012).

1.4. Compostos orgânicos de mercúrio

O etilmercúrio e o metilmercúrio são compostos quimicamente semelhantes, muitas vezes conhecidos como compostos “alquilo de cadeia curta”, que afetam principalmente o sistema nervoso central. A principal diferença entre os dois compostos é que o etilmercúrio converte-se mais rapidamente em composto inorgânico, podendo assim causar danos no sistema urinário, nomeadamente nos rins, enquanto o metilmercúrio causa exclusivamente danos no sistema nervoso. O fenilmercúrio e o metoxietilmercúrio são outros compostos orgânicos, mas que passam rapidamente a compostos inorgânicos sendo, por isso, os seus efeitos tóxicos equivalentes aos sais inorgânicos referidos anteriormente. No entanto, estes compostos são absorvidos de uma forma mais eficaz do que os inorgânicos. O etilmercúrio, metilmercúrio e fenilmercúrio foram produzidos inicialmente como biocidas e pesticidas (Clarkson, 2006; Goldman & Shannon, 2001).

O etilmercúrio (EtHg) é utilizado como pesticida, antisséptico, e sobretudo como conservante para vacinas na forma de timerosal (Pless & Risher, 2000). Apesar da sua toxicidade e de algumas recomendações da comunidade científica no sentido de banir totalmente a utilização de timerosal em vacinas, a Organização Mundial de Saúde ainda permite a utilização de timerosal para vacinação de recém-nascidos e crianças (Marques, Bernardi, Cunha, & Dórea, 2016).

O metilmercúrio (MeHg) é um dos compostos orgânicos mais estudados. Este composto forma-se a partir da metilação do mercúrio inorgânico por ação bacteriana. Os principais microrganismos responsáveis pela metilação de mercúrio em ambiente aquático são as bactérias redutoras de sulfato (Mason et al., 2005). O mercúrio inorgânico entra nos ecossistemas aquáticos maioritariamente através da ação antropogénica, e uma vez depositado nos sedimentos sofre biometilação por ação bacteriana e é depois rapidamente incorporado pelos níveis inferiores da cadeia trófica, sofrendo depois biomagnificação ao longo da cadeia trófica. Assim, as maiores concentrações de metilmercúrio são detetadas nos predadores de topo (P. Li, Feng, & Qiu, 2010).

A ingestão de metilmercúrio está assim associada à quantidade e variedade de peixe consumido (atum, camarão, salmão, bacalhau, peixe-gato, moluscos, peixes achatados, caranguejos e vieiras). Alguns grupos por consumirem mais peixe são particularmente suscetíveis como por exemplo as populações que vivem no Ártico (Clarkson, 2006). Por forma a reduzir a exposição a este metal tóxico, têm sido dados passos para conseguir controlar a poluição e as emissões de mercúrio para o meio ambiente nomeadamente através da Convenção de Minamata (UNEP, 2013c).

1.5. O mercúrio no meio ambiente

O mercúrio pode ser encontrado em praticamente todos os compartimentos ambientais: no ar, na água, nos sedimentos, nos solos e no biota (organismos terrestres e aquáticos).

1.5.1. Atmosfera

As concentrações de mercúrio no ar são diferentes no Hemisfério Norte e no Hemisfério Sul, sendo superior no hemisfério norte (1.3 a 1.7 ng/m³) relativamente ao hemisfério sul (1.1 a 1.3 ng/m³) (Sprovieri, Pirrone, Ebinghaus, Kock, & Dommergue, 2010). Estima-se que as emissões globais de mercúrio para atmosfera variem entre 6500 e 8200 Mg/ano, sendo controladas através de processos atmosféricos (Driscoll, Mason, Chan, Jacob, & Pirrone, 2013). A atmosfera é uma das vias mais importantes para redistribuição de mercúrio nos ecossistemas terrestres e marinhos. Como o mercúrio tem um tempo de residência bastante longo, pode ser transportado por longas distâncias antes de ser depositado até aos lugares mais remotos da superfície terrestre (Sprovieri et al., 2010). O ciclo do mercúrio pode ser afetado através de imensas variáveis, tais como, pH, potencial redox, composição química da água, tipos de solos e geologia, sendo que hoje em dia, uma grande parte de mercúrio presente na atmosfera deve-se a fontes antropogénicas (Boening, 2000).

1.5.2. Hidrosfera

A neve e a chuva são duas formas de o mercúrio entrar nos sistemas aquáticos. Através da precipitação, o mercúrio presente na atmosfera é transportado para os lagos, rios e oceanos. O mercúrio pode também infiltrar-se nos lençóis freáticos e fontes de água subterrâneas através dos resíduos libertados pelas indústrias e também através da lixiviação de solos nos quais foram aplicados pesticidas com mercúrio. Após ser incorporado na hidrosfera o mercúrio elementar é convertido em metilmercúrio, através de bactérias existentes nos sedimentos dos lagos, rios e oceanos (Kim, Kabir, & Jahan, 2015).

A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) estabeleceu como nível máximo de mercúrio para ambiente aquático 1400 ng/L para uma exposição aguda e 770 ng L⁻¹ para uma exposição crónica (USEPA, 2016). Na Europa, e no âmbito da implementação da diretiva quadro da água, foi estabelecido uma concentração máxima permitida (“*maximum allowable concentration*” - MAC) para o mercúrio e seus compostos de 70 ng L⁻¹. Em termos médios anuais a concentração média de mercúrio é de 50 ng/L (EC, 2008).

1.5.3. Solo e Plantas

Nos ecossistemas terrestres o solo constitui o maior reservatório de mercúrio, assim as transferências de mercúrio de e para o solo são extremamente importantes no ciclo deste metal. As concentrações de mercúrio no solo variam de acordo com a localização geográfica, variando entre 10 ng g^{-1} e 1000 ng g^{-1} em localizações rurais e remotas; e desde 100 ng g^{-1} até concentrações superiores a $10,000 \text{ ng g}^{-1}$ em solos de zonas urbanas, industriais ou de exploração mineira (Burns, Woodruff, Bradley, & Cannon, 2014). A absorção de mercúrio existente nos solos pelas plantas não ocorre de forma linear, dependendo de vários fatores e variáveis, como por exemplo a capacidade de troca catiónica, a oxigenação e pH do solo, sendo que a acumulação de mercúrio na planta depende também do tipo de espécie (Patra & Sharma, 2000).

1.5.4. Peixes

Os peixes são considerados uma das principais fontes de exposição a metilmercúrio para os humanos, devido sobretudo ao fenómeno de biomagnificação do mercúrio que ocorre nos ecossistemas aquáticos (Figura 4).

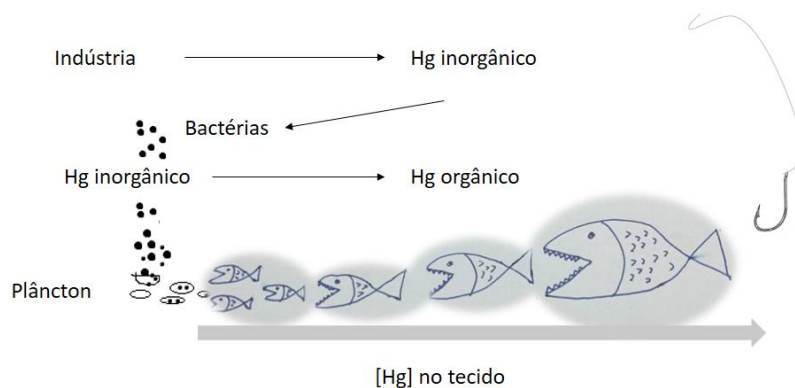


Figura 4. Esquemática do fenómeno de biomagnificação.

O mercúrio, maioritariamente sob a forma de metilmercúrio, pode ser encontrado em várias espécies de peixe, desde os peixes da base da cadeia alimentar aos predadores de topo. No entanto, uma vez que a concentração de mercúrio vai aumentando ao longo da cadeia alimentar, os peixes de topo possuem concentrações superiores (Burger & Gochfeld, 2011).

A maioria da população mundial não considera que o consumo de peixe contaminado represente um problema de saúde pública, no entanto, devido à elevada toxicidade do mercúrio e aos

níveis elevados detetados em algumas espécies de peixe, as organizações internacionais recomendam alguma cautela para certos grupos vulneráveis da população nomeadamente grávidas e crianças. A *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Environmental Protection Agency* (USEPA) dos Estados Unidos, por exemplo, aconselham as mulheres grávidas ou que ainda estejam a amamentar e a crianças pequenas ao consumo de peixes e mariscos que contenham doses baixas de mercúrio (Goldman & Shannon, 2001; USEPA, 2016; USFDA, 2011).

1.6. Fontes de mercúrio para humanos

Na Figura 5 estão esquematizadas as principais fontes de mercúrio para os humanos considerando não só a ingestão de comida contaminada, mas também a exposição em ambiente doméstico e em ambiente ocupacional.

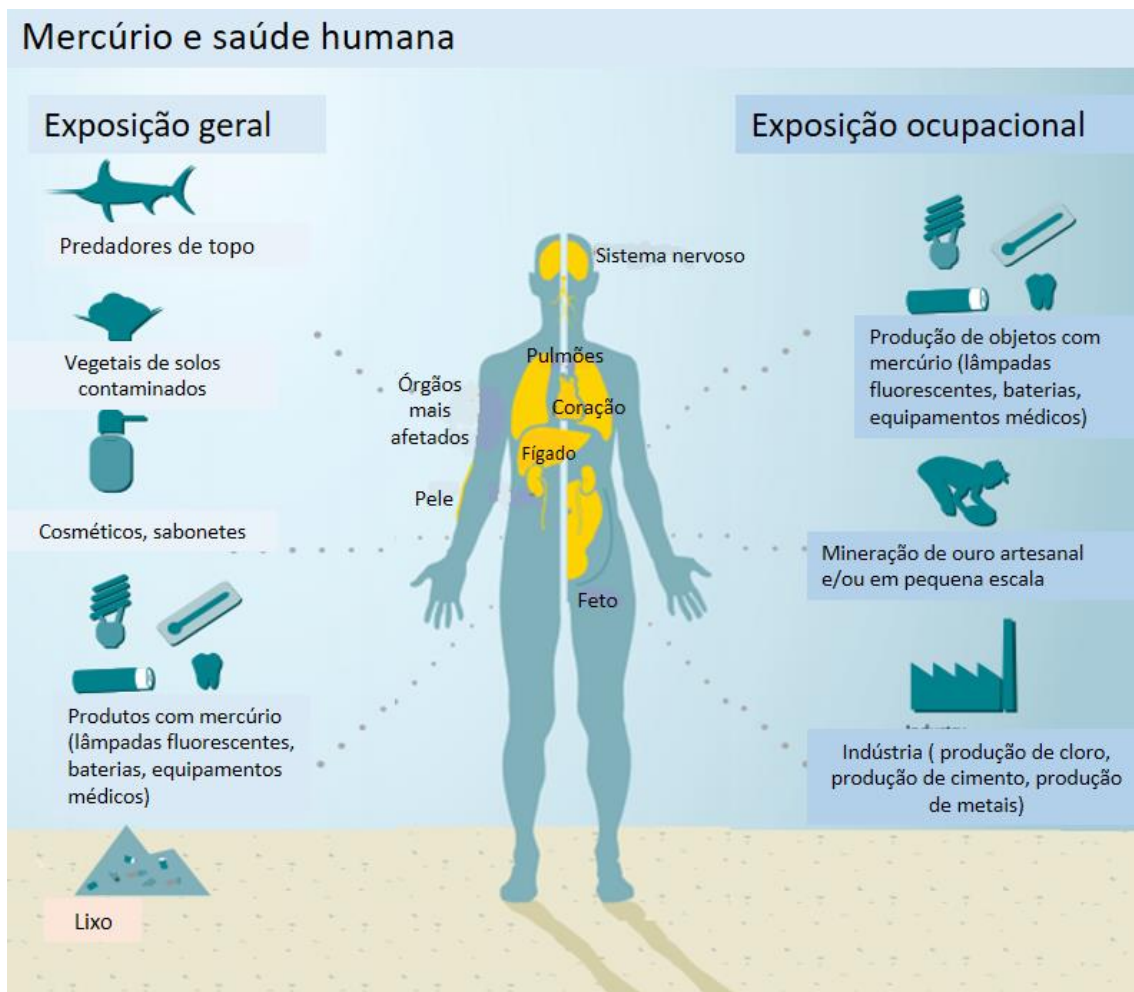


Figura 5. Esquema representativo das principais fontes de mercúrio para humanos e possíveis órgãos alvo. Adaptado de UNEP (2013b).

A população geral está exposta a mercúrio através da ingestão de alimentos contaminados (principalmente peixes predadores) e através da exposição a vários produtos de consumo que contêm mercúrio como por exemplo cosméticos, detergentes e medicamentos, ou ainda através de exposição involuntária a produtos que contêm mercúrio na sua composição como por exemplo pilhas, equipamentos elétricos e eletrônicos, lâmpadas fluorescentes e equipamentos médicos (p. ex. termômetros e esfigmomanômetros).

1.6.1. Exposição ocupacional

Este tipo de exposição ocorre no local de trabalho e depende muito do tipo de atividade exercida e das medidas de proteção implementadas. A gravidade dos efeitos pode variar desde as mais pequenas intoxicações a danos graves na saúde e, em casos extremos, levar mesmo à morte. A exposição ocupacional pode ocorrer em todos os ambientes onde sejam produzidos produtos com mercúrio e/ou derivados ou em processos que utilizem mercúrio como intermediário para o produto final. As exposições têm ocorrido sobretudo na indústria de produção de cloro; em fábricas de termômetros; em indústrias de produção de químicos à base de mercúrio, em indústrias de extração, processamento e venda de ouro; em minas de ouro; e ainda em clínicas dentárias (ATSDR, 1999a).

Porém, em muitos países, durante as últimas décadas, tem sido feito um grande esforço para combater este tipo de exposição. As entidades patronais foram introduzindo nos ambientes de trabalho melhor ventilação, sistemas de trabalho fechados, equipamentos de proteção seguros, procedimentos de manuseamento seguros e têm ainda tentado arranjar alternativas tecnológicas ao mercúrio. Mas nem sempre estes esforços são universais, podendo ainda alguns trabalhadores estarem expostos ao mercúrio (Seigneur, Prasard, & Prakash, 1997).

1.7. Efeitos do mercúrio na saúde

A toxicidade do mercúrio para a saúde humana varia consoante a sua forma química e a taxa de exposição. Esta exposição ocorre tal como anteriormente descrito através do consumo de alimentos contaminados e da exposição ambiental, pelo que podem associar-se à exposição a mercúrio vários tipos de doenças, como mostra o esquema da Figura 6.

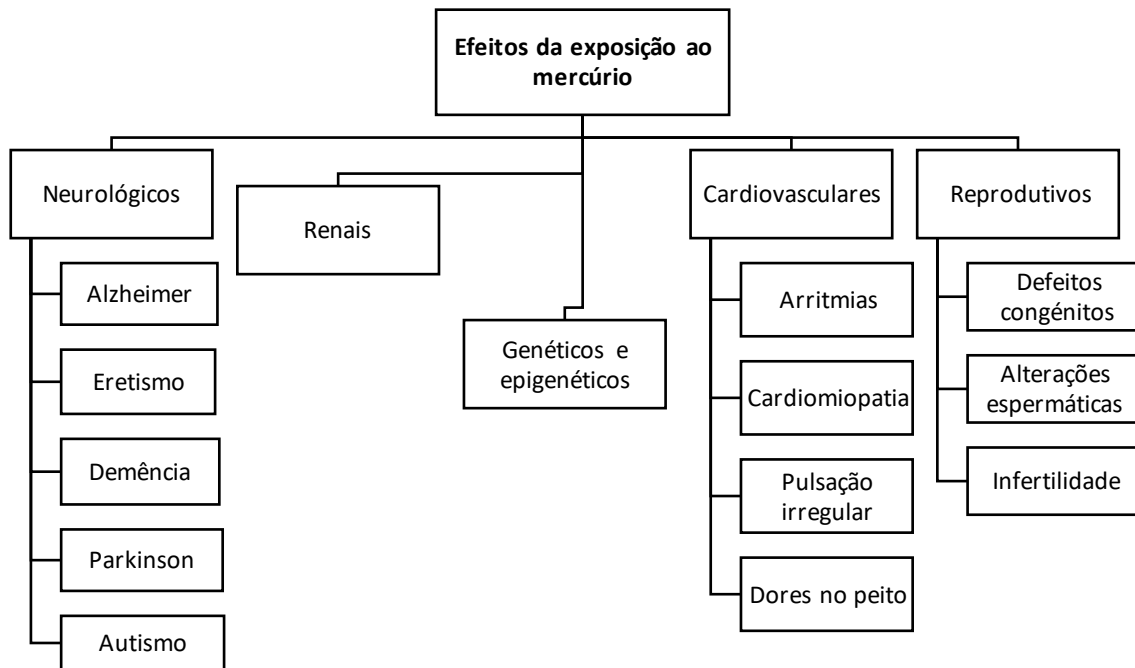


Figura 6. Esquema dos efeitos provocados pela exposição ao mercúrio na saúde humana. Adaptado de Kim et al. (2015).

1.7.1. Efeitos neurológicos

Os distúrbios neurológicos são os efeitos mais comuns no que diz respeito à exposição a mercúrio, podem causar mau humor, depressão, raiva, perda de memória, sonolência e até problemas de ansiedade ou obsessões (J. Park & Zheng, 2012).

Alguns estudos têm sugerido que a contaminação por mercúrio inorgânico pode estar associada a doenças como Alzheimer e Parkinson (Mutter, Curth, Naumann, Deth, & Walach, 2010; Zahir, Rizwi, Haq, & Khan, 2005). No entanto, certos autores defendem que ainda não foi estabelecida uma associação clara entre a contaminação por mercúrio inorgânico e a doença de Alzheimer, alegando que não existem provas suficientes para sustentar as relações entre o início tardio da doença e a exposição precoce ao mercúrio (J. Park & Zheng, 2012), pelo que é necessária mais investigação nesta área.

O eretismo é um dos primeiros sintomas a desenvolver-se, começando por existir uma estranha timidez na presença de estranhos. A pessoa com este tipo de doença tem imensas dificuldades no seu dia-a-dia, pode acabar por perder o autocontrolo e até mesmo entrar em depressão, e

em casos mais extremos perder a memória ou ter alucinações, (Buckell, Hunter, Milton, & Perry, 1929).

A intoxicação por mercúrio inorgânico pode também estar relacionada a doenças do espectro autista. O mercúrio está associado a um aumento nos danos oxidativos nos tecidos e, crianças com autismo apresentam níveis superiores de peroxidação lipídica na urina quando comparados com controles saudáveis. De acordo com Goer e Clarkson (2001), estes danos podem ser relacionados com a presença de mercúrio inorgânico no sistema nervoso periférico, que ao ser absorvido pelas terminações nervosas diminuiu a síntese de actina e tubulina, constituintes importantes das células neuronais e são muito importantes nos processos de destoxificação (Goyer & Clarkson, 2001).

1.7.2. Efeitos nos rins

Nos seres humanos e noutros mamíferos os rins são os órgãos primários onde o mercúrio é acumulado após exposição ao mercúrio elementar ou inorgânico. A exposição a mercúrio inorgânico habitualmente provoca proteinúria (ATSDR, 1999b).

1.7.3. Efeitos cardiovasculares

Quando expostos a níveis tóxicos de mercúrio os principais sintomas cardiovasculares são taquicardia, pulsação irregular, dores no peito e pressão arterial elevada. As maiores evidências destes efeitos ocorreram no passado em crianças com acrodinia, em consequência da aplicação generalizada de calomel (Kim et al., 2015).

1.7.4. Efeitos reprodutivos

O mercúrio afeta o sistema reprodutor tanto masculino diminuindo por exemplo a motilidade dos espermatozoides e a contagem espermática, o que pode conduzir a problemas de infertilidade. Nas mulheres grávidas o mercúrio tem a capacidade de atravessar a placenta pelo que induz efeitos no feto, nomeadamente defeitos congénitos. Evidências recentes também demonstram que a exposição a mercúrio *in útero* pode estar associada a distúrbios e défice de atenção em crianças (Kim et al., 2015).

1.7.5. Efeitos epigenéticos

A exposição a mercúrio é responsável por alterações epigenéticas, nomeadamente através de metilação do DNA que foi recentemente proposta como um possível biomarcador da exposição

a mercúrio e ainda através da hipometilação de DNA de tecidos cerebrais (Basu, Goodrich, & Head, 2014).

1.8. Animais domésticos como sentinelas

Existem muitos casos descritos na literatura onde os animais são considerados bons sentinelas para os seres humanos, estes estão expostos ao mesmo tipo de contaminantes que os seres humanos, pois estão em contacto com os mesmos tipos de ambiente, tanto dentro de casa como fora e, tal como o humano, também podem sofrer os mesmos efeitos crónicos e agudos derivados da exposição a contaminantes (Bastos & Sousa, 2012; Reif, 2011).

Um dos casos mais clássicos descritos da utilização de animais como sentinelas é o exemplo da utilização de canários na mineração. No século XIX os mineiros utilizavam este pássaro para detetar gases tóxicos, nomeadamente o metano e o monóxido de carbono, como os canários eram mais sensíveis adoeciam primeiro, o que permitia que os mineiros escapassem ou colocassem máscaras de proteção (Bastos & Sousa, 2012). Existem muitos outros casos onde a presença de disruptores endócrinos no meio ambiente, afetou a reprodutividade de peixes, aves e crocodilos (Bastos & Sousa, 2012).

Um caso famoso da utilização de animais como sentinelas ocorreu em Minamata, no Japão em 1950. Neste incidente, que é conhecido por “*dancing cat disease*”, os gatos foram expostos ao metilmercúrio através do consumo de peixe. O nome deste fenómeno é devido aos sintomas que os gatos apresentavam, estes começavam a “dançar” nas ruas, sintomas neuro comportamentais que levavam ao colapso e, na maioria das vezes, à própria morte do animal (Glickman, 1991). Mais tarde, os humanos também exibiram sintomas neurológicos semelhantes e considerando que o elo comum era o peixe capturado na baía de Minamata e que era ingerido quer por humanos quer pelos gatos foi possível identificar a causa da contaminação.

Os animais para além de partilharem o mesmo ambiente que o ser humano, por vezes também consomem a mesma comida e a mesma água, estando também expostos aos mesmos stresses impostos pelos avanços tecnológicos. Estes têm uma resposta análoga ao ser humano aquando da exposição a agentes tóxicos e desenvolvem doenças semelhantes induzidas por fatores ambientais, mas os animais apresentam os sintomas das doenças mais rapidamente que os humanos, pois têm um período de vida mais curto, o que faz com que o animal seja uma boa sentinela para o ser humano (Glickman, 1991). Particularmente, pode considerar-se os cães e os gatos como bons sentinelas para baixos níveis de exposição, pois partilham a maioria dos ambientes com os donos, estando expostos basicamente aos mesmos tipos de contaminantes (Bastos & Sousa, 2012).

De acordo com Bastos & Sousa, (2012) e Bolser et al. (2009) os cães apresentam características importantes para estes serem usados como sentinelas:

- São animais geneticamente diversificados;
- Apresentam características importantes para o estudo de várias patologias, nomeadamente cancro, doenças infecciosas e doenças do envelhecimento;
- Apresentam um sistema cardiovascular semelhante ao dos humanos;
- O uso da escolha aleatória permite-nos ter animais maiores e que são fisiologicamente e fisicamente semelhantes aos seres humanos;
- Os animais com idades mais avançadas permitem avaliar doenças crónicas ou persistentes, tais como insuficiência cardíaca congestiva, artrites, alergias e demência;
- A escolha aleatória de cães expostos a diferentes tipos de ambientes e a vários vetores de doenças, proporciona modelos para o combate a doenças infecciosas.

Assim como os cães, os gatos também apresentam características importantes para serem considerados bons sentinelas (Bastos & Sousa, 2012; Bolser et al., 2009):

- Apresentam um sistema neurológico, cardiovascular, respiratório e imunológico muito semelhante ao ser humano;
- Existem muitos estudos referenciados na literatura, nos quais os gatos são utilizados como modelos para doenças em humanos;
- A população dos gatos é muito diversificada geneticamente, esta diversidade proporciona importantes modelos para doenças humanas.

2. Objetivo

Atualmente os seres humanos passam cada vez mais tempo em ambientes interiores, quer em casa, no trabalho, ginásios ou locais de lazer. De uma forma geral é dentro das habitações que passamos a maior parte do tempo (em média mais de 12 h por dia), (Sousa, Takashi, & Tanabe, 2014). Desta forma, os humanos estão constantemente expostos a vários tipos de contaminantes presentes no ambiente doméstico. Por outro lado, os animais domésticos (cães e gatos), ao partilharem a habitação com os donos também se encontram expostos aos mesmos tipos de contaminantes. Assim, o principal objetivo deste trabalho centra-se em monitorizar os níveis de contaminantes ambientais, neste caso do mercúrio, em animais de companhia, cães e gatos, na região Centro de Portugal (Aveiro e Covilhã), através da análise do seu pelo e sangue. Adicionalmente, pretende-se verificar se estes podem ser considerados sentinelas para o ser humano, para tal serão também analisadas amostras de cabelo dos respetivos donos.

O cabelo é uma matriz validada para monitorizar as concentrações de mercúrio no ser humano, no entanto tal não acontece nos animais de companhia. Assim, como objetivo secundário deste trabalho, pretende-se validar a utilização de pelo dos animais de estimação como matriz não invasiva para quantificar as concentrações de mercúrio nos mesmos.

3. Materiais e métodos

3.1. Amostragem

3.1.1. Seleção dos participantes

As amostras utilizadas durante a realização do trabalho de investigação foram adquiridas no contexto do projeto PETTO. Este projeto pretende avaliar os níveis de várias classes de contaminantes ambientais (disruptores endócrinos, metais e nanopartículas) em animais de companhia. O projeto PETTO decorre desde 2013 e tem uma duração prevista de 5 anos, tendo sido aprovado em 2013 pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (Referência DGAV 0421/000/000/2013, autorização da DGAV Anexo I).

Os indivíduos a estudar são os animais incluídos no projeto PETTO e os seus respetivos donos. Todos os animais foram selecionados após o projeto ser explicado ao respetivo dono, através de um folheto disponível na sala de espera da Clínica Veterinária (Anexo II) e posteriormente no âmbito da consulta pelo médico veterinário. Só foram incluídos no estudo os animais para os quais os donos assinaram um consentimento informado permitindo a recolha de sangue e pelo do seu animal.

Os donos com idade superior ou igual a 18 anos foram também convidados a participar no estudo. Após a assinatura do consentimento, foi solicitado aos donos que respondessem a um questionário demográfico e alimentar (Erro! A origem da referência não foi encontrada. I e V) e que cedessem uma amostra de cabelo. Foram excluídos os donos que apresentassem calvície e que demonstrassem incapacidade para compreender o presente estudo.

O recrutamento foi realizado na Clínica Veterinária da Covilhã, com a colaboração da Dra. Egídia Guerreiro e do Dr. Hugo Brancal e no Hospital Veterinário do Baixo Vouga com a colaboração do Dr. Hugo Vilhena.

3.1.2. Recolha das amostras

A recolha das amostras dos animais de companhia foi efetuada por um profissional de saúde certificado, no âmbito da consulta de rotina que incluía a recolha de sangue para análises. O médico veterinário em conjunto com o dono, preencheu um questionário (Anexo V) com as características do animal, a localização geográfica, o tipo de alimentação consumida, os cuidados de beleza e higiene e local onde foi recolhida a amostra do animal, tal como representado na Figura 7.

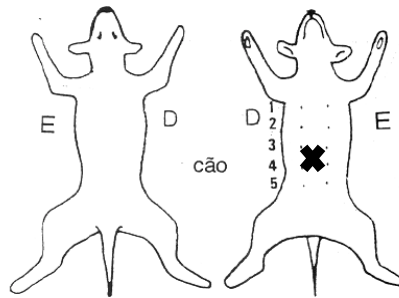


Figura 7. Representação esquemática do local onde foi recolhida a amostra de pelo.

Pelo

O pelo dos animais foi recolhido pelo médico veterinário recorrendo a uma tesoura de aço inoxidável, desinfetada com etanol antes e após a recolha de cada amostra, e, de seguida, preservado em sacos individuais de polietileno à temperatura ambiente e protegidos da luz.

Sangue

O sangue foi recolhido pelo médico veterinário para tubos de EDTA (*Aquisel K3E-EDTA-K*) a partir das veias jugular ou cefálica. Imediatamente após a recolha os tubos foram preservados a -20°C até realização das análises químicas.

Cabelo Humano

Os donos que aceitaram participar, após assinatura do consentimento, preencheram um questionário (Anexo IV) e foi recolhida uma amostra de cabelo com uma tesoura de aço inox desinfetada com etanol entre cada participante. O cabelo foi preservado em sacos individuais de polietileno, à temperatura ambiente e resguardados da luz.

3.1.3. Processamento das amostras

Pelo e Cabelo Humano

O pelo e do cabelo humano foram processados por forma a garantir uma maior homogeneidade da amostra. Para tal os cabelos e pelo foram cortados e posteriormente macerados em almofarizes. Os almofarizes foram descontaminados em banho ácido 4 % (ácido nítrico 68%, VWR CHEMICALS, BDH Prolabo), e posteriormente lavados com água ultrapura. Feita a descontaminação procedeu-se ao processamento da amostra reduzindo-a ao máximo, como se pode observar na Figura 8.

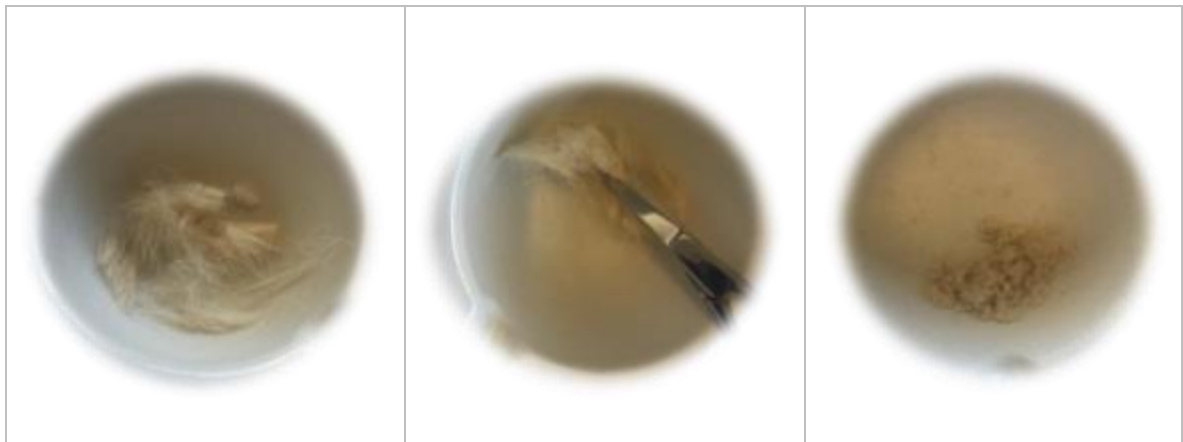


Figura 8. Etapas do processamento de uma amostra de pelo.

Sangue

O sangue preservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos EDTA (Aquisel K3E-EDTA-K3) foi descongelado 30 minutos antes da análise química.

3.2. Quantificação de mercúrio

A quantificação de mercúrio total nas amostras foi efetuada através de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amálgama de ouro no equipamento NIC-MA-3000 (*Nippon Instruments Corporation, Japan*). Este aparelho realiza a análise de mercúrio total de acordo com os protocolos da USEPA 7473 e ASTM D-6722-01.

Após a colocação das amostras em barquinhas de cerâmica (aproximadamente 100 µg de sangue ou 10 mg de pelo), estas são inseridas no aparelho, no qual a amostra sofre decomposição térmica, mais precisamente num forno de decomposição com oxigênio como gás de carreamento, libertando o mercúrio das amostras sob condições pré-estabelecidas por um programa específico para o tipo de amostra em análise. Potenciais interferências incorporadas nos gases gerados são removidas através de um tubo de combustão. O coletor de mercúrio recolhe o elemento volatilizado numa amálgama de ouro, removendo, assim, todos os agentes de interferência, condensando e purificando o mercúrio. Aquando da finalização da sequência de decomposição térmica, o tubo da colheita de mercúrio é aquecido volatilizando o mercúrio novamente sendo depois medida a absorvância a um comprimento de onda de 253,7 nm. Na Figura 9 encontra-se uma representação esquemática deste processo.

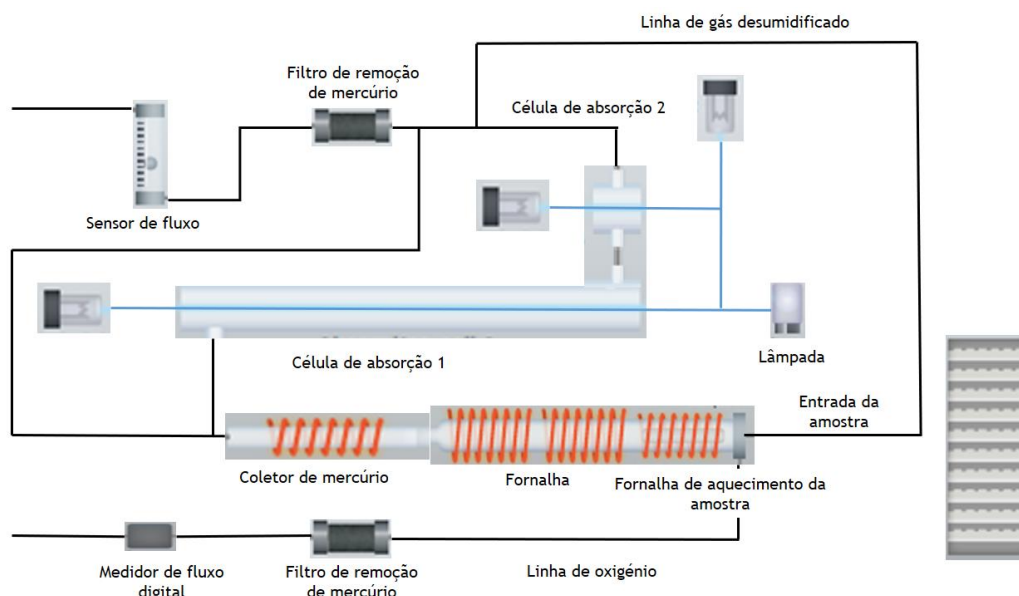


Figura 9. Esquema de funcionamento do equipamento NIC-MA-3000 (*Nippon Instruments Corporation, Japan*).

A utilização deste equipamento apresenta inúmeras vantagens tais como: permite a análise de matrizes sólidas e líquidas; é um método de quantificação bastante rápido (aproximadamente 7 min por amostra); apresenta um limite de deteção baixo de 0,001 ng; apresenta uma alta sensibilidade e precisão e as amostras não necessitam de pré-tratamento e extração prévia.

3.2.1. Preparação da curva de calibração

As soluções usadas na curva de calibração foram preparadas numa solução de L-cisteína (100mg/L). A L-cisteína foi utilizada pois, sendo esta um estabilizador de mercúrio, impede a volatilização do mesmo em todas as soluções preparadas. A solução de L-cisteína (100mg/L) foi preparada adicionando 100 mg de L-cisteína HSCH₂CH(NH₂)COOH num balão de vidro com água ultrapura e 0,5 mL de ácido nítrico (HNO₃) perfazendo um total de 1000 ml de solução.

De seguida, preparou-se uma solução *standard* de mercúrio de 10 ppm diluindo 1 mL de solução padrão de mercúrio para absorção atômica (1000 ppm, *Spectro ECON; Chem-Lab*) na solução de L-cisteína (100 mg/L) previamente preparada perfazendo um total de 100 mL.

Foram realizadas diluições sucessivas de forma a obter as seguintes concentrações de mercúrio: 1 ppm; 0,05 ppm e 0,01 ppm.

3.2.2. Controlo de qualidade

Para controlar a qualidade e precisão das medições foram também utilizados os materiais de referência para o sangue: *Seronorm - Trace elements whole blood L-1 (Ref 210105, Lot 1406263)* e *Seronorm - Trace elements whole blood L-2 (Ref 210105, Lot 1406264)*; para o pelo: *ERM-DB001 (Trace Elements in Human Hair)*. Os materiais de referência foram analisados intervaladamente entre séries de 10 amostras num total de 13 vezes para o pelo e 17 vezes para o sangue (14 vezes para o *Seronorm L1* e 3 vezes para o *Seronorm L2*).

Para todas as quantificações de mercúrio no sangue foram efetuados triplicados; para a quantificação de mercúrio no pelo, e dada a quantidade reduzida de algumas amostras só foi possível realizar triplicados em 32 amostras de pelo de cão e 16 amostras de pelo de gato. O mesmo sucedeu com o cabelo humano que só foi possível quantificar em triplicado para 8 amostras. Para garantir que o equipamento estava livre de contaminações de mercúrio foram realizadas purgas durante a análise das amostras, tendo-se verificado que estas apresentavam sempre valores abaixo do limite de deteção do aparelho.

Preparação do Material de Referência para o sangue - *Seronorm*

O CRM para o sangue foi preparado a partir de material liofilizado de acordo com as especificações do fabricante. Ao preparado liofilizado foi adicionado 3 ml de água ultrapura esterilizada e a solução obtida foi cuidadosamente agitada durante 30 min. Após homogeneização a solução foi transferida para um tubo de centrífuga estéril e mantida a -20°C. Foi ainda preparada uma alíquota de 1 ml para uso imediato e que foi mantida a 4°C durante 7 dias.

3.3. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado no *software* ExelStat V.2014.5.03. Após verificação da distribuição não paramétrica das variáveis (através do teste de Shapiro-Wilk) foram utilizados testes não paramétricos, nomeadamente a correlação de spearman e para comparação de dois grupos utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Quando mais de dois grupos foram objecto de comparação o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. O nível de significância foi de 95%. Os gráficos apresentados foram elaborados no *software* MiniTab V17.

4. Resultados e discussão

4.1. QA/QC e Otimização do método de análise de pelo e cabelo

4.1.1. Materiais de referência

Para avaliar a exatidão e precisão do método foram analisados dois tipos de materiais de referência (CRMs), nomeadamente material de referência para cabelo humano (ERM-DB001 - *Trace Elements in Human Hair*) e material de referência para sangue humano. No caso do sangue humano foram analisados 2 CRMs com diferentes concentrações: o *Seronorm Trace elements whole blood L-1, Lot 1406263* ($1,18 < [\text{Hg}] < 1,77$ ng/g) e o *Seronorm Trace elements whole blood L-2, Lot 1406264* cuja gama de concentrações certificada varia entre 13,6 e 20,4 ng/g. Os resultados obtidos para todas as quantificações realizadas encontram-se disponíveis no anexo VI.

A concentração de mercúrio no material de referência de cabelo humano nas 13 medições foi de $310,05 \pm 14,74$ ng/g o que corresponde a uma percentagem de recuperação de $84,9 \pm 4,0\%$. O coeficiente de variação (CV) das 13 réplicas foi inferior a 5% (CV=4.8%).

Relativamente ao sangue humano as recuperações variaram entre $72,1 \pm 4,8\%$ para o *Seronorm L1* e $97,9 \pm 1,5\%$ para o *Seronorm L2*, com CVs de 6,6% para o L1 (n=14) e 1,5% para o L2 (n=3).

4.1.2. Otimização da quantidade de cabelo e pelo a usar

De acordo com as especificações do fabricante do equipamento a análise de cabelo humano deve ser realizada com a rotina pré-estabelecida para “solid sample”. Devido à reduzida quantidade de amostras de pelo e cabelo obtidas, foi realizada uma otimização do método com vista à utilização de uma quantidade inferior de amostra. Assim foram realizadas quantificações (em triplicado) de quantidades distintas da mesma amostra de cabelo (2,5mg; 5mg; 10mg; 15mg e 20mg). Para as amostras com 20mg, 15mg e 10 mg o coeficiente de variação foi sempre inferior a 5% ao passo que para quantidades inferiores de amostra (2,5mg e 5 mg) o coeficiente de variação foi superior a 5%. Assim foi decidido usar 10mg de amostra de cabelo e pelo para quantificação dos níveis mercúrio total. Nesta fase foi ainda quantificado o mercúrio total no material de referência ERM-DB001 (3 réplicas) tendo-se obtido uma taxa de recuperação de 86,9% e um coeficiente de variação de 0,47%.

4.2. Concentrações de mercúrio total nas amostras de sangue e pelo de cães

No âmbito do protocolo de colaboração estabelecido com o Hospital Veterinário do Baixo Vouga e com a Clínica Veterinária da Covilhã foi possível recrutar 45 cães e 9 donos. Na Tabela 1 estão sumariadas as características gerais dos animais que participaram no estudo e as concentrações de mercúrio obtidas. No anexo VII todas as informações referentes aos animais e donos recrutados encontram-se descritas.

Tabela 1. Características dos cães recrutados e resultados dos valores de mercúrio em amostras de sangue e pelo dos cães e no cabelo dos respetivos donos (-) amostra não disponível; (< LD) inferior ao limite de deteção do equipamento; (SRD) sem raça definida).

Código	Sexo	Raça	[Hg] sangue ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] pelo ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] cabelo ng/g (média±DesvPad)
C01	F	SRD	< LD	28,13 ± 1,49	1126,38
C02	F	SRD	1,11 ± 0,11	333,27	1056,50 ± 62,63
C03	M	SRD	0,64 ± 0,08	229,54 ± 0,82	781,01 ± 183,95
C04	F	SRD	0,32 ± 0,00	-	-
C05	M	Serra de Aires	< LD	41,03 ± 2,91	2785,72 ± 163,17
C06	F	SRD	1,32 ± 0,04	-	-
C07	M	SRD	0,02 ± 0,02	68,19 ± 2,80	-
C08	F	Bulldog Francês	0,58 ± 0,04	271,69	815,96
C09	F	Yorkshire	0,81 ± 0,02	159,74 ± 3,51	899,81 ± 79,11
C10	F	Golden Retriever	0,05 ± 0,04	127,05 ± 1,82	-
C11	F	Lulu da Pomerânia	< LD	41,73 ± 0,80	-
C12	M	Boxer	0,63±0,04	68,69	-
C13	F	Serra da Estrela	21,40 ± 1,43	11,01 ± 0,38	-
C14	M	SRD	< LD	41,53 ± 1,61	-
C15	F	SRD	< LD	118,70 ± 3,46	-
C16	M	SRD	0,72 ± 0,04	245,81 ± 4,03	-
C17	F	SRD	< LD	134,25 ± 4,30	962,37
C18	M	SRD	0,95 ± 0,10	-	-
C19	F	SRD	0,05 ± 0,02	101,49 ± 7,49	-
C20	M	Caniche	< LD	482,48 ± 33,21	-
C21	M	Yorkshire terrier	1,38 ± 0,06	662,08	-
C22	M	Lulu da Pomerânia	0,47 ± 0,04	176,73	-
C23	F	SRD	0,78 ± 0,05	234,25	-
C24	M	Collie	0,19 ± 0,04	116,83 ± 3,04	-
C25	F	Sharpei	0,18 ± 0,03	-	-

Código	Sexo	Raça	[Hg] sangue ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] pelo ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] cabelo ng/g (média±DesvPad)
C26	F	Sharpei	0,21 ± 0,09	-	-
C27	M	York Shire	< LD	79,99 ± 0,68	553,44
C28	M	Beagle	< LD	51,36	3815,43
C29	M	Bulldog Francês	0,38 ± 0,02	-	1126,38
C30	M	SRD	0,76 ± 0,02	150,91 ± 7,39	1056,50 ± 62,62
C31	M	Épagneul Breton	0,54 ± 0,07	117,39 ± 5,26	781,02 ± 183,95
C32	M	Labrador	0,19 ± 0,03	65,83 ± 5,58	-
C33	M	São Bernardo	< LD	19,58 ± 0,86	2785,73 ± 163,17
C34	F	SRD	0,38 ± 0,03	38,25 ± 1,27	-
C35	M	Golden Retriever	0,26 ± 0,02	47,08 ± 2,67	-
C36	M	SRD	< LD	26,55 ± 1,74	815,96
C37	F	Pastor Alemão	-	150,43 ± 10,38	899,81 ± 79,11
C38	M	Labrador	< LD	44,99 ± 1,94	-
C39	F	SRD	1,38 ± 0,05	45,15 ± 0,05	-
C40	F	SRD	< LD	118,14 ± 150,86	-
C41	F	Bulldog Francês	0,24 ± 0,04	152,07 ± 2,63	-
C42	M	Pastor Alemão	< LD	64,23 ± 1,92	-
C43	M	Labrador	< LD	17,16 ± 0,86	-
C44	M	SRD	-	70,26 ± 2,27	-
C45	F	SRD	0,41 ± 0,00	130,06 ± 6,54	-

Dos 45 cães recrutados foi possível obter 39 amostras de pelo e 43 amostras de sangue. Relativamente aos donos a taxa de adesão foi relativamente baixa (20%) só tendo sido possível recolher 9 amostras de cabelo humano.

Do total da amostragem canídea, 21 eram fêmeas e 24 eram machos. Relativamente à idade estudaram-se 2 animais com idade inferior a 1 ano, 17 com idades entre 1 e 5 anos, 19 entre 6 e 10 anos e 7 com idade superior a 10 anos até um máximo de 18 anos (Anexo VII). Relativamente às raças, a maioria dos animais eram de raça não definida (44,4%), seguindo-se os Labradores, Yorkshires e Bulldog Francês com 6,6% para cada uma delas, depois as raças Golden Retriever, Lulu da Pomerânia, Pastor Alemão e Sharpei (com 4,4% cada) e por fim 2,2% dos animais eram das raças Beagle, Boxer, Caniche, Collie, Epagneul Breton, São Bernardo, Serra da Estrela e Serra de Aires. A nível de peso, 7 animais tinham peso compreendido entre 1 e 5 quilogramas (kg), 9 entre 6 a 10 kg, 13 entre 11 e 20 kg, 5 entre 21 e 30 kg e 10 animais com peso superior a 30 kg. Relativamente à alimentação 39 cães eram alimentados apenas com ração comercial, 5 com ração e restos e apenas 1 era alimentado só com restos de comida dos donos. No que diz respeito às doenças 24 eram portadores de doenças, sendo que 21 animais tomavam medicação e 21 animais não apresentavam qualquer tipo de doença. Dos animais estudados, 33 localizavam-se em área urbana dos quais 14 pertenciam à região geográfica de Aveiro e 19 ao distrito de Castelo Branco, 10 viviam em meio rural (9 Distrito de Castelo Branco e 1 Distrito de Aveiro) e apenas dois na zona industrial da Covilhã. Sendo que, destes grupos, 23 habitavam em casa juntamente com os donos, 7 na rua e 15 frequentavam ambas as áreas.

Nos cães analisados foi possível quantificar mercúrio em todas as amostras de pelo com valores entre 11,01 ng/g e 662,08 ng/g. Para as amostras de sangue, os níveis de mercúrio estavam abaixo dos limites de deteção do equipamento (0,001 ng) em 15 animais. Nos 28 animais onde foi possível quantificar mercúrio no sangue os valores variaram entre 0,021 ng/g até 21,39 ng/g (Tabela 1 e **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**).

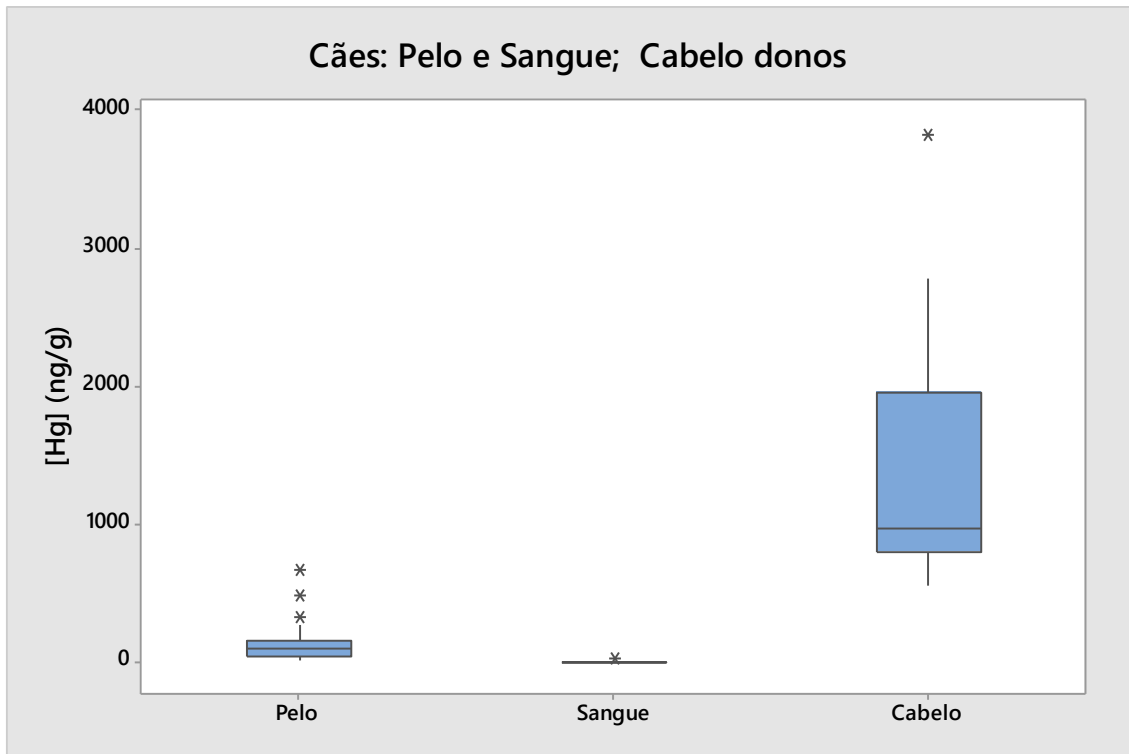


Figura 10. Boxplot com as concentrações de mercúrio (ng/g) no pelo (n=39) e sangue (n=43) dos cães e no cabelo dos respetivos donos (n=9).

A Figura 12 ilustra a influência dos vários parâmetros nas concentrações de mercúrio no sangue e no pelo dos cães. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de mercúrio no sangue e os seguintes factores: Género (Man Whitney U Test: $U= 188,5$; $p= 0,447464$); dieta (Man Whitney U Test: $U= 46,5$; $p= 0,080424$); Doenças (Man Whitney U Test: $U= 187,0$; $p= 0,4043$); Medicação (Man Whitney U Test: $U= 143,0$; $p= 0,0534$); Habitat (Kruskal-Wallis Test: $K= 188,5$; $p= 0,608176$). Registaram-se diferenças significativas entre a concentração de mercúrio no sangue dos cães que vivem em zonas urbanas quando comparados com os cães que vivem em zonas rurais (Man Whitney U Test: $U= 68,5$; $p= 0,007969$), sendo que estes últimos apresentam concentrações superiores. Relativamente ao pelo não foram registadas diferenças significativas para nenhum dos factores. O facto de não se terem registado diferenças na concentração de mercúrio no pelo nos animais que vivem em ambiente rural face aos animais que vivem em ambiente urbano e de se terem detectado diferenças entre estes dois grupos de animais, sugere que se trata de uma exposição recente uma vez que o sangue reflete exposições recentes e o pelo ao ser uma matriz integradora reflete exposições passadas.

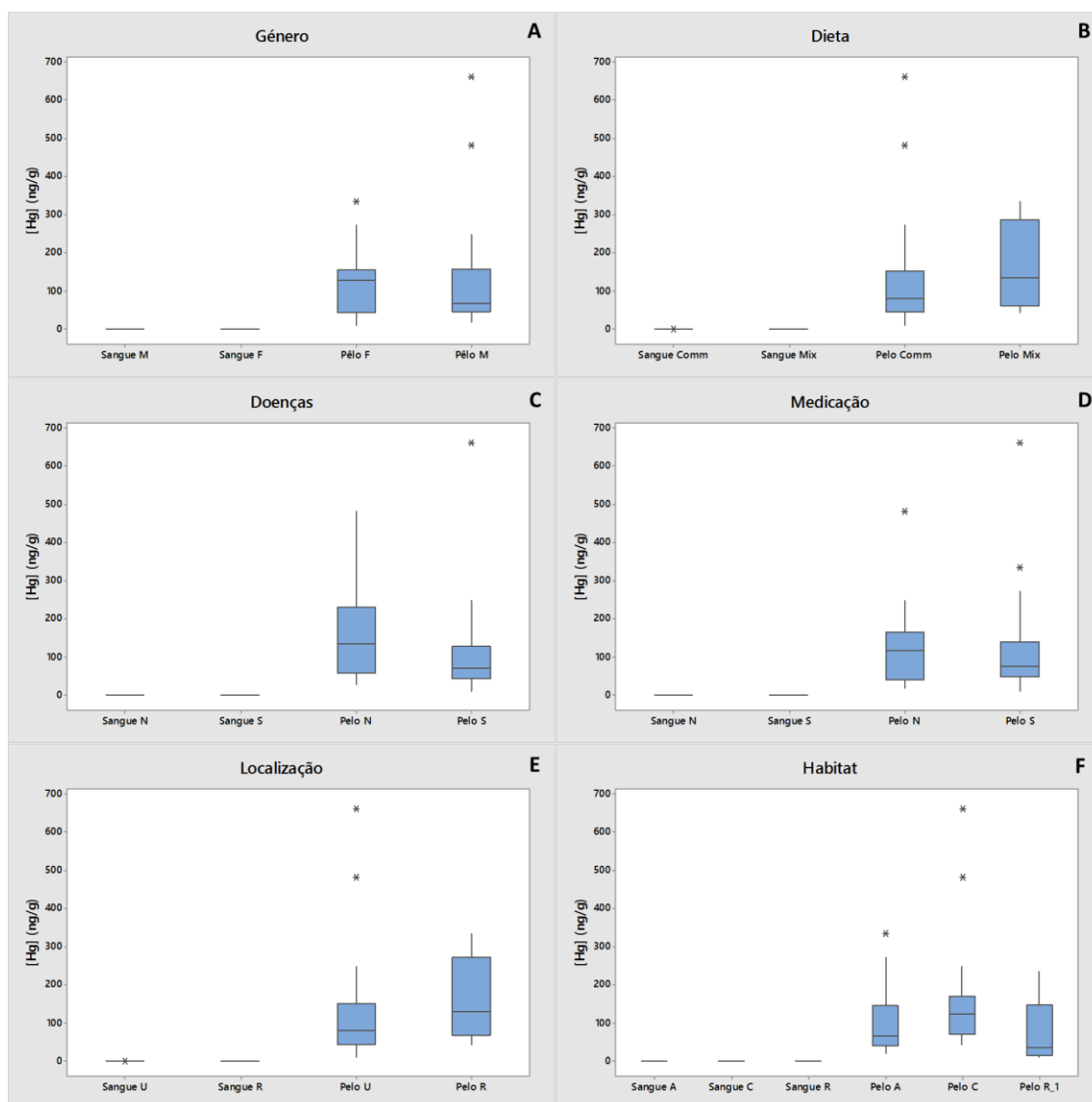


Figura 11. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no sangue e pelo dos cães elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: género (A); dieta (B); doenças (C); medição (D); Localização (E) e habitat (F). M: macho; F: Fêmea; Comm: Dieta Comercial; Mix: Mistura de dieta comercial e caseira; N (não): sem doença; S (sim): com doença; U: Urbano; R: Rural; A: ambos (casa+rua); C: Casa; R: Rua.

Existe uma correlação significativa entre os níveis de mercúrio no sangue e no pelo dos animais ($r=0.6355$, $p=0.0001$). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores onde também se observaram correlações significativas entre os níveis de mercúrio no sangue e no pelo de cães (ver Sousa et. al. 2013 e referências incluídas). O rácio entre as concentrações de mercúrio no sangue e no pelo de cão variou bastante entre os diferentes animais, com um mínimo de 0,5 e um máximo de 3196. Estes valores divergem numa ordem de grandeza dos registados num estudo semelhante com cães do Norte de Portugal (rácio sangue/pelo entre 8 e 623). Estes resultados apontam para uma grande variabilidade individual no rácio pelo/sangue e podem ser um reflexo das diferentes raças incluídas nos dois estudos e das condições a que cada animal incluído no estudo esteve sujeito.

4.3. Concentrações de mercúrio total nas amostras de sangue e pelo de gatos

O recrutamento de gatos é normalmente mais difícil uma vez que o manuseamento dos gatos e consequente colheita de amostras é dificultado pelo próprio animal que habitualmente não colabora com o médico veterinário. Assim, só foi possível recolher amostras de 17 gatos. Na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** estão descritas as características gerais dos atos que participaram no estudo. No anexo VIII encontram-se descritas todas as informações relativas aos gatos e donos recrutados.

Tabela 2. Características dos gatos recrutados e resultados dos valores de mercúrio em amostras de sangue e pelo dos gatos e no cabelo dos respetivos donos (-) amostra não disponível; (SRD) sem raça definida).

Código	Sexo	Raça	[Hg] pelo ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] sangue ng/g (Média±DesvPad)	[Hg] cabelo ng/g (Média±DesvPad)
G01	M	Europeu Comum	121,61 ± 1,06	9,91 ± 0,80	378,01 ± 5,17
G02	F	Europeu Comum	384,64 ± 2,81	22,65 ± 0,62	1349,26 ± 18,47
G03	M	Europeu Comum	399,91 ± 7,03	16,80 ± 1,11	1568,38
G04	M	Europeu Comum	206,41 ± 10,24	3,46 ± 0,06	408,71
G05	F	SRD	163,13 ± 4,57	4,93 ± 0,35	828,46
G06	M	Europeu Comum	469,56 ± 15,15	1,08 ± 0,05	1361,15
G07	M	SRD	887,74 ± 29,12	20,40 ± 0,42	794,7728 ± 65,62
G08	F	Europeu Comum	672,33 ± 124,71	7,66 ± 0,19	1585,719 ± 273,95
G09	F	Europeu Comum	66,28 ± 2,32	1,11 ± 0,14	743,0825 ± 4,43
G10	F	SRD	328,17 ± 4,50	6,85 ± 0,25	-
G11	F	SRD	116,67	5,89 ± 1,02	-
G12	M	Europeu Comum	683,39 ± 33,43	16,85 ± 1,26	-
G13	M	Europeu Comum	771,26 ± 17,58	5,96 ± 0,27	-
G14	M	Persa	172,84 ± 2,13	3,36 ± 0,23	-
G15	F	Europeu Comum	301,72 ± 14,10	33,41 ± 2,27	-
G16	M	Europeu Comum	367,15 ± 3,15	5,88 ± 0,21	-
G17	F	Europeu Comum	72,77 ± 2,82	0,68 ± 0,04	-

Dos 17 gatos recrutados foi possível obter amostras de pelo e de sangue de todos os animais. Relativamente aos donos a taxa de adesão foi superior relativamente às dos cães (53%) tendo sido possível recolher 9 amostras de cabelo humano.

Dos gatos incluídos na análise, 8 eram fêmeas e 9 machos, 7 tinham uma idade entre 1 e 5 anos, 4 entre 6 e 10 anos e 4 com idade superior a 10 anos. A grande maioria dos gatos eram da raça Europeu comum (70,5%) ou sem raça definida (23,5%). Relativamente ao peso, 4 pesavam entre

1 e 2 kg, 8 entre 3 e 5 kg e 5 tinham mais de 5 kg. Nos gatos recrutados apenas 1 era alimentado com uma mistura de restos e ração e os restantes eram alimentados exclusivamente com ração comercial. No que diz respeito à saúde do animal, verificou-se que 10 apresentavam problemas de saúde, dos quais 6 eram medicados, enquanto que os restantes 7 não possuíam qualquer tipo de doença. Os gatos na sua maioria habitavam em áreas urbanas (14), sendo que apenas 2 se situavam em áreas rurais e 1 em área industrial. A nível de habitat, 11 gatos residiam em casa, 1 na rua e 5 em ambas as áreas.

Nos gatos foi possível quantificar mercúrio em todas as amostras de pelo e sangue com valores entre 66,28 ng/g a 887,74 ng/g no pelo e 0,68 ng/g a 33,41 ng/g no sangue (Tabela 2 e Figura 12).

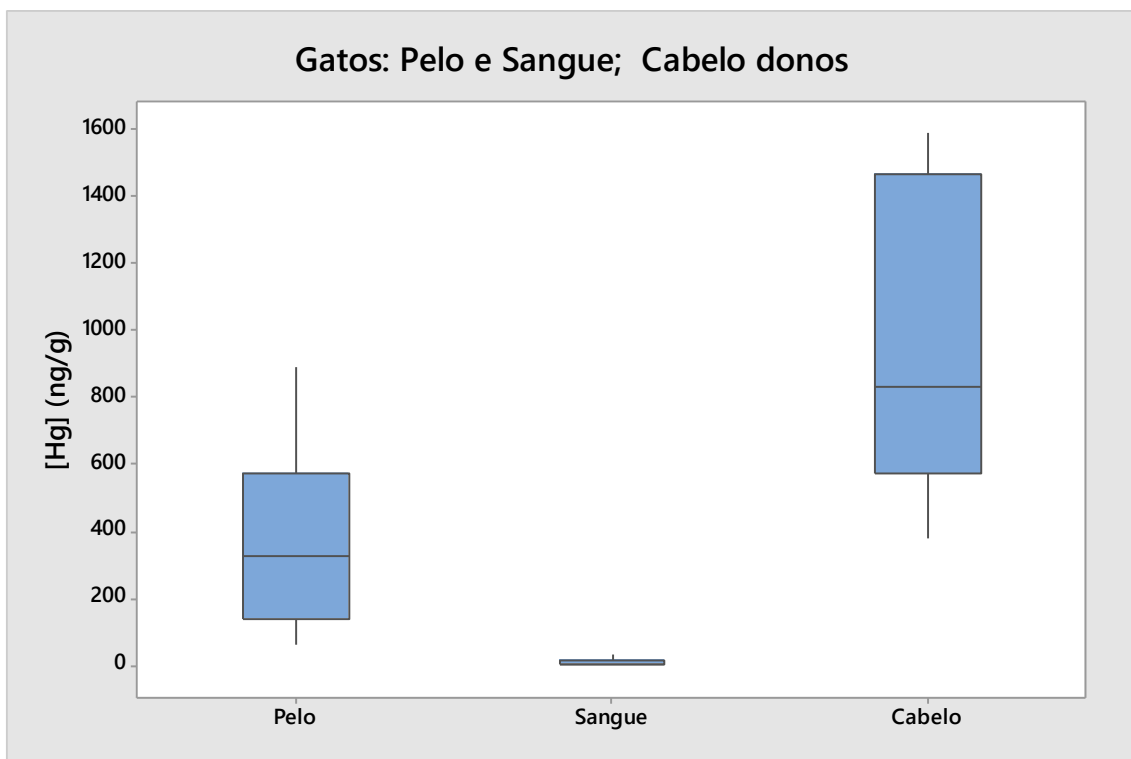


Figura 12. Boxplot com as concentrações de mercúrio (ng/g) no pelo (n=17) e sangue (n=17) dos gatos e no cabelo dos respetivos donos (n=9).

A influência dos vários parâmetros nas concentrações de mercúrio no sangue e no pelo dos gatos encontra-se descrita na Figura 13. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de mercúrio no sangue dos gatos e os seguintes factores: Género (Man Whitney U Test: U= 36,000; p= 1,000); Doenças (Man Whitney U Test: U= 47,0; p= 0,261741); Medicação (Man Whitney U Test: U= 21,000; p= 0,247766); Localização (Man Whitney U Test: U= 20,000; p= 0,382515); Habitat (Man Whitney U Test: U = 24,0000; p= 0,7340). Relativamente ao pelo e à semelhança do sangue também não foram registadas diferenças significativas para nenhum

dos factores. A dieta não foi considerada uma vez que todos os gatos à exceção de um eram alimentados exclusivamente com ração.

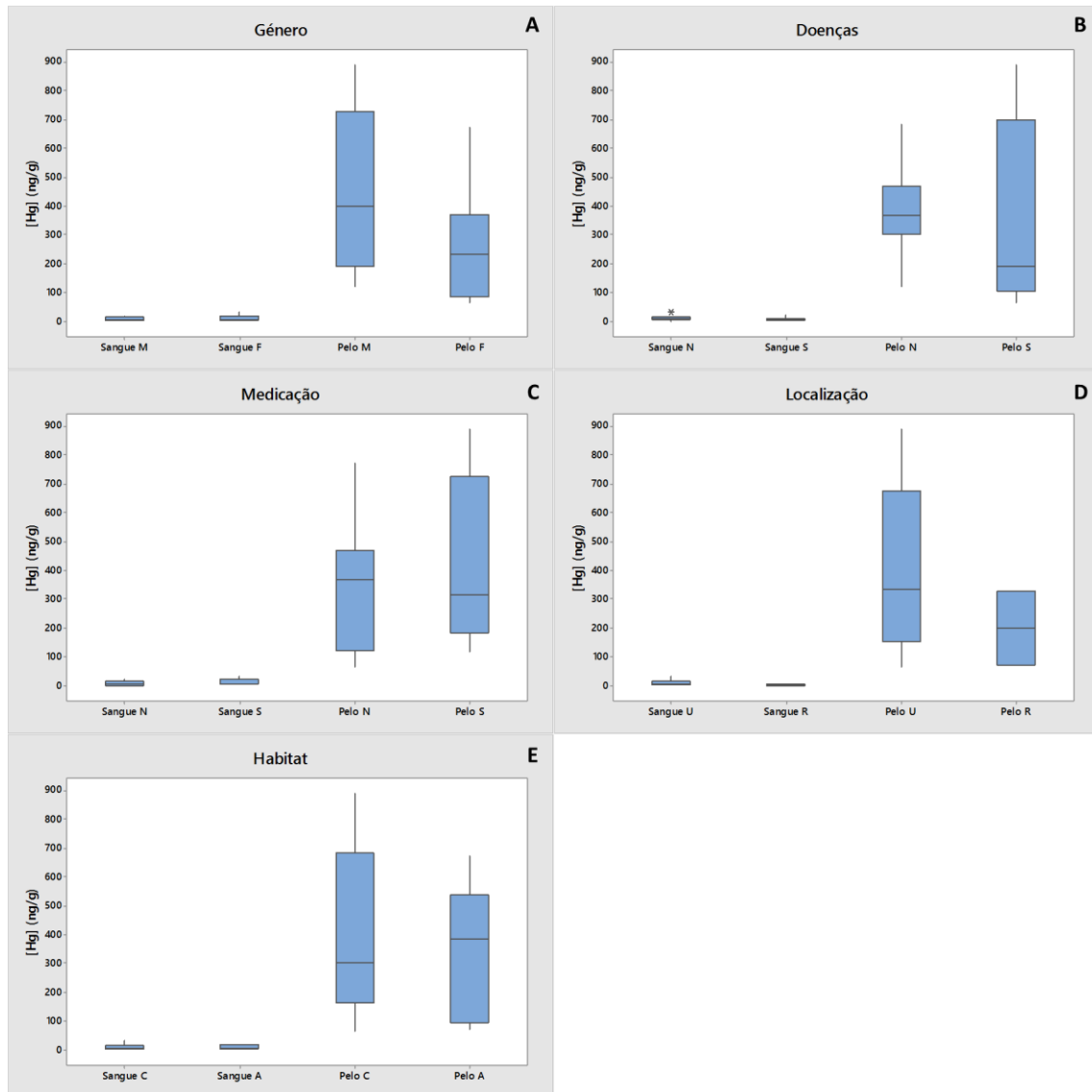


Figura 13. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no sangue e pelo dos gatos elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: género (A); doenças (B); medicação (C); localização (D) e habitat (E). M: macho; F: Fêmea; N (não): sem doença; S (sim): com doença; U: Urbano; R: Rural; A: Ambos (casa+rua); C: Casa.

À semelhança do que se registou com os cães, existe uma correlação significativa entre os níveis de mercúrio no sangue e no pelo dos gatos ($r=0,5049$, $p=0,0402$). Face à ausência de estudos com gatos (provavelmente associado à dificuldade de recolha de sangue) não é possível comparar os resultados obtidos com outros estudos para a mesma espécie. O rácio entre as concentrações de mercúrio no sangue e no pelo de gato também variou bastante entre os diferentes animais, com um mínimo de 9 e um máximo de 435. Mais uma vez, face à ausência de estudos com sangue de gatos é impossível estabelecer comparações com outros estudos.

4.4. Comparação com a literatura

Na Erro! A origem da referência não foi encontrada. podem observar-se resultados de estudos realizados anteriormente em cães e gatos, por todo o mundo, em diferentes tecidos como soro, fígado, rim e ossos, para além daqueles analisados no presente estudo.

Tabela 3. Compilação dos níveis de mercúrio total detetados em amostras de cães e gatos ($< LD$) inferior ao limite de deteção do equipamento).

Localização geográfica	N	Animais	[Hg] ng/g	Referência bibliográfica	
Alasca,USA	29	Cães de trenó	Pelo: 44 - 125	(Dunlap, Reynolds, Bowers, & Duffy, 2007)	
Alasca,USA	47	Cães de trenó	Pelo: 139 - 15800	(Dunlap et al., 2007)	
Alasca	4	Cães de trenó	Sangue: $9,2 \pm 1,97$	(Lieske et al., 2011)	
			Pelo: 544 ± 11		
Alemanha	1	Cão pastor alemão	Fígado: 1500	(Hansmann, Stephan, Wirtz, Gruber, & Wohlsein, 2009)	
			Rim: 12600		
Coreia do Sul	204	Cães domésticos	Pelo: 210 ± 90	(Park et al. 2005a)	
Coreia do Sul	204	Cães domésticos	Soro: 240 ± 40	(Park et al. 2005b)	
Gronelândia	10	Cães de trenó	Pelo: 4105 - 34743	(Hansen & Danscher, 1995)	
Espanha	57	Cães rurais e urbanos	Fígado: $< LD - 294$	(Lopez-alonso, Miranda, García-partida, & Cantero, 2007)	
			Rim: $< LD - 379$		
Itália	38	Cães domésticos e vadios	Fígado: 54	(Serpe et al., 2012)	
			Rim: 40		
Japão	ND	Cães vadios	Pelo: $< 5,000$	(Doi, Nakaya, Ohno, & Yamashita, 1986)	
Japão	34	Cães	Pelo fêmea: 660 ± 100	(Sakai, Ito, Aoki, Aimi, & Nitaya, 1995)	
			Pelo macho: 930 ± 230		
	41	Gatos	Pelo fêmea: 7450 ± 1280		
			Pelo macho: 7400 ± 2930		
Midwest, USA	36	Cães	Sangue: < 20	(Penumarthy, Oehme, & Hayes, 1980)	
			Fígado: $< 0 - 40$		
			Rim: $< 20 - 400$		
Nova Iorque, USA	16	Cães de trenó	Pelo: 20 - 59	(Dunlap et al., 2007)	
Polónia	26	Cães domésticos	Ossos: $4,1 \pm 7,0$	(Lanocha & Kalisinska, 2012)	
Portugal	27	Cães domésticos	Sangue: 0,16 - 12,38	(Sousa et al., 2013)	
			Pelo: 24,16 - 826,30		
	39	Cães domésticos	Sangue: 0,021 - 21,4	Este estudo	
			Pelo: 11,01 - 622,08		
	17	Gatos domésticos	Sangue: 0,68 - 33,41		
			Pelo: 66,28 - 887,74		
República Checa	131	Cães	Pelo: 37,5		(Kral, Blahova, Sedlackova, Vecerek, & Svobodova, 2015)

As concentrações de mercúrio total quantificadas nas amostras de pelo dos animais podem ser consideradas relativamente baixas. Apesar de não haver um limite de concentração de mercúrio total para os cães e gatos, todas as amostras estão abaixo de 1000 ng/g que é a concentração associada à toxicidade na vida selvagem (Lieske et al., 2011). Os valores obtidos também foram inferiores à concentração de referência da USEPA para o cabelo humano, correspondente a 1000 ng/g (Sousa et al., 2013).

Comparando os resultados obtidos neste estudo com a bibliografia já descrita, pode observar-se que as concentrações de mercúrio total obtidas no pelo dos cães, estão próximas das descritas em vários trabalhos realizados, como apresentado na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**

Contudo, existe uma certa diferença em relação a alguns estudos específicos, fruto dos animais em questão viverem nas regiões árticas (Dunlap et al., 2007; Hansen & Danscher, 1995) e terem uma dieta rica em peixe. Por exemplo, em Dunlap et al. (2007), nos animais que são alimentados com ração comercial, apesar de viverem no Ártico, as concentrações de mercúrio total no pelo são da mesma magnitude que as apresentadas neste estudo. Os resultados apresentados por Sousa et al. (2013) relativos a cães do Norte de Portugal também são semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Relativamente às amostras de sangue em cães, existem apenas três estudos onde foi analisada a concentração de mercúrio total (Lieske et al., 2011; Penumarthy et al., 1980; Sousa et al., 2013). Um deles foi realizado em 1980, sendo que os resultados obtidos foram inferiores ao nível de deteção do aparelho. O segundo estudo (Lieske et al., 2011), apresenta um número de amostras bastante reduzido (n=4), pelo que os resultados são pouco conclusivos. Por fim, no estudo efetuado em Portugal por Sousa et al. (2013), as concentrações de mercúrio no sangue variaram de 0,16 ng/g a 12,38 ng/g, valores estes que são próximos dos aqui obtidos. Porém, no presente trabalho, das 43 amostras analisadas, em 15 delas as concentrações de mercúrio total foram inferiores ao limite de deteção do equipamento, o que não se verificou no estudo realizado anteriormente.

O estudo dos níveis de mercúrio total no pelo e sangue dos gatos ainda não foi muito aprofundado. Foi realizado um estudo no Japão por Sakai et al. (1995) onde foram analisadas 41 amostras de pelo de gato, com concentrações detetadas na ordem dos 7400 ± 2930 ng/g, cujos valores diferem bastante dos obtidos neste estudo. Esta diferença pode estar relacionada com o tipo de alimentação dos gatos, pois a maioria dos gatos alimentava-se de atum fresco.

4.5. Níveis de mercúrio em humanos

Para a quantificação de mercúrio total em cabelo humano foram recolhidas 18 amostras. As concentrações obtidas variam de 372 ng/g a 3815,42 ng/g, correspondente a uma concentração média de mercúrio total detetada de 1235,18 ng/g. No anexo IX estão descritas as características dos humanos que participaram neste estudo, assim como os seus hábitos alimentares particularmente no que concerne ao consumo de peixe. O questionário de consumo de peixe aplicado foi o proposto por Hond et al. (2015).

De uma forma geral, os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza que os resultados obtidos para a região mediterrânica, nomeadamente Espanha, Itália e Portugal e superiores aos níveis detetados noutros países Europeus (Tabela 4). De salientar que nos outros estudos, o número de amostras era superior ao do trabalho atual.

Segundo a *USEPA* o valor de referência recomendado para o cabelo humano é de 1000 ng/g. Comparando este valor com os que foram obtidos neste estudo, pode observar-se que das 18 amostras analisadas e quantificadas, 44% delas apresentam valores superiores à dose de referência. Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos para uma população de adolescentes dos Açores e de Aveiro na qual 50% dos participantes apresentaram níveis de mercúrio no cabelo superiores à dose de referência de 1000ng/g.

Tabela 4. Comparação dos valores de mercúrio detetados em estudos com cabelo humano ((n) número de amostras; (-) informação não disponível).

Localização	Data	n	População	[Hg] µg/g	Referência bibliográfica
Alemanha	2011/2012	120	Mulheres e crianças	0,0046 - 0,065	(Hond et al., 2015)
Bélgica	2011/2012	129	Mulheres e crianças	0,172 - 0,241	(Hond et al., 2015)
Brasil	2006-2012	649	Mulheres e crianças	0,82 - 17,11	(Marques et al., 2016)
Canadá	2007-2008	388	Crianças	1,43	(Tian, Egeland, Sobol, & Man, 2011)
China	2011	5	-	0,258	(P. Li, Feng, Qiu, & Wan, 2011)
Chipre	2011/2012	60	Mulheres e crianças	0,257 - 0,413	(Hond et al., 2015)
Dinamarca	2011/2012	145	Mulheres e crianças	0,211 - 0,295	(Hond et al., 2015)
Eslováquia	2011/2012	126	Mulheres e crianças	0,078 - 0,109	(Hond et al., 2015)
Eslovénia	2011/2012	118	Mulheres e crianças	0,142 - 0,200	(Hond et al., 2015)
Espanha	1997-1999	53	Crianças	< LD - 1,152	(Torrente et al., 2014)
Espanha	2005-2006	170	Adultos e crianças	0,20 - 9,35	(Diez, Esbrí, Tobias, Higuera, & Martínez-coronado, 2011)
Espanha	2014	114	Crianças	0,16 - 4,86	(Peña-Fernández, González-Muñoz, & Lobo-Bedmar, 2014)

Localização	Data	N	População	[Hg] µg/g	Referência bibliográfica
Espanha	2011/2012	133	Mulheres e crianças	0,747 - 1,046	(Hond et al., 2015)
Hungria	2011/2012	120	Mulheres e crianças	0,021 - 0,029	(Hond et al., 2015)
Irão	2008	149	Mulheres	0,44 - 53,56	(Salehi & Esmaili-sari, 2010)
Irão	2006-2007	186	Mulheres e crianças	0,07 - 8,97	(Okati & Sari, 2012)
Irlanda	2011/2012	101	Mulheres e crianças	0,082 - 0,114	(Hond et al., 2015)
Itália	2016	224	Adultos	0,04 - 10,5	(Bonsignore et al., 2016)
Luxemburgo	2011/2012	52	Mulheres e crianças	0,142 - 0,229	(Hond et al., 2015)
Polónia	1996-2003	83	Adultos	2,15 ± 0,29	(Chojnacki, 2005)
Polónia	2011/2012	116	Mulheres e crianças	0,060 - 0,083	(Hond et al., 2015)
Portugal, Açores	-	84	Adolescentes	0,03 - 2,130	(Vieira, Morgado, Soares, & Abreu, 2015)
Portugal, Aveiro	-	73	Adolescentes	0,03 - 2,600	(Vieira et al., 2015)
Portugal	2011/2012	120	Mulheres e crianças	0,873 - 1,222	(Hond et al., 2015)
Portugal	2016	18	Adultos, Castelo Branco	0,372 - 3,815	Este estudo
Reino Unido	2011/2012	21	Mulheres e crianças	0,163 - 0,228	(Hond et al., 2015)
República Checa	2011/2012	120	Mulheres e crianças	0,221 - 0,295	(Hond et al., 2015)
República Checa	2003	3427	Crianças	0,01 - 3,17	(Beneš, Sladká, Spevackova, & Šmíd, 2003)
Roménia	2011/2012	120	Mulheres e crianças	0,072 - 0,101	(Hond et al., 2015)
Suécia	2011/2012	94	Mulheres e crianças	0,153 - 0,214	(Hond et al., 2015)
Suíça	2011/2012	115	Mulheres e crianças	0,083 - 0,116	(Hond et al., 2015)

Face à reduzida taxa de adesão ao nosso estudo (29%) por parte dos donos dos animais é difícil analisar quais os factores responsáveis pelos níveis de mercúrio registados. No entanto, é possível que os valores elevados registados no presente estudo possam ser consequência do elevado consumo de peixe (Tabela 5) por parte dos donos dos animais, ou da exposição ambiental a mercúrio resultante por exemplo da libertação deste metal através dos incêndios florestais (Webster, Kane, Obrist, Ryan, & Aiken, 2016).

Tabela 5. Consumo de peixe de acordo com as categorias propostas por Hond et al. (2015) dos danos dos aniamis (cães + gatos) que aceitaram participar neste estudo.

Consumo de peixe							
	Várias vezes por dia	Diariamente	Várias vezes por semana	1 X semana	2-3 X mês	1 x mês	Raramente
Peixe/marisco*	1	1	3	7	5	2	2
Peixe de água salgada	1	1	7	9	1	1	1
Marisco	–	–	–	4	3	3	11
Peixe de água doce	–	–	5	3	1	3	9
Outros produtos marinhos (p. ex. algas)	–	–	–	–	21	–	19

* incluído atum nas saladas, sandes/pizza, cocktail de marisco, algas, etc.

Considerando que para além do consumo de peixe uma das principais vias de exposição a mercúrio são as amálgamas dentárias, a influência das amálgamas nos níveis de mercúrio registados no cabelo humano foi avaliado. No entanto, não se registaram diferenças significativas entre o grupo de donos com amálgamas e aqueles sem amálgamas (Mann-Whitney U Test: $U = 50$; $p = 0,426777$) (Figura 14-A). Também não se registaram diferenças significativas entre as concentrações de mercúrio entre homens e mulheres (Mann-Whitney U Test: $U = 39$; $p = 0,9646$) (Figura 14-B).

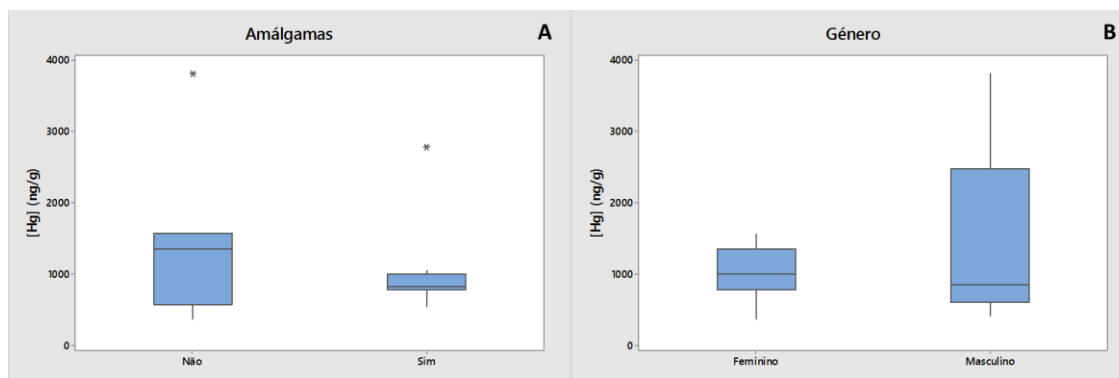


Figura 14. Box plots dos valores das concentrações de mercúrio no cabelo humano elaborados de acordo com os diferentes níveis das variáveis categóricas independentes rastreadas através dos inquéritos, nomeadamente: presença de amálgamas dentárias (A) e Género (B).

4.5.1. Comparação dos níveis de mercúrio nos animais e nos respectivos donos

A concentração de mercúrio no cabelo humano é superior à concentração de mercúrio registrada no pelo dos respectivos animais. Nos cães é em média 4 vezes superior (variação entre 0,9 e 11) ao passo que nos gatos é em média 24 vezes superior (variação entre 3 e 74). Não existe nenhuma correlação significativa entre os níveis de mercúrio nos cães e nos seus donos ($r=-0,6429$, $p=0,0962$) nem entre os gatos e os seus donos ($r=0,4286$, $p=0,3536$).

Face aos resultados obtidos não foi possível validar a utilização dos cães e gatos como sentinelas para a exposição a mercúrio. Aliás, os resultados (apesar de preliminares face ao nº reduzido de humanos recrutados), parecem sugerir que existem vias distintas de exposição nos humanos e nos animais domésticos. Essas vias distintas são consequência da adoção de uma dieta comercial para os animais de companhia em detrimento de uma dieta baseada nos restos dos alimentos dos donos.

5. Conclusões e perspetivas futuras

O principal objetivo deste trabalho centrou-se em monitorizar os níveis de contaminantes ambientais, neste caso do mercúrio, em animais de companhia, cães e gatos, na região Centro de Portugal (Aveiro e Covilhã). O estudo foi desenvolvido recorrendo a amostras de pelo e sangue dos animais, assim como amostras de cabelo de alguns humanos. Verificou-se que os níveis de mercúrio total quantificados nas amostras de sangue e pelo dos cães se enquadravam na mesma ordem de grandeza que os apresentados na literatura. Note-se que não existem estudos previamente realizados para a quantificação de mercúrio total no sangue e pelo nos gatos, pelo que o presente trabalho torna-se pioneiro na quantificação deste metal nestes animais domésticos.

Outro objetivo de estudo era a validação da utilização de pelo dos animais de estimação como matriz não invasiva, a fim de quantificar as concentrações de mercúrio nos mesmos. Quer para os cães quer para os gatos os níveis de mercúrio foram sempre superiores no pelo do que no sangue e foram registadas correlações significativas entre as concentrações de mercúrio no pelo e no sangue dos cães e entre as concentrações de mercúrio entre o pelo e o sangue dos gatos. Desta forma, a utilização do pelo foi validada e, em estudos futuros, o pelo destes animais pode ser utilizado para monitorizar os níveis de mercúrio.

Relativamente aos humanos, averiguou-se que o nível de mercúrio total médio das amostras de cabelo analisadas está acima do valor referenciado para o cabelo humano.

No que diz respeito à utilização destes animais como sentinelas para o ser humano, pode concluir-se que os cães e gatos não podem ser considerados bons sentinelas para o ser humano, uma vez que não foram estabelecidas correlações estatisticamente significativas entre estes e, a baixa adesão dos humanos no fornecimento do seu cabelo acabou por dificultar a realização deste objetivo.

Em relação a trabalho futuro, seria importante recrutar mais clínicas veterinárias para aumentar o número de amostras, não só na Covilhã, mas também alargar estas parcerias a clínicas da Guarda e Fundão, por exemplo, para se poder monitorizar as concentrações de mercúrio no centro do país.

Face à limitação verificada na dificuldade em recolher o cabelo dos humanos para este estudo, os investigadores deveriam ter contacto direto com a população alvo para expor os objetivos à população sensibilizando-a dos problemas que podem ter associados à contaminação de mercúrio e as vantagens que podem obter ao conseguir-se monitorizar este contaminante na região. Com o objetivo de se recolher um maior número de amostras de cabelo humano, poder-se-ia também recrutar cabeleireiros para o projeto onde a população pudesse beneficiar de um desconto ou oferta no corte do cabelo.

6. Bibliografia

- ATSDR. (1999a). *Public Health Statement Mercury*.
- ATSDR. (1999b). Toxicological profile for mercury. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (March).
- Bastos, V., & Sousa, A. (2012). *Indoor contaminants in pet cats and dogs*. Lambert Academic Publishing.
- Basu, N., Goodrich, J. M., & Head, J. (2014). Ecogenetics of mercury: from genetic polymorphisms and epigenetics to risk assessment and decision-making. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1248-1258.
- Beneš, B., Sladká, J., Spevackova, V., & Šmíd, J. (2003). Determination of normal concentration levels of Cd, Cr Cu, Hg, Pb, Se and Zn in hair of the child population in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*, 11(4), 184-184.
- Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, 1335-1351.
- Bolser, D. C., Garcia, K. D., Haywood, J. R., Leland, S. E., Miller, L., Nelson, R. J., ... Talcott, M. R. (2009). *Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research*. National Academy of Sciences. Washington, D.C.
- Bonsignore, M., Andol, N., Barra, M., Madeddu, A., Tisano, F., Ingallinella, V., ... Sprovieri, M. (2016). Assessment of mercury exposure in human populations: A status report from Augusta Bay (southern Italy). *Environmental Research*, 150, 592-599.
- Buckell, M., Hunter, D., Milton, R., & Perry, K. M. A. (1929). Chronic Mercury Poisoning. *British Journal of Industrial Medicine*, 55-63.
- Burger, J., & Gochfeld, M. (2011). Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1418-1429.
- Burns, D. A., Woodruff, L. G., Bradley, P. M., & Cannon, W. F. (2014). Mercury in the Soil of Two Contrasting Watersheds in the Eastern United States. *Plos One*, 9(2).
- Chan, T. Y. K. (2011). Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products. *Clinical Toxicology*, 49, 886-891.
- Chojnacki, A. (2005). Inter-element interactions in human hair. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 368-374.
- Clarkson, T. W. (1997). The Toxicology of Mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34(3), 369-403.

- Clarkson, T. W. (2006). The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 609-662.
- Davis, L. (2000). Unregulated potions still cause mercury poisoning. *Western Journal of Medicine*, 173(July), 2000.
- Díez, S., Esbrí, J. M., Tobias, A., Higuera, P., & Martínez-coronado, A. (2011). Determinants of exposure to mercury in hair from inhabitants of the largest mercury mine in the world. *Chemosphere*, 84(5), 571-577.
- Doi, R., Nakaya, K., Ohno, H., & Yamashita, K. (1986). Metal Content in the Fur of Domestic and Experimental Animals. *Environmental Contamination and Toxicology*, 213-218.
- Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N. (2013). Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environmental Science & Technology*, 47(10), 4967-4983.
- Dunlap, K. L., Reynolds, A. J., Bowers, P. M., & Duffy, L. K. (2007). Hair analysis in sled dogs (*Canis lupus familiaris*) illustrates a linkage of mercury exposure along the Yukon River with human subsistence food systems. *Science of the Total Environment* 385, 385, 80-85.
- EC. (2008). *Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC*,. European Union.
- Glickman, L. (1991). *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. Washinton, D.C.: National Academy Press.
- Goldman, L. R., & Shannon, M. W. (2001). Technical Report : Mercury in the Environment : In *PEDIATRICS* (Vol. 108, pp. 197-205).
- Goyer, R. A., & Clarkson, T. W. (2001). Toxic Effects of Metals. In *Casarett and Doull's toxicology:the basic science of poisons* (pp. 811-867).
- Guney, M., Welfringer, B., Repentigny, C. De, & Zagury, G. J. (2013). Children ' s Exposure to Mercury-Contaminated Soils : Exposure Assessment and Risk Characterization. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 345-355.
- Hansen, J. C., & Danscher, C. (1995). Quantitative and Qualitative Distribution of Mercury in Organs from Arctic Sledgedogs : An Atomic Absorption Spectrophotometric and Histochemical Study of Tissue Samples from Natural Long-Termed High Dietary Organic Mercury-Exposed Dogs from Thule , Green. *Pharmacology and Toxicology*, 77, 189-195.
- Hansmann, F., Stephan, I., Wirtz, A., Gruber, A. D., & Wohlsein, P. (2009). Mercury poisoning in a German shepherd dog. *Veterinary Record*, 165, 447-448.

- Hirschman, S. Z., Feingold, M., & George, B. (1963). Mercury in house paint as a cause acrodynia. *The New England Journal of Medicine*, 269, 230-241.
- Hond, E. Den, Govarts, E., Willems, H., Smolders, R., Casteleyn, L., Gehring, M. K., ... Mulcahy, M. (2015). First Steps toward Harmonized Human Biomonitoring in Europe : Demonstration Project to Perform Human Biomonitoring on a European Scale. *Environmental Health Perspectives*, 123(3), 255-263.
- Hoover, A. W., & Goldwater, L. J. (2013). Absorption and Excretion of Mercury in Man. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 10-13.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C., & Bermond, A. (2009). Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica Chimica Acta*, 631(1), 1-12.
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2015). A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 376-385.
- Kral, T., Blahova, J., Sedlackova, L., Vecerek, V., & Svobodova, Z. (2015). Evaluation of mercury contamination in dogs using hair analysis. *Neuro Endocrinology Letters*, 36, 68-72.
- Lanocha, N., & Kalisinska, E. (2012). Evaluation of Dog Bones in the Indirect Assessment of Environmental Contamination with Trace Elements. *Biological Trace Element Research*, 143, 103-112.
- Li, P., Feng, X., & Qiu, G. (2010). Methylmercury Exposure and Health Effects from Rice and Fish Consumption : A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 2666-2691.
- Li, P., Feng, X., Qiu, G., & Wan, Q. (2011). Hair can be a good biomarker of occupational exposure to mercury vapor : Simulated experiments and field data analysis. *Science of the Total Environment*, 409(20), 4484-4488.
- Li, W. C., & Tse, H. F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 192-201.
- Lieske, C. L., Moses, S. K., Castellini, J. M., Klejka, J., Hueffer, K., & Hara, T. M. O. (2011). Toxicokinetics of mercury in blood compartments and hair of fish-fed sled dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 66.
- López-alonso, M., Miranda, M., García-partida, P., & Cantero, F. (2007). Use of dogs as indicators of metal exposure in rural and urban habitats in NW Spain. *Science of the Total Environment* 372, 372, 668-675.
- Lyman, S. N., & Jaffe, D. A. (2011). Formation and fate of oxidized mercury in the upper

- troposphere and lower stratosphere. *Nature Geoscience*, 5(2), 114-117.
- Marques, R. C., Bernardi, J. V. E., Cunha, M. P. L., & Dórea, J. G. (2016). Impact of organic mercury exposure and home delivery on neurodevelopment of Amazonian children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 154, 326-332.
- Mason, R. P., Abbott, M. L., Bodaly, R. A., Bullock, O. R. J., Evers, D., Linberg, S. E., ... Swain, E. B. (2005). Monitoring the reponse to changing mercury deposition. *Environmental Science Technology*, 1, 15A-22A.
- Mutter, J., Curth, A., Naumann, J., Deth, R., & Walach, H. (2010). Does Inorganic Mercury Play a Role in Alzheimer ' s Disease? A Systematic Review and an Integrated Molecular Mechanism. *Journal of Alzheimer ' s Disease*, 22, 357-374.
- Okati, N., & Sari, A. E. (2012). Hair Mercury Concentrations of Lactating Mothers and Breastfed Infants in Iran (Fish Consumption and Mercury Exposure). *Biological Trace Element Research*, 149, 155-162.
- Park, S H , Lee , M H, Kim, S. K. (2005). Studies on the Concentrations of Cd , Pb , Hg and Cr in Dog Serum in Korea. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, (18), 1623-1627.
- Park, J., & Zheng, W. (2012). Human Exposure and Health Effects of Inorganic and Elemental Mercury. *Journal of Preventive Medicine & Public Health*, 344-352.
- Park, S. H., Lee, M. H., & Kim, S. K. (2005). Studies on Cd , Pb , Hg and Cr Values in Dog Hairs from Urban Korea. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(8), 1135-1140.
- Patra, M., & Sharma, A. (2000). Mercury Toxicity in Plants. *The Botanical Review*, 66(3), 379-422.
- Peña-Fernández, A., González-Muñoz, M. J., & Lobo-Bedmar, M. C. (2014). “ Reference values ” of trace elements in the hair of a sample group of Spanish children (aged 6 - 9 years) - Are urban topsoils a source of contamination? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, 141-152.
- Penumarthy, L., Oehme, F. W., & Hayes, R. H. (1980). Lead , Cadmium , and Mercury Tissue Residues in Healthy Swine , Cattle , Dogs , and Horses From the Midwestern United States. *Archieve of Environmental Contamination and Toxicology*, 206, 193-206.
- Pless, R., & Risher, J. F. (2000). Mercury, infant neurodevelopment and vaccination. *The Journal of Pediatrics*, 136(5), 571-573.
- Reif, J. S. (2011). Animal Sentinels for Environmental and Public Health. *Public Health Reports*, 126, 50-57.
- Sakai, T., Ito, M., Aoki, H., Aimi, K., & Nitaya, R. (1995). Hair Mercury Concentrations in Cats and Dogs in Central Japan. *British Veterinary*, 215-219.

- Salehi, Z., & Esmaili-sari, A. (2010). Science of the Total Environment Hair mercury levels in pregnant women in Mahshahr , Iran : Fish consumption as a determinant of exposure. *Science of the Total Environment, The*, 408(20), 4848-4854.
- Seigneur, C., Prasad, P., & Prakash, K. (1997). Simulation of the regional atmospheric transport and fate of mercury using a comprehensive Eulerian Model. *Atmospheric Environment*, 31(17), 2717-2732.
- Serpe, F. P., Russo, R., Simone, A. De, Florio, S., Esposito, M., & Severino, L. (2012). Levels of heavy metals in liver and kidney of dogs from urban environment. *Open Veterinary*, 2, 15-18.
- Sousa, A. C. A., De Sá Teixeira, I. S., Marques, B., Vilhena, H., Vieira, L., Soares, A. M. V. M., ... Lillebø, A. I. (2013). Mercury, pets' and hair: Baseline survey of a priority environmental pollutant using a noninvasive matrix in man's best friend. *Ecotoxicology*, 22(9), 1435-1442.
- Sousa, A. C. A., Takashi, S., & Tanabe, S. (2014). Organic contaminants in house dust. *Current Organic Chemistry*, 18(17), 2181.
- Sprovieri, F., Pirrone, N., Ebinghaus, R., Kock, H., & Dommergue, A. (2010). A review of worldwide atmospheric mercury measurements. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10, 8245-8265.
- Tian, W., Egeland, G. M., Sobol, I., & Man, H. (2011). Mercury hair concentrations and dietary exposure among Inuit preschool children in Nunavut , Canada. *Environment International*, 37(1), 42-48. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.05.017>
- Torrente, M., Gascon, M., Vrijheid, M., Sunyer, J., Forn, J., Domingo, J. L., & Nadal, M. (2014). Levels of Metals in Hair in Childhood: Preliminary Associations with Neuropsychological Behaviors. *Toxics*, 2, 1-16.
- UNEP. (2013a). Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases, and Environmental Transport. *Unep*, 42.
- UNEP. (2013b). *Mercury time to act. Diesel* (Vol. 1).
- UNEP. (2013c). Minamata Convention.
- USEPA. (2016). Mercury: Human Exposure.
- USFDA, U. S. F. and D. A. (2011). Mercury Levels in Commercial Fish and Shellfish.
- Vieira, H. C., Morgado, F., Soares, A. M. V. M., & Abreu, S. N. (2015). Real and Potential Mercury Accumulation in Human Scalp of Adolescents : A Case Study, 19-27.
- Von Burg, R. (1995). Inorganic Mercury. *Journal of Applied Toxicology*, 15(6), 483-493.
- Warkany, J, Hubbard, D. (1951). Adverse Mercurial Reactions in the form of Acrodynia and

related conditions. *American Journal of Diseases of Children*, 81(3), 335-373.

Webster, J. P., Kane, T. J., Obrist, D., Ryan, J. N., & Aiken, G. R. (2016). Estimating mercury emissions resulting from wildfire in forests of the Western United States. *Science of the Total Environment*, 1-9.

Ye, B.-J., Kim, B.-G., Jeon, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, H.-C., Jang, T.-W., ... Hong, Y.-S. (2016). Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 28(1), 5.

Zahir, F., Rizwi, S. J., Haq, S. K., & Khan, R. H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 351-360.

7. Anexos

7.1. Anexo I - Autorização da DGAV e Autorização ad Comissão de Ética da FCS-UBI

Ex^{ma} Senhora
Doutora Ana Catarina Almeida Sousa
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
Campus de Santiago
3810 – 193 AVEIRO

2013-11-20 030193

Nossa referência
0421/000/000
/2013

Vossa referência

Vossa data

Assunto: **PROTEÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS PARA FINS EXPERIMENTAIS E/OU OUTROS FINS CIENTÍFICOS – PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROJECTO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Na sequência do pedido efetuado por V. Ex^a no sentido de poder ser autorizada a realização do projeto experimental designado “**PETTO – Níveis e efeitos de contaminantes ambientais em animais de companhia**”, de que é a investigadora responsável, cabe-me informar que o mesmo foi levado à consideração dos membros da Comissão Consultiva prevista na alínea b) do n^o 49, da Portaria n^o 1005/92, de 23 de Outubro, sendo que os mesmos não levantaram qualquer objeção à solicitação supra referida.

Mais se informa V. Ex^a que esta Direção Geral, também, nada tem a opôr ao projeto apresentado, pelo que, poderá o mesmo ser levado a efeito.

Com os melhores cumprimentos,

A Diretora Geral

As) Maria Teresa Villa de Brito


M. T. VILLA DE BRITO
Bic. ar de Serviços de
Proteção Animal

DBEA/APM





UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências da Saúde

Exma. Senhora
Prof^a. Doutora Ana Catarina Almeida Sousa

Sua Referência	Sua Data	Nossa Referência	Nossa Data
000.000.000	0000.00.00	000.000.000	2016.01.20

Assunto: Parecer da Comissão de Ética da FCS

No seguimento da solicitação de apreciação do Projecto “*PETTO - níveis e efeitos de contaminantes ambientais em animais de companhia e respetivos donos*”, por parte da Comissão de Ética da FCS, envio em anexo o parecer resultante da análise do referido projecto de investigação.

Cordiais cumprimentos

O Presidente da Faculdade de Ciências da Saúde
Prof. Doutor Luís Taborda Barata

Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, PORTUGAL
Telef.: +351 275 329 002 | Fax: +351 275 329 099
E-mail: fcsaude@fcsaude.ubi.pt | www.ubi.pt



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PARECER

Processo: CE-FCS-2015-038

Tema Projecto/Proponente: “*PETTO - níveis e efeitos de contaminantes ambientais em animais de companhia e respetivos donos*” – Exma. Senhora Prof^a Doutora Ana Catarina Almeida Sousa

Exmo. Sr. Presidente da Faculdade de Ciências da Saúde

Apreciado o pedido referente ao processo acima mencionado esta Comissão não detectou matéria que ofenda os princípios éticos.

Covilhã, 20 de Janeiro de 2016



O Presidente da Comissão de Ética
Prof. Doutor José Martinez de Oliveira

7.2. Anexo II - Folheto de Divulgação do projeto PETTO



Projeto

PETTO

"LEVELS AND EFFECTS OF SELECTED ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS IN PETCATS AND DOGS"



Atualmente a maior parte do nosso tempo é passado no Interior de edifícios. O ambiente Interior apesar de aparentemente oferecer proteção dos "perigos ambientais" de que todos os dias ouvimos falar (como por exemplo a poluição atmosférica), possui os seus riscos próprios (por exemplo a Inalação de fumos e pó).

Os animais de estimação partilham com os seus donos este ambiente Interior podendo assim ser utilizados para avaliar a sua qualidade, atuando como "sentinelas".

O Projeto PETTO, desenvolvido por Investigadores da Faculdade de Ciências da Saúde e do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior em colaboração com a Clínica Veterinária da Covilhã, tem como objetivo quantificar os níveis de metais (Incluindo metais tóxicos como o mercúrio) nos animais de companhia e assim avaliar a qualidade do ambiente que habitam. Para isso, necessitamos da sua colaboração através da autorização da recolha de amostras de sangue e pelo do seu animal pelo médico veterinário no âmbito de procedimentos de rotina durante a consulta médica.



Ao autorizar a recolha de amostras, estará a contribuir para a compreensão de quais os níveis de contaminantes na Cova da Beira, região para a qual não existe qualquer informação relativa a esta importante questão de Saúde Pública. A recolha destas amostras não comporta qualquer desconforto para o seu animal, e não envolve custos adicionais.

Para que o estudo tenha pleno impacto na Saúde humana, gostaríamos ainda de lhe solicitar uma pequena amostra do seu cabelo. Nesta amostra iremos analisar os níveis de metais que serão comparados com os níveis observados no seu animal de companhia. Desta forma pretendemos avaliar se os animais domésticos da Cova da Beira podem efetivamente ser usados como sentinelas para a exposição a metais, permitindo assim o alargamento do estudo a toda a região.

Os resultados obtidos serão usados única e exclusivamente para fins científicos e toda a informação recolhida durante o estudo permanecerá confidencial. A sua identidade e a identidade do seu animal não serão reveladas e todas as referências que possam comprometer serão eliminadas antes da publicação de relatórios ou artigos científicos.

Desde já agradecemos a sua colaboração!

A equipe de Investigadores responsáveis,
 Ana Catarina Sousa (Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior)
 Hugo Branco (Clínica Veterinária da Covilhã)
 Ramiro Pastorinho (Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior)



Fotografias: **INSTINTO**
WORK IN PROGRESS

7.3. Anexo III - Consentimento informado

CONSENTIMENTO INFORMADO

NOME E REFERÊNCIA DO PROJETO:

PETTO - Níveis e Efeitos de Contaminantes Ambientais em Animais de Companhia; Projeto aprovado pela Direção Geral de Agricultura e Veterinária (DGAV 0421/000/2013)

INVESTIGADORES RESPONSÁVEIS:

Doutora Ana Catarina Sousa, Prof. Doutor M. Ramiro Pastorinho
Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã

Este trabalho tem como objetivo quantificar os níveis de metais (incluindo metais tóxicos como o mercúrio) no seu animal de companhia e avaliar se estes podem ser usados como sentinelas. Para tal, necessitamos da sua colaboração através do preenchimento de um questionário e autorizando a recolha e armazenamento de amostras de pelo e sangue do seu animal que serão recolhidas pelo médico veterinário no âmbito de procedimentos de rotina durante a consulta médica e que não implicarão qualquer desconforto adicional para o animal nem nenhum custo extra.

Gostaríamos ainda de lhe solicitar autorização para recolher uma pequena amostra do seu cabelo. Nesta amostra iremos analisar os níveis de metais que serão comparados com os níveis observados no seu animal de companhia. Desta forma pretendemos avaliar se os animais domésticos podem ser usados como sentinelas para a exposição a metais. Os resultados obtidos serão usados única e exclusivamente para fins científicos e toda a informação relativa a este estudo permanecerá confidencial. A sua identidade e a identidade do seu animal não serão reveladas e todas as referências que a possam comprometer serão eliminadas antes da publicação de relatórios ou artigos científicos.

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____



CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ (Nome completo)
concordo em participar voluntariamente no presente estudo e aceito que a minha amostra de cabelo e as amostras de sangue e pelo do meu animal de companhia (_____ nome do animal) sejam preservadas para estudos futuros de monitorização ambiental.

Ao assinar o presente consentimento declaro que:

- Li todo o conteúdo deste consentimento informado;
- Compreendi e estou de acordo com o que será efetuado;
- Recebi todas as informações que desejava conhecer e tive possibilidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas.

Não assine esta folha antes de a ter lido atentamente, compreendido e aceite.

Assinatura: _____

Data: _____

Assinatura do Investigador Responsável: _____

7.4. Anexo IV- Questionário relativo ao dono do animal

QUESTIONÁRIO

Sexo (M/F) _____ Data de Nascimento _____

Peso : _____ (kg) Altura: _____ (m)

Profissão: _____

Código Postal da área de residência: _____

Área de residência:

Urbana

Rural

Industrial

Características do cabelo:

Liso

Natural

Ondulado

Pintado

Encaracolado

Madeixas

Outro _____

Comprimento do cabelo: _____ (cm)

Quando foi a última vez que lavou o cabelo? _____

Após a última lavagem colocou algum produto no cabelo?

Sim

Não

Se sim qual o produto e a marca? _____

Possui alguma amálgama dentária? (dentes chumbados)

Sim

Não

Se respondeu afirmativamente à pergunta anterior, indique quantos dentes tem chumbados:

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____



Fumador: Sim Não

Se respondeu afirmativamente à pergunta anterior, indique:

Fumador diário Fumador Ocasional Ex-Fumador

Consumo de peixe:

Nas últimas quatro semanas com que frequência consumiu os seguintes produtos?

	Várias vezes por dia	Diariamente	Várias vezes por semana	1 X Semana	2-3 X mês	1 x mês	Raramente
A-Peixe/marisco (incluindo atum nas saladas, sandes/piza, cocktail de marisco, algas, etc.)							
B-Peixe de água salgada							
C-Marisco							
D-Peixe de água doce							
E- Outros produtos marinhos (p. ex. algas)							

Colheita realizada por: _____

Data: _____

Notas: _____

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____



7.5. Anexo V- Questionário relativo ao animal

QUESTIONÁRIO - ANIMAL DE COMPANHIA: CÃO

1. Caracterização do animal:

Sexo (M/F) _____

Raça _____

Data Nascimento _____

Peso _____ (Kg)

O animal sofre de alguma doença?

Sim Não

Se sim, qual? _____

Toma medicação:

Sim Não

Se sim, qual? _____

2. Localização geográfica:

Código Postal _____

Localização _____

Urbana

Rural

Industrial

Outra: _____

O animal vive:

Dentro de casa Na Rua

Ambos _____

3) Alimentação

Qual o tipo de alimentação dada ao animal?

Ração Qual a marca da ração? _____

Restos Mistura ração e restos

Outra _____

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____



4) Cuidados de beleza e higiene

Tamanho do pelo _____ (cm)

O animal costuma tomar banho?

Sim Não

Quando foi a última vez que o animal tomou banho? _____

Costuma usar algum produto no pelo do animal?

Ampolas/pipetas biocidas

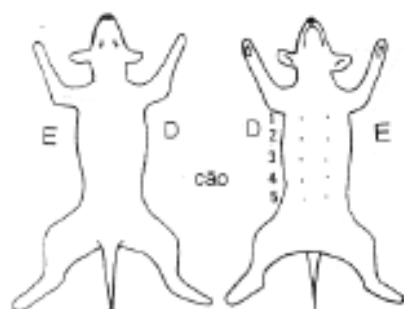
Shampoo

Perfumes/aromas

5) Características da amostra

Código da amostra _____

Local de colheita (Assinalar com x na imagem, o local aproximado onde o pelo foi recolhido):



Colheita realizada por: _____

Data: _____

Notas: _____

CÓDIGO DA AMOSTRA: _____



7.6. Anexo VI- Tabelas com as concentrações de mercúrio total quantificado nos CRMs

ERM-DB001	Data	[Hg]	[Hg]corrigida após calculada a percentagem de água	Recuperação
1	17/09/2016	323,17073	323,1863839	88,5
2	21/09/2016	304,19048	304,2052145	83,3
3	21/09/2016	318,07339	318,0887969	87,1
4	22/09/2016	335,21739	335,2336274	91,8
5	22/09/2016	318,62595	318,6413837	87,3
6	22/09/2016	320,71429	320,7298249	87,9
7	23/09/2016	306,73267	306,7475276	84,0
8	23/09/2016	284,3	284,313771	77,9
9	23/09/2016	320,20408	320,2195902	87,7
10	24/09/2016	307,31959	307,3344761	84,2
11	24/09/2016	292,34043	292,3545905	80,1
12	24/09/2016	289,62963	289,6436592	79,4
13	24/09/2016	309,89899	309,914001	84,9

ERM (sangue-L1), Lot 1406263	Data	[Hg]	Recuperação
1	23/09/2016	1,22	82,4
2	23/09/2016	1,04	70,3
3	28/09/2016	1,11	75,0
4	28/09/2016	1,17	79,1
5	28/09/2016	1,1	74,3
6	29/09/2016	0,98	66,2
7	29/09/2016	1,13	76,4
8	29/09/2016	1,06	71,6
9	30/09/2016	1,03	69,6
10	30/09/2016	1,04	70,3
11	30/09/2016	1,02	68,9
12	01/10/2016	0,98	66,2
13	01/10/2016	1,03	69,6
14	01/10/2016	1,02	68,9

ERM (sangue-L2), Lot 1406264	Data	[Hg]
1	23/10/2016	16,93
2	23/10/2016	16,53
3	23/10/2016	16,47

7.7. Anexo VII - Características gerais dos cães que participaram no estudo

Código da amostra	Género	Idade	Peso (kg)	Raça	Dieta	Doenças	Medicação	Localização	Habitat
C01	F	10	4,3	SRD	Com	N	N	Urbana	Ambos
C02	F	9	10	SRD	Mix	N	S	Rural	Ambos
C03	M	1	x	SRD	Com	N	N	Urbana	Casa
C04	F	2	13	SRD	Com	S	S	Rural	Ambos
C05	M	6	19,5	Serra de Aires	Com	N	N	Urbana	Ambos
C06	F	7	25,5	SRD	Mix	S	S	Rural	Ambos
C07	M	15	30	SRD	Com	N	S	Urbana	Ambos
C08	F	1	8	Bulldog Francês	Com	N	S	Rural	Ambos
C09	F	10	4,5	Yorkshire	Com	S	S	Rural	Ambos
C10	F	5	32	Golden Retriever	Com	S	S	Urbana	Casa
C11	F	12	5	Lulu da Pomerânia	Com	S	S	Urbana	Casa
C12	M	4	34	Boxer	Com	S	S	Rural	Casa
C13	F	<1	10	Serra da Estrela	Com	S	S	Industrial	Rua
C14	M	3	8	SRD	Mix	N	N	Rural	Rua
C15	F	4	14	SRD	Com	N	N	Urbana	Casa
C16	M	2	14	SRD	Com	S	N	Urbana	Casa
C17	F	10	15	SRD	Com	S	S	Urbana	Casa
C18	M	3	14	SRD	Res	S	S	Rural	Rua
C19	F	<1	8	SRD	Com	S	S	Urbana	Casa
C20	M	18	12	Caniche	Com	N	N	Urbana	Casa
C21	M	3	5	Yorkshire terrier	Com	S	S	Urbana	Casa
C22	M	2	1,5	Lulu da Pomerânia	Com	N	N	Urbana	Casa

Código da amostra	Género	Idade	Peso (kg)	Raça	Dieta	Doenças	Medicação	Localização	Habitat
C23	F	1	20	SRD	Com	N	N	Urbana	Rua
C24	M	8	24	Collie	Mix	S	N	Rural	Ambos
C25	F	1	28	Sharpei	Com	N	N	Urbana	Casa
C26	F	7	14	Sharpei	Com	N	N	Urbana	Casa
C27	M	12	1,5	York Shire	Com	S	S	Urbana	Casa
C28	M	10	24	Beagle	Com	S	S	Industrial	Casa
C29	M	8	12	Bulldog Francês	Com	N	N	Urbana	Casa
C30	M	2	3,5	SRD	Mix	N	N	Urbana	Casa
C31	M	2	14,5	Epagneul Breton	Com	S	N	Urbana	Casa
C32	M	7	33	Labrador	Com	N	N	Urbana	Ambos
C33	M	7	83	São Bernardo	Com	S	N	Urbana	Ambos
C34	F	7	7,2	SRD	Com	S	S	Urbana	Ambos
C35	M	13	35	Golden Retriever	Com	S	S	Urbana	Casa
C36	M	13	20	SRD	Com	N	N	Urbana	Rua
C37	F	5	40	Pastor Alemão	Com	N	N	Urbana	Casa
C38	M	6	46,5	Labrador	Com	S	N	Urbana	Ambos
C39	F	7	7,2	SRD	Com	S	S	Urbana	Ambos
C40	F	6	8	SRD	Com	N	N	Urbana	Rua
C41	F	1	9,5	Bulldog Francês	Com	N	N	Urbana	Casa
C42	M	1	35	Pastor Alemão	Com	N	N	Urbana	Casa
C43	M	3	33	Labrador	Com	S	N	Urbana	Rua
C44	M	6	18,7	SRD	Com	S	S	Urbana	Casa
C45	F	13	35	SRD	Com	S	S	Rural	Ambos

7.8. Anexo VIII - Características gerais dos gatos que participaram no estudo

Código	Género	Idade	Peso (kg)	Raça	Dieta	Doenças	Medicação	Localização	Habitat	[Hg] sangue	[Hg] pelo
G01	M	5	4,8	Europeu Comum	Com	N	N	Urbana	Casa	9,91	121,61
G02	F	5	6	Europeu Comum	Com	S	N	Urbana	Ambos	22,65	384,64
G03	M	9	7	Europeu Comum	Com	N	N	Industrial	Ambos	16,80	399,91
G04	M	1	2,5	Europeu Comum	Com	S	S	Urbana	Casa	3,46	206,41
G05	F	15	3,9	SRD	Com	S	N	Urbana	Casa	4,93	163,13
G06	M	4	3,4	Europeu Comum	Com	N	N	Urbana	Casa	1,08	469,56
G07	M	14	3,7	SRD	Com	S	S	Urbana	Casa	20,40	887,74
G08	F	8	1	Europeu Comum	Com	S	S	Urbana	Ambos	7,66	672,33
G09	F	1	2,5	Europeu Comum	Com	S	N	Urbana	Casa	1,11	66,28
G10	F	-	1	SRD	Mix	N	S	Rural	Rua	6,85	328,17
G11	F	8	1,8	SRD	Com	S	S	Urbana	Ambos	5,89	116,67
G12	M	15	5,5	Europeu Comum	Com	N	N	Urbana	Casa	16,85	683,39
G13	M	1	2	Europeu Comum	Com	S	N	Urbana	Casa	5,96	771,26
G14	M	7	5,2	Persa	Com	S	N	Urbana	Casa	3,36	172,84
G15	F	1,5	3,5	Europeu Comum	Com	N	S	Urbana	Casa	33,41	301,72
G16	M	11	6	Europeu Comum	Com	N	N	Urbana	Casa	5,88	367,15
G17	F	-	3,5	Europeu Comum	Com	S	N	Rural	Ambos	0,68	72,77

7.9. Anexo IX - Características gerais dos humanos que participaram no estudo

Código	Sexo	Idade	Peso (kg)	Altura (m)	Localização	Amalgamas dentárias	Fumador	Consumo de peixe				
								A	B	C	D	E
CH01	F	28	48	1,65	Urbana	N	Ocasional	2-3 x mês	1 x semana	2-3 x mês	1 x mês	Raramente
CH02	F	55	72	1,67	Rural	4	NF	Var x semana	Var x semana	Raramente	1 x mês	Raramente
CH03	M	56	105	1,82	Urbana	5	NF	2-3 x mês	Var x semana	1 x mês	Raramente	Raramente
CH04	M	59	66	1,6	Urbana	6	NF	1 x semana	1 x semana	1 x semana	1 x mês	Raramente
CH05	M	37	76	1,76	Rural	2	Diário	1 x semana	1 x semana	2-3 x mês	Raramente	Raramente
CH06	M	42	76	1,75	Rural	5	NF	2-3 x mês	2-3 x mês	1 x semana	Raramente	2-3 x mês
CH07	F	60	63	1,5	Urbana	2	NF	Raramente	Var x semana	Raramente	Var x semana	Raramente
CH08	F	28	56	1,6	Urbana	2	NF	1 x semana	1 x semana	1 x semana	Var x semana	Raramente
CH09	M	65	62	1,6	Urbana	4	Diário	1 x mês	Var x semana	1 x mês	Var x semana	Raramente
CH10	M	80	62	1,65	Industrial	N	NF	Raramente	Var x semana	Raramente	Var x semana	Raramente
GH11	F	25	45	1,55	Urbana	N	NF	1 x semana	1 x semana	Raramente	Var x semana	Raramente
GH12	F		60	1,54	Urbana	N	NF	2-3 x mês	1 x mês	Raramente	Raramente	Raramente
GH13	F	26	49	1,55	Industrial	N	Ocasional	Var x semana	Var x semana	2-3 x mês	Raramente	2-3 x mês
GH14	M	36	83	1,76	Urbana	N	NF	2-3 x mês	Raramente	1 x mês	Raramente	Raramente
GH15	F	32	88	1,55	Urbana	6	NF	Var x dia	Var x dia	Raramente	2-3 x mês	Raramente
GH16	F	24	70	1,6	Urbana	N	NF	1 x semana	1 x semana	Raramente	1 x semana	Raramente
GH17	F	32	46	1,58	Urbana	2	NF	1 x semana	1 x semana	Raramente	Raramente	Raramente
GH18	M	32	75	1,75	Urbana	N	NF	Diariamente	Diariamente	1 x semana	Raramente	Raramente
GH19	F	28	60	1,55	Urbana	N	NF	Var x semana	Var x semana	Raramente	Raramente	Raramente
GH20	M			1,7	Urbana	N	NF	1 x mês	1 x semana	Raramente	1 x semana	Raramente
GH21	F	54	63	1,62	Urbana	N	NF	1 x semana	1 x semana	Raramente	1 x semana	Raramente

Legenda:

F-feminino

M-masculino

NU-não utiliza

NF-não fumador

A-Peixe/marisco (incluindo atum nas saladas, sandes/pizza, cocktail de marisco, algas, etc.)

B-Peixe de água salgada

C-Marisco

D-Peixe de água doce

E- Outros produtos marinhos (p. ex. algas)

