



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



**Estudo da bioacessibilidade do Mercúrio e  
Metilmercúrio presente em produtos da pesca usando  
um modelo de digestão *in vitro***

Mestrado em Aquacultura e Pescas (via Pesca)

Especialização em Pesca

**Denise Regina Ramos Neves**

Outubro de 2012



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



**Estudo da bioacessibilidade do Mercúrio e  
Metilmercúrio presente em produtos da pesca usando  
um modelo de digestão *in vitro***

Mestrado em Aquacultura e Pescas (via Pesca)

Especialização em Pesca

**Denise Regina Ramos Neves**

Dissertação orientada por:

Engenheira Maria Leonor Nunes

Professor Doutor Adelino Canário

Outubro de 2012

*“A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência”*

Goethe

*Às pessoas mais especiais:*

Dedico este trabalho a minha mãe *Leocádia Ramos*, pelo seu sacrifício, as minhas tias e meu querido tio, aos meus manos *Naty* e *Edu* pelo apoio e principalmente a minha querida e estimada avó *Zezinha* que mesmo estando no céu estará sempre aqui comigo no meu coração.

*“Mi ê dôd na bsot tud”*

O conteúdo deste relatório é da exclusiva responsabilidade da autora:

---

/Denise Neves/

## **Agradecimentos**

À Engenheira Maria Leonor Nunes por ter permitido a realização da minha tese na Unidade de Valorização de Produtos da Pesca e Aquacultura do INRB, I.P./IPIMAR e pela sua orientação durante todo este período. Ao Professor Doutor Adelino Canário pela orientação e pronta disponibilidade.

À Doutora Cláudia Afonso pela sua pronta disponibilidade, orientação na análise e tratamento estatísticos dos dados, interpretação dos resultados e demais auxílios prestados.

À Doutora Sara Costa pela amizade e pelo apoio na aprendizagem de aplicação das técnicas de digestão *in vitro*, e orientação na análise.

À Doutora Helena Loureço pelas ajudas, sugestões, e simplicidade na forma como transmite os conhecimentos.

Ao pessoal do laboratório de Bromatologia pelo apoio crucial prestado no momento certo. À Vanessa e Luísa amigas queridas pelo apoio durante a realização desta tese.

Ao meu namorado Moisés Lopes pela forma como me tem apoiado, contribuindo para que esse projeto se tornasse uma realidade. À minha amiga, colega Daniela Venkova pelo seu amor, carinho e companheirismo.

Aos meus colegas e amigos Fernando Soares, Jeremias Malheiro, Pabla Ugalde, Daniela Urtega, Artur Leão e Samir Martins pela amizade, convivência e prestigiosa contribuição na concretização deste trabalho.

À minha tia Rita que permitiu que ficasse hospedada em sua casa e desta forma frequentar o meu estágio. À minha velha amiga Shirley Delgado por tudo que fez por mim nesta etapa final.

Ao meu pai Augusto Neves pelo apoio tanto financeiro como moral. A todos os meus familiares pelo apoio incondicional nesta jornada. A todos aqueles que contribuíram para que hoje este projeto se concretizasse o meu Muito Obrigado.

## Índice

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice Tabelas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Acrónimos</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Breve caracterização do setor das pescas e da aquacultura a nível mundial .....	1
1.2 Setor das pescas e aquacultura em Portugal .....	3
1.3 Benefícios associados ao consumo do pescado .....	3
1.4 Perigos associados ao consumo do pescado .....	4
1.4.1 Contaminação através de Mercúrio (Hg) .....	4
1.5 Conceito de bioacessibilidade .....	9
1.6 Fisiologia do trato digestivo humano .....	10
1.6.1 Digestão <i>in vitro</i> .....	11
<b>2 Objetivo</b> .....	<b>12</b>
<b>3 Metodologia</b> .....	<b>14</b>
3.3 Mercúrio .....	14
3.1.1 Amostra .....	14
3.1.2 Mercúrio total .....	15
3.1.3 Metilmercúrio .....	17
3.1.4 Bioacessibilidade .....	21
3.2 Análise estatística .....	26
<b>4 Resultados e Discussão</b> .....	<b>28</b>
4.1 Caracterização dos níveis de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura .....	28
4.2 Efeitos dos tratamentos culinários nos níveis de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura .....	29
4.3 Bioacessibilidade de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura .....	36
4.3.1 Bioacessibilidade num modelo <i>in vitro</i> .....	36
4.3.2 Mercúrio total na amostra crua .....	37

4.3.3 Metilmercúrio na amostra crua.....	39
4.4 Bioacessibilidade de mercúrio total e metilmercúrio após tratamentos culinários na corvina e salmão de aquacultura .....	40
4.4.1 Mercúrio total.....	40
4.4.2 Metilmercúrio.....	44
4.5 Valores legislados/recomendados .....	46
<b>5 Conclusão .....</b>	<b>49</b>
<b>6 Recomendações .....</b>	<b>51</b>
<b>7 Referências bibliográficas.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>61</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Abastecimento e utilização mundial do pescado no período 1950-2008 (FAO, 2010).	1
<b>Figura 2 -</b> Produção mundial da pesca de captura de 1950-2008 (FAO, 2010).	2
<b>Figura 3 -</b> Captura marinha e continental em toneladas dos principais produtores em 2008 (FAO, 2010).	2
<b>Figura 4 -</b> Ciclo do mercúrio e acumulação nas cadeias alimentares. Os números 1-7 indicam a biomagnificação do Hg ao longo da cadeia alimentar (Soares, 2008).	6
<b>Figura 5 -</b> Nível de bioacumulação ( <a href="http://www.epa.gov/mercury/exposure.htm">http://www.epa.gov/mercury/exposure.htm</a> acessado em Outubro de 2011).	6
<b>Figura 6 -</b> Esquema representativo do trato digestivo ( <a href="http://www.afh.bio.br/digest/digest1.asp">http://www.afh.bio.br/digest/digest1.asp</a> ).	10
<b>Figura 7 -</b> Analisador de mercúrio (Leco, AMA 254).	16
<b>Figura 8 -</b> Diagrama explicativo do modelo seguido.	24
<b>Figura 9 -</b> Média de mercúrio total exposto em mg/kg para os tratamentos na corvina (CC - corvina crua; CO - corvina cozida; CF - corvina forno; CG - corvina grelhada). Os valores representam médio $\pm$ desvio padrão desses tratamentos. Colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).	31
<b>Figura 10 –</b> Média de mercúrio total exposto em mg/kg para os tratamentos no salmão (SC - salmão cru; SO - salmão cozido em água; SV - salmão cozido a vapor; SF - salmão forno; SG - salmão grelhado). Os valores representam médio $\pm$ desvio padrão desses tratamentos. Colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).	32
<b>Figura 11 -</b> Teor de metilmercúrio, exposto em mg/kg para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico figura 9; os valores representam médio $\pm$ desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).	33
<b>Figura 12 -</b> Teor de metilmercúrio, exposto em percentagem para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio $\pm$ desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).	34
<b>Figura 13 -</b> Teor de metilmercúrio, exposto em mg/kg para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio $\pm$ desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).	35

- Figura 14** - Teor de metilmercúrio, expresso em percentagem para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médias desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 35
- Figura 15** - Teor de mercúrio total recuperados após o processo de bioacessibilidade; expresso em percentagem para os tratamentos na corvina (n=4); tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 38
- Figura 16** – Teor de mercúrio total recuperados após o processo de bioacessibilidade; expresso em percentagem para os tratamentos no salmão (n=2); tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 38
- Figura 17** - Teor de mercúrio total no bioacessível e não digerido, expresso em percentagem (%) para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico figura 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). ..... 41
- Figura 18** - Teor de mercúrio total no bioacessível e não digerido, expresso em percentagem (%) para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). ..... 42
- Figura 19** - Teor de metilmercúrio (MeHg) encontrado no bioacessível, expresso em percentagem (%) para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 44
- Figura 20** - Teor de metilmercúrio (MeHg) encontrado no bioacessível, expresso em percentagem (%) para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 45

## Índice Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Composição típica (soluções orgânicos e inorgânicos) e concentrações dos sucos artificiais (saliva, suco gástrico, duodenal e bile) do modelo de digestão (Versantvoort, 2004).....	22
<b>Tabela 2</b> - Teor de mercúrio total e metilmercúrio (media $\pm$ desvio padrão), expressos em mg/kg, para as espécies estudadas. ....	28
<b>Tabela 3</b> - Teor de mercúrio total e metilmercúrio nos tratamentos culinários, expresso em mg/kg, para as espécies estudadas. ....	30
<b>Tabela 4</b> - Percentual de material digerido e não digerido na corvina crua após os diversos tratamentos culinários. ....	37
<b>Tabela 5</b> - Percentual de material digerido e não digerido no salmão cru após os diversos tratamentos culinários. ....	37
<b>Tabela 6</b> - Concentração média de Metilmercúrio para os tratamentos na corvina e no salmão (mg/kg), e o número de refeições por semanal, para um adulto de 60 Kg e considerando um consumo diário de 160g de peixe. ....	47

## Acrónimos

<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	Cloreto de Cálcio Di-hidratado
<b>DACR</b>	Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar
<b>DGPA</b>	Direção Geral das Pescas e Aquicultura
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
<b>EPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização para a Alimentação e Agricultura)
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>Hg<sub>T</sub></b>	Mercúrio total
<b>INE.I.P</b>	Instituto Nacional de Estatísticas
<b>INRB</b>	Instituto Nacional de Recursos Biológicos
<b>IPIMAR</b>	Instituto de Investigação das Pescas e do Mar
<b>JECFA</b>	<i>Expert Committee on Food Additives</i> (Comité Perito em Aditivos Alimentares e Contaminantes)
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Dihidrogenofosfato de Potássio
<b>KSCN</b>	Tiocianato de Potássio
<b>MeHg</b>	Metilmercúrio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Dihidrogenofosfato de Sódio
<b>NaSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Sódio
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de Amônio

<b>pH</b>	Potencial de Hidrogénio Iónico
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>PTWI</b>	<i>Provisional Tolerable Weekly Intake</i> (Ingestão Semanal Tolerável Provisória)
<b>SACN</b>	<i>Scientific Advisory Committee on Nutrition</i> (Comitê Científico Consultivo em Nutrição)
<b>U-VPPA</b>	Unidade de valorização dos Produtos de Pesca e Aquacultura

## Resumo

O mercúrio é considerado pela Agência para a Proteção do Ambiente Americana (*United States Environmental Protection Agency - USEPA*) como sendo um dos metais pesados mais tóxicos. A partir da apreciação dos dados epidemiológicos existentes sobre a exposição humana ao mercúrio total ( $Hg_T$ ) e metilmercúrio (MeHg), as várias agências reguladoras tentaram determinar quais os valores máximos de MeHg que podem ser ingeridos durante toda a vida sem terem associado qualquer risco considerável. Foi nesse âmbito que se desenvolveu esse trabalho. Foram testadas tanto a corvina (*Argyrosomus regius*), como o salmão (*Salmo salar*) para os tratamentos: cozido com água e a vapor, forno e grelhado. Os valores de  $Hg_T$  e MeHg para ambas as espécies estudadas estiveram abaixo do limite máximo admitido (0,5 mg/kg), pela União Europeia (U.E.). Quando presente em concentrações muito baixas, o  $Hg_T$  não representa um perigo toxicológico para o consumidor, mas a sua acumulação a longo prazo pode ser prejudicial, por ser eliminado muito lentamente pelo organismo humano. Trabalhos realizados por diversos autores permitiram concluir que o percentual de MeHg em peixes em relação ao  $Hg_T$  varia de 75 a 90 % o que corrobora com o estudo aqui apresentado. O teor de  $Hg_T$  na corvina variou entre 0,21 mg/kg no cru e 0,30 mg/kg no forno. Constata-se que após os tratamentos culinários houve um aumento do teor deste contaminante, o mesmo foi visto na análise do MeHg. O cozer em água não alterou a concentração de  $Hg_T$  no salmão como os demais tratamentos, quanto ao teor MeHg observou-se um aumento pouco acentuado. A recuperação do  $Hg_T$  após as amostras terem sido submetidas ao processo de digestão *in vitro*, foi de  $\pm 90$  % tanto para a corvina como para o salmão. Os tratamentos culinários não fizeram com que houvesse uma diminuição significativa na bioacessibilidade do  $Hg_T$  e MeHg na corvina, mas com o salmão os resultados foram diferentes ( $\pm 50$  %). No que respeita a corvina o máximo de refeições por semana estimado foi de 3 em qualquer dos tratamentos culinários, enquanto no salmão o número de refeições não oferece qualquer problema.

**Palavras-chave:** *Argyrosomus regius*, *Salmo salar*, cru e após tratamento culinário, bioacessibilidade (digestão *in vitro*), mercúrio total e metilmercúrio.

## Abstract

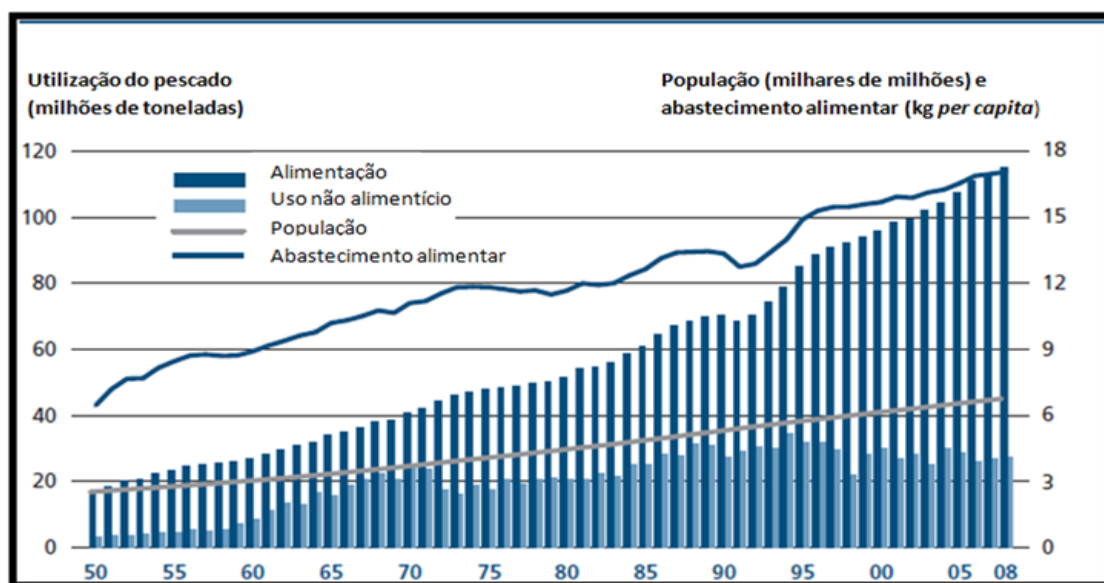
Mercury is considered by the *United States Environmental Protection Agency* (EPA) as one of the most toxic heavy metals. From the assessment of existing epidemiological data on human exposure to total mercury (THg) and methylmercury (MeHg), the various regulatory agencies have attempted to determine the maximum values of MeHg that can be ingested over a lifetime without any significant associated risk. It was in this context that this work was developed. The meagre (*Argyrosomus regius*), as well as salmon (*Salmo salar*) were tested for treatments: cooked with water, steam oven and grilled. The values of THg and MeHg for both species were found to be below the maximum allowed (0.5 mg / kg) by the European Union (EU). When present at very low concentrations, the THg does not represent a toxicological hazard to the consumer, but their long-term accumulation may be harmful, because it is slowly eliminated by the human body. Studies by several authors throughout have shown that the percentage of MeHg in fish in relation to THg varies from 75 to 90%, which corroborates the data presented here in this study. The content of the THg in the meagre ranged from 0.21 mg / kg raw and 0.30 mg / kg in the oven. It was noted that after any treatment there was an increase in the culinary level of contaminant; the same was seen in the analysis of MeHg. The boiling in water treatment did not alter the concentration of the THg on the salmon as the other types of treatments; as to the contents of MeHg, there was a small markedly increase. The recovery of THg after the samples were subjected to *in vitro* digestion was  $\pm 90\%$  for both the salmon and meagre. The culinary treatments did not cause there to be a significant decrease in the bioaccessibility of the on THg and MeHg in the meagre, but on the salmon, the results were different ( $\pm 50\%$ ). With regards to the meagre, the maximum number of meals estimated per week was three regardless of the cooking treatments; while with the salmon, the number of meals presents no problems.

**Key-words:** *Argyrosomus regius*, *Salmo salar*, raw and after cooking treatment, bioaccessibility (*in vitro* digestion), total mercury and methylmercury.

# 1 Introdução

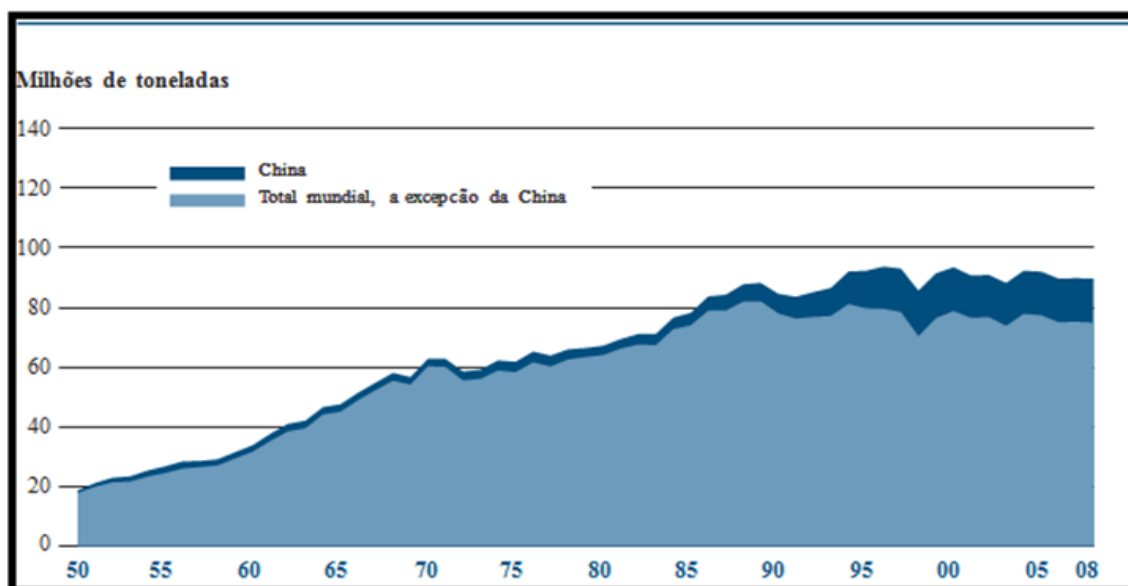
## 1.1 Breve caracterização do setor das pescas e da aquacultura a nível mundial

Os produtos da pesca e aquacultura têm uma importância crescente na alimentação das populações não só pelo elevado valor nutricional, mas também pelos benefícios que o seu consumo apresenta em termos de saúde e bem-estar dos consumidores. O papel socioeconómico da pesca e da aquacultura é também muito relevante, pois em alguns países estas atividades contribuem para o Produto Interno Bruto (PIB) e para o mercado de emprego. Na maioria das espécies de peixes, crustáceos e moluscos os benefícios associados ao consumo são muito superiores aos perigos, todavia há que ter também em conta os potenciais perigos biológicos, físicos e químicos.



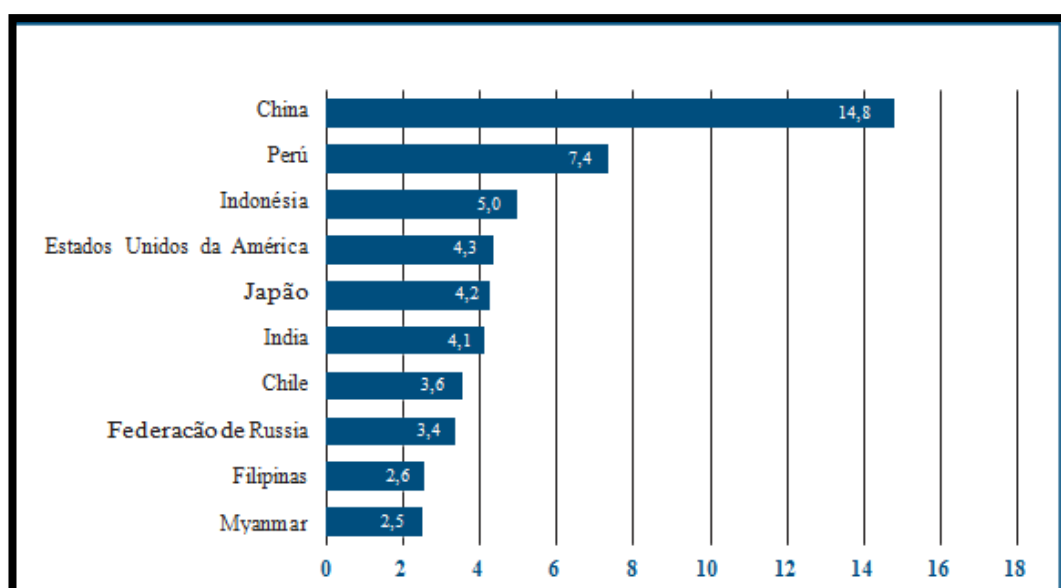
**Figura 1-** Abastecimento e utilização mundial do pescado no período 1950-2008 (FAO, 2010).

Estudos feitos pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) no ano de 2009 indicam um crescimento ténue na produção mundial de pescado, passando de 142 milhões de toneladas em 2008 para 145 milhões de ton em 2009 (Fig. 1). Deste, 115 milhões foram destinadas ao consumo, que por sua vez corresponde a um valor *per capita* de 17 kg/ano (FAO, 2010).



**Figura 2** - Produção mundial da pesca de captura de 1950-2008 (FAO, 2010).

Dados estatísticos referentes à produção proveniente da aquacultura em 2008, revelam claramente o domínio do continente asiático neste setor, detendo na totalidade 91,36 % da produção mundial (Fig. 2 e 3). Dos principais produtores, a China destaca-se tanto a nível do setor das pescas como também da aquacultura com um percentual estimado de 62,4 % (FAO, 2010). Segundo relatórios publicados pela FAO, para três milhões de pessoas o ganho de 15 % da média de proteínas de origem animal provém exclusivamente de uma dieta feita a base de peixes (FAO, 2010).



**Figura 3** - Captura marinha e continental em toneladas dos principais produtores em 2008 (FAO, 2010).

## **1.2 Setor das pescas e aquacultura em Portugal**

A atividade piscatória tem tido um papel muito importante em Portugal não só em termos socio-económicos, mas também no que respeita à gastronomia nos últimos anos. Portugal regista uma tendência decrescente devido a diminuição dos preços de venda desde o ano de 2002. A captura de pescado no ano de 2009 constituiu um total de 144 792 toneladas, o que corresponde a uma percentagem de 14,9 % inferior ao do registado em 2008. Esta atividade neste país permite satisfazer um consumo *per capita* de 23 kg/ano, muito embora o consumo seja muito superior a este valor (57 kg/ano). Devido a este alto consumo de produtos derivados da pesca, Portugal é considerado como sendo o país com maior consumo da União Europeia (DGPA, 2007<sup>a</sup>; INE.I.P, 2011).

Portugal é também um país que possui condições favoráveis a prática de aquacultura. Tendo em conta o desgaste que o ecossistema marinho tem vindo a sofrer devido a sobrepesca, a aquacultura surge como uma alternativa credível a reposição dos produtos de pesca (INE.I.P, 2011). Desta forma ajuda também a minimizar os efeitos negativos, de modo a assegurar que o ecossistema tenha tempo para se recuperar.

O ano de 2008 foi marcado pelo aumento de 7,3 % da produção aquícola total (7987 ton) em relação ao ano anterior. A maior parte deste corresponde a produção em águas salobras e marinhas com um valor equivalente a 88 %. A região do Algarve é que detém o maior percentual (50%) tendo em conta a produção nacional (DGPA, 2007<sup>a,b</sup>; INE.I.P, 2011).

## **1.3 Benefícios associados ao consumo do pescado**

Os produtos da pesca e aquacultura englobam proteínas de elevado valor biológico, lípidos maioritariamente constituídos por ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa e um elevado número de vitaminas e minerais.

A contribuição comprovada para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares é o efeito mais benéfico associado a ingestão de pescado, em vários estudos realizados nesta área de investigação (Bandarra *et al.*, 2001; Bandarra *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2007; Chan & Cho, 2009). As espécies mais gordas são fontes de vitaminas A e D, que desempenham funções muito importantes no nosso organismo (manutenção e desenvolvimento dos órgãos). Para além dos peixes serem ricos em vitaminas, também o são de proteínas consideradas de elevado valor biológico (Santos *et al.*, 2001).

#### **1.4 Perigos associados ao consumo do pescado**

Muitas organizações ligadas a educação alimentar e dietética recomendam o consumo de pescado, de uma forma equilibrada e assim garantir uma alimentação saudável (Lourenço *et al.*, 2003). Contudo, vários têm sido as limitações dirigidas essencialmente aos grupos considerados de risco, nomeadamente, grávidas e crianças. Isso devido a resultados provenientes de estudos de investigações epidemiológicas que revelaram um elevado índice de exposição ao metilmercúrio e compostos organoclorados que podem ter efeitos à saúde dos fetos e bebés (Becker *et al.*, 2007).

O consumo de pescado contaminado por metilmercúrio pode afetar alguns órgãos e tecidos, tais como, rins e o sistema nervoso central, particularmente durante o desenvolvimento embrionário dos fetos. Embora, as inúmeras vantagens anteriormente vistas para a saúde associadas ao consumo de pescado, este mesmo consumo, também, pode constituir alguns perigos para o homem enquanto consumidor (SACN, 2004).

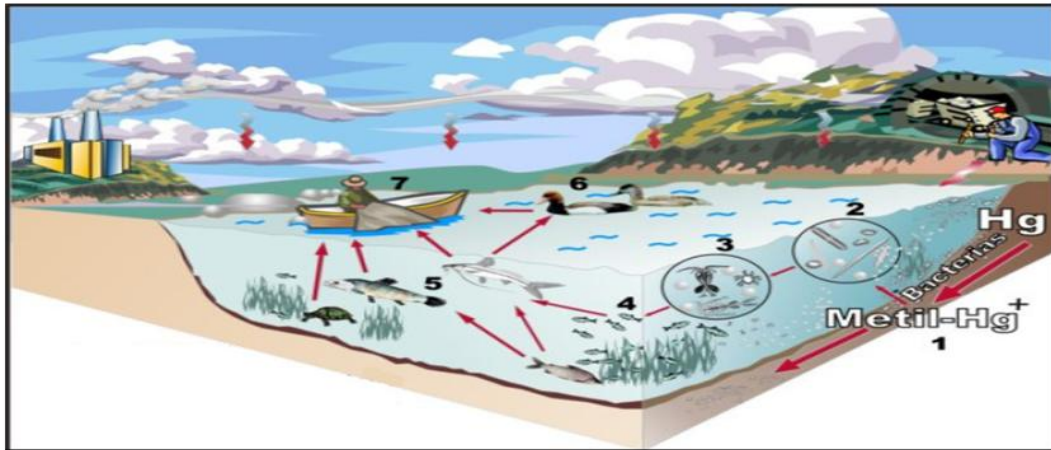
##### **1.4.1 Contaminação através de Mercúrio (Hg)**

O mercúrio apresenta diversas formas e estas ao entrarem no ambiente aquático como resultado das atividades do homem ou a partir de fontes geológicas, são convertidos em metilmercúrio por microrganismos e conseqüentemente acumulada/concentrada em peixes e outras espécies aquáticas. Sendo assim, conclui-se que a concentração do metilmercúrio nos peixes provém tanto do meio aquático como também da ingestão de alimentos (Fig. 4; Goyer, 1996; SACN, 2004). A maior

quantidade de mercúrio é encontrada na crosta terrestre sendo liberado naturalmente por degaseificação entre 2700 a 6000 toneladas/ano. O metal sofre alterações químicas ao longo do seu ciclo, tanto pode ser convertido em vapor de mercúrio e regressar a atmosfera, como pode ser metilado por organismos presentes nos sedimentos aquáticos (Lin *et al.*, 2006). Da mesma forma, apresenta uma variabilidade tanto na sua solubilidade (metálico, orgânico e inorgânico) como no seu estado de oxidação (elementar  $\text{Hg}^0$  e íon mercúrico  $\text{Hg}^{2+}$ ). É também caracterizado por ser um metal volátil, com capacidade de percorrer longas distâncias na sua forma gasosa e permanecer cerca de um ano na atmosfera (Lin & Pehkonen, 1999; Mason & Shen, 2002; Selin *et al.*, 2008).

Este metal pesado é considerado um poluente muito tóxico podendo ser acumulado em vários órgãos e tecidos de diversos organismos. No entanto, é provável que os estudos realizados sobre o nível de toxicidade de compostos químicos vestigiais no ambiente, sejam dirigidos maioritariamente ao efeito nocivo deste elemento (Morel *et al.*, 1998).

Uma elevada concentração de compostos tóxicos no organismo em relação a fonte (biomagnificação) é geralmente provocada pela transferência de um produto químico xenobiótico a partir do consumo de alimentos contaminados (Connell, 1989, 1990; Rand *et al.*, 1995). Os grandes predadores são considerados como as espécies com nível de mercúrio mais elevado, já que este elemento químico tem um período de meia-vida relativamente longo em peixes, e desta forma terão acumulado uma maior quantidade de mercúrio (SACN, 2004).



**Figura 4** - Ciclo do mercúrio e acumulação nas cadeias alimentares. Os números 1-7 indicam a biomagnificação do Hg ao longo da cadeia alimentar (Soares, 2008).

Os contaminantes nos produtos de pesca provêm predominantemente da sua dieta e dos níveis de bioacumulação, de forma que os contaminantes são mais elevados nos peixes que pertencem ao topo da cadeia alimentar (Fig. 5). A farinha e o óleo de peixe são as principais vias de contaminação dos alimentos para peixes de aquacultura, tanto de dioxinas como de metais pesados (EFSA, 2005). Deste modo, a substituição de farinhas e óleos de peixe por proteínas e óleos vegetais na alimentação dos peixes ou procedimentos de descontaminação podem ser um meio possível de redução de alguns níveis de contaminantes (EFSA, 2005).



**Figura 5** - Nível de bioacumulação (<http://www.epa.gov/mercury/exposure.htm> acessado em Outubro de 2011).

Sendo assim é de se esperar que embora haja sempre procura dos produtos da pesca, também haverá uma certa insegurança em relação ao seu consumo.

## Toxicidade

As informações que se têm atualmente, sobre intoxicações por inalação ou ingestão de mercúrio estão todas relacionadas a tragédia vivida pela população de Minamata-Japão. Contudo, Powel (1991) fez alusão a um caso que aconteceu em 1863, em que dois químicos que utilizavam experimentalmente dimetilmercúrio (determinação da valência de metais) acabaram por falecer. Este acontecimento foi relatado a outros químicos, todavia a causa da morte dos dois permaneceu desconhecida até ao ano de 1940. Neste período fizeram autópsia a um corpo de um trabalhador de uma fábrica (produzia compostos de mercúrio como fungicida para campos de cereais) que havia falecido, e este apresentou atrofia cerebral e destruição neuronal devido ao longo período de exposição a este metal (Powel, 1991; Kimberlie *et al.*, 1998).

Mas foi em Minamata na década de 50, que o caso ganhou mais repercussão após vários pacientes terem dado entrada no hospital local acusando os mesmos sintomas (Powel, 1991; Kimberlie *et al.*, 1998; Ekino *et al.*, 2007). Um fator em comum entre as vítimas chamou mais atenção aos médicos especialistas, que foi o fato de todas terem ingerido peixes retirados da Baía de Minamata. Análises feitas posteriormente aos peixes dessa mesma Baía os levaram a conclusão de que não se tratava apenas de uma doença, mas sim de um caso de envenenamento (Powel, 1991; Kimberlie *et al.*, 1998).

Os principais sintomas diagnosticados nos pacientes com doença de Minamata foram distúrbios sensoriais nos membros inferiores e superiores, perda da visão e audição e em casos mais graves ocorreu paralisia e morte (Kimberlie *et al.*, 1998). Os sistemas, respiratório, digestivo, nervoso e hematopoiético (circulatório) são os principais destinos do mercúrio após o envenenamento (Goyer, 1996; Kimberlie *et al.*, 1998; Stier & Gordon, 1998; WHO, 2003; Clarkson, 2002; Ekino *et al.*, 2007; Macedo, 2010).

A inalação aguda de metilmercúrio é muito invulgar, mas resulta em danos irreversíveis ao Sistema Nervoso Central (SNC). Estima-se que a dose letal mínima de MeHg para uma pessoa com 70 kg varia de 20-60 mg/kg (JECFA, 2003).

## **Limites de segurança**

Atendendo aos resultados obtidos, a partir de estudos que refletem os níveis de exposição humana ao mercúrio orgânico – metilmercúrio (MeHg), organismos internacionais tentaram determinar qual o valor máximo de MeHg por ingestão que um ser humano pode tolerar enquanto vivo, sem correr o risco de envenenamento.

Por outro lado, o funcionamento do organismo difere de pessoa a pessoa e este fator é considerado determinante, já que, pode dificultar a previsão do valor exato da concentração deste metal. Para a determinar essa concentração, pesquisadores estabeleceram cruzamentos entre dados relativos à quantidade de MeHg encontrado em amostras de peixes e cálculos referentes a duração de exposição a partir dos padrões de consumo médio (JECFA, 2003). Contudo, chegaram a conclusão que estes dados não são suficientemente seguros para pessoas cujo consumo de peixes ultrapassa a média estipulada.

Conforme a Organização Mundial da Saúde – WHO concluiu no ano de 1990, é difícil determinar com exatidão um nível seguro de exposição a este composto químico, principalmente no caso de gestantes, devido a total falta de informações alusivos aos efeitos causados tanto a mãe como ao feto. O Comité Perito em Aditivos e Contaminantes Alimentares – JECFA da Organização para Alimentação e Agricultura/ Organização Mundial da Saúde – FAO/WHO estabeleceu um valor de Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) para o MeHg de 200g que corresponde a 3,3 mg/kg de peso corporal para a população em geral (DARC/ASAE, 2009).

Estudos posteriores vieram revelar que este índice, não seria seguro o suficiente para proteger o feto *in utero* durante a gestação. Sendo assim este valor foi substituído no ano de 2003 por um PTWI de 1,6 mg/kg de peso corporal. O comité considera que uma ingestão semanal até duas vezes superior ao estabelecido, não representa risco de neurotoxicidade em adultos, mas no caso de gestantes esse valor não deve ser excedido (JECFA, 2003). Esse tipo de pesquisa têm como principal objetivo, ajudar a população mundial a consumir de forma responsável os produtos da pesca.

## 1.5 Conceito de bioacessibilidade

O conceito de bioacessibilidade muitas vezes é confundido com o de biodisponibilidade. A verdade é que bioacessibilidade está incluída no conceito de biodisponibilidade, de modo que do ponto de vista nutricional, é definido como sendo uma fração libertada a partir da matriz de um determinado alimento, durante o processo de digestão no trato gastrointestinal (Tait, 1993; Benito & Miller, 1998).

De acordo com Garcia *et al.*, 2009 o total de nutrientes que se encontra num alimento, não corresponde ao seu valor nutricional, já que nem toda essa quantidade é libertada a partir matriz de um alimento para ser absorvida durante a digestão. Posto isso, conclui-se que do valor total de nutrientes bioacessível somente uma parte ficará disponível a ser usado pelo organismo humano, tanto para as suas funções fisiológicas como também armazenado para posteriormente ser utilizado.

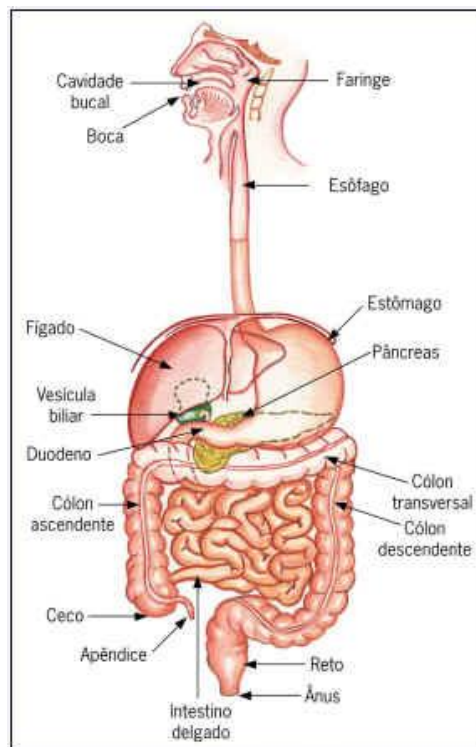
Segundo Versantvoort e seus colaboradores, a biodisponibilidade oral de um composto pode ser visto como o resultante de três processos:

1. Libertação do composto a partir de sua matriz no trato gastrointestinal (bioacessibilidade);
2. Transporte através do epitélio intestinal para a *Vena portae* (transporte intestinal);
3. Degradação do composto no fígado (e intestino) (metabolismo).

Resumidamente, a bioacessibilidade é um parâmetro muito importante, por ser considerado um fator limitante da biodisponibilidade nos estudos de avaliação de risco (Van de Wiele *et al.*, 2007).

## 1.6 Fisiologia do trato digestivo humano

Para a aplicação de um método *in vitro* de simulação gastrointestinal é fundamental a compreensão da fisiologia humana. Para essa percepção é importante saber que o trato digestivo é constituído tanto pelo tubo digestivo como também por glândulas secretoras anexas (Fig. 6). Da mesma forma que digere os alimentos também funciona como barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o meio interno. As glândulas secretoras são os anexos e produzem enzimas digestivas por quase toda a sua extensão, desde a boca até o íleo terminal. Essas enzimas têm como principal função degradar as macromoléculas presentes nos alimentos ingeridos, em moléculas mais simples portanto mais solúveis no meio intestinal, proporcionando uma absorção mais facilitada na mucosa intestinal (Oomen *et al.*, 2003; Versantvoort *et al.*, 2004).



**Figura 6** - Esquema representativo do trato digestivo (<http://www.afh.bio.br/digest/digest1.asp>).

O alimento é introduzido na boca, onde vai ocorrer a degradação inicial devido a ação da saliva, com pH de 6,5. Esse processo é relativamente curto, o material então ingerido, é transportado através do esôfago para o estômago em poucos segundos. O alimento é conduzido da boca até o estômago, através de contrações musculares

(peristaltismo). As células da parede do estômago libertam pepsinogênio inativo e ácido clorídrico com  $\text{pH} < 2$  (Malagelada *et al.*, 1976; Davenport, 1984; Dressman *et al.*, 1990; Gray, 1996; Versantvoort *et al.*, 2004).

O intestino delgado é o principal órgão onde se dá a absorção dos nutrientes, incluindo gorduras, hidratos de carbono, proteínas, cálcio, ferro, vitaminas, água e electrólitos. O fígado produz e secreta a bÍlis, enquanto o pâncreas secreta suco pancreático. O suco pancreático contém água, enzimas e grandes quantidades de bicarbonato de sódio, o seu  $\text{pH}$  oscila entre 8,5 e 9. A secreção digestiva deste suco é responsável pela hidrólise da maioria das moléculas do alimento, como hidratos de carbono, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. A água e electrólitos são absorvidos no intestino grosso. Após a absorção de água e electrólitos, o material residual passa para o reto (Oomen *et al.*, 2003; Versantvoort *et al.*, 2004; Dean & Ma, 2007).

### **1.6.1 Digestão *in vitro***

A maioria dos ensaios *in vitro* baseia-se na fisiologia do trato gastrointestinal e simulam as condições da digestão humana. Em substituição a saliva e aos sucos gástrico e duodenal naturais, utilizam soluções artificiais que imitam o meio de cada uma das divisões digestivas. As soluções artificiais contêm enzimas, aminoácidos, ácido clorídrico, sais orgânicos e inorgânicos (Tabela 1).

O trato gastrointestinal distingue-se principalmente por estar dividido em três áreas distintas e interligadas do sistema digestivo humano (boca, estômago e intestino delgado) que são essenciais na aplicação da metodologia de digestão. A boca é fundamental no processo da digestão humana, contudo, o alimento permanece neste local um curto período de tempo, sendo assim muitas vezes é excluída do processo. No estômago, o alimento estará sujeito a pepsina ( $\text{pH} \approx 2$ ) por alguns minutos (normalmente 8 minutos) até várias horas ( $\pm 3$  h), passando posteriormente para o intestino delgado onde ficará sujeito a ação do suco intestinal composto por enzimas como tripsina, quimiotripsina, pancreatina e  $\alpha$ -amilase, sais biliares e bicarbonato (Versantvoort *et al.*, 2005).

## 2 Objetivo

Aos produtos da pesca são atribuídos inúmeros benefícios pelo que o seu consumo é largamente recomendado, cerca de 2 a 3 refeições por semana (ISSFAL, 2004). No entanto, este tipo de produtos pode ser uma importante via de exposição a certos contaminantes na dieta alimentar, nomeadamente de mercúrio (EFSA, 2005). O mercúrio (Hg) tem suscitado muitas preocupações ao nível da saúde pública, isto porque cerca de 90 % do Hg encontrado no peixe se encontra sob a forma de metilmercúrio (MeHg). Este composto orgânico é lipofílico e pode ser facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal (entre 90 a 95 %). A sua toxicidade é elevada e atinge o sistema nervoso central, especialmente o do feto. Tendo como base estudos epidemiológicos, que referem a relação entre a exposição materna ao metilmercúrio e alterações no neurodesenvolvimento dos seus filhos, a JECFA da FAO/WHO estabeleceu uma ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) deste composto, a partir do consumo de produtos da pesca, de 1,6 µg/kg peso corporal (FAO/WHO, 2010). No entanto, muito embora a toxicidade do metilmercúrio seja um problema de saúde global (Chapman & Chan, 2000), existe alguma controvérsia sobre esta temática, observada em diferentes populações, e este facto foi atribuído a possíveis efeitos da modulação dietética. É sabido que a concentração de um nutriente ou de um composto tóxico, só por si, pode não ser suficiente para uma análise de risco sustentada pois, só a fração de um composto que é libertada de um alimento (bioacessibilidade) e que fica biodisponível pode exercer efeitos benéficos ou tóxicos (Versantvoort *et al.*, 2005). Desta forma, alguns compostos não são modificados durante a digestão enquanto outros são afetados de modo significativo pelo processo digestivo. Por outro lado, a digestibilidade é muito influenciada pelo tipo e composição do alimento.

Sendo assim, este trabalho tem como *principal objetivo* adquirir informações sobre a bioacessibilidade do teor mercúrio e do metilmercúrio presente em peixe cru e cozinhado utilizando um método *in vitro*. O método *in vitro* utilizado neste trabalho, descrito por Versantvoort *et al.* (2005), é considerado simples, fiável, rápido e relativamente barato e será otimizado, levando em consideração a sua aplicabilidade para a determinação da bioacessibilidade do Hg e MeHg em produtos da pesca. Esta digestão *in vitro* vai simular a exposição oral, baseada na fisiologia humana (composição química dos fluidos digestivos, pH e períodos de tempo de residência

típica de cada compartimento). Assim, pH, tipo de enzimas, percentagem e digestão serão previamente estabelecidos, tendo em conta a aplicabilidade da digestão para determinação de mercúrio e metilmercúrio. Os dados gerados permitirão conhecer a liberação de contaminantes em estudo a partir desta matriz especial (peixe cru e cozinhado) durante o trânsito no trato gastrointestinal. Os resultados serão aplicados na avaliação risco do consumo dos peixes estudados.

## **3 Metodologia**

### **3.3 Mercúrio**

#### **3.1.1 Amostra**

A corvina (peso e comprimento médio respetivamente:  $600,53 \pm 44,28$  g e  $40,17 \pm 1,34$  cm) foi cultivada em tanques de terra do IPIMAR.I.P.- Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, centro de pesquisa de aquacultura em Olhão, Portugal. Para o abate do peixe usou-se o método de imersão em gelo misturado com água. Foram usados 15 indivíduos em cada tratamento de cozedura tradicional, o que corresponde a 5 pools com 3 peixes cada. A corvina foi previamente eviscerada, lavada e confeccionada. Após o cozimento, a pele e os ossos foram retirados e a parte edível foi seguidamente homogeneizada.

Quanto ao salmão, este foi adquirido num estabelecimento comercial português. Foram utilizados para cada tratamento culinário 3 pools com duas postas cada. É de salientar que ao contrário da corvina em que se usou o peixe inteiro para a confeção, no salmão só se usou postas. Após o cozimento das postas, foram retirados a pele e por fim homogeneizada a parte edível.

Os tratamentos culinários: cozido em água, cozido a vapor, forno e grelhagem foram efetuados de acordo com as práticas domésticas usuais. Os produtos foram cozidos em água com 1,5 a 2 % de sal (dependendo do tamanho do peixe/espessura), utilizando um rácio peixe/água de 1:2. Para grelhar, adicionou-se também aos peixes cerca de 1,5 a 2,0 % de sal (dependendo do tamanho do peixe/espessura). No caso do forno, estes foram salgados como para grelhar, condimentados com azeite, cebola e vinho branco e seguidamente colocados no forno. As amostras foram colocadas em sacos plásticos, selados e armazenados a uma temperatura de  $-80$  °C até serem analisadas.

Na análise do metilmercúrio foram utilizadas 5 pools para cada tratamento culinário da corvina (devidamente homogeneizados e numerados de 1 a 5) e no caso da bioacessibilidade só utilizaram 2 desses pools escolhidos aleatoriamente, enquanto para o salmão foram feitos 3 pools (igualmente homogeneizados e etiquetados), para análise

do metilmercúrio e da bioacessibilidade fez-se um único pool dos 3. A análise foi feita em duplicado.

### **3.1.2 Mercúrio total**

A determinação do teor de mercúrio total foi baseada no método descrito na norma US EPA 7473 (EPA, 1998) e no procedimento técnico em uso na Unidade U-VPPA do INRB, I.P./L-IPIMAR.

#### **Resumo do processo**

Decomposição térmica e química da amostra em forno. Retenção seletiva do mercúrio numa amálgama de ouro seguida de libertação após aquecimento. Arrasto do vapor de mercúrio pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro. Leitura da absorção no comprimento de onda de 253,7 nm.

#### **Reagente e soluções**

Todos os reagentes utilizados possuíam um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore).

- Óxido de alumínio 90 ativo básico (0,063-0,200) (Merck)
- Ácido nítrico 65 % (m/m) (Merck)
- Solução de ácido nítrico 1 % (v/v)
- Solução padrão de mercúrio 1000 mg/l (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico) (Merck)

#### **Solução padrão**

Preparou-se 100 ml de uma solução padrão de concentração 10 µg/ml a partir da solução padrão de mercúrio (1000 mg/l) utilizando um solvente ácido nítrico a 1 %. A da solução a 10 µg/ml foi preparada uma solução padrão de 0,1 µg/ml e uma de 0,005 µg/ml.

## Equipamentos e utensílios

- Material de uso corrente no laboratório.
- Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)
- Barquinhas de níquel
- Analisador de mercúrio (Leco, AMA 254) (Figura 7)



**Figura 7** - Analisador de mercúrio (Leco, AMA 254).

## Preparação da amostra

As amostras para análise (postas de salmão e corvina) foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas. Para a leitura do teor de mercúrio total no material liofilizado, congelou-se uma fração da amostra homogeneizada, distribuída uniformemente numa caixa de Petri, e foi posteriormente colocada no liofilizador durante 48 horas (a uma temperatura de  $-45^{\circ}\text{C}$  e uma pressão de aproximadamente  $10^{-1}$  atmosferas). As amostras liofilizadas e novamente homogeneizadas foram colocadas em sacos de plástico devidamente identificadas (espécie, número), embaladas sob vácuo e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

## Técnica

Pesou-se até 100 mg da amostra para a barquinha. Adicionou-se um pouco de óxido de alumínio até cobrir a amostra. A barquinha foi colocada no analisador de mercúrio e efetuou-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho. A barquinha foi retirada e limpada. No fim da sessão de trabalho colocou-se a barquinha em mufla a  $700^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora, para descontaminar.

## **Ensaio em branco**

Colocou-se um pouco de óxido de alumínio na barquinha e efetuou-se a leitura no equipamento.

## **Curva de calibração**

Foi aceite a curva que está introduzida no software do analisador (0,01; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00; 20,00; 30,00; 36,00 ng de mercúrio).

## **Resultados**

O tratamento dos resultados foi feito através do software do analisador de mercúrio. O cálculo do teor de mercúrio, expresso em mg/kg, foi dado pela relação:

$$\frac{A}{m}$$

Sendo:

m - massa, em miligrama, da toma para análise;

A - leitura dada pelo analisado em nano-gramas.

Os resultados são dados pela média aritmética de, pelo menos, duas determinações paralelas.

### **3.1.3 Metilmercúrio**

A determinação do teor de metilmercúrio (MeHg) - mercúrio orgânico foi baseada no método descrito por (Scerbo & Barghigiani, 1998).

## **Resumo do processo**

Hidrólise da amostra liofilizada com ácido bromídrico seguido de extração dos compostos orgânicos com tolueno. Remoção dos compostos orgânicos de mercúrio usando uma solução de cisteína.

Decomposição térmica e química da amostra (cisteína contendo os compostos orgânicos de mercúrio) em forno. Retenção seletiva do mercúrio numa amálgama de ouro seguida de libertação após aquecimento. Arrasto do vapor de mercúrio pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro. Leitura da absorção no comprimento de 253,7 nm.

### **Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados possuíam um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore).

- Ácido bromídrico 47 % (m/m) (Merck)
- Tolueno  $\geq 99,9$  % (m/m) (Merck)
- Cloridrato mono-hidratada de L-cisteína  $\geq 99,9$  % (m/m) (Merck)
- Sulfato de sódio anidro  $\geq 99,9$  % (m/m) (Merck)
- Acetato de sódio  $\geq 99,9$  % (m/m) (Merck)
- Solução de cisteína (1 % cisteína em 12,5 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 0,8 % de  $\text{NaCH}_3\text{CO}_2$ )
- Óxido de alumínio 90 ativo básico (0,063-0,200) (Merck)
- Ácido nítrico a 65 % (m/m) (Merck)
- Solução de ácido nítrico 1 % (v/v)
- Solução padrão de mercúrio 1000 mg/l (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico).

### **Solução padrão**

Preparou-se 100 ml de uma solução padrão de concentração 10  $\mu\text{g/ml}$  a partir da solução padrão de mercúrio (1000 mg/l), utilizando como solvente ácido nítrico a 1 %. A partir da solução a 10  $\mu\text{g/ml}$  foi uma solução padrão de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  e uma de 0,005  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Equipamentos e utensílios**

- Material de uso corrente no Laboratório
- Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)

- Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)
- Vortex (Heidolph, ReAX)
- Tubos de centrífuga em FEP com tampa de rosca em ETFE (Nalgene)
- Centrífuga (Sigma, 3K29)
- Barquinha de níquel
- Analisador de mercúrio (AMA 254, Leco)

## **Preparação da amostra**

As amostras para análise (postas de salmão e corvina) foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas.

Congelou-se uma fração da amostra homogeneizada, distribuída uniformemente numa caixa de Petri, e foi colocado no liofilizador durante 48 horas (a uma temperatura de - 45 °C e uma pressão de aproximadamente  $10^{-1}$  atmosferas). As liofilizadas e novamente homogeneizadas foram colocadas em sacos de plásticos devidamente identificadas (espécie, numero), embaladas sob vácuo e armazenadas a - 20 °C até posterior análise.

## **Técnica**

Pesou-se cerca de 200 mg da amostra liofilizada para tubo de centrífuga. Foram adicionados 10 ml de ácido bromídrico e 20 ml de tolueno a amostra. A mistura agitada durante por aproximadamente 5 minutos (manualmente e em vortex) e centrifugada durante 20 minutos a 3000 rpm. Retirou-se 15 ml da fase orgânica que foi transferido para outro tubo ao qual se adicionou previamente 6 ml da solução de cisteína.

Adicionou-se 15 ml de tolueno ao tubo inicial contendo o ácido bromídrico e o processo repetiu-se. Finalmente agitou-se (manualmente e em vortex) o tubo contendo a solução de cisteína e tolueno (30 ml) e centrifugando-o durante 20 minutos a 3000 rpm. Transferiram-se para outro tubo de centrífuga 3 ml da solução de cisteína para posterior análise. Dessa solução retirou-se entre 100 µl a 500 µl para a barquinha. A barquinha

foi colocada no analisador de mercúrio e deu-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho.

### **Ensaio em branco**

O ensaio em branco é efetuado de acordo com o descrito para o mercúrio, excetuando o passo de pesagem da amostra que não se efetua.

### **Curva de calibração**

Foi aceite a curva que está introduzida no software do analisador (0,10; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00; 20,00; 30,00; 36,00 ng de mercúrio).

### **Resultados**

O cálculo do teor de metilmercúrio (MeHg), expresso em percentagem, é dado pela relação:

$$\left[ \frac{\frac{6}{Va} \times (a - b)}{m} \times 1,07 \right] \times \left[ \frac{100}{c} \right]$$

Sendo:

*V<sub>a</sub>* - volume de amostra em µl, analisado no equipamento;

*a* - concentração lida em ng, da amostra;

*b* - concentração lida em ng, do branco;

*m* - massa em grama, da toma para análise;

*c* - concentração lida em mg/kg de peso seco, de mercúrio total.

O cálculo do teor de MeHg expresso em mg/kg peso húmido, é dado pela relação:

$$\frac{C \times \text{MeHg}\%}{100}$$

Sendo:

*C* - concentração lida em mg/kg de peso húmido, de mercúrio total;

MeHg % - percentagem de metilmercúrio na amostra.

O cálculo do mercúrio inorgânico ( $Hg_{Inorg}$ ), expresso em mg/kg, é dado pela relação:

$$Hg_T - MeHg$$

Sendo:

$Hg_T$  - concentração de mercúrio total em mg/kg de peso húmido, na amostra

$MeHg$  - concentração de metilmercúrio em mg/kg de peso húmido, na amostra

Os resultados foram dados pela média aritmética de, pelo menos, duas determinações paralelas efetuadas.

### **3.1.4 Bioaccessibilidade**

A determinação do teor de mercúrio total bioacessível foi baseada no método descrito por Versantvoort (2005).

#### **Resumo do processo**

Ensaio *in vitro* que se baseia na fisiologia do trato gastrointestinal e simula as condições da digestão humana. No lugar da saliva, dos sucos gástrico, duodenal e biliar naturais, são utilizadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos juntamente com seus respectivos valores de pH e tempo de contacto de cada solução na porção sólida (amostra). As soluções simuladoras do trato gastrointestinal, contêm enzimas, aminoácidos, sais orgânicos, inorgânicos e ácido clorídrico. Os ensaios foram executados a temperatura controlada.

Decomposição térmica e química da amostra (Sobrenadante e Bioacessível devidamente separados após a última centrifugação) em forno. Retenção seletiva do mercúrio numa amálgama de ouro seguida de libertação após aquecimento. Arrasto do vapor de mercúrio pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro. Leitura da absorção no comprimento de 253,7 nm.

## Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados possuíam um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore).

**Tabela 1** - Composição típica (soluções orgânicos e inorgânicos) e concentrações dos sucos artificiais (saliva, suco gástrico, duodenal e bile) do modelo de digestão (Versantvoort, 2004).

	Saliva	Suco Gástrico	Suco Duodenal	Suco Biliar
<b>Soluções inorgânicas</b>	50 ml	100 ml	100 ml	50 ml
KCl (89,6 g/l)	1	1,84	1,26	0,42
KSCN (20 g/l)	1			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88,8 g/l)	1	0,6		
NaSO <sub>4</sub> (57 g/l)	1			
NaCl (175,3 g/l)	0,17	3,14	8	3
NaHCO <sub>3</sub> (84,7 g/l)	2		8	6,83
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (22,2 g/l)		3,6	1,8	1
NH <sub>4</sub> Cl (30,6 g/l)		2		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/l)			2	
MgCl <sub>2</sub> (5 g/l)			2	
HCl 37% (g/g)		1,3	36 µl	15 µl
<b>Soluções orgânicas</b>	50ml	100ml	100ml	50ml
Urea (25 g/l)	0,8	0,68	0,8	1
Acido glucorônico (2g/l)		2		
Glucose (65 g/l)		2		
Glucosamina		2		
Ácido clorídrico (33 g/l)				
<b>Soluções Inorg + Org (perfazer 500 ml água destilada)</b>	50ml	100ml	100ml	50ml
α-amilase	29			
Ácido úrico	1,5			
Mucina	2,5	0,6		
BSA		0,2	0,2	0,18
Pepsina		0,66		
Pancretina			1,8	
Lipase			0,3	
Bilis				3
Tripsina			0,016	
α- quimotripsina			0,174	
<b>pH</b>	6,8±0,2	1,3±0,02	8,1±0,2	8,2±0,2

## **Equipamentos e utensílios**

- Material de uso corrente no Laboratório
- Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)
- Vortex (Heidolph, ReAX)
- Estufa Memmert (Tv40U, 220v, 854 schwabach)
- Banho-de-água Memmert
- Medidor de pH
- Tubos de centrífuga em FEP com tampa de rosca em ETFE (Nalgene)
- Centrífuga (Sigma, 3K29)
- Barquinha de níquel
- Analisador de mercúrio (AMA 254, Leco)
- Agitador magnético (IKA-VIBRAX-VRX, w3-8540 3)

## **Preparação da amostra**

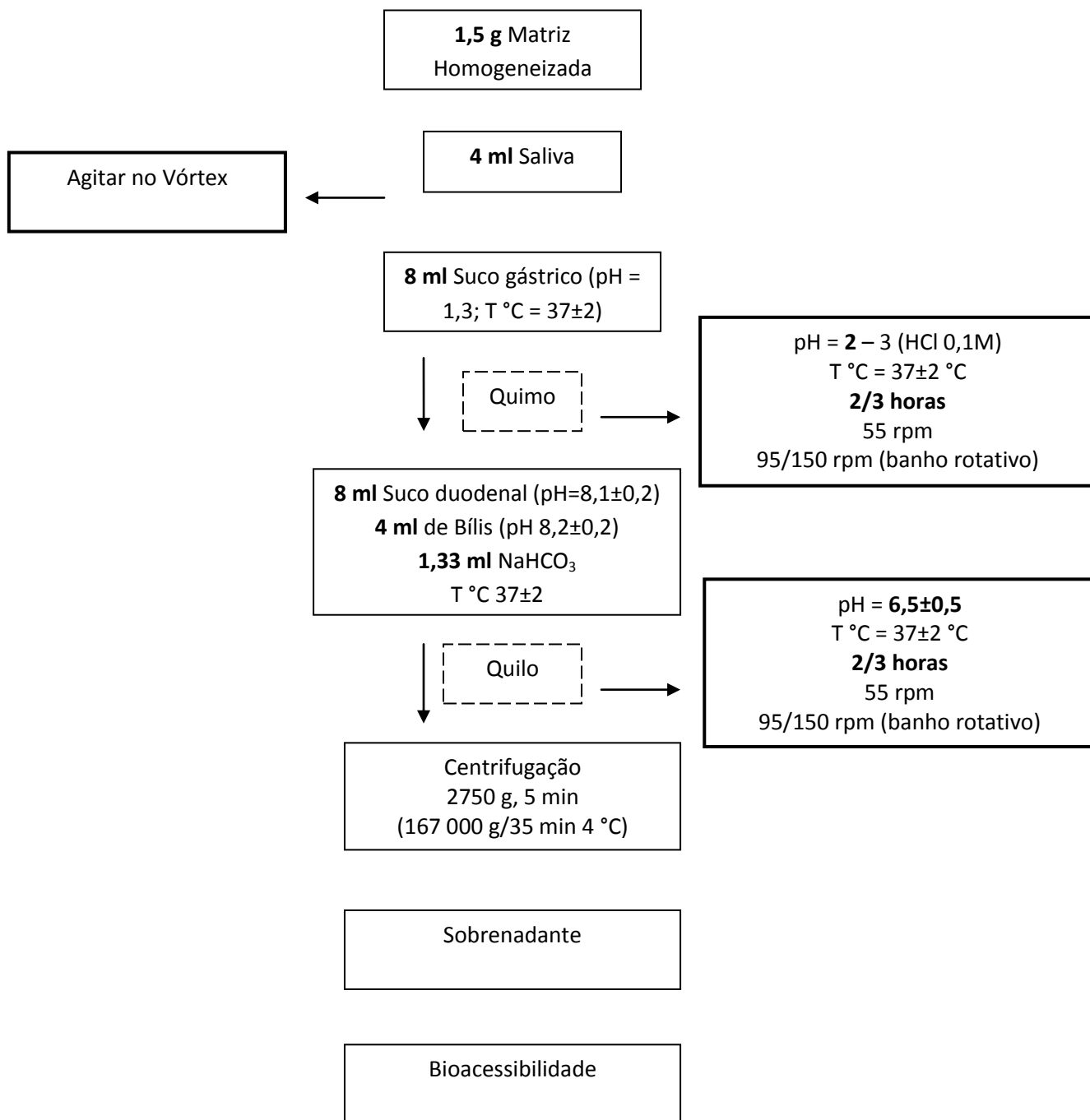
As amostras para análise (postas de salmão e corvina) foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas.

## **Técnica**

Digestão *in vitro* inclui três etapas - simulação dos processos digestivos na boca, estômago e intestino delgado - que serão realizadas em amostras peixe cru e cozinhado. A 1,5 gramas da amostra de peixe será adicionado 4 ml de saliva artificial (a pH 6,8 e temperatura  $37 \pm 2$  °C) e esta homogeneizada cerca 1 minuto no vortex. Seguidamente, 8 ml do suco gástrico artificial (a pH  $1,3 \pm 0,02$  e temperatura 37 °C) dando origem assim a quimo (ajuste do pH a 2-3 com auxílio de HCl 0,1 M) que será homogeneizado/agitado através de movimentos rotativos simulando assim os movimentos peristálticos no estômago (durante 2 h).

Finalmente, 8 ml do suco duodenal artificial a pH  $8,1 \pm 0,2$ , 4 ml do biliar a pH  $8,2 \pm 0,2$  e 1,33 ml de solução de NaHCO<sub>3</sub> (1 M), a temperatura  $37 \pm 2$  °C, dando origem assim ao quilo (ajuste do pH a  $6,5 \pm 0,5$ ) que também será agitado por mais 2

horas. A solução obtida será centrifugada a uma rotação aproximada de 3000 g durante 5 minutos e a 5 °C, a fim de separar a fração não digerida da bioacessível (sobrenadante) (Fig. 8).



**Figura 1** - Diagrama explicativo do modelo seguido.

## Ensaio em branco

O ensaio em branco é efetuado de acordo com o descrito no mercúrio, excetuando o passo de pesagem da amostra que não se efetua.

## Resultados

O cálculo do teor de mercúrio total ( $Hg_T$ ), expresso ng/g, para uma amostra de 1,5 gramas é dado pela relação:

$$\frac{A * c}{m}$$

$A$  - 1,5 gramas de amostra;

$m$  - massa em miligrama, da toma para análise;

$c$  - leitura dada pelo analisado em ng.

O cálculo do teor de mercúrio total ( $Hg_T$ ) na fração não digerida, expresso ng/g é dado pela relação:

$$\frac{n * c}{m}$$

$c$  - leitura dada pelo analisado (não digerido) em ng;

$m$  - massa em miligrama, da toma para análise;

$n$  - massa total do não digerido.

O cálculo do teor de mercúrio total ( $Hg_T$ ) na fração bioacessível, expresso ng/g é dado pela relação:

$$\frac{b * c}{m}$$

$c$  - leitura dada pelo analisado (bioacessível) em ng;

$m$  - massa em miligrama da toma para análise;

*b* - massa total do bioacessível.

O cálculo do teor de mercúrio total ( $Hg_T$ ) na fração não digerida, expresso em percentagem é dado pela relação:

$$\frac{N * 100}{S}$$

*N* - concentração obtida em ng/g de ( $Hg_T$ ) na fração não digerida;

*S* - concentração total obtida no processo de bioacessibilidade ou seja é a soma da concentração de ( $Hg_T$ ) na fração não digerida com a da fração bioacessível.

O cálculo do teor de mercúrio total ( $Hg_T$ ) na fração bioacessível, expresso em percentagem é dado pela relação:

$$\frac{B * 100}{S}$$

*B* - concentração obtida em ng/g de ( $Hg_T$ ) na fração bioacessível;

*S* - concentração total obtida no processo de bioacessibilidade ou seja é a soma da concentração de ( $Hg_T$ ) na fração não digerida com a da fração bioacessível.

Para a determinação do metilmercúrio no bioacessível foi seguido o mesmo procedimento descrito no 3.1.3, exceto a parte referente a amostra, que nesse caso foi utilizado 5ml do bioacessível.

Os resultados foram dados pela média aritmética de, pelo menos, duas determinações paralelas efetuadas.

### **3.2 Análise estatística**

Todos os resultados obtidos a partir do doseamento são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

De modo a determinar se existem diferenças no teor de mercúrio total e metilmercúrio entre os tratamentos culinários utilizou-se a análise de variâncias (“One-

way ANOVA), usando o teste “*Tukey*”. Os pressupostos destas aplicações, normalidade e homogeneidade de variâncias, foram efetuados, utilizando, para “*Tukey*” o teste “*Levene’s F-test*”. Para os dados onde não se verificaram estes pressupostos foram utilizados testes não paramétricos, nomeadamente o teste “*Kruskal-Wallis*” em conjunto com o Método de comparações múltiplas.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização dos níveis de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura

Os exemplares de corvina apresentavam, em média, um comprimento e uma massa que variaram entre (34,7 - 43,0 cm e 466 - 715 g, respectivamente). As postas de salmão tinham uma espessura compreendida entre 1,3 - 3,2 cm e uma massa entre 190 - 440 g.

Os valores de Hg e MeHg obtidos para ambas as espécies encontram-se indicados na Tabela 2, verificando-se que o metilmercúrio corresponde a 76,2 e 66,7 % de Hg<sub>T</sub> na corvina e no salmão, respectivamente. Os níveis observados nas duas espécies são muito diferentes, sendo significativamente superiores na corvina.

**Tabela 2** - Teor de mercúrio total e metilmercúrio (média ± desvio padrão), expressos em mg/kg, para as espécies estudadas.

Espécie	Mercúrio total (Hg <sub>T</sub> )	Metilmercúrio (MeHg)
CC	0,21±0,01	0,16±0,01
SC	0,03±0,003	0,02±0,003

CC-corvina crua (n=5); SC-salmão cru (n=3).

Os peixes, incluindo os de aquacultura, podem acumular poluentes, como alguns metais tóxicos, que lhes confere algum perigo para a saúde pública. O mercúrio nos peixes apresenta-se sob várias formas químicas com efeitos tóxicos bastante diferentes (George *et al.*, 2008). Quanto ao metilmercúrio (MeHg), é conhecido por sua neurotoxicidade alta, fácil penetração através das membranas biológicas, fácil bioacumulação, estabilidade e retenção a longo prazo nos tecidos biológicos (Cabanero *et al.*, 2007). É a principal forma química de armazenamento de mercúrio nos tecidos musculares dos peixes (80 a 90 % do mercúrio total) (He & Wang, 2011).

A variabilidade dos níveis de mercúrio entre diferentes espécies de peixe está associada ao processo de absorção *versus* metabolização deste metal por parte do peixe e da influência de inúmeros outros fatores quer bióticos quer abióticos (Storelli *et al.*, 2008). Assim, são vários os estudos que têm vindo a caracterizar os níveis de mercúrio

total e orgânico em várias espécies de peixe e o que pode afetar tais concentrações (He & Wang, 2011).

Como já mencionado anteriormente, os constituintes químicos no pescado variam tanto entre indivíduos da mesma espécie como também entre espécies diferentes em função do período e local de amostragem, sexo, habitat, idade e tamanho (Beharav & Nevo, 2003; Farias *et al.*, 2010). Segundo o estudo feito por Farias *et al.* (2010) os hábitos alimentares dos peixes são cruciais na percepção da diferença quanto aos valores da concentração de mercúrio total e conseqüentemente do metilmercúrio entre as diferentes espécies.

Darren *et al.*, (2010) em seu estudo compararam o crescimento do salmão de aquacultura com o nível de bioacumulação de metais, nisto constataram que o fato do salmão ser um animal de crescimento rápido, a concentração de mercúrio nesse peixe é relativamente baixo, tendo em conta que os contaminantes bioacumulam ao longo do tempo. O salmão apresenta não só baixos níveis de mercúrio, como de outros metais também.

Outro estudo recentemente publicado no *Jornal de Toxicologia e Química Ambiental (Journal of Environmental Toxicology and Chemistry)* (Kelly *et al.*, 2008) apresenta os teores de mercúrio no salmão, como sendo equivalentes ou inferiores aos observados em outros alimentos como frutas, verduras, laticínios, mel e carnes.

#### **4.2 Efeitos dos tratamentos culinários nos níveis de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura**

Foram testadas nesse estudo tanto para a corvina como para o salmão os seguintes tratamentos culinários: cozido em água e a vapor, assado em forno e grelhado em grelhador elétrico. Os valores de  $Hg_T$  e MeHg obtidos encontram-se indicados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Teor de mercúrio total e metilmercúrio nos tratamentos culinários, expresso em mg/kg, para as espécies estudadas.

Tratamento <sup>#</sup>	Mercúrio total (Hg <sub>T</sub> )	Metilmercúrio (MeHg)
CC	<b>0,21±0,01</b>	<b>0,16±0,01</b>
CO	0,22±0,01	0,17±0,01
CF	0,30±0,04	0,21±0,03
CG	0,27±0,03	0,19±0,02
SC	<b>0,03±0,003</b>	<b>0,02±0,003</b>
SO	0,02±0,004	0,02±0,003
SV	0,03±0,003	0,02±0,003
SF	0,04±0,001	0,02±0,001
SG	0,04±0,001	0,03±0,001

#: CC - corvina crua; CO - corvina cozida; CF - corvina forno; CG - corvina grelhado; SC - salmão cru; SO - salmão cozido em água; SV - salmão cozido a vapor; SF - salmão forno; SG - salmão grelhado; (média ± desvio padrão); Corvina (n=4) e Salmão (n=2).

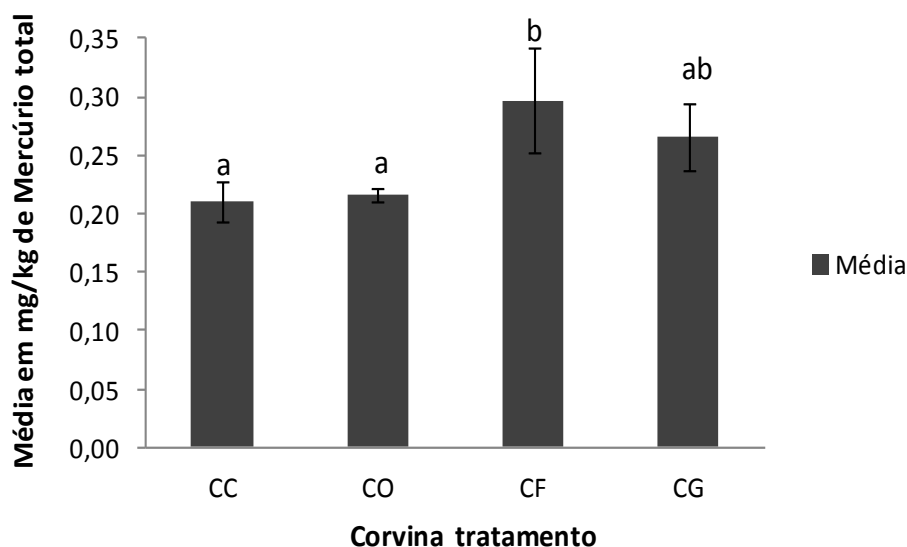
#### 4.2.1 Mercúrio Total

Na corvina o teor deste contaminante variou entre 0,21 mg/kg no cru e 0,30 mg/kg no forno. A partir dos dados da Tabela 3, constata-se que após os tratamentos culinários existiu um aumento do teor de mercúrio total, tendo-se verificado que a corvina assada no forno apresentava os valores mais elevados (0,30±0,04 mg/kg), seguida da grelhada (0,27±0,03 mg/kg) e, por último, da cozida (0,22±0,01 mg/kg). A análise estatística mostrou que embora haja esta diferença entre os teores de mercúrio total dos tratamentos estudados (Fig. 9), há somente uma diferença significativa sendo nesse caso o forno diferente do cru e cozido com *p-value* equivalente a 0,0045 e 0,0038 respectivamente (Teste *kruskal-Wallis*;  $p < 0,05$ ).

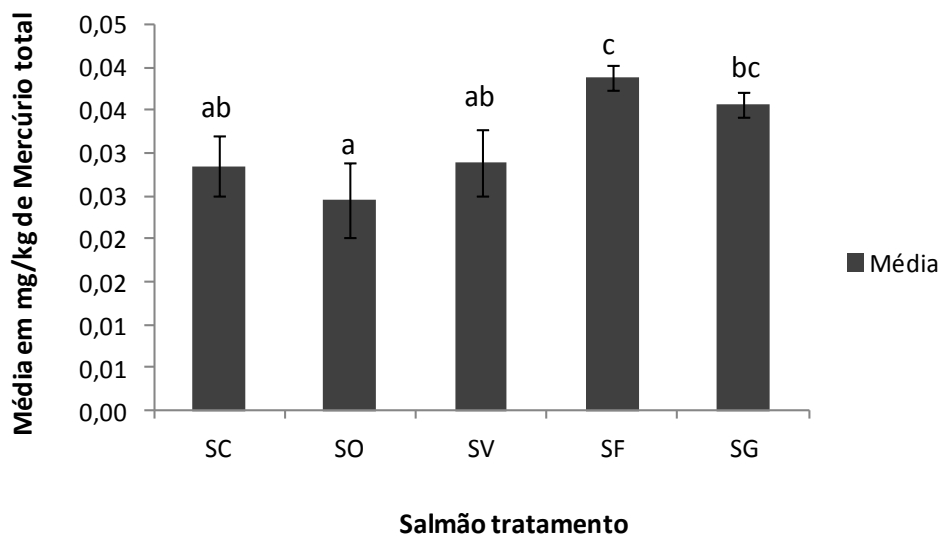
No que respeita aos teores de mercúrio total obtidos no salmão (Fig. 10) constatou-se que o produto cozinhado em forno (0,04±0,001 mg/kg) se distingue tanto do cru (0,03±0,004 mg/kg), do cozido em água (0,02±0,004 mg/kg) como também do cozido a vapor (0,03±0,003 mg/kg), enquanto o grelhado (0,04±0,001 mg/kg) se diferencia unicamente do cozido em água (Teste *Tukey*;  $p < 0,05$ ).

A confeitura culinária do pescado conduz a alterações nas características organolépticas e na composição química. Estas alterações, para além de dependerem do processo culinário, também dependem da espécie, da forma e espessura do produto (Nunes *et al.*, 2008). Em todos os tratamentos tem lugar alguma perda de água que leva à concentração dos outros nutrientes, deste modo é igualmente expectável que haja um aumento dos teores de mercúrio.

O carácter lipofílico do mercúrio, segundo alguns autores que investigaram a ação deste composto químico seria responsável pela facilidade da sua aglomeração no músculo do peixe (Afonso, 2009). Desta forma, quanto mais gordo o peixe, maior a sua predisposição em acumular mercúrio. Entretanto, de acordo com Afonso, (2009) que efetuou umas correlações em seu trabalho entre o teor de mercúrio e percentagem de gordura, estes apresentaram sempre uma tendência negativa, fato também verificado por Balshaw *et al.* (2008).



**Figura 2** - Média de mercúrio total expresso em mg/kg para os tratamentos na corvina (CC - corvina crua; CO - corvina cozida; CF - corvina forno; CG - corvina grelhada). Os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos. Colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



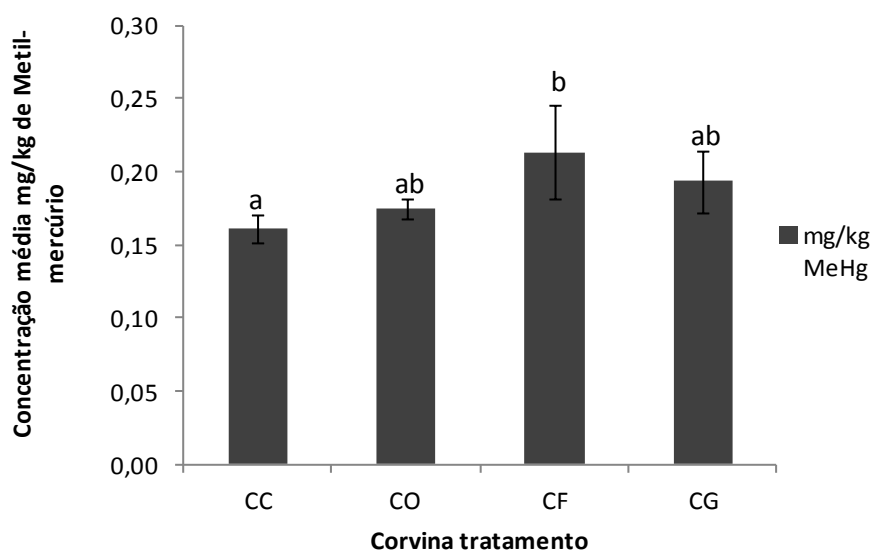
**Figura 3** – Média de mercúrio total expresso em mg/kg para os tratamentos no salmão (SC - salmão cru; SO - salmão cozido em água; SV - salmão cozido a vapor; SF - salmão forno; SG - salmão grelhado). Os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos. Colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Há controvérsias em relação ao estudo da concentração de Hg nos peixes após a sua confecção culinária, já que para alguns autores causa perda e para outros tanto pode afetar como não (Chicourel *et al.*, 2001). Assim estes autores fizeram um estudo onde focaram na distribuição de Hg em todo o corpo do tubarão azul (*Prionace glauca*) e nos efeitos sobre os níveis de mercúrio da fritura, da cozedura em água e em forno de micro-ondas, tendo concluído que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de Hg nas diferentes regiões do corpo (perto da cabeça ou partes central e caudal) e que a fritura e a cozedura não afetaram os níveis de Hg originais presentes nestes tubarões azuis.

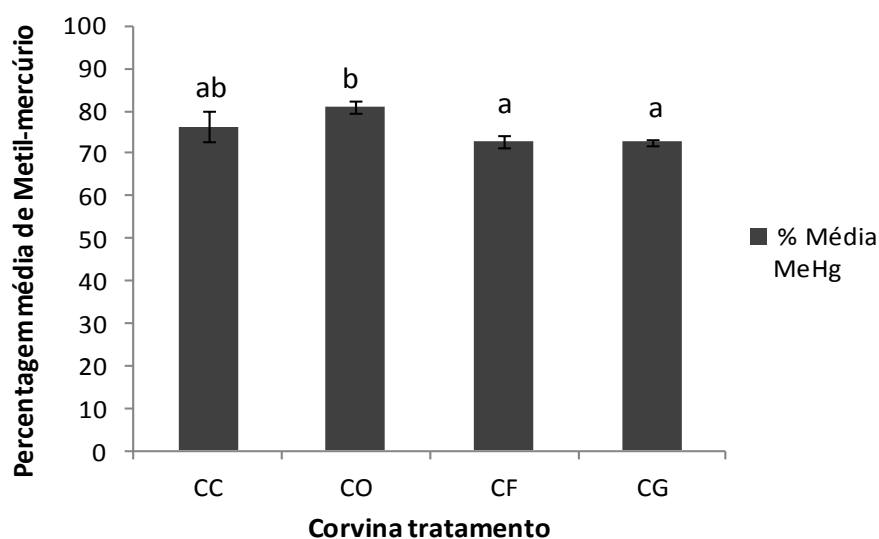
Também Limaverde Filho *et al.* (1999) investigaram as perdas de mercúrio na corvina, piraíba (*Brachyplatystoma ssp*) e traíra (*Hoplias malabaricus*) após dois processos culinários (cozedura e fritura), tendo registado perdas entre 0 a 30%. Para estes autores, tais resultados indicam que as populações que consomem peixes não estão totalmente protegidas contra a exposição de mercúrio, pelos processos de confecionamento por eles estudados.

#### 4.2.2 Metilmercúrio

Ao avaliar a quantidade de metilmercúrio presente na corvina (Fig. 11) constatou-se que o teor variou entre 0,14 mg/kg no tratamento cru e 0,28 mg/kg no forno, observando-se que a CF ( $0,21 \pm 0,03$  mg/kg) apresenta valores maiores que os do CC ( $0,16 \pm 0,01$  mg/kg), CO ( $0,17 \pm 0,007$  mg/kg) e CG ( $0,19 \pm 0,02$  mg/kg). Em termos percentuais os valores variaram entre 72 % no grelhado e 82 % no cru, existindo uma diferença significativa entre a corvina cozida em água, com o forno e o grelhado com os respectivos *p-value* equivalente a 0,002 e 0,011 (Fig. 12). A realização da análise estatística mostrou que embora haja uma pequena diferença entre os teores de mercúrio total dos tratamentos estudados, há somente uma diferença significativa sendo nesse caso o forno diferente do cru e cozido com *p-value* equivalente a 0,0045 e 0,0038 respectivamente (Teste *kruskal-Wallis*;  $p < 0,05$ ).

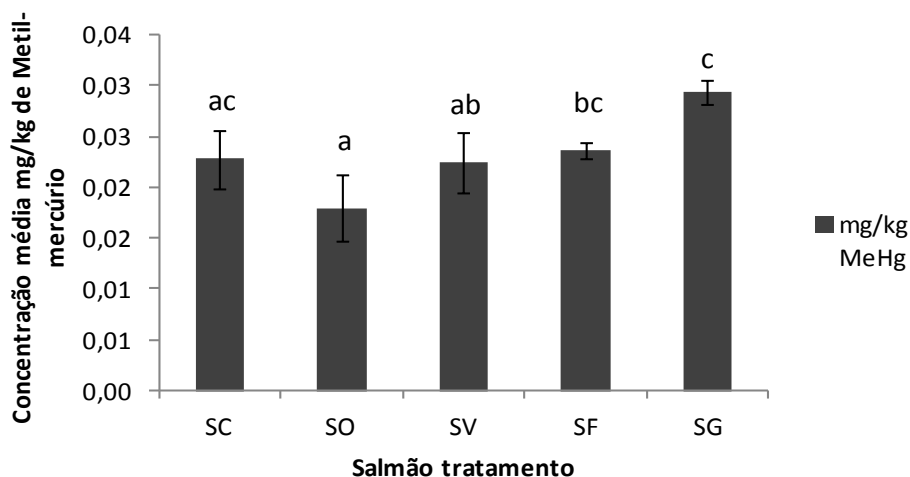


**Figura 11-** Teor de metilmercúrio, expresso em mg/kg para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico figura 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

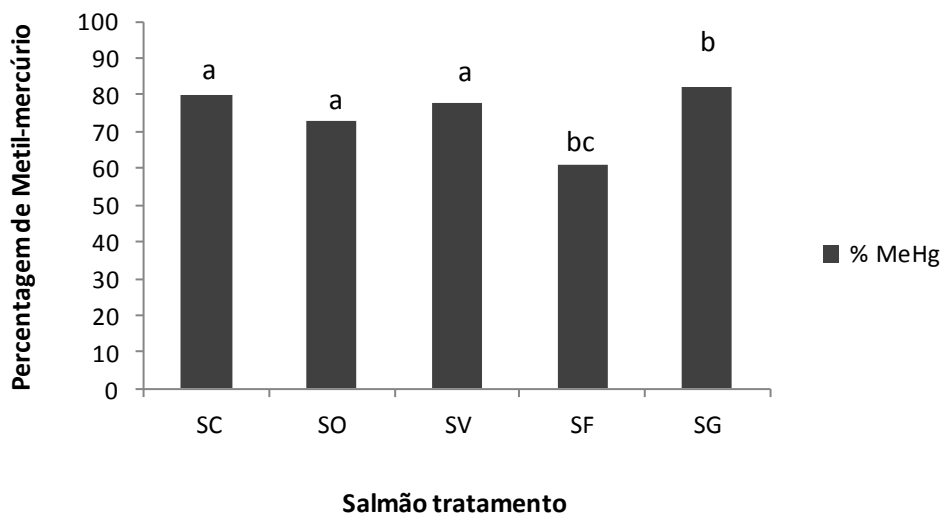


**Figura 12** - Teor de metilmercúrio, expresso em percentagem para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 13 pode-se ver que os teores de metilmercúrio no salmão oscilaram entre 0,14 mg/kg e 0,28 mg/kg, respectivamente, no cru e no forno. Com a análise estatística (Fig. 14) constatou-se que o grelhado ( $0,03 \pm 0,001$  mg/kg), só não se difere do forno ( $0,02 \pm 0,001$  mg/kg) (Teste *Kruskal-Wallis*;  $p > 0,05$ ), e quanto ao forno ( $0,02 \pm 0,001$  mg/kg), este por sua vez só se difere do cozido em água ( $0,02 \pm 0,003$  mg/kg), (Teste *Tukey*;  $p < 0,05$ ). Em termos percentuais os valores variaram entre 61 % no forno e 82 % no grelhado, existindo também uma diferença significativa do salmão forno em relação aos outros tratamentos, excetuando o grelhado com os respectivos *p-value* equivalente a 0,002 e 0,011 (Fig. 14).



**Figura 13** - Teor de metilmercúrio, expresso em mg/kg para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 44**- Teor de metilmercúrio, expresso em porcentagem para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médias desses tratamentos; colunas com letras minúsculas diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tal como o mercúrio, a variação do metilmercúrio (MeHg) entre os tratamentos depende grandemente da sua composição da parte edível e da temperatura de exposição (Nunes *et al.*, 2008). Vários trabalhos realizados por diversos autores (Cabanero *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008; He & Wang, 2011) permitiram concluir que o percentual de

MeHg no peixe cru em relação ao teor de mercúrio total varia de 75 a 90 % o que corrobora com o estudo aqui apresentado (Figs. 13 e 14).

### **4.3 Bioacessibilidade de mercúrio total e metilmercúrio em corvina e salmão de aquacultura**

#### **4.3.1 Bioacessibilidade num modelo *in vitro***

A concentração total de poluentes e a taxa de consumo de peixe são os índices tradicionais usados na avaliação do risco para a saúde do consumidor, mas a concentração total de elementos tóxicos, ingeridos com os alimentos nem sempre reflete a sua biodisponibilidade oral (Oomen, 2003), daí a necessidade de se fazerem estudos de modo a ter-se noção da quantidade ingerida e assim tomar as devidas precauções. Tanto os métodos *in vivo* como *in vitro*, são normalmente usados para avaliar a bioacessibilidade de compostos tóxicos (He & Wang, 2011). Os métodos *in vivo* são mais convincentes, mas ao mesmo tempo são mais caros e trabalhosos, quanto aos *in vitro* (realizado nesse estudo) são mais rápidos, simples, económicos e têm boa reprodutividade (He & Wang, 2011).

A bioacessibilidade refere-se à biodisponibilidade máxima de uma substância ingerida através de alimentos e a sua estimacão pode permitir uma avaliação de risco mais precisa, em comparacão com as concentraçoes de tais substâncias num alimento (He & Wang, 2011). Como está exposto no ponto 1.5 a bioacessibilidade também pode ser definida como sendo a fracão de um composto que é libertado a partir da amostra em soluçao do suco digestivo e representa a quantidade máxima de composto que está disponível para absorçao intestinal.

Após ter sido aplicado a metodologia de bioacessibilidade, obteve-se como produto final uma fracão solúvel (bioacessível) e uma outra não solúvel (não digerido). O bioacessível para ambas as espécies, como se pode constatar nas Tabelas 4 e 5, corresponde à fracão mais elevada ou seja  $\pm 90\%$  do produto final é bioacessível e o restante é o não digerido (parte não digerida que posteriormente é excretada). A realizacão da análise estatística mostrou que há diferenca somente entre o tratamento

grelhado e o cozido no não digerido na corvina com um *p-value* de 0,02 (Teste *Kruskal-Wallis*;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4** - Percentual de material digerido e não digerido na corvina crua e após os diversos tratamentos culinários.

Tratamento <sup>#</sup>	% de material não digerido	% de material bioacessível
CC	2 <sup>ab</sup>	98 <sup>a</sup>
CO	1 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
CF	2 <sup>ab</sup>	98 <sup>a</sup>
CG	4 <sup>b</sup>	96 <sup>a</sup>

#: idêntico a Tabela 3; letras diferentes foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

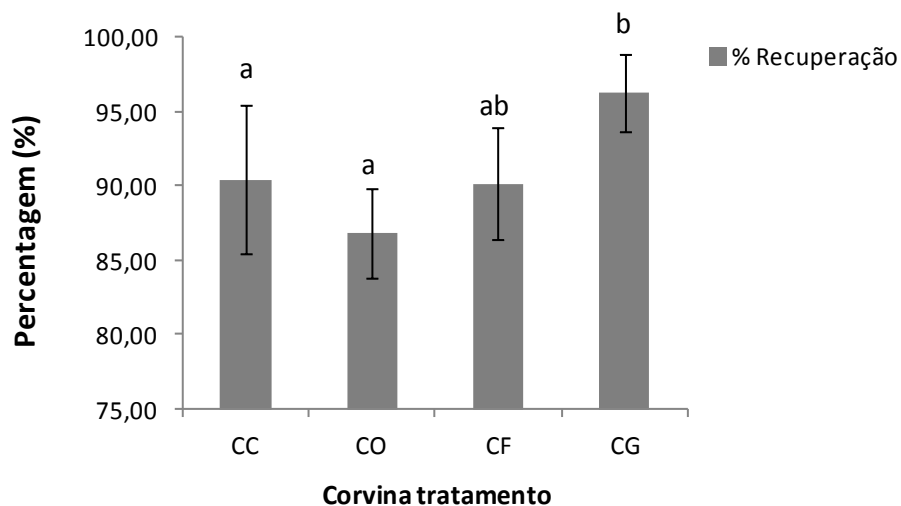
**Tabela 5** - Percentual de material digerido e não digerido no salmão cru após os diversos tratamentos culinários.

Tratamento <sup>#</sup>	% de material não digerido	% de material bioacessível
SC	1 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
SO	2 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
SV	3 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
SF	3 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
SG	3 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>

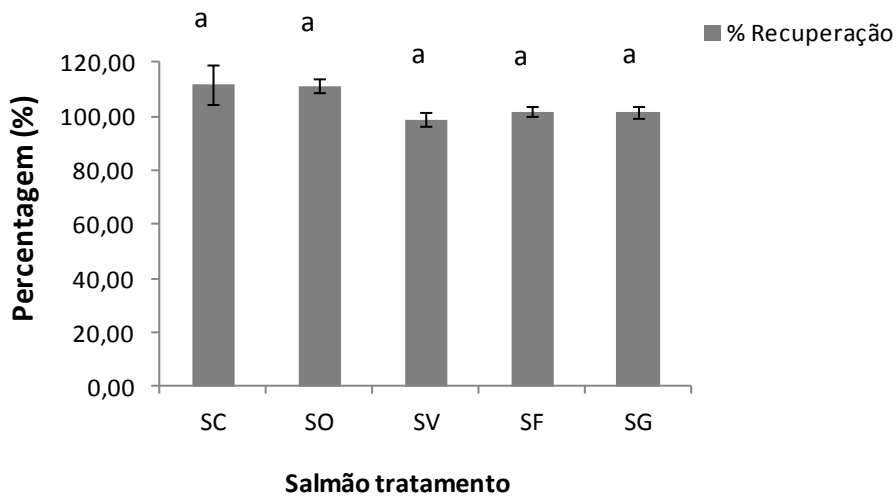
#: idêntico a Tabela 3; letras iguais não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2 Mercúrio total na amostra crua

Neste estudo, a recuperação do Hg<sub>T</sub> após as amostras terem sido submetidas ao processo de digestão *in vitro* segundo o modelo de Versantvoort *et al.* (2005), foi de ± 90 % tanto para a corvina como para o salmão em cru. A análise estatística mostrou que há diferenças significativas na percentagem de recuperação de Hg<sub>T</sub> (Fig. 15) da corvina grelhada (96,3±2,62%) em relação a crua (90,4±5,01%) e a cozida (86,8±3,04%) (Teste *Tukey*;  $p < 0,05$ ). No caso do salmão não existe diferença entre os tratamentos (Fig. 16) (Teste *Kruskal-Wallis*;  $p < 0,05$ ), tendo a recuperação do Hg<sub>T</sub> oscilado entre 97 a 117 %.



**Figura 15** - Teor de mercúrio total recuperados após o processo de bioacessibilidade; expresso em percentagem para os tratamentos na corvina (n=4); tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 56** – Teor de mercúrio total recuperados após o processo de bioacessibilidade; expresso em percentagem para os tratamentos no salmão (n=2); tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A metodologia aplicada neste trabalho foi usada também por He *et al.* (2010). Versantvoort *et al.* (2005) em seus estudos alcançaram um percentual médio de recuperação de  $Hg_T$  que ficou no intervalo de 73 e 80 %. Todavia, He *et al.* (2010)

usando esta mesma metodologia observaram recuperações entre 90 e 101%, valores que não se afastam assim dos resultados aqui obtidos tanto na corvina como no salmão (Figs. 15 e 16). Assim esta comprovação sugere que houve uma perda mínima de Hg<sub>T</sub>.

Van de Wiele *et al.* (2007) fizeram um estudo comparativo usando cinco modelos distintos de digestão *in vitro*. Nos diferentes modelos obtiveram recuperações de Hg<sub>T</sub> que variaram de 73 a 93 %. No que respeita ao Hg<sub>T</sub> na fração digerida as percentagens estiveram compreendidas entre 7,0 e 38,8 %. Com base nestes resultados, é possível concluir que houve uma perda apreciável do elemento em estudo durante o processo da digestão. Contrariamente aos resultados alcançados no trabalho destes pesquisadores, os obtidos neste estudo (modelo de Versantvoort *et al.*, 2005) levaram a obtenção de recuperações semelhantes (Figs. 15 e 16), os valores percentuais de bioacessibilidade foram  $\geq \frac{3}{4}$  dos valores iniciais de Hg<sub>T</sub>. Através do valor de mercúrio total da corvina (291,20  $\pm$  28,83 ng/g), obtido antes de se dar início ao processo de digestão *in vitro* pôde-se constatar, que um percentual de 76,6 deste valor fica bioacessível. Enquanto para o salmão quase todo o Hg<sub>T</sub> inicialmente presente na amostra fica bioacessível.

#### 4.3.3 Metilmercúrio na amostra crua

Nos peixes carnívoros marinhos, como já referido (4.1), cerca de 80-90% do mercúrio total (Hg<sub>T</sub>) está sob a forma metilada – metilmercúrio – MeHg (WHO, 2003) enquanto o restante consiste em pequenas quantidades de mercúrio inorgânico, etilmercúrio e fenilmercúrio (Branco *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Torres-Escribano *et al.*, 2009; He & Wang, 2011). Após a determinação tanto do valor de Hg<sub>T</sub> bioacessível, como do MeHg foi possível saber com exatidão qual a percentagem de Hg<sub>T</sub> que está sob a forma metilada. Sendo assim nesse estudo obteve-se um percentual de 87  $\pm$  4,79 de MeHg para as amostras em cru de corvina e 58  $\pm$  10,10 % de salmão cru.

O teor de MeHg bioacessível para a corvina manteve-se no intervalo 80 - 90 %, tal como anteriormente descrito por outro autores (Branco *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Torres-Escribano *et al.*, 2009; He & Wang, 2011), mas o mesmo não foi visto no salmão pelo que o teor desse composto para esta espécie diminuiu consideravelmente

após a simulação da digestão. Segundo Cabanero *et al.* (2007) muitos fatores podem afetar a bioacessibilidade do MeHg principalmente a espécie química. Assim, neste estudo obtiveram uma percentagem de MeHg bioacessível muito menor do que a de mercúrio inorgânico em alguns peixes. No caso do salmão alguns fatores podem ter afetado a bioacessibilidade do MeHg, não só a espécie química como também provavelmente características organoléticas e composição química (He & Wang, 2011).

De acordo com He & Wang, (2011) a bioacessibilidade do mercúrio tanto orgânico como inorgânico foi independente da concentração de  $Hg_T$ . Assim, não houve correlação entre a bioacessibilidade do MeHg e a concentração total do mercúrio nas oito espécies de peixes por eles estudadas ( $p > 0.05$ ,  $r^2 = 0.326$ ). Visto isso, chegaram a conclusão que outros fatores podem afetar a bioacessibilidade do MeHg ao invés da concentração total. Como resultado asseguraram que a bioacessibilidade deste elemento pode ser mais precisa do que a concentração MeHg na melhoria da avaliação do risco de intoxicação por este metal (He & Wang, 2011).

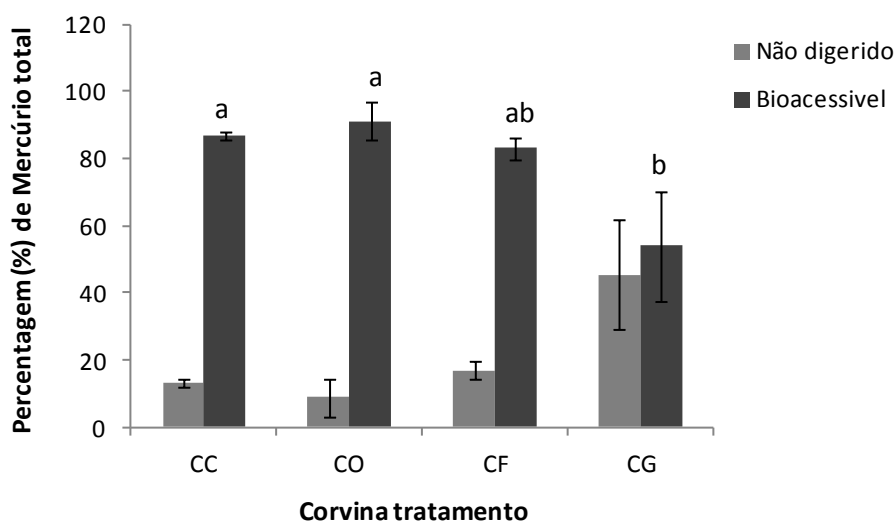
#### **4.4 Bioacessibilidade de mercúrio total e metilmercúrio após tratamentos culinários na corvina e salmão de aquacultura**

##### **4.4.1 Mercúrio total**

Os resultados obtidos permitiram concluir que a percentagem mais elevada de bioacessibilidade do mercúrio total após a digestão da corvina e do salmão, foi obtida na amostra cozida com cerca de 90 % e  $55 \pm 3,46$  % respectivamente (Figs. 17 e 18). O teor de  $Hg_T$  bioacessível detetado variou de acordo com os tratamentos culinários usados. No que diz respeito à corvina grelhada, verificou-se que embora a concentração de  $Hg_T$  fosse superior à dos restantes tratamentos, o mesmo não foi visto quanto a sua bioacessibilidade, já que apenas 54 % de  $Hg_T$  permaneceu bioacessível. Em compensação a corvina cozida que com uma concentração inicial de  $330,86 \pm 12,89$  mg/kg obteve  $\pm 100$  % de  $Hg_T$  bioacessível (Fig. 17).

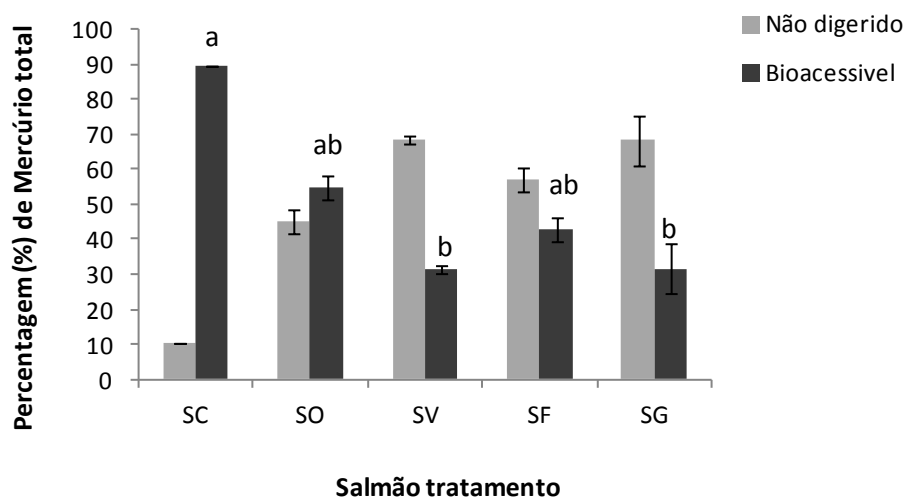
Logo, conclui-se que este tratamento culinário da corvina - cozida em água - foi menos eficaz na redução da bioacessibilidade do  $Hg_T$  que os restantes tratamentos. Estatisticamente falando, houve uma diferença significativa entre o tratamento da

corvina no forno, na grelha e em cru (Fig. 17). No salmão observou-se diferença estatisticamente significativa do salmão cru em relação ao salmão cozido a vapor e o grelhado (Fig. 18) (Teste *Kruskal-Wallis*;  $p > 0,05$ ).



**Figura 17** - Teor de mercúrio total no bioacessível e não digerido, expresso em porcentagem (%) para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico figura 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Para a maioria dos tratamentos no salmão o percentual bioacessível ficou abaixo dos 50 % com exceção da amostra do salmão cozido em água (Fig. 18). Embora a concentração de  $Hg_T$  tivesse aumentado após os tratamentos culinários, o inverso aconteceu com a bioacessibilidade destes. Não houve uma relação proporcional entre a concentração de  $Hg_T$  nas amostras de salmão e sua solubilidade gastrointestinal. Torres-Escribano *et al.* (2009) obtiveram valores baixos para a bioacessibilidade do espadarte, semelhante aos valores aqui apresentados para o salmão (Fig. 18).



**Figura 18** - Teor de mercúrio total no bioacessível e não digerido, expresso em percentagem (%) para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Dadas as características analíticas do método utilizado para quantificar  $Hg_T$  na fração bioacessível, a vasta gama de valores de bioacessível encontrados não pode ser atribuída apenas a problemas relacionadas com o método analítico usado. Mesmo porque He & Wang, (2011) fizeram uso da mesma metodologia (descrito por Versantvoort) para o mercúrio orgânico (MeHg) e registaram também um decréscimo na bioacessibilidade deste nos tratamentos culinários. Podem sim, ser o resultado do tratamento culinário, do período de congelação, condições de descongelação, temperatura de armazenamento tendo em conta a desnaturação de proteínas (Torres-Escribano *et al.*, 2009). Alterações estruturais durante o confecionamento do pescado podem ter afetado a solubilidade e liberação do  $Hg_T$  no salmão como também no tratamento forno e grelhado, isso porque, a perda de proteínas nativas e alteração estrutural durante exposição ao calor, limita a atividade das enzimas gastrointestinais que degradam as estruturas proteicas de baixo peso molecular (tióis), ou seja, grupo sulfídrico contendo moléculas tais como cisteínas, ligadas ao  $Hg_T$  (Burger *et al.*, 2003; Maulvault *et al.*, 2011; Torres-Escribano *et al.*, 2011).

Além do conteúdo proteico, níveis mais elevados de teor de gordura, como no caso do salmão que é um peixe extremamente gordo, também podem contribuir para reduzir a bioacessibilidade de Hg<sub>T</sub> (Ersoy & Özeren, 2009).

São vários os autores que se têm debruçado sobre o efeito do calor na desnaturação das proteínas. É o caso dos Dunn *et al.* (1981), em seus estudos observaram que o tratamento térmico (74 °C banho de água entre 10 - 15 min) de fígado de rato homogeneizado, dificulta a conversão de Hg<sup>2+</sup> a Hg elementar no ensaio *in vitro*. Eles argumentaram que a desnaturação pelo calor pode criar outros pontos de ligação, e assim, efetivamente transferir o metal para sítios ativos (Ouédraogo & Amyot, 2011).

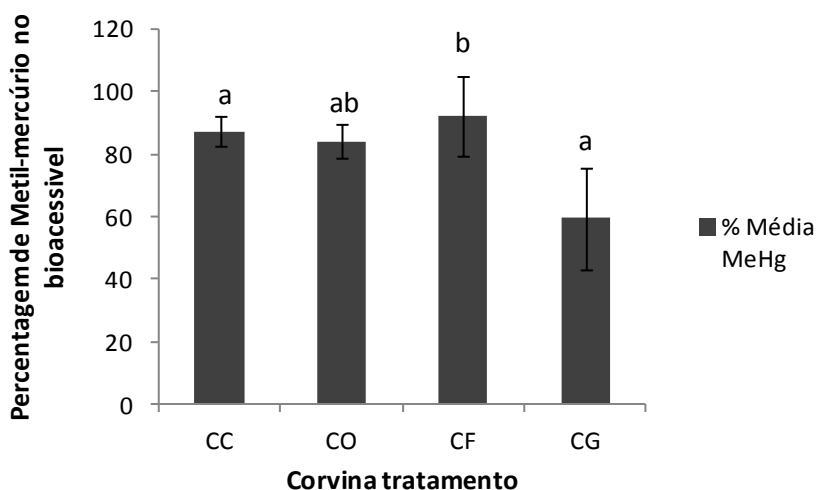
Por sua vez, Liard *et al.* (2009) relataram que a bioacessibilidade do Hg<sub>T</sub> é afetada pela transferência dinâmica de Hg<sub>T</sub> entre a fração bioacessível isto é, <10 kDa (kiloDalton) e a não bioacessível >10 kDa (Maulvault *et al.*, 2011). Há que se ter em conta também que “digestores” *in vitro* têm por si só dificuldade para reproduzir todo o processo gastrointestinal, como no caso da secreção de enzimas em sequência fisiológica, concentração de pH apropriada para enzimas e adição de cofatores relevantes tais como sais biliares e coenzimas, o tempo de trânsito fisiológico para cada passo de digestão, mecanismos físicos de absorção no intestino delgado, ausência da borda em escova (Liard *et al.*, 2009).

Liard *et al.* (2009) também disseram que microrganismos gastrointestinais de certa forma podem influenciar a especiação de Hg no lúmen intestinal através da conversão de MeHg em Hg<sup>2+</sup>, apesar de variar com o tipo de alimento ingerido.

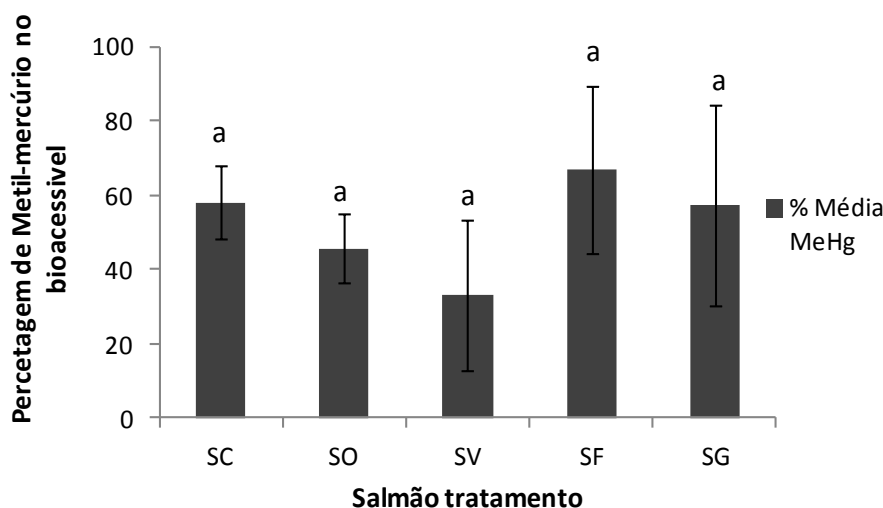
Cabañero *et al.* (2004) por sua vez proferiram que a bioacessibilidade do mercúrio em peixes está correlacionada com o teor de selênio. Sendo assim consideraram que a baixa capacidade das enzimas para liberar Hg<sub>T</sub> complexado com selênio no método *in vitro*, pode também ser uma das razões da baixa percentagem de bioacessível nos seus experimentos.

#### 4.4.2 Metilmercúrio

Ao efetuar os cálculos para determinação das médias de metilmercúrio bioacessível verificou-se que tanto na corvina como no salmão, o forno é que detém maior percentagem ( $92 \pm 13 \%$ ) e ( $67 \pm 22 \%$ ) respectivamente (Figs. 19 e 20), a menor na corvina grelhada ( $59 \pm 16 \%$ ) e no salmão cozido a vapor ( $33 \pm 20 \%$ ). Não existe diferenças significativas, para os tratamentos culinários no salmão, mas já com a corvina a situação é diferente, na medida em que o tratamento forno se difere estatisticamente tanto do grelhado, como também da corvina crua (Teste *Kruskal-Wallis*;  $p > 0,05$ ).



**Figura 19** - Teor de Metilmercúrio (MeHg) encontrado no bioacessível, expresso em percentagem (%) para os tratamentos na corvina; tratamento idêntico Fig. 9; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20** - Teor de Metilmercúrio (MeHg) encontrado no bioacessível, expresso em percentagem (%) para os tratamentos no salmão; tratamento idêntico Fig. 10; os valores representam médio  $\pm$  desvio padrão desses tratamentos; colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os resultados desse estudo indicam que os diferentes tipos de preparação no salmão contribuíram para diminuição de  $\pm 50$  % da bioacessibilidade do MeHg. A corvina em contrapartida teve um percentual deste metal bioacessível superior ao deparado no salmão, com valores  $\geq 50$  %, chegando mesmo até a haver um aumento no tratamento culinário forno (92 %) em relação a percentagem encontrada na corvina crua (87 %). O que se observou nesse estudo é que métodos culinários diferentes têm consequentemente efeitos diferentes na bioacessibilidade do MeHg (He & Wang, 2011).

Estas diminuições da bioacessibilidade do MeHg como resultado de confeccionamento podem ser devido a duas razões. À perda de água durante o aquecimento, que resultou na perda de algumas proteínas lábeis, e portanto, reduziu a bioacessibilidade do metal (Amiard *et al.*, 2008). Também, a desnaturação das proteínas das fibras musculares levou ao encolhimento do tecido e a formação de frações insolúveis, o que fez as proteínas menos digestíveis e seus componentes menos bioacessíveis (kulp *et al.*, 2003).

Estudos recentes também têm mostrado que a distribuição subcelular de metais pode fornecer informações valiosas sobre a toxicidade e tolerância do metal, a

transferência de nível trófico, bem como bioacumulação (Wallace *et al.*, 2003<sup>a e b</sup>). He *et al.* (2010) nos seus estudos mostraram uma significativa relação entre a bioacessibilidade e a distribuição celular em dois peixes de aquacultura. Desta forma verificaram que a distribuição celular pode estar relacionada com os hábitos alimentares dos peixes por eles estudados, mas também é difícil concluir que essa distribuição depende unicamente da alimentação. No entanto deduziram que presas diferentes de peixes podem ter um fracionamento subcelular diferente de MeHg. Hábitos alimentares diferentes podem levar a padrões de acumulação e distribuição subcelular diferentes, e por isso bioacessibilidades distintas (He & Wang, 2011), o que de certa forma explica a diferença nas percentagens quanto ao MeHg bioacessível nas duas espécies aqui estudadas.

O facto da bioacessibilidade do MeHg no salmão ter sido baixo também pode estar relacionado ao facto dele ser um peixe gordo o que dificulta a sua digestibilidade. A digestibilidade também é afetada pelos processos culinários, verificando-se que as proteínas do pescado cozido são tão digeríveis como as do peixe cru enquanto as do produto grelhado, frito ou salgado são digeridas mais lentamente. Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que, em termos gerais, o processo de cozimento é apenas um valor muito limitado utilizado como meio de reduzir as concentrações do metal. Esta redução hipotética depende das condições de cozimento (tempo, temperatura e meio de cozimento) (Perelló *et al.*, 2008).

#### **4.5 Valores legislados/recomendados**

Estimou-se a quantidade ingerida de Mercúrio total e Metilmercúrio a partir do cálculo do PTWI (*Provisional Estimated weekly intakes*), dose de ingestão semanal provisória, utilizando os valores médios obtidos, considerando um adulto de 60 kg e uma ingestão semanal diária de 160 g *per capita* pela população portuguesa.

Assim, com base nos resultados apresentados na Tabela 6 consegue-se ter uma perceção de quantas refeições semanais um consumidor pode fazer sem exceder o limite de ingestão semanal tolerável deste contaminante químico.

**Tabela 6** - Concentração média de Metilmercúrio para os tratamentos na corvina e no salmão (mg/kg), e o número de refeições por semanal, para um adulto de 60 Kg e considerando um consumo diário de 160g de peixe.

Tratamento <sup>#</sup>	MeHg (mg/kg)	Numero máximo de refeições por semana (cada refeição 160 g)
CC	<b>0,16</b>	<b>4</b>
CO	0,17	3
CF	0,21	3
CG	0,19	3
SC	<b>0,02</b>	<b>26</b>
SO	0,02	34
SV	0,02	27
SF	0,02	25
SG	0,03	20

#: idêntico a Tabela 3.

Quando presente em concentrações muito baixas, o mercúrio não representa um perigo toxicológico para o consumidor, mas a sua acumulação a longo prazo pode ser prejudicial, por ser eliminado muito lentamente pelo organismo humano (Nunes *et al.*, 2008).

A maior parte dos valores que servem como indicadores de mercúrio em peixes está diretamente relacionada à proteção da saúde humana (Castilho & Rodrigues, 2008). Segundo Castilho & Rodrigues, (2008) as instituições de controlo sanitário de diversos países utilizam o valor de 0,5 mg/kg (ou de 1 mg/kg, dependendo do país e do tipo de peixe) de mercúrio em peixes, como um referencial para a proteção da saúde humana. Quando o objetivo é identificar, se um ecossistema está contaminado ou não, este valor de 0,5 mg/kg perde a aplicabilidade. Ele foi predisposto para uso na proteção da saúde pública.

Os valores de mercúrio total para ambas as espécies estudadas estiveram abaixo do limite máximo admitido (0,5 mg/kg) pela União Europeia (UE) (Tabela 3). Os valores de MeHg encontrados nas duas espécies estudadas também não excederam o limite admitido de 0,5 mg/kg (Tabela 3). Portanto, a determinação de mercúrio total em

peixes tem-se mostrado suficiente para as avaliações de risco à saúde humana por ingestão de peixes contendo MeHg.

A partir dos resultados aqui obtidos (Tabela 6) tendo em conta os valores médios, um adulto de 60 kg e uma ingestão semanal diária de 160 g *per capita*, pode-se constatar, no que respeita o MeHg na corvina o máximo de refeições por semana estimado foi de 3 em qualquer dos tratamentos culinários, enquanto no salmão o número de refeições não oferece qualquer problema.

Atendendo a esses valores pode-se concluir que uma ingestão descuidada da corvina pode trazer riscos a saúde de um consumidor menos atento, principalmente quando a confeção é forno. Quanto ao salmão esse risco é muito improvável já que a quantidade de refeições é superior ao que normalmente uma pessoa ingere, sendo assim é muito importante que se procure ficar mais informado a esse respeito.

## 5 Conclusão

O painel global dos efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em humanos atestam que, apesar das inúmeras contradições, estes compostos apresentam efeitos suficientemente graves que merecem ser cada vez mais estudados. Estes estudos deverão servir de auxílio para uma ação mais efetiva dos órgãos da saúde pública, e somam conhecimentos para a comunidade científica relacionada à vigilância sanitária e ciência de alimentos como forma de manter a integridade da saúde do público-alvo.

Um dos maiores problemas para se predizer o comportamento do mercúrio no meio ambiente aquático, é que ainda persistem muitos factos intrigantes, pois alguns parâmetros influenciam a acumulação de mercúrio em peixes (Castilho & Rodrigues, 2008). De um modo geral, todas as espécies aquáticas contêm mercúrio, mas as do topo da cadeia alimentar é que apresentam níveis mais altos como antes referido. Isso porque o tempo de meia-vida desse metal no tecido muscular do organismo é relativamente longo (Eisler, 2006).

Analisando na totalidade os resultados aqui obtidos pode-se concluir que tanto a espécie, como as várias formas a que pescado poderá ser confeccionado, irão influenciar ou mesmo provocar alterações na concentração de mercúrio total, assim como na do metilmercúrio e conseqüentemente na bioacessibilidade destes metais. A pesquisa realizada mostra que, os tratamentos culinários a que foram expostos não fizeram com que houvesse uma diminuição significativa na bioacessibilidade desse metal. Pelo menos foi o que se observou na corvina já que a redução não foi tão acentuada como aconteceu no salmão. O que leva a concluir que mesmo confeccionando o pescado, o risco de uma intoxicação alimentar estará sempre presente se não forem tomadas as devidas precauções como por exemplo, ter em atenção o máximo de refeições por semana que se pode fazer de um determinado peixe. No caso da corvina, ela deverá ser consumida com moderação.

Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que, em termos gerais, o processo culinário tem um valor muito limitado como meio de reduzir as concentrações de metal. Esta redução hipotética depende das condições (tempo, temperatura e meio).

Desta forma é fundamental a monitorização de  $Hg_T$  em amostras da biota aquática visto que trata-se de um metal altamente tóxico e de efeito cumulativo e, atualmente, pequenas quantidades deste metal no organismo humano já estão sendo imputadas por desencadear sintomas psicossomáticos como depressão, anteriormente não relacionados à contaminação mercurial (Roldão, 2007).

Quanto aos valores de  $Hg_T$  e do MeHg para ambas as espécies estudadas estiveram abaixo do limite máximo admitido (0,5 mg/kg), pela União Europeia (U.E.). Como anteriormente foi dito, a determinação de mercúrio total em peixes tem-se mostrado suficiente para as avaliações de risco à saúde humana por ingestão de peixes contendo MeHg.

## 6 Recomendações

O consumo de peixes conjuntamente com alimentos ricos em fitoquímicos, como por exemplo o chá verde, pode diminuir significativamente os riscos de saúde associados à presença de MeHg em peixes. Um estudo anterior já mostrou que alguns alimentos ricos em fitoquímicos, como o extrato chá verde, extrato de chá preto, e proteína de soja reduzem significativamente a bioacessibilidade do mercúrio (Shim *et al.*, 2009; He & Wang, 2011).

Por conseguinte, a bioacessibilidade deste composto metálico depende não só da espécie do peixe, como também dos diferentes hábitos alimentares, métodos de cozimento e outros itens consumidos com o peixe. Bioacessibilidade de mercúrio em peixes herbívoros e onívoros é geralmente mais baixo, que a dos peixes carnívoros. Escolher peixes herbívoros e onívoros para consumir, pode potencialmente diminuir os riscos para a saúde quanto a ingestão do MeHg pelos seres humanos.

O meso-2,3-dímercaptosuccínico (DMSA) é um agente quelante que segundo Shim *et al.*, (2009) é eficiente para o mercúrio, já que normalmente o utilizam para tratar a intoxicação por mercúrio. Um estudo recente feito por He & Wang, (2011) revelou que ao contrário que o Shim *et al.*, (2009) escreveu, este agente aumentou a bioacessibilidade MeHg.

Mais análises como estas deverão ser desenvolvidas com a finalidade de determinar os fatores importantes que possam afetar bioacessibilidade MeHg em peixes marinhos, na esperança de se encontrar formas de diminuir o risco potencial de MeHg relacionado ao consumo de peixe.

## 7 Referências bibliográficas

- Afonso, C.I., 2009. Produtos da pesca capturados na costa Portuguesa: Benefícios e Perigos Associados ao seu Consumo. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia. Lisboa 243 p.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P.S., Wang, W.X., 2008. Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2010-2022.
- ASAE, 2009. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos 16 de Abril de 2009. Lisboa 330 p.
- Balshaw, S., Edwards, J.W., Ross, K.E., Daughtry, B.J., 2008. Mercury distribution in the muscular tissue of farmed southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) is inversely related to the lipid content tissues. *Food and Chemical Toxicology*, 111: 616-621.
- Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., 2001. O Óleo de Sardinha e a Saúde. Divulgação *IPIMAR* (Lisboa), 18, 4 p.
- Bandarra, N. M., Calhau, A., Nunes, M. L., Oliveira, L., Batista, I., 2004. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. Publicações Avulsas do *IPIMAR* (Lisboa), 11, 103 p.
- Becker, W., P. O. Darnerud and K. Petersson-Grawé. 2007. Risks and Benefits of Fish Consumption: A Risk-Benefit Analysis Based on the Occurrence of Dioxin/PCB, Methyl Mercury, n-3 Fatty Acids and Vitamin D in Fish. *Livsmedels Verket*. Sweden.143 p.
- Beharav, A., Nevo, E., 2003. Predictive validity of discriminant analysis for genetic data. *Genética*, 119: 259-267.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2000. Tocopherol and astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defense and fatty acid metabolism, *Journal of Nutrition*, 130(7): 1800-1808.
- Benito, P., Miller, D., 1998. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*, 18: 581-603.

- Berry, M.J., Ralston, N.V.C., 2008. Mercury Toxicity and the Mitigating Role of Selenium. *International Association for Ecology and Health*, 5: 456-459.
- Bosso, S.T., Enzweiler, J., 2008. Ensaio para determinar a biodisponibilidade de chumbo em solos contaminados revisão. *Química Nova*, 31: 394-400.
- Branco, V., Vale, C., Canário, J., Santos, M.N.D., 2007. Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L. 1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean. *Journal of Environmental Pollution*, 150: 373-380.
- Burger, J., Dixon, C., Boring, C.S., Gochfeld, M., 2003. Effect of deep-frying fish on risk from mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 66: 817-828.
- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526: 51-61.
- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2007. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biological Trace Element Research*, 119:195-211.
- Cabral, M.J., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L., Santos-Reis, M., 2005. *Salmon salar* Salmão. In: Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. *Instituto da Conservação da Natureza*, Lisboa.
- Carvalho, C.M.L., Matos, A.I.N.M., Mateus, M.L., Santos, A.P.M., Batoréu, M.C. C., (2008) 'High-Fish Consumption and Risk Prevention: Assessment of Exposure to Methylmercury in Portugal, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, 71(18): 1279 -1288.
- Castilhos, Z.C., Rodrigues, A.P.C., 2008. Avaliação da Potencial Acumulação de Mercúrio em Peixes dos Reservatórios (previstos) de Jirau e de Santo Antônio, Rio Madeira, RO. Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro, 103 p.
- Catalán, I.A., Jiménez, M.T., Alconchel, J.I., Prieto, L., Muñoz, J.L., 2006. Spatial and temporal changes of coastal demersal assemblages in the Gulf of Cadiz (SW Spain) in relation to environmental conditions. *Deep-Sea Research II*, 53: 1402-1419.
- Chan, E. J., Cho, L., 2009. What can we expect from omega-3 fatty acids? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 76 (4), pp 245-251.

- Chang, L.F., Jiang, S.J., Sahayam, A.C., 2007. Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1176: 143-148.
- Chapman, L., Chan, H.M., 2000. The Influence of Nutrition on Methyl Mercury Intoxication. *Environmental Health Perspectives*, 108: 29-51.
- Chicourel, E.L, Sakuma, A.M., Zenebon, O., Tenuta-Filho, A., 2001. Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51: 288-292.
- Clakson, T.W., 2002. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives, Resarch Triangle Prak*, 110: 11-23.
- Connell, D.W., 1989. Biomagnification by aquatic organisms a proposal. *Chemosphere* 19: 1573-1584.
- Connell, D.W., 1990. Environmental routes leading to the bioaccumulation of lipophilic chemicals. In: Connell, D.W. (Ed.), *Bioaccumulation of Xenobiotic Compounds. Taylor & Francis group, CRC Press, Boca Raton, Florida*, pp. 60-73.
- Darren, M.W., Keith, H.N., Celia, Y.C., Carol L.F., 2010. Reduced trace element concentrations in fast-growing juvenile atlantic salmon in natural streams. *Environmental Science and Technology*, 44 (9), 3245-3251.
- Davenport, H.W., 1984. Physiology of the digestive tract. *Yearbook Medical Publishers*, pp 3-13.
- Dean, J. R., Ma, R., 2007. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. *Chemosphere*, 68:1399-1407.
- DGPA, 2007<sup>a</sup>. Plano estratégico nacional para a pesca 2007-2013. MADRP – Direcção Geral das Pescas e Aquacultura, 84 p.
- DGPA, 2007<sup>b</sup>. Programa operacional de pesca 2007-2013. MADRP – Direcção Geral das Pescas e Aquacultura, 96 p.
- Doario, I., 2001. Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid, 364 p.
- Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russell, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M., 1990. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7: 756-761
- Dunn, J.D., Clarkson, T.W., Magos, L., 1981. Ethanol reveals novel mercury detoxification step in tissues. *Science News Service*, 213: 1123-1125.

- Eeckhout, S.G., 2007. Mercury: a poisonous solution. 7: 12-15.
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Parliament related to the safety of wild and farmed fish Question n. ° EFSA-Q-2004-22, adopted on 22 June 2005. *The EFSA Journal*, 236: 1-118.
- Eisler, R. 2006. Mercury hazards to living organisms. *Taylor & Francis group*, CRC press, Boca Raton, 312 p.
- Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T. 2007. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl-mercury poisoning. *Journal of the the Neurological Sciences*, Amsterdam, 262: 131-144.
- EPA, 1997. Mercury Study Report to Congress, Volume VII: Characterization of Human Health and Wildlife Risks from Mercury Exposure in the United States. United States Environmental Protection Agency, 19 p.
- EPA, 1998. Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. SW-846, United States Environmental Protection Agency, 14 p.
- EPA, 2012. Health Effects Mercury. Disponível em :<<<http://www.epa.gov/mercury/effects.htm>>> acessado em 12 de julho de 2012.
- Fairweather-Tait, S.J., 1993. Bioavailability of nutrientes. *Encyclopeadia of food science, food technology and nutrition*. London Academic Press; pp 384-388.
- FAO, 1997. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Documento Técnico sobre as Pescas. N.º 334, Roma, 176 p.
- FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma 2010, 219 p.
- FAO/WHO, 2003. Summary and conclusions of the fifty-third meeting of the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) 61<sup>st</sup> Meeting, Rome, 10-19 June 2003, 22 p.
- Farias, L.A., Fávaro, D.I., Santos, J.O., Vasconcellos, M.B., Pessôa, A., Aguiar, J.P.L., Yuyama, L., 2010. Cooking process evaluation on mercury content in fish. *Acta Amazonica*, 40(4): 741-748.
- Fishbase, 2012. [www.fishbase.com](http://www.fishbase.com) (accedido em Setembro 2012).

- George, G.N., Singh, S.P., Prince, R.C., Pickering, I.J., 2008. Chemical forms of mercury and selenium in fish following digestion with simulated gastric fluid. *Chemical Research in Toxicology*, 21: 2106-2110.
- Giori, F.P., 2010. Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -Caroteno em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. Seropédica RJ, 56 p.
- González-Quirós, R., del Arbol, J., García-Pacheco, M.M., Silva-García, A.J., Naranjo, J.M., Morales-Nin, B., 2011. Life history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*, 109: 140-149.
- Goyer R.A., 1996. Toxic effects of metals. in: Klaassen C.D., Amdur M.O. e Doull J. (Eds.) Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5ª Edição, McGraw-Hill Companies, New-York, EUA, pp 691-736.
- Gray, V.A., 1996. Change of pH requirements for simulated intestinal fluid TS. *Pharmacopeial Forum*, 22: 1943-1945
- He, M., Ke, C.H., Wang, W.X., 2010. Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. *Journal Agricultural Food and Chemical Toxicology*, 58: 3517-3523.
- He, M., Wang, W.X., 2011. Factors Affecting the Bioaccessibility of Methylmercury in Several Marine Fish Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7155-7162.
- INE, 2011. Estatística da pesca 2010. *Instituto Nacional de Estatística*, 101 p.
- ISSFAL, 2004. Recommendations for intake of polynsaturated fatty acids in healthy adults. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 22 p.
- Kelly, C.B., Ikonomou, G.M., Higgs, A.D., Oakes, J., Dubetz, C., 2008. Mercury and other trace elements in farmed and wild salmon from british Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(6): 1361-1370.
- Kimberlie A.G., Charles V.P.Jr., 1998. Heavy metal toxicity, part I: Arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine*, 16(1): 45-56.
- King, M., 1995. Fisheries Biology, Assessment and Management. *Blackwell Science*, Oxford, 341 p.
- Kulp, K.S., Fortson, S.L., Knize, M.G., Felton, J.S., 2003. An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1701-1710.

- Liard, B.D., Shade, C., Gantner, N., Man Chan, H., Siciliano, S.D., 2009. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. *Science of the Total Environment*, 407: 6003-6008.
- Limaverde Filho, A.M., Campos, R.C., Goes, V.A., Pinto, R.A.G., 1999. *Avaliação da perda de mercúrio total em peixe antes e após os processos de fritura e cocção. Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(1): 19-22.
- Macedo, L.F.L., 2010. Remoção de mercúrio e arsênio em cação-azul, *Prionace glauca*. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 87 p.
- Malagelada, J.R., Longstreth, G.F., Summerskill, W.H.J., Go, V.L.W., 1976. Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man. *Gastroenterology*, 70: 203-210
- Maulvault, A.L., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H.M., Nunes, M.L., Coelho, I., Langerholc, T., Marques, A., 2011. Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2808-2815.
- Miller, D.D., Schriker, B.R., Rasmussen, R.R., Campen, D.V., 1981. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34: 2248-2256.
- Mitchell, S.C., Cunjak, R.A., 2007. Relationship of upstream migrating adult Atlantic salmon (*Salmon salar*) and stream discharge within Catamaram Brook, New Brunswick. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(3): 563-573.
- Nunes, M.L., Batista, I., Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O., 2008. Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. Publicações avulsas do IPIMAR, 18, 77 p.
- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeydner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., Van Wynen, J.H., 2002. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, 36: 3326-3334.
- Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., Sips, A.J.A.M., 2003. Development of an in vitro digestion model for estimation

- of bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 281-287.
- Ouédraogo, O., Amyot, M., 2011. Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. *Environmental Research*, 111: 1064-1069.
- Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2008. Effects of various processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury and lead in foods. *Journal Agricultural Food and Chemical Toxicology*, 56: 11262-11269.
- Powell, P.P., 1991. Minamata disease: a story of mercury's malevolence. *South Medicine Journal*, 84: 1352-1358.
- Prista, N., Jones, C.M., Costa, J.L., Costa, M.J., 2008. Inferring movements from small-scale fisheries data: The case of *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) in Portugal. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), *CM/K*: 19, 19 p.
- Ramo, J., Torreblanca, A., Mayans, J.D., 1993. Toxicidad de los matales. In: A. Mas, J.M. Azcue (eds.), *Metales en sistemas biológicos*, PPU, S.A., Barcelona, pp. 143-162.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarthy, L.S., 1995. Introduction to aquatic ecology. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis group, CRC, London, pp. 3-53.
- Roldão, A.P.G., 2007. Contaminação mercurial em pescado. Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, 66 p.
- Ruby, M.V., Davis, A., Link, T.E., Schoof, R., Chaney, R.L., Freeman, G.B., Bergstrom, P., 1993. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology*, 27: 2870-2877.
- Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M., 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology*, 30: 422-430.
- SACN. 2004. Advice on fish consumption: benefits & risks. Published for the Food Standards Agency and the Department of Health under licence from the Controller of Her Majesty's Stationery Office. Published by TSO (The Stationery Office) and available from: Online [www.tso.co.uk/bookshop](http://www.tso.co.uk/bookshop).

- Santos, H. S., Cruz, W. M., 2001. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47(3): 303-08.
- Scerbo, R., Barghigiani, C., 1998. Organic mercury determination in fish samples using an automatic mercury analyser. *Environmental Science and Technology*, 19: 339-342.
- Shim, S.M., Ferruzzi, M.G., Kim, Y.C., Janle, E.M., Santerre, C.R., 2009. Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Journal Agricultural Food and Chemical Toxicology*, 112: 46-50.
- Soares, T.C., 2008. Acumulação de Hg em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados sob diferentes dietas alimentares. Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências, Departamento de Química Analítica e Físico-química. Fortaleza-CE 50 p.
- Stier, P.A., Gordon, R.A., 1998. Psychiatric aspects of mercury poisoning. *Medical Update for Psychiatrists*, Amsterdam, 3: 144-147.
- Torres-Escribano, S., Velez, D., Montoro, R., 2009. Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Journal: Food Additives and Contaminants*, 27(3): 327-337.
- Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Vélez, D., Montoro, R., 2011. Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 981-986.
- Van de Wiele, T.R., Oomen, A.G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Corneli, C., Rempelberg, C.J.M., De Zwart, L.L., Klinck, B., Wijnen, J.V., Verstraete, W., Sips, A.J.M., 2007. Comparison of five in vitro digestion models: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health*, 42: 1203-1211.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*, 62: 1033-1042.
- Versantvoort, C.H.M., Kamp, E van de., Rempelberg, C.J.M., 2004. Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. *National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)*, rapport 320102002.

- Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 31-40.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, 249: 183-197.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, 257: 125-137.
- WHO, 2003. World health organization. Methyl-mercury (addendum). *WHO Food Additives Series*: 52. Geneva.

## Anexo

### Corvina

A corvina é classificada taxonomicamente da seguinte forma:

**Classe:** Actinopterygii

**Ordem:** Perciformes

**Família:** Sciaenidae

**Espécie:** *Argyrosomus regius* (Asso, 1801)

**Longevidade máxima:** 42 anos (González – Quirós *et al.*, 2011).

**Distribuição:** Caracterizado por ser uma espécie costeira, sendo que pode ser encontrado a profundidades inferiores a 80 m. O seu habitat se estende do canal Inglês ao Senegal, incluindo os mares Mediterrâneo e Negro (Fishbase, 2012; González – Quirós *et al.*, 2011).

**Alimentação:** Carnívoros. Alimentam-se de pequenos peixes e camarões (Fishbase, 2012).

**Reprodução:** O período de reprodução ocorre no final do mês de Maio, onde trespasam os estuários com o propósito de desovar (Catalán *et al.*, 2006; González – Quirós *et al.*, 2011).

**Importância económica:** Constitui uma importante espécie-alvo para comerciantes de pequena escala local, devido tanto ao seu tamanho (atinge 200 cm de comprimento) como a alta disponibilidade sazonal (Prista *et al.*, 2008).



## Salmão

O salmão é classificado taxonomicamente da seguinte forma:

**Classe:** Actinopterygii

**Ordem:** Salmoniformes

**Família:** Salmonidae

**Espécie:** *Salmo salar* (Linnaeus, 1758)

**Longevidade máxima:** 13 anos (Fishbase, 2012).

**Distribuição:** Pode ser encontrado no Atlântico Norte, desde Norte da Europa até as costas leste do Canadá e Estados Unidos (Cabral *et al.*, 2005; Limburg & Waldman, 2010). Em Portugal ocorre nas bacias dos rios Minho e Lima (Cabral *et al.*, 2005).

**Alimentação:** Alimentam-se preferencialmente de krill no mar, ao iniciarem a migração anádroma não se alimentam. Os juvenis e alevins nas águas doces têm uma alimentação baseada em macroinvertebrados aquáticos (Doadrio, 2001).

**Reprodução:** Quando atingem a maturação sexual regressam aos locais onde nasceram (rios com caudal permanente, bem oxigenados e de baixa profundidade) para se reproduzirem. Durante a postura as fêmeas depositam entre 2500 a 7000 ovos, a quantidade depositada depende do tamanho do peixe (Cabral *et al.*, 2005; Mitchell & Cunjak, 2007).

**Importância económica:** Espécie de elevado valor comercial, considerado tanto na pesca desportiva como também na gastronomia (Cabral *et al.*, 2005).



