

EFEITO DA TEMPERATURA NA BIOACUMULAÇÃO E ELIMINAÇÃO DO METILMERCÚRIO EM ROBALO (*Dicentrarchus labrax*)

Ana Filipa Silva Custódio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutor António Manuel Barros Marques

Coorientador: Dra. Ana Luísa Marques Paixão de Carvalho Maulvault

Coorientador: Professora Doutora Maria Luísa Louro Martins

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutor António Manuel Barros Marques, Investigador Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

Lisboa, 2014

Agradecimentos

Este espaço tem o propósito de agradecer a todos aqueles que ajudaram e contribuíram para que a execução desta tese fosse possível e, de certa forma, me ajudaram a crescer, quer a nível académico, quer pessoal. No entanto gostaria, de uma forma particular, deixar aqui expressos os meus sinceros agradecimentos.

Ao Doutor António Marques, pelos conselhos prestados, a compreensão e paciência que teve comigo. Agradeço ainda o entusiasmo que me incutiu ao longo deste estágio, mas acima de tudo, na confiança que depositou em mim.

À Ana Maulvault, pelo conhecimento transmitido, tanto na parte prática como na parte escrita desta tese. Pela ajuda e acompanhamento demonstrados ao longo destes meses de estágio. Pela (enorme) paciência e disponibilidade, mesmo quando estes eram diminutos. Mas agradeço principalmente a sua amizade.

À Patrícia Anacleto e Vera Barbosa, pela amizade, companheirismo, ajuda e força que me deram durante todo o estágio.

Aos colegas do LMG, pela ajuda e conhecimentos transmitidos, bem como a oportunidade que me foi concedida para poder realizar a minha tese nas instalações do LMG.

Aos meus pais e irmã, que desde sempre me apoiaram e me deram coragem para continuar, transmitindo-me confiança e incentivos para alcançar os meus objetivos, acreditando em mim mesmo nos momentos de desalento. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Ao Tiago, pelo apoio incondicional, paciência e compreensão ao longo dos anos. Por acreditar que consigo ir mais longe.

A todos os meus amigos, por estarem presentes nos bons e nos maus momentos. Pelos momentos casuais de distração e descontração. Muito obrigado pela vossa enorme amizade.

A todos, aqui deixo expresso o meu enorme agradecimento.

Resumo

Neste trabalho estudaram-se os efeitos do aumento da temperatura da água do mar expectável em condições de alterações climáticas, na bioacumulação de mercúrio (Hg) em robalos (*Dicentrarchus labrax*). Determinou-se a concentração de mercúrio total (Hg total) e metilmercúrio (MeHg) nas amostras de peixe submetidos a 28 dias de exposição a ração contaminada com MeHg e 28 dias de eliminação (i.e. alimentados com ração não contaminada). Os resultados obtidos mostraram que os teores mais elevados de Hg encontravam-se nos robalos mantidos a temperaturas mais elevadas (22 °C). As concentrações de Hg total e MeHg foram aumentando durante a fase de exposição, começando com 0,10 e 0,08 mg kg⁻¹, respetivamente no dia 0, até atingirem 0,11 e 0,08 mg kg⁻¹ no final da fase de exposição para o cenário 1; 1,47 e 1,23 mg kg⁻¹ para o cenário 2 e 1,78 e 1,50 mg kg⁻¹ no cenário 3. Durante a fase de eliminação os teores mantiveram-se constantes nos três cenários. Concluiu-se com este estudo que robalos expostos a temperaturas mais elevadas bioacumulam mais Hg, sendo assim expectável que as alterações climáticas possam potenciar os riscos associados ao consumo de pescado com características idênticas aos robalos.

Palavras-chave: Alterações climáticas, temperatura, metilmercúrio, bioacumulação, robalo

Abstract

In this study the effects of seawater temperature increase expected in climate change in bioaccumulation of mercury (Hg) were studied in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). The concentration of total mercury (total Hg) and methylmercury (MeHg) were determined in fish samples subjected to 28 days of exposure to a diet contaminated with MeHg, followed by 28 days of elimination (i.e. non contaminated diet). The results revealed that the highest concentrations of Hg were observed in sea bass maintained at higher temperature (22 °C). Total Hg and MeHg concentrations increased during the exposure phase, starting from 0.10 and 0.08 mg kg⁻¹, respectively, on day 0, and reaching 0.11 and 0.08 mg kg⁻¹ in scenario 1, 1.47 and 1.23 mg kg⁻¹ in scenario 2, and 1.78 and 1.50 mg kg⁻¹ in scenario 3. During the elimination phase the concentrations of Hg remained stable in the three scenarios. In conclusion, this study revealed that sea bass exposed to higher temperatures bioaccumulate more Hg, thus being expected that climate change may exacerbate the risk associated with the consumption of seafood with identical characteristics to those of sea bass.

Key-words: Climate change, temperature, methylmercury, bioaccumulation, sea bass

Extended abstract

Nowadays, the contamination of marine ecosystems presents various concerns to the environment and human health, since some contaminants can bioaccumulate and biomagnify. One type of contaminant is methylmercury (MeHg), derived from anthropogenic activities and natural sources, and being accumulated in the aquatic environment. This toxic metal is an organometallic compound with neurotoxic effects that are extremely dangerous to human health. As a result of climate changes, it is possible that the bioaccumulation and biomagnifications of this chemical contaminants changes in seafood.

The purpose of this study was to verify if the increase of seawater temperature foreseen with climate change would affect the bioaccumulation of MeHg in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), thus being a potential risk for human health. In this way, the concentration of total mercury (total Hg) and MeHg was determined in fish muscle samples exposed during 28 days to a contaminated diet with MeHg, followed by 28 days of elimination (i.e. fed with a non contaminated diet). It was ensured that all Hg was encapsulated in the sea bass feed without being released to the water.

The concentrations of total Hg and MeHg in the seabass muscle during the exposure phase were stable in scenario 1, on average remaining at 0.10 and 0.09 mg kg⁻¹, respectively. This seems to indicate a balance between the amounts of MeHg ingested through the diet and those excreted by the fish. The ratio MeHg/total Hg was always between 75 and 81%, which demonstrates that the greatest amount of Hg was in the organic form. In scenario 2 and 3 the concentrations of total Hg and MeHg in fish muscle (and the ratio MeHg/total Hg) increased during the exposure phase. However, the increase in contaminants concentrations was higher in scenario 3, likely due to the higher metabolic rates and consequent increase in MeHg uptake. In contrast, during the elimination phase, the concentrations of total Hg and MeHg were stable in the three scenarios. The poor elimination rates registered during the 28 elimination days in the three scenarios indicate that Hg has bioaccumulation and biomagnification characteristics. The results also showed that temperatures have no effect on MeHg elimination, nor promotes the conversion of organic Hg into the less toxic inorganic Hg.

In conclusion, this study revealed that the effects of the climate change, more specifically the increase of seawater temperature, is likely to lead to an increase in the bioaccumulation of Hg and MeHg in sea bass. In this ways, the risk associated with the consumption of this fish (or other fish species occupying identical places in the trophic chain) will be exacerbated

Índice Geral

Índice de Figuras.....	I
Índice de Tabelas.....	II
Lista de Abreviaturas.....	III
1. Introdução.....	1
1.1 Poluição.....	1
1.2 Contaminantes químicos emergentes.....	3
1.2.1 Produtos farmacêuticos e de uso pessoal.....	3
1.2.2 Disruptores Endócrinos.....	6
1.2.3 Microplásticos.....	7
1.2.4 Retardantes de Chama Bromados.....	9
1.2.5 Metais tóxicos.....	11
1.3 Alterações Climáticas.....	13
1.3.1 Acidificação dos oceanos.....	14
1.3.2 Temperatura.....	17
1.3.3 Hipoxia.....	18
1.3.4 Impactos das alterações climáticas na aquacultura.....	19
1.4 Modelo biológico: Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	20
1.5 Objetivos.....	22
2. Material e métodos.....	23
2.1. Delineamento experimental.....	23
2.1.1. Sistema de cultivo.....	23
2.1.2. Formulação de rações.....	25
2.1.3. Transporte e aclimação dos organismos de estudo.....	26
2.1.4. Fase 1: Exposição de MeHg.....	26
2.1.5. Fase 2: Eliminação MeHg.....	28
2.1.6. Amostragens.....	29
2.2. Análises químicas.....	30

2.2.1. Determinação do teor de mercúrio total	30
2.2.2. Determinação do teor de mercúrio orgânico (MeHg)	30
2.3. Análise estatística.....	31
3. Resultados e discussão.....	32
3.1. Controlo de qualidade dos resultados.....	32
3.2. Estabilidade da ração	32
3.3. Dados biométricos.....	33
3.4. Exposição a MeHg	35
3.5. Eliminação de MeHg	40
3.6. Correlações entre parâmetros biométricos e concentrações de Hg	44
3.7. Implicações para a saúde humana	46
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	48
Bibliografia	49
Anexos	i
Anexo I – Técnicas analíticas	ii
Anexo II – Resultados	vii

Índice de Figuras

Figura 1 – Poluição dos ecossistemas marinhos	3
Figura 2 – Giros oceânicos e “o grande depósito de lixo” do Giro do Pacífico Norte	9
Figura 3 – Ciclo do carbono	15
Figura 4 – Robalo adulto	20
Figura 5 – Valores globais de captura vs produção em aquacultura.....	22
Figura 6 – Sistema de cultivo para simulação das alterações climáticas em organismos marinhos.	23
Figura 7 – Componentes do sistema de cultivo.	24
Figura 8 – Corte da coluna vertebral.	29
Figura 9 – Procedimento de remoção de espinhas e pele da amostra de tecido muscular. ...	30
Figura 10 – Concentrações de Hg total e MeHg (mg kg^{-1} peso fresco) e proporção MeHg/Hg total (%) nos três cenários, durante a fase de exposição a MeHg (C1 – Cenário 1; C2 – Cenário 2; C3 – Cenário 3).	36
Figura 11 – Concentrações de Hg total e MeHg (mg kg^{-1} peso fresco) e proporção MeHg/Hg total (%) nos três cenários, durante a fase de eliminação a MeHg (C1 – Cenário 1; C2 – Cenário 2; C3 – Cenário 3).....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tempo de degradação de diferentes resíduos sólidos nos oceanos.....	2
Tabela 2 – Teores máximos de três metais tóxicos presentes em diferentes géneros alimentícios.....	11
Tabela 3 – Variação média estimada (ΔT) e melhor estimativa para o aumento da temperatura da superfície da água dos oceanos esperado até ao final do século XXI.....	17
Tabela 4 – Composição nutricional da ração para robalos juvenis.....	25
Tabela 5 – Comparação entre os valores certificados de Hg total e MeHg e os valores obtidos no presente estudo, no material de referência DORM-4 (média \pm desvio padrão; n=3).....	32
Tabela 6 – Concentração de Hg total (mg kg^{-1}) nas duas rações (em peso seco) e amostras de água ao longo do tempo (média \pm desvio padrão; n=3).....	33
Tabela 7 – Comprimento total (cm) e peso total (g) dos indivíduos amostrados em cada um dos cenários (n=6).....	34
Tabela 8 – Diferenças significativas encontradas em relação às concentrações de Hg total, MeHg e relação MeHg/Hg total, para cada cenário, durante a fase de exposição a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0,05$).....	35
Tabela 9 – Quantidade de Hg bioacumulado (mg kg^{-1} peso fresco) e taxas de bioacumulação de Hg (%) para os três cenários durante a fase de exposição.....	39
Tabela 10 – Diferenças significativas encontradas em relação às concentrações de Hg total, MeHg e relação MeHg/Hg total, para cada cenário, durante a fase de eliminação a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0,05$).....	41
Tabela 11 – Quantidade de Hg eliminado (mg kg^{-1} peso fresco) e taxas de eliminação de Hg (%) para os três cenários durante a fase de eliminação.....	44
Tabela 12 – Correlação de Pearson (* – significativa para $p < 0,05$).....	45

Lista de Abreviaturas

As(III) – arsenito

As(V) – arsenato

BFRs – retardantes de chama bromados

BTBPE – 1,2-bis (2,4,6-dibromofenoxi) etano

CFC – clorofluorcarboneto

CID – carbono inorgânico dissolvido

DBDPE – decabromodifenil etano

E2 – 17- β -estradiol

EE2 – 17- α -etinilestradiol

EPA – ácido eicosapentaenóico

ETARs – estações de tratamento de águas residuais

HBCD – hexabromociclododecano

iAs – arsénio inorgânico

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LMG – Laboratório Marítimo da Guia

MeHg – metilmercúrio

MRC – material de referência certificado

n – número de amostras

NBFR – Novos retardantes de chama bromados

p – nível de significância

PBB – polibromobifenilo

PBT – pentabromotolueno

PCBs – compostos bifenilpoliclorado

PDBE – éteres difenil polibromados

PE – polietileno

PET – politereftalato de etileno

PP – polipropileno

PPCPs – produtos farmacêuticos e de uso pessoal

PS – poliestireno

PUFA n-3 – ácidos gordos polinsaturados, ómega-3

PVC – policloreto de vinil

r – valor de correlação

TBBPA – tetrabromobisfenol A

TWI – ingestão semanal tolerável

UV – ultra violeta

ΔT – variação de temperatura

1. Introdução

1.1 Poluição

A poluição está geralmente associada à introdução direta ou indireta de substâncias ou calor na atmosfera, solo e meio aquático, que resultem de causas naturais ou antropogênicas e possam ser prejudiciais para a saúde humana ou para a qualidade dos ecossistemas (CE, 2000).

Apesar de não ser possível definir uma data ou época exata, sabe-se que a poluição teve início há milhares de anos, tendo-se registado um aumento exponencial a partir de meados do século XVIII, aquando da Revolução Industrial. A melhoria das condições de vida durante a Revolução Industrial levou ao aumento da população mundial e da urbanização e conseqüente desflorestação, bem como, à produção de resíduos urbanos (esgotos, resíduos hospitalares, entre outros) e industriais. Embora exista alguma poluição de ocorrência natural, por exemplo, proveniente da atividade vulcânica, a de origem antropogénica é a mais preocupante e relevante quer em termos de produção de gases de efeito de estufa (dióxido de carbono – CO₂, metano – CH₄, óxido nitroso – N₂O, clorofluorocarboneto – CFC, vapor de água – H₂O, ozono – O₃; Nye, 2010), quer em relação à introdução de contaminantes químicos no solo e meio aquático, tais como os pesticidas, plásticos, metais tóxicos (mercúrio – Hg, cádmio – Cd, chumbo – Pb, arsénio – As), retardantes de chama bromados (BFRs), compostos bifenilpoliclorado (PCBs), produtos farmacêuticos, entre outros. Estes poluentes são produzidos através da utilização de combustíveis fósseis, agricultura, exploração mineira, indústria, fabrico de cimento, urbanização, desflorestação, entre outras atividades antropogénicas (CNFCG, 1994; Hill, 2010).

Os ecossistemas marinhos são particularmente suscetíveis às contaminações, quer biológicas quer químicas, provenientes de descargas de efluentes que contêm resíduos domésticos, industriais e hospitalares, que atravessam rios, mares, estuários e, finalmente, chegam aos oceanos (Islam & Tanaka, 2004).

Certos contaminantes químicos (ex. metais tóxicos, substâncias ativas de fármacos ou pesticidas) têm a particularidade de, por vezes, se concentrarem nos organismos marinhos. Isto deve-se à bioacumulação destes contaminantes e em alguns casos biomagnificação ao longo da cadeia trófica, podendo representar um risco para a saúde dos consumidores de pescado (Islam & Tanaka, 2004; Karouna-Reiner *et al.*, 2007; Figueira *et al.*, 2012).

Ao contrário do que se poderá pensar, não são os derrames de petróleo os maiores causadores de poluição marinha, mas sim os resíduos sólidos. Estes resíduos sólidos, como a madeira, papel, plásticos, vidro e latas, podem ser introduzidos acidental ou

intencionalmente no ambiente, sendo os mais encontrados nos oceanos e zonas costeiras (estuários, praias e salinas). O seu tempo de degradação no oceano difere consoante o tipo de material (Tabela 1; Gates & Blauvelt, 2011; Noone *et al.*, 2013; DNVGL, 2014).

Tabela 1 – Tempo de degradação de diferentes resíduos sólidos nos oceanos (Adaptado de: Gates & Blauvelt, 2011; DNVGL, 2014).

Resíduos Sólidos	Tempo de degradação no oceano
Papel	2 – 4 Semanas
Tecido de algodão	1 – 5 Meses
Corda	3 – 14 Meses
Tecido de lã	1 Ano
Filtros de cigarro	1 – 5 Anos
Madeira	13 Anos
Saco de plástico	10 – 20 Anos
Lata de estanho	100 Anos
Lata de alumínio	200 – 500 Anos
Fraldas	450 Anos
Garrafa de plástico	450 Anos
Rede de pesca	600 Anos
Garrafa de vidro	1.000.000 Anos

Como se pode observar na Tabela 1, os plásticos e o vidro são os tipos de resíduos que mais tempo demoram a degradar-se nos oceanos, dado ser um material resistente, duradouro e utilizado no dia-a-dia (Cole *et al.*, 2011; Ivar do Sul & Costa, 2014). O plástico é também o material que é encontrado em maior quantidade nos oceanos e zonas costeiras, pondo em risco a vida de mais de 660 espécies marinhas através de ingestão, enredamento e “pesca fantasma”, isto é, ferimentos ou até mesmo morte de animais marinhos causados por equipamentos de pesca perdidos ou descartados no mar (Figura 1; Cole *et al.*, 2011, Karydis & Kitsiou, 2013; Schulz *et al.*, 2013; O’Shea *et al.*, 2014).



Figura 1 – Poluição dos ecossistemas marinhos (retirado de www.nationalgeographic.com e <http://coastalcare.org/2009/11/plastic-pollution/>).

1.2 Contaminantes químicos emergentes

Contaminantes químicos emergentes são compostos e materiais cuja presença no ambiente e produtos alimentares (ex. pescado) ainda não se encontra regulamentada ou cuja legislação atual necessita revisão atendendo aos dados obtidos em estudos toxicológicos e epidemiológicos recentes (EFSA, 2014a). Apesar de muitas vezes serem detetados em concentrações bastante baixas, a presença de contaminantes químicos emergentes nos ecossistemas aquáticos tem vindo a ser alvo de diversos estudos nos últimos anos, dada a falta de informação e desconhecimento acerca dos seus efeitos toxicológicos em plantas, animais e no ser humano (Hernando *et al.*, 2006). De entre estes compostos emergentes, destacam-se os produtos farmacêuticos e de uso pessoal, disruptores endócrinos, microplásticos, retardantes de chama bromados e metais tóxicos.

1.2.1 Produtos farmacêuticos e de uso pessoal

Os produtos farmacêuticos e de uso pessoal (pharmaceutical and personal care products ou PPCPs) são produtos utilizados no dia-a-dia e em grandes quantidades (Rahman *et al.*, 2010). A crescente preocupação com a saúde e cuidados de higiene pessoal pela

população mundial nos últimos 50 anos implicou a utilização contínua e crescente destes produtos, existindo portanto um maior risco de ocorrência destes contaminantes na água (Ellis, 2006; Damásio *et al.*, 2011; Dolar *et al.*, 2012).

Existem cerca de 3000 substâncias utilizadas para produzir PPCPs (Huerta *et al.*, 2012; Claessens *et al.*, 2013a), podendo ser divididas em dois grupos: 1) fármacos, que têm a função de tratar e prevenir doenças e que atuam sobre funções bioquímicas e fisiológicas (humanos e animais; Jjemba, 2006; Jelic *et al.*, 2009); e 2) produtos de uso pessoal (Breton & Boxall, 2003). No grupo dos fármacos encontram-se medicamentos com e sem prescrição médica utilizados na medicina humana e animal, tais como, antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, β -bloqueadores, psicotrópicos, antiepiléticos, citotóxicos, citostáticos, de contraste de raio-X, hormonas e esteroides (McBride & Wyckoff, 2002; Boyd *et al.*, 2004; Hernando *et al.*, 2006; Hedgespeth *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2012; Damásio *et al.*, 2011; Claessens *et al.*, 2013a; Ferguson *et al.*, 2013; Liu & Wong, 2013). No grupo dos produtos de uso pessoal encontram-se cosméticos, fragrâncias, protetores solares, conservantes, dentífricos, desinfetantes, antissépticos, detergentes, repelentes de insetos, loções, cremes, sabonetes, entre outros (McBride & Wyckoff, 2002; Breton & Boxall, 2003; Ellis, 2006; Ferguson *et al.*, 2013; Liu & Wong, 2013).

Como será descrito mais à frente (Capítulo 1.2.2.), alguns PPCPs podem também ser considerados compostos disruptores endócrinos (ex. hormonas e esteroides), uma vez que afetam o sistema endócrino alterando o seu normal funcionamento.

Vários estudos têm reportado a presença de PPCPs em ambientes aquáticos em concentrações, geralmente, na ordem de ng L^{-1} (ppt) ou $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb), pelo que estes compostos poderão ser considerados micropoluentes (Damásio *et al.*, 2011; Huerta *et al.*, 2012; Claessens *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2014). O escoamento de resíduos provenientes de atividades agropecuárias e aquacultura, bem como efluentes associados à indústria farmacêutica, resíduos domésticos e hospitalares constituem as principais fontes de contaminação de PPCPs (Bris & Poulique, 2004; Ellis *et al.*, 2006; Gros *et al.*, 2006; Fatta *et al.*, 2007; Al-Odaini *et al.*, 2010; Fatta-Kassinos, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Dolar *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2012; K'Oreje *et al.*, 2012; Sirés & Brillas, 2012; Claessens *et al.*, 2013a). De entre estes compostos, destacam-se os antibióticos, uma vez que se encontram em diversos ecossistemas devido à sua incorreta e excessiva utilização, quer humana quer veterinária (Huerta *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2013b; Gros *et al.*, 2013). Esta é uma questão preocupante dado que a frequente exposição a antibióticos pode ter consequências dramáticas no ambiente, como o desenvolvimento de estirpes de bactérias resistentes (Huerta *et al.*, 2013b; Liu & Wong, 2013).

O desenvolvimento da indústria farmacêutica e cosmética nas últimas décadas tem promovido uma utilização cada vez maior, mais diversificada e frequente de PPCPs. Uma vez

que grande parte destes compostos, bem como, dos seus metabolitos, é depois excretada (podendo atingir 90%) através da urina e fezes (Breton & Boxall, 2003; Ellis, 2006; Jjemba, 2006; Hedgespeth *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013), o consumo elevado e contínuo de PPCPs, faz com que sejam descarregados continuamente através dos esgotos domésticos nos ecossistemas marinhos, sobretudo nos estuários e lagoas costeiras (Gros *et al.*, 2006). Ainda que estes resíduos sejam encaminhados e tratados nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), os processos de tratamento convencionais, muitas vezes não eliminam eficientemente os compostos farmacêuticos e seus metabolitos, dado que estas ETARs (convencionais) não foram inicialmente conceptualizadas para remover este tipo de contaminantes (Jones *et al.*, 2005; Kummerer, 2010; Huerta *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Deste modo, após o processo de tratamento, 60 a 90% dos resíduos de PPCPs podem permanecer na água tratada, na sua forma química original ou sob a forma de metabolitos e produtos transformados (i.e. PPCPs ou metabolitos que sofreram alterações estruturais no ambiente por processos bióticos, como bactérias e fungos, ou abióticos, como a luz, oxidação e hidrólise; Kummerer, 2010; Huerta *et al.*, 2012).

De modo semelhante, os animais provenientes de pecuárias e aquaculturas excretam também os PPCPs que lhes são administrados durante o crescimento, no entanto, nestes casos não é efetuado qualquer tipo de tratamento das águas residuais (McBride & Wyckoff, 2002; Breton & Boxall, 2003; Ellis, 2006; Santos *et al.*, 2010).

Devido à introdução contínua destes poluentes nos ecossistemas aquáticos os PPCPs são considerados contaminantes “pseudo-persistentes”, pois a quantidade introduzida no ambiente é, geralmente, superior à que é degradada ou eliminada (McBride & Wyckoff, 2002; Ellis, 2006; Hernando *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2012).

Mesmo em reduzidas concentrações, estes poluentes podem ter efeitos agudos e crónicos, constituindo assim um perigo para a vida marinha e saúde humana (Hernando *et al.*, 2006; Martín-Díaz *et al.*, 2009; Al-Odaini *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2012). Apesar de se terem observado efeitos adversos em alguns organismos marinhos, de momento pouco se sabe sobre as consequências a médio e longo prazo da introdução contínua de PPCPs nos ecossistemas marinhos (McBride & Wyckoff, 2002; Huerta *et al.*, 2012).

A maioria dos compostos dos PPCPs são hidrofílicos, mas alguns estudos revelaram que determinados compostos e/ou os seus metabolitos podem ser bioacumulados por espécies marinhas como bivalves, crustáceos e peixes, devido à exposição crónica nos seus habitats (Ellis, 2006; Gros *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2012; Dodder *et al.*, 2013; Huerta *et al.*, 2013b). No que respeita à biomagnificação destes compostos ao longo da cadeia alimentar marinha, bem como, aos efeitos sinérgicos entre vários compostos, a informação é ainda bastante escassa (McBride & Wyckoff, 2002; Huerta *et al.*, 2012; Liu & Wong, 2013).

A Comissão Europeia apresentou a Diretiva 2013/39/EU incluindo, pela primeira vez, alguns PPCPs como diclofenac, 17- α -etinilestradiol (EE2), 17- β -estradiol (E2) na lista de vigilância, para que sejam recolhidos dados que indiquem os riscos que estas substâncias poderão, eventualmente, trazer para os consumidores. Os restantes PPCPs não têm ainda qualquer regulamentação até à data.

1.2.2 Disruptores Endócrinos

Os disruptores endócrinos são compostos químicos que interagem com o sistema endócrino e conseguem mimetizar ou bloquear a ação de hormonas, interferindo na sua síntese, segregação, ligação e transporte, pelo que a sua presença nos ecossistemas marinhos poderá traduzir-se em diversos efeitos adversos nos organismos e, conseqüentemente, na saúde humana (Porte *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2006; Diano *et al.*, 2007; Burkhardt-Holm, 2010; Riva *et al.*, 2010; De Falco *et al.*, 2013).

Deste grupo de contaminantes fazem parte alguns pesticidas, produtos farmacêuticos e de uso pessoal (PPCPs), hormonas (naturais e sintéticas) e compostos fenólicos (bisfenóis, alquifenóis), que podem ser encontrados em vários produtos do quotidiano (plásticos, recipientes alimentares, tintas, detergentes e cosméticos; Porte *et al.*, 2006; Diano *et al.*, 2007; Jonkers *et al.*, 2009; Burkhardt-Holm, 2010; Li *et al.*, 2012).

A maioria destes compostos químicos e seus metabolitos são lipofílicos, persistentes, ubíquos e facilmente absorvidos por organismos, ou seja, têm um potencial elevado de bioacumulação e ainda de biomagnificação ao longo da cadeia trófica (Porte *et al.*, 2006; De Falco *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2013).

Os disruptores endócrinos mais estudados são o nonilfenol, um composto da família dos aquilfenóis produzido industrialmente, em particular, na síntese de detergentes polietoxilados, bastante resistente à biodegradação e o bisfenol A, um monómero (sintético) e plastificante muito utilizado mundialmente em produtos de consumo, como por exemplo, latas de alumínio utilizadas na indústria de produtos alimentares enlatados, equipamento médico, material dentário, componentes eletrónicos e elétricos, entre outros (Vandenberg *et al.*, 2007; Loffredo *et al.*, 2010; Riva *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; De Falco *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2013). O nonilfenol encontra-se na lista das 33 substâncias prioritárias da Diretiva 2008/105/EC, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água. Apesar de apenas ter sido banida a utilização de bisfenol A no fabrico de biberons para crianças, de acordo com esta mesma diretiva da Comissão Europeia, este composto encontra-se, neste momento, descrito como contaminante prioritário, isto é, estudos recentes indicam que a sua relevância e perigosidade a nível toxicológico e epidemiológico deverá ser revista (EFSA, 2014b; CE, 2008). Tal como os PPCPs, alguns destes compostos “pseudo-

persistentes” encontram-se em efluentes de ETARs, provenientes de águas residuais domésticas devido a excreções destes compostos pelos humanos (como estrogénios naturais e sintéticos) e até mesmo através de escoamento de águas residuais provenientes das atividades agrícolas, pois estes compostos encontram-se usualmente em pesticidas (Burkhardt-Holm, 2010; Kummerer, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Gros *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2013). Assim, os disruptores endócrinos presentes nos ecossistemas aquáticos, mesmo que se encontrem no ambiente em baixas concentrações, terão efeitos adversos nos organismos que neles habitam (Snyder *et al.*, 2006; Jonkers *et al.*, 2009; Al-Odaini *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2012), interferindo com a sua reprodução e desenvolvimento, uma vez que poderão provocar a alteração dos géneros, induzir a síntese da vitelogenina, alterar os padrões de acasalamento, promover intersexualismo e esterilização das fêmeas, afetando por sua vez a sobrevivência da população (Valcárcel *et al.*, 2011; Huerta *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2013; Giusti & Joaquim-Justo 2013; Liu & Wong, 2013).

No ser humano estes compostos podem causar diversos tipos de cancro (da mama, próstata, testicular, útero e ovários), deficiências congénitas, redução da fertilidade, abortos espontâneos, puberdade precoce, entre outros (Vandenberg *et al.*, 2007; McKinglay *et al.*, 2008; Burkhardt-Holm, 2010).

1.2.3 Microplásticos

Os plásticos são polímeros sintéticos que podem ser obtidos a partir do petróleo ou gás natural (Cole *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2013; Ivar do Sul & Costa, 2014). Estes polímeros são diversos, dependendo da sua estrutura e densidade, sendo os mais utilizados mundialmente, o polipropileno (PP), polietileno (PE), politereftalato de etileno (PET), poliestireno (PS) e policloreto de vinil (PVC; Andrady, 2011; Wright *et al.*, 2013; Ivar do Sul & Costa, 2014). Os plásticos são empregues em diversas indústrias como as de embalagem, construção civil, automóvel, eletrónica e elétrica, entre outras (Plastic Europe, 2013). Apenas no ano de 2012 foram produzidos 288 milhões de toneladas de plásticos mundialmente, isto é, cerca de 170 vezes mais do que em 1950 (Plastics Europe, 2013).

Tal como referido no Capítulo 1.1 (Poluição), os plásticos foram idealizados para serem resistentes e duradouros de modo a serem aplicados eficazmente no quotidiano (Cole *et al.*, 2011; Ivar do Sul *et al.*, 2013). São estas características que fazem dos plásticos um problema ambiental, contaminando o ambiente marinho, quer por via terrestre quer por via aquática (Frias *et al.*, 2010; Andrady, 2011; Cole *et al.*, 2011).

Os microplásticos são pedaços de plásticos com dimensões menores que 5mm, que são obtidos através da degradação de plásticos de maiores dimensões, ou até mesmo fabricados com este tamanho (Frias *et al.*, 2010; Andrady, 2011; Ivar do Sul & Costa, 2014).

Estes são divididos em microplásticos primários e secundários. Os microplásticos primários são plásticos fabricados com tamanhos diminutos ($\leq 5\text{mm}$), vulgarmente utilizados em cosméticos como exfoliantes, ou em equipamentos de decapagem abrasiva. Os microplásticos secundários são originados a partir de plásticos de dimensões maiores que foram fragmentados através de degradação biológica, física e/ou química, processo que poderá ainda resultar na libertação de aditivos plásticos, como bisfenol A e nonilfenol, no ecossistema (Andrady, 2011; Cole *et al.*, 2011).

A principal forma de degradação dos plásticos é a via termo-oxidativa, ou seja, através da exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV-B) do sol, pois esta promove a oxidação dos polímeros constituintes do plástico (Andrady, 2011; Cole *et al.*, 2011; Vianello *et al.*, 2013; Ivar do Sul & Costa, 2014). A degradação destes polímeros pode ser também influenciada por biodegradação, fotodegradação e hidrólise, embora esta última não seja muito eficaz na água do mar (Andrady, 2011; Claessens *et al.*, 2013b).

De acordo com a sua densidade, os plásticos podem flutuar, afundar ou derivarem a meio da coluna de água (flutuabilidade neutra; Cole *et al.*, 2011; Claessens *et al.*, 2013b; Ivar do Sul & Costa, 2014).

No que respeita aos plásticos flutuantes, estes poderão ser transportados até às zonas costeiras ou, simplesmente, afundar, devido à formação de biofilmes microbianos criados à superfície destes (Cole *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2013; Ivar do Sul & Costa, 2014).

Existem grandes concentrações de plásticos de baixa densidade nos ambientes aquáticos, principalmente no giro do Pacífico Norte e Atlântico Norte (Figura 2). Apesar de serem considerados poluentes ubíquos e, por isso, estarem amplamente presentes, o giro do Pacífico Norte é comumente designado de “Grande depósito de lixo do Pacífico” uma vez que nele se encontra uma quantidade exorbitante de plásticos (cerca de quinze vezes o tamanho de Portugal; Andrady, 2011; Wright *et al.*, 2013; NOAA, 2014).

Para além da possível ingestão, os microplásticos poderão também ter efeitos adversos nos organismos marinhos, devido à possível libertação de aditivos como bisfenol A e contaminantes orgânicos hidrofóbicos e persistentes que se aderem aos microplásticos. Estes compostos são passíveis de ser bioacumulados e biomagnificados ao longo da cadeia trófica (Frias *et al.*, 2010; Andrady, 2011; Cole *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2013; Farrel & Nelson, 2013; Koelmans *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013; Setala *et al.*, 2014).



Figura 2 – Giros oceânicos e “o grande depósito de lixo” do Giro do Pacífico Norte (adaptado de: <http://www.guiageo-mapas.com/>).

Considerando que este grupo de contaminantes só recentemente começou a ser alvo de estudos, neste momento ainda existem diversas lacunas em relação ao seu impacto ambiental, ecológico e de exposição humana. Deste modo, os plásticos e microplásticos presentes no ambiente marinho encontram-se atualmente no topo da lista de contaminantes considerados emergentes e prioritários pela União Europeia, merecendo ser urgentemente alvo de investigação científica.

1.2.4 Retardantes de Chama Bromados

Retardantes de chama bromados (brominated flame retardants ou BFRs) são compostos “organobromados” cujo objetivo é reduzir e retardar a ignição e propagação de chamas, de modo a proteger os materiais de possíveis incêndios, sendo incorporados durante a produção de vários materiais para que estes sejam resistentes ao fogo (D’ Silva *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010; Poma *et al.*, 2014).

Os BFRs são comumente utilizados em materiais domésticos (mobiliário, têxteis, plásticos), eletrônicos e elétricos (computadores, televisões, placas de circuito impresso; D’ Silva *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014; Poma *et al.*, 2014).

Dos BFRs fazem parte compostos que se incluem em diferentes categorias de acordo com as suas características químicas, entre os quais se destacam os éteres difenilo polibromados (PDBE), polibromobifenilo (PBB), tetrabromobisfenol A (TBBPA) e

hexabromociclododecano (HBCD; D' Silva *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010; Covaci *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Venkatesan & Halden, 2014).

Os BFRs encontram-se em diversos compartimentos ambientais (ar, solo, vegetação, água e sedimento) e acumulam-se em diversos animais, como os moluscos, peixes (ex. perca, salmão), aves, mamíferos marinhos (ex. focas, morsas, golfinhos, baleias, lontras, ursos polares; D' Silva *et al.*, 2004; Ronisz *et al.*, 2004; Wit *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Law *et al.*, 2014). Alguns destes contaminantes (PBDEs, PBBs e os HBCDs) são persistentes e lipofílicos, acumulando-se essencialmente nos sedimentos e nos tecidos gordos dos animais, particularmente, nos que pertencem a níveis tróficos mais elevados e inclusive nos humanos (D' Silva *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2010; Devanathan *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Poma *et al.*, 2014; Venkatesan & Halden, 2014).

Alguns estudos indicam que os valores de concentração de BFRs são mais elevados em crianças do que em adultos, o que poderá estar relacionado com a amamentação (i.e. leite materno contaminado), ingestão de poeiras devido a comportamentos típicos da infância como levar as mãos à boca, bem como uma menor capacidade de eliminação de contaminantes (D' Silva *et al.*, 2004; Pulkrabová *et al.*, 2009; Devanathan *et al.*, 2012; Berger *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). Foram já encontrados diversos BFRs em amostras de sangue humano, tecido adiposo, cabelo, leite materno (entre outros; Sjodin *et al.*, 2003; D' Silva *et al.*, 2004; Devanathan *et al.*, 2012; Berger *et al.*, 2014; Law *et al.*, 2014).

Alguns efeitos adversos na saúde humana decorrentes da exposição a BFRs são o cancro (no sistema digestivo e linfático), alterações nas funções da tiroide, efeitos no sistema reprodutivo (feminino e masculino), diabetes e problemas no sistema nervoso central (Williams *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Stapleton *et al.*, 2014).

Considerando a sua toxicidade, bioacumulação e persistência, a utilização de alguns BFRs, (ex. penta-, octa- e deca-BDEs) foi banida da União Europeia (CE, 2002). Assim, surgiu a necessidade de desenvolver e substituir estes BFRs por outros compostos denominados BFRs “novos” ou emergentes (NBFR; Wit *et al.*, 2010; Covaci *et al.*, 2011; Poma *et al.*, 2014; Stieger *et al.*, 2014). Alguns exemplos destes “novos” BFRs são o decabromodifenil etano (DBDPE), hexabromociclododecano (HBCD) e pentabromotolueno (PBT), 1,2-bis (2,4,6-dibromofenoxi) etano (BTBPE; Covaci *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Houde *et al.*, 2014). Ainda que pouco se saiba sobre estes compostos emergentes, acredita-se que sejam também bioacumulados no ambiente e biomagnificados ao longo da cadeia trófica uma vez que possuem propriedades físico-químicas semelhantes às dos PBDEs (Wu *et al.*, 2012; Houde *et al.*, 2014). Alguns destes NBFRs já foram detetados no ar, sedimento, peixes, aves, mamíferos aquáticos e humanos. No entanto pouco se sabe sobre a sua ocorrência, distribuição e toxicidade, sendo portanto necessários mais estudos nesta área (Covaci *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Houde *et al.*, 2014; Poma *et al.*, 2014; Venkatesan & Halden, 2014).

1.2.5 Metais tóxicos

Os metais não essenciais ou tóxicos, como o Cd, Pb, Hg e As, são elementos que não possuem qualquer função benéfica ou vital nos organismos (Duffus, 2002). Os metais tóxicos são introduzidos no ambiente por fontes naturais ou antropogênicos, podendo tornar-se num problema ambiental. Embora a contaminação de ambientes aquáticos se deva, em grande parte, a atividades antropogênicas (efluentes industriais e urbanos, agricultura, mineração, processos metalúrgicos, etc.), atividades naturais como o vulcanismo e transferência a partir do solo onde se encontram naturalmente, também contribuem para esta contaminação (Zouboulis *et al.*, 2004; Patel & Reynolds, 2013; Duarte *et al.*, 2014). A poluição através destes contaminantes apresenta várias preocupações a nível ambiental e de saúde humana, pois alguns podem ser bioacumulados e biomagnificados (Zouboulis *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2013).

Atendendo aos teores que podem ser encontrados, bem como à sua toxicidade, na legislação atual estão regulamentados teores máximos para os seguintes elementos tóxicos comumente presentes em espécies de pescado: Pb, Cd e mercúrio total (Hg total), tal como apresenta a Tabela 2.

Tabela 2 – Teores máximos de três metais tóxicos presentes em diferentes géneros alimentícios (CE, 2006a).

Géneros alimentícios	Teores máximos (mg kg⁻¹ de peso fresco)
Chumbo	
Parte edível do peixe	0,3
Crustáceos	0,5
Moluscos bivalves	1,5
Cefalópodes	1,0
Cádmio	
Parte edível do peixe	Entre 0,05 e 0,30
Crustáceos	0,5
Moluscos bivalves	1,0
Cefalópodes	1,0
Mercúrio	
Produtos de pesca e parte edível do peixe	Entre 0,5 e 1,0

Apesar de diversos autores indicarem que o Hg presente no pescado se encontra predominantemente sob a forma orgânica (i.e. metilmercúrio, MeHg; Lawson *et al.*, 2000; Verger *et al.*, 2007; Kehrig *et al.*, 2010), a legislação vigente ainda não regula a sua presença, não existindo assim, limites legais para o MeHg em matrizes alimentares. No entanto, a Comissão Europeia reconhece a necessidade de rever as atuais diretrizes e adquirir maior conhecimento no que respeita à presença e toxicidade deste elemento (CE, 2006a). Neste contexto, a European Food Safety Agency (EFSA), emitiu um parecer estabelecendo como limite tolerável de ingestão semanal de MeHg o valor de $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal e definindo este contaminante como prioritário dada a falta de regulamentação e estudos toxicológicos (EFSA, 2012). De modo semelhante, a informação acerca da toxicidade e ocorrência em produtos alimentares de As na forma mais tóxica (i.e. inorgânica; iAs) é ainda bastante escassa, pelo que também é considerado um contaminante prioritário.

No ambiente aquático o MeHg é formado a partir da metilação do mercúrio inorgânico, principalmente, através da atividade de bactérias sulfito-redutoras que se encontram na superfície dos sedimentos (Ceccatelli *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Patel & Reynolds, 2013; Zhu *et al.*, 2013;). Esta metilação pode ser facilitada por diversos fatores ambientais e químicos, como temperaturas elevadas, pH baixo, matéria orgânica e quantidades reduzidas de oxigénio (Kim *et al.*, 2008; Pizarro-Barraza *et al.*, 2014).

O MeHg é a forma orgânica química de Hg mais bioacumulável e a única que se biomagnifica ao longo da cadeia trófica (Kim *et al.*, 2008; Ceccatelli *et al.*, 2010; Kehrig *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Spada *et al.*, 2012).

Durante o processo digestivo, cerca de 95% do MeHg ingerido fica disponível para absorção no epitélio intestinal (i.e. bioacessível; Liu *et al.*, 2008), sendo distribuído para os diversos tecidos de todo o corpo, i.e. cerca de 10% migra para o cérebro e cerca de 5% permanece na circulação sanguínea. Em oposição, a absorção de Hg inorgânico é, comparativamente, mais baixa (<15 %, Liu *et al.*, 2008).

Dado que o MeHg é biomagnificável, os organismos onde as concentrações tendem a ser mais elevadas são os que ocupam níveis tróficos mais elevados, predadores, de maiores dimensões e com um ciclo de vida mais longo, como o atum, tubarão, espadarte, cherne, robalo, peixe-espada (Verger *et al.*, 2007; Ceccatelli *et al.*, 2010; Carrasco *et al.*, 2011).

A principal fonte de exposição do ser humano ao MeHg é através do consumo de pescado, o que poderá constituir um potencial risco do ponto de vista da saúde pública, sobretudo em populações onde o consumo *per capita* de pescado é bastante elevado, como é o caso de Portugal (Kim *et al.*, 2008; Ceccatelli *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; Carrasco & Vassileva, 2014; FAO, 2014a).

O MeHg é um composto neurotóxico podendo apresentar efeitos adversos no sistema nervoso central, quer em animais quer no ser humano, particularmente durante os primeiros

anos de vida e desenvolvimento (Ceccatelli *et al.*, 2010; Spada *et al.*, 2012; Patel & Reynolds, 2013; Zhu *et al.*, 2013).

A maioria do conhecimento sobre os sintomas do MeHg deve-se aos surtos ocorridos nos anos 50 e 60 em Minamata e Niigata, Japão e no início dos anos 70 no Iraque (Ceccatelli *et al.*, 2010). No Japão, os surtos resultaram do consumo de peixe contaminado, devido ao lançamento de águas residuais que continham Hg, enquanto no Iraque deveu-se ao consumo de pão cujo trigo tinha sido tratado com fungicida que continha Hg (Castoldi *et al.*, 2001). Através destes surtos foi possível estudar os efeitos adversos provocados por este contaminante. Os pacientes (adultos) apresentavam distúrbios sensoriais, ataxia (dificuldade na coordenação de movimentos), surdez, deficiência na fala, tremores, movimento ocular anormal, transtornos mentais e distúrbios no paladar e olfato (Ceccatelli *et al.*, 2010). Este composto neurotóxico e lipofílico, consegue ainda atravessar as membranas, como as membranas hematoencefálica e placentária (Ceccatelli *et al.*, 2010; Patel & Reynolds, 2013).

Relativamente ao iAs, as duas espécies predominantemente presentes nos solos e cursos de água são o arsenato [As(V)] e o arsenito [As(III)]. A toxicidade do As(III) é cerca de 20 vezes maior que a do As(V), embora ambos sejam considerados carcinogénicos (Yamamura & Amachi, 2014; Sarmiento *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012, Asadollahzadeh *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2012). Segundo um estudo realizado por Muñoz *et al.* (2000), as espécies de peixe que contêm mais iAs são espécies com um teor de gordura superior a 1%, como a sardinha e carapau. Em ambientes aeróbios e biologicamente produtivos, o As(V) é geralmente o mais abundante no meio marinho, enquanto em ambientes anaeróbios e de baixa salinidade o As(III) é o mais abundante (Zhang *et al.*, 2011; Yamamura & Amachi, 2014). Contudo, a informação existente é ainda escassa no que respeita às vias e taxas de bioacumulação deste contaminante nos organismos, bem como, ao processo de biomagnificação ao longo da cadeia trófica (Zhang *et al.*, 2011).

Estudos epidemiológicos demonstram que a exposição crónica ao iAs, quando ingerido, pode levar a efeitos adversos como cancro ou tumores na pele, bexiga, fígado e pulmões e problemas dermatológicos (ex. úlceras, hiperpigmentação; EPA, 2007a; Ruttens *et al.*, 2012; Yamamura & Amachi, 2014).

1.3 Alterações Climáticas

Desde o início da Revolução Industrial, que os níveis de CO₂ na atmosfera aumentaram cerca de 40%, levando às atuais alterações climáticas (Vitousek *et al.*, 1997; Nye, 2010; FAO, 2008). A partir de amostras de gelo recolhidas na Antártica e Gronelândia foi possível determinar a quantidade de CO₂ que esteve presente na atmosfera no passado, tendo-se concluído que os valores de CO₂ têm vindo a aumentar desde a era pré-industrial

(IPCC, 2007). Segundo o Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), por volta do ano 1750, a concentração de CO₂ atmosférico era, aproximadamente 280 ppm, ao passo que em 2005 este valor aumentou para 379 ppm, ou seja, ocorreu um aumento de 35% em cerca de 250 anos.

De acordo com o Earth Systems Research Laboratory/National Oceanic and Atmospheric Administration (2013) os valores de CO₂ atmosférico em dezembro de 2013 eram de 396 ppm. Mais preocupantes são as estimativas de que no final deste século os valores da concentração de CO₂ atmosférico serão entre os 730 e 1020 ppm (IPCC, 2007).

Nos ecossistemas marinhos, sobretudo nos estuários e as zonas costeiras, são esperadas diversas alterações físico-químicas, como por exemplo, acidificação da água do mar, aumento da temperatura e nível do mar, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (O₂) e maior frequência na ocorrência de chuvas e ventos de grande intensidade (FAO, 2009; Marques *et al.*, 2010; Hernroth *et al.*, 2011; Matozzo & Marin, 2011; Doney *et al.*, 2012). Prevê-se que estas alterações climáticas continuem a aumentar durante muitos anos devido ao CO₂ já acumulado na atmosfera e ao que é continuamente produzido (IPCC, 2007; Marques *et al.*, 2010). Estas alterações climáticas terão, naturalmente, impacto sobre os organismos marinhos, (Matozzo & Marin, 2011; Talmage & Gobler, 2011; Matoo *et al.*, 2013), podendo afetar o seu crescimento, reprodução, respiração, metabolismo e, em geral, a biodiversidade. (Marques *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2012b; Noone *et al.*, 2013).

1.3.1 Acidificação dos oceanos

O carbono é um elemento essencial à vida e encontra-se presente em todos os organismos vivos. Este elemento está em permanente transferência entre a atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera, circulando e sendo reciclado num processo denominado ciclo biogeoquímico do carbono (Philander, 2008; Dawson & Spannagel, 2009; Levin, 2013).

Como se pode observar na Figura 3, o ciclo do carbono, na sua totalidade, influencia o clima do planeta, uma vez que a quantidade de carbono que se encontra na atmosfera na forma de CO₂ é regulada através deste processo (Philander, 2008).

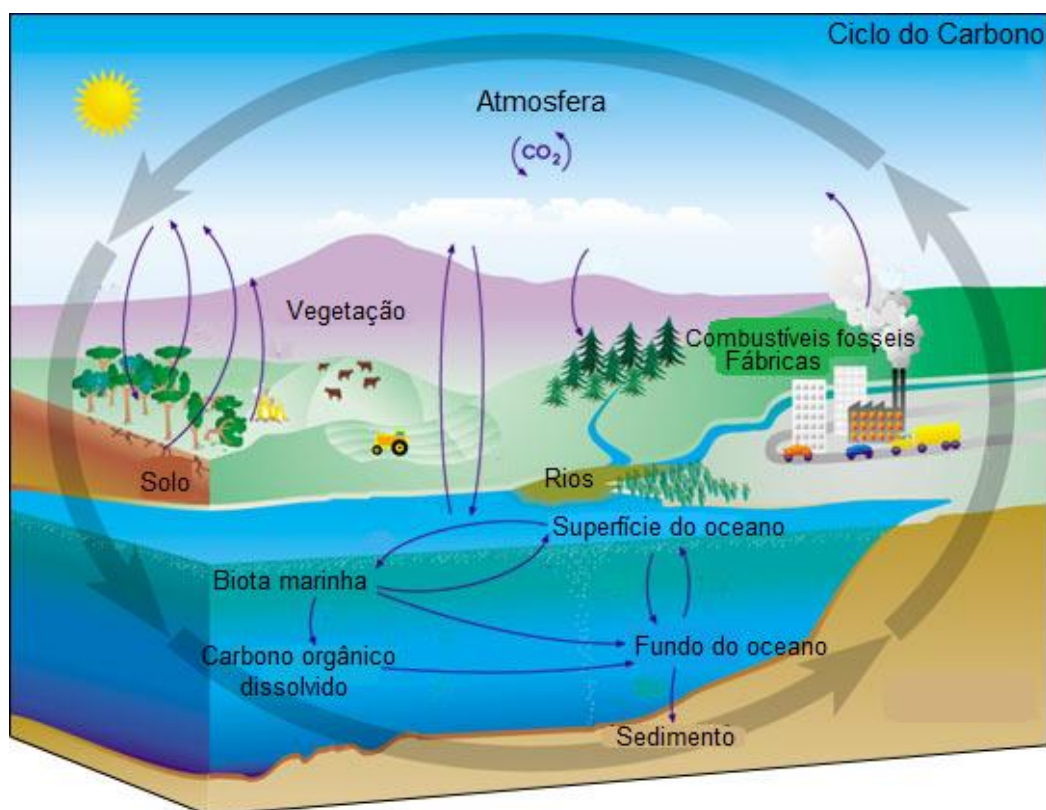


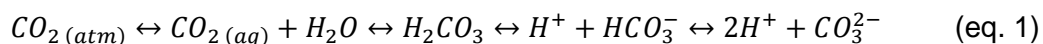
Figura 3 – Ciclo do carbono (Adaptado de: <http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/>).

Este ciclo tem sido continuamente perturbado devido ao aumento de CO₂ proveniente de atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis e a desflorestação contínua, bem como de fontes naturais, erupções vulcânicas e incêndios florestais (Steele *et al.*, 2001; Philander, 2008; Dawson & Spannagel, 2009; Levin, 2013).

Existem vários reservatórios de carbono, ou seja, sistemas que retêm carbono, tais como os oceanos, árvores e plantas (Steele *et al.*, 2001; Philander, 2008; Dawson & Spannagel, 2009; Levin, 2013). As árvores atuam como um reservatório natural de carbono, pelo que a desflorestação impede a retenção de CO₂, fazendo com que mais CO₂ permaneça na atmosfera e, conseqüentemente, mais CO₂ seja absorvido pelos oceanos (Philander, 2008). Deste modo, os oceanos constituem também um reservatório natural de carbono, assumindo um papel vital na regulação do ciclo do carbono e, naturalmente, do clima, estimando-se que a sua capacidade de armazenamento seja superior a 90% do carbono presente no seu ciclo (Philander, 2008; Dawson & Spannagel, 2009). O carbono absorvido pelos oceanos é utilizado, em parte, pelos organismos aquáticos calcificadores que, em conjunto com o cálcio formam as conchas ou exosqueletos calcários (Bibby *et al.*, 2008; Rosa & Seibel, 2008; Talmage & Gobler, 2010; Range *et al.*, 2011; Talmage & Gobler, 2011; Matoo *et al.*, 2013).

A acidificação dos oceanos devido ao aumento de CO₂ atmosférico e conseqüente transferência para a superfície da água dos oceanos é uma das conseqüências dramáticas

das alterações climáticas a que se irá assistir. O CO₂ atmosférico ao entrar em contacto com a superfície da água difunde-se passivamente, transformando-se em CO₂ aquoso dissolvido (Spicer *et al.*, 2007; Doney *et al.*, 2009; Matoo *et al.*, 2013). De acordo com a Equação química 1, uma vez em equilíbrio, o CO₂ dissolvido reage com H₂O formando ácido carbónico (H₂CO₃).



Este ácido fraco dissocia-se em iões bicarbonato (HCO₃⁻) e iões carbonato (CO₃²⁻), consoante a perda de um ou dois iões hidrogénio (H⁺), respetivamente. Com a transferência contínua de CO₂ atmosférico para a superfície dos oceanos, a concentração de CO₂ dissolvido, iões H⁺ e HCO₃⁻ irá aumentar. Dado que o valor de pH corresponde a $-\log_{10} H^+$. O aumento da concentração de iões H⁺ traduz-se, conseqüentemente, na diminuição do pH dos oceanos, ou seja, na acidificação.

Em suma, dadas as alterações dos equilíbrios químicos, o pH dos oceanos terá tendência a diminuir com o aumento das emissões de CO₂ resultantes de várias atividades antropogénicas, tornando-se cada vez mais ácido (CNFCG, 1994; Rosa & Seibel, 2008; Widdicombe & Spicer, 2008; Doney *et al.*, 2009). Com este aumento contínuo dos iões H⁺, a concentração de CO₃²⁻ tende a diminuir, levando portanto à formação de HCO₃⁻ (CNFCG, 1994; Rosa & Seibel, 2008; Widdicombe & Spicer, 2008; Doney *et al.*, 2009).

O carbono inorgânico dissolvido (CID) encontra-se em equilíbrio termodinâmico nos oceanos, sob as formas de: CO₂ aquoso (~1%), iões HCO₃⁻ (~90%) e iões CO₃²⁻ (9%), para um pH de aproximadamente 8,1 (CNFCG, 1994; Doney *et al.*, 2009). Os iões HCO₃⁻ são assim o CID mais abundante nos oceanos, existindo portanto uma disponibilidade de iões CO₃²⁻ relativamente baixa. O aumento da concentração de iões H⁺ proporcionará a diminuição da concentração dos iões CO₃²⁻ o que constituirá um problema ecológico afetando os organismos marinhos que dependem destes iões para a formação das suas conchas ou exosqueletos calcários, como por exemplo algumas espécies de plâncton, moluscos bivalves, crustáceos e corais (Bibby *et al.*, 2008; Rosa & Seibel, 2008; Talmage & Gobler, 2010; Range *et al.*, 2011; Talmage & Gobler, 2011; Matoo *et al.*, 2013).

De acordo com alguns autores (Caldeira & Wickett, 2005; IPCC, 2007; Noone *et al.*, 2013) cerca de 50% do CO₂ antropogénico produzido desde a Revolução Industrial e cerca de 30% do CO₂ produzido desde 1994, já se encontra armazenado na superfície da água dos oceanos (Rosa & Seibel, 2008). Este CO₂ já diminuiu o pH das águas em 0,1 unidades. Se as emissões de CO₂ continuarem, o pH dos oceanos irá igualmente diminuir.

O IPCC prevê que o pH dos oceanos irá diminuir em 0,4 unidades até ao final de 2100.

1.3.2 Temperatura

Com o aquecimento global, para além da temperatura atmosférica, também a temperatura dos oceanos irá aumentar. Dado o aumento da temperatura da superfície do oceano devido às alterações climáticas, a capacidade de retenção de CO₂ tenderá a diminuir, uma vez que a solubilidade do CO₂ diminui com o aumento da temperatura da água (Dawson & Spannagel, 2009). O IPCC propôs diversos modelos para as alterações climáticas previstas para próximos 100 anos, sendo algumas projeções mais drásticas que outras (Tabela 3).

Tabela 3 – Variação média estimada (ΔT) e melhor estimativa para o aumento da temperatura da superfície da água dos oceanos esperado até ao final do século XXI (probabilidade de ocorrência > 66%; IPCC, 2007).

Caso	Melhor estimativa (°C)	ΔT (°C)
Valores das concentrações do ano 2000	0,6	0,3 – 0,9
Cenário B1	1,8	1,1 – 2,9
Cenário A1T	2,4	1,4 – 3,8
Cenário B2	2,4	1,4 – 3,8
Cenário A1B	2,8	1,7 – 4,4
Cenário A2	3,4	2,0 – 5,4
Cenário A1FI	4,0	2,4 – 6,4

Legenda:

A1 – Cenário caracterizado por, crescimento económico rápido; população global atinge os 9 mil milhões em 2050 decrescendo de seguida; aquisição de tecnologias novas e eficientes

A1B – Balanço entre todas as fontes de energia

A1FI – Uso intensivo de combustíveis fósseis

A1T – Uso de combustíveis provenientes de energia não-fósseis

A2 – Cenário caracterizado por, nações autossuficientes; população continuamente crescente; desenvolvimento económico orientado para o local

B1 – Cenário caracterizado por um mundo mais amigo do ambiente; aumento da população que atinge 9 mil milhões em 2050 decrescendo de seguida; introdução de tecnologias limpas e de recursos eficientes; estabilidade económica, social e ambiental

B2 – Cenário caracterizado pelo crescimento da população; ênfase na solução local da estabilidade a nível económico, social e ambiental; um aumento na tecnologia mas não tão acentuado como nos cenários A1 e B1; o desenvolvimento económico encontra-se num nível intermédio

O aumento da temperatura terá consequências físicas (alterações das condições meteorológicas, clima e até na intensidade dos furacões e ciclones tropicais) e biológicas (ex.

alteração do taxas respiratórias/metabolismo dos organismos e, conseqüentemente, do teor de oxigénio dissolvido no ambiente aquático; Noone *et al.*, 2013), tendo um impacto negativo no crescimento, reprodução, interação entre espécies e condições fisiológicas das espécies marinhas (Noone *et al.*, 2013). Espécies marinhas calcificadoras (ex. corais, bivalves e plâncton) serão particularmente afetadas, o que poderá resultar em decréscimos ou extinção das populações e espécies (Noone *et al.*, 2013).

1.3.3 Hipoxia

A hipoxia (ou “dead zone”) ocorre em determinadas áreas/zonas de rios, estuários, zonas costeiras, mares, lagos e oceanos, onde os níveis de oxigénio dissolvido (O_2) são menores que 2 mg L^{-1} ($\approx 61 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$), constituindo assim uma ameaça à sobrevivência de organismos marinhos (Diaz & Rosenberg, 2008; Hofmann *et al.*, 2011; Bendtsen & Hansen, 2013; Gogina *et al.*, 2014).

A hipoxia é um processo que ocorre naturalmente em diversos ecossistemas aquáticos, devido a oscilações de O_2 dissolvido. No entanto, as atividades antropogénicas promovem um aumento na frequência dos períodos de hipoxia nestas zonas (Rabouille *et al.*, 2008; Aboagye & Allen, 2014; NOAA, 2014).

Deste modo, a hipoxia será igualmente uma consequência das alterações climáticas, uma vez que o aumento da temperatura influenciará o metabolismo dos organismos marinhos e promoverá as suas taxas de respiração (Aboagye & Allen, 2014). Antes de 1960 registavam-se, mundialmente, cerca de 40 zonas de hipoxia, relacionadas com eutrofização, mas esse número aumentou de forma significativa, tendo-se reportado 640 zonas de hipoxia nos finais de 2010 (Diaz & Rosenberg, 2008; Noone *et al.*, 2013). Segundo Diaz & Rosenberg (2008), em 2008 existiam três zonas de hipoxia em Portugal, sendo estas o Rio Mondego, a Ria de Aveiro e a Ria Formosa.

As atividades antropogénicas, como a agricultura, utilização de combustíveis fósseis, atividade industrial, descargas de águas residuais, contribuem para o aumento dos nutrientes nos ecossistemas marinhos, como o azoto e fósforo sendo as principais causas da eutrofização de rios, estuários, mares e zonas costeiras (Noone *et al.*, 2013; NOAA, 2014).

A eutrofização implica um excesso de matéria orgânica disponível na água que, conseqüentemente, promove o crescimento excessivo de algas, conhecido como *bloom* de algas e vegetação. A matéria orgânica por sua vez afunda-se e é decomposta por microrganismos aeróbios (consumidores de O_2), contribuindo igualmente para a diminuição nos níveis de O_2 na água (Diaz & Rosenberg, 2008; Bendtsen & Hansen, 2013; Noone *et al.*, 2013; NOAA, 2014). Por outro lado, o excesso de nutrientes torna a água mais turva,

dificultando a penetração da luz solar e, conseqüentemente, afetando a fotossíntese (Bendtsen & Hansen, 2013; Noone *et al.*, 2013; NOAA, 2014).

A carência de O₂ tem diversas conseqüências para a fauna e flora marinhas, afetando de um modo geral, a condição fisiológica dos organismos, bem como a sua reprodução, crescimento, resposta imunitária e taxas respiratórias. Na fauna marinha móvel a migração forçada é uma das conseqüências, levando assim a mudanças de habitat e conseqüentemente alterações nos padrões de reprodução e alimentação ou até mesmo na ausência destes. A fauna imóvel adotará comportamentos de sobrevivência, mas se as concentrações de O₂ dissolvido forem diminuindo ou se os períodos de hipoxia se tornarem mais longos com o decorrer do tempo, estes organismos acabarão por morrer (Bendtsen & Hansen, 2013; Aboagye & Allen, 2014).

1.3.4 Impactos das alterações climáticas na aquacultura

A aquacultura desempenha atualmente um papel de extrema relevância na alimentação mundial, contribuindo largamente para a produção global de pescado (FAO, 2014b). No entanto, prevê-se que esta atividade seja bastante afetada pelas alterações climáticas, sobretudo nos cultivos extensivos. Com o aumento da temperatura da água irá ocorrer um aumento no metabolismo, taxas de crescimento e, conseqüentemente na produção global (Rosa *et al.*, 2012a). Devido a estas temperaturas as taxas de evaporação irão também aumentar, levando assim a um aumento na salinidade da água, com implicações na fisiologia das espécies menos tolerantes a variações deste parâmetro (Rosa *et al.*, 2012a). O previsível aumento do nível da água, juntamente com o aumento da salinidade, vai alterar a qualidade das águas, afetando a produção de pescado tanto em águas doces como em águas salobras (Rosa *et al.*, 2012a). Outra conseqüência das alterações climáticas para a aquacultura é o aumento da eutrofização que levará a uma diminuição dos teores de oxigénio, bem como, à ocorrência de *blooms* de algas com impacto negativo na aquacultura (Rosa *et al.*, 2012a). Paralelamente, o aumento das temperaturas da água poderá favorecer o aumento da frequência de ocorrência de organismos patogénicos (ex, parasitas, bactérias e vírus) e biotoxinas marinhas, tornando-se assim uma ameaça para a produção sustentável em aquacultura, onde as densidades populacionais são, por norma, bastante elevadas (Rosa *et al.*, 2012a). Isto poderá acarretar igualmente problemas para a saúde humana, pois existe um risco acrescido para a ingestão de alimentos contaminados, levando assim a uma maior frequência e intensidade das intoxicações alimentares transmitidas pelo pescado ou pela água contaminada (Rosa *et al.*, 2012a). Face às conseqüências previstas, a adaptação e otimização da aquacultura a um ambiente caracterizado por alterações climáticas constituirá brevemente um dos grandes desafios da investigação.

1.4 Modelo biológico: Robalo (*Dicentrarchus labrax*)

O robalo (*Dicentrarchus labrax*) é encontrado ao longo da costa Atlântica Europeia, desde o sul da Noruega até ao Senegal, incluindo estuários e lagoas, mares Mediterrâneo e Negro, tendo também sido introduzido em Israel, Omã e Emirados Árabes Unidos (Ferreira *et al.*, 2010; Schnitzler *et al.*, 2011).

O robalo é uma espécie com corpo alongado, contendo duas barbatanas dorsais separadas, uma espinhosa apresentando 8 ou 9 espinhos e outra com uma espinha e 12 ou 13 raios moles, uma barbatana anal com 3 espinhos e 10 a 12 raios moles com um longo pedúnculo caudal e uma barbatana caudal moderadamente bifurcada (Figura 4; FAO, 2014c; FAO, 2014d). Apresenta uma cabeça relativamente pontiaguda, onde a maxila inferior é mais proeminente que a superior. Possui o opérculo com espinhos lisos e o pré-opérculo com grandes espinhas direcionadas para a boca (FAO, 2014c).



Figura 4 – Robalo adulto (retirado de www.fishbase.com).

A pele apresenta uma tonalidade cinzenta escura (por vezes, azulada) no dorso, tornando-se mais prateada lateralmente, esbranquiçada no abdómen e, por vezes, amarelada ou branca no ventre. Os juvenis exibem manchas escuras no dorso, uma mancha negra na extremidade do opérculo e medem, geralmente, 20 a 50 cm, podendo atingir 1 metro de comprimento no estado adulto. Em média, o ciclo de vida do robalo é de 25 anos, podendo atingir os 30 (Fish Base, 2014; EOL, 2014).

Os machos atingem a maturidade sexual entre os 2 e 4 anos de idade (~35 cm de comprimento) e as fêmeas entre os 5 e 8 anos (~42 cm de comprimento; EOL, 2014).

Trata-se de uma espécie demersal, ou seja, que habita zonas costeiras até aos 100 metros de profundidade, tolerando grandes flutuações de salinidade (3‰ até 35‰) e temperatura (5° a 28 °C), isto é considera-se uma espécie eurialina e euritérmica (EOL, 2014; FAO, 2014c; FAO, 2014d; FAO, 2014e; Fish Base, 2014). Nas fases juvenis vive em cardumes, enquanto em adulto apresenta um comportamento solitário (EOL, 2014).

Esta espécie é predadora durante a fase juvenil, alimentando-se maioritariamente de invertebrados, passando a ingerir pequenos peixes à medida que vai crescendo. Na fase adulta, a sua alimentação inclui essencialmente peixes, cefalópodes, crustáceos e moluscos bivalves (Schnitzler *et al.*, 2011; Fish Base, 2014). Dado o seu comportamento alimentar, esta espécie é passível de biomagnificar contaminantes mesmo quando se encontram em baixas concentrações (Pastor *et al.*, 1996; Sarmiento *et al.*, 2004; Maria *et al.*, 2009). Assim, considerando as características e comportamento desta espécie, o robalo reúne os atributos necessários para ser um bom bioindicador de contaminação marinha, podendo fornecer informação relativa à presença de contaminantes nos ecossistemas marinhos em que habita (Maria *et al.*, 2009; Schnitzler *et al.*, 2011). No entanto, a acumulação de contaminantes dependerá também de diversos fatores, designadamente da idade/tamanho dos indivíduos, tipo de alimento disponível (e teores de contaminantes nele contidos) e variáveis físico-químicas da água (Abreu *et al.*, 2000).

O robalo é bastante apreciado pelos consumidores devido ao seu sabor suave, carne branca e baixo teor em gordura quando selvagem (Kyrana & Lougovois, 2002), apresentando assim um elevado valor comercial, tanto na pesca como na aquacultura (Alasalvar *et al.*, 2002). Apenas em Portugal, as capturas nominais em 2012 foram de 401 toneladas, enquanto a produção em aquacultura representou 460 toneladas (INE, 2013).

Dada a sua importância económica a nível mundial, a produção de robalos em aquacultura tem demonstrado um forte crescimento ao longo dos anos, tendo sido de 581 toneladas em 1985 e atingindo as 153182 toneladas em 2012 (Figura 5; Kyrana & Lougovois, 2002; FAO, 2014e). O robalo tornou-se assim (em conjunto com a dourada – *Sparus aurata*) uma das espécies mais produzidas em aquacultura e consumidas nos países mediterrânicos (Ferreira *et al.*, 2010; Greco *et al.*, 2010).

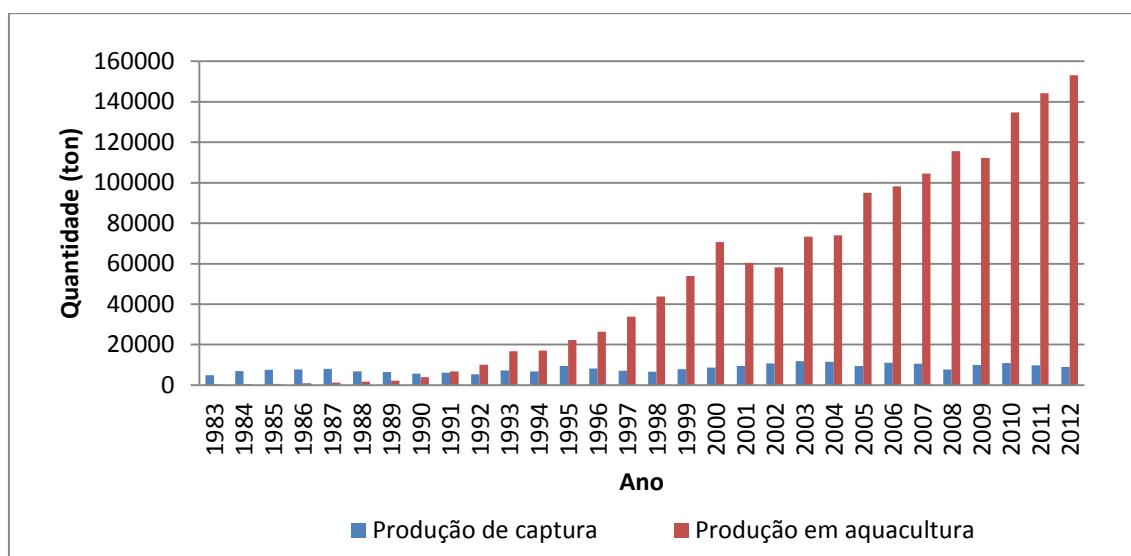


Figura 5 – Valores globais de captura vs produção em aquacultura (retirado de FAO, 2014e).

1.5 Objetivos

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do aquecimento da água na acumulação de MeHg no robalo e quais os potenciais riscos para a saúde humana. Para tal, foi avaliado o processo de bioacumulação e eliminação deste contaminante químico emergente em robalos juvenis (*Dicentrarchus labrax*) sujeitos ao aumento da temperatura da água do mar. O robalo foi escolhido como modelo biológico por se tratar de uma espécie com elevado interesse comercial e passível de acumular teores elevados de contaminantes por ocupar um nível trófico elevado.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental

O trabalho experimental da presente dissertação foi realizado no Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) em parceria com o Laboratório Marítimo da Guia, Centro de Oceanografia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (LMG).

2.1.1. Sistema de cultivo

Em colaboração com a empresa Fernando Ribeiro, Lda. (Lisboa), conceptualizou-se e construiu-se um sistema de cultivo de organismos marinhos que permitisse simular as alterações climáticas. Como ilustram as Figuras 6 e 7, trata-se de um sistema em circuito fechado (i.e. recirculação de água), composto por 12 aquários de vidro (cada um com cerca de 80 L de capacidade), cada um deles com controlo independente de temperatura e pH, refrigeração, filtração biológica, sistema de filtração UV, escumadores e carvão ativado.



Figura 6 – Sistema de cultivo para simulação das alterações climáticas em organismos marinhos.

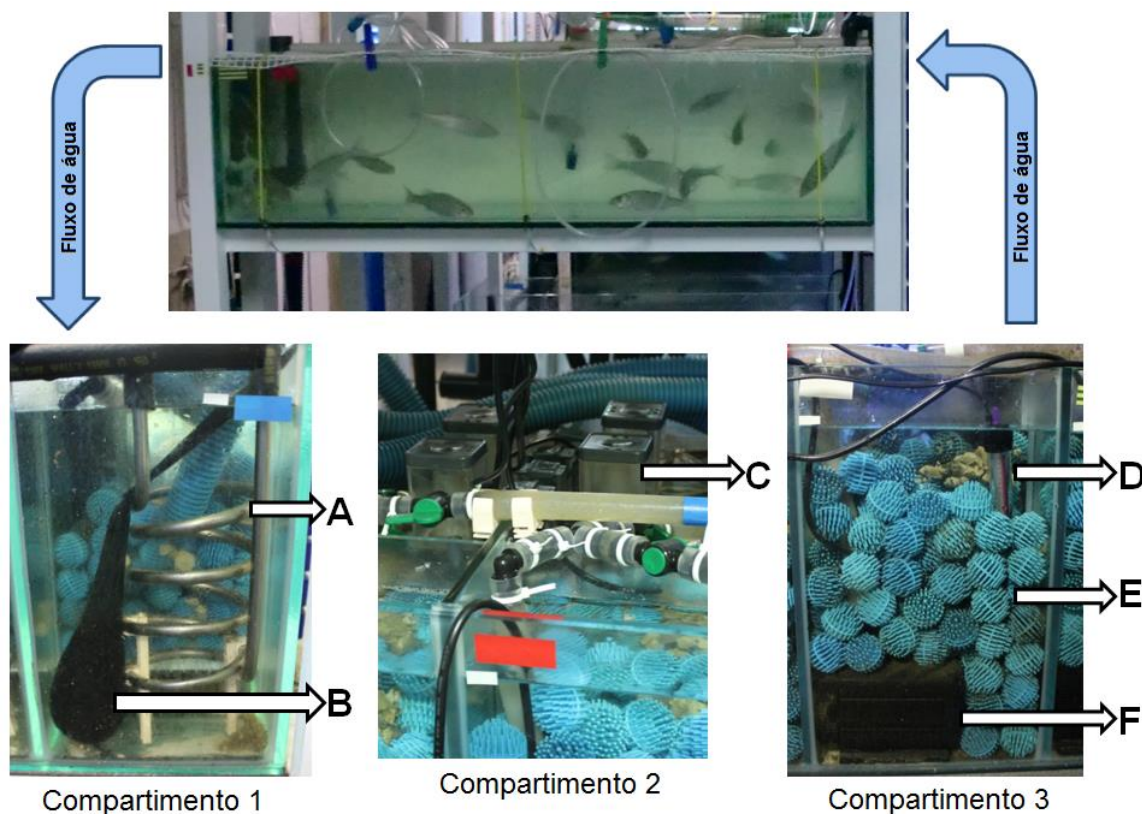


Figura 7 – Componentes do sistema de cultivo.

Legenda:

- A – Serpentina de refrigeração (sistema de refrigeração)*
- B – Carvão ativado*
- C – Escumador*
- D – Resistência*
- E – Filtros biológicos (biobolas)*
- F – Bomba de recirculação de água*

Visto tratar-se de um sistema de recirculação de água, a cada aquário estão associados três compartimentos que asseguram a qualidade da água. Sucintamente, a água de cada aquário ao atingir o nível da tubagem (Figura 7), desce por gravidade e atinge o primeiro compartimento, no qual se encontra uma serpentina de refrigeração (Figura 7 A) e um saco contendo carvão ativado que assegura uma remoção eficiente de contaminantes químicos (neste caso, MeHg), caso estes existam na água (Figura 7 B). Ao atingir o limite da capacidade do primeiro compartimento, a água passa, por gravidade para um segundo compartimento no qual se encontram os escumadores (Figura 7 C), que removem a matéria orgânica sólida excretada pelos organismos e o filtro biológico (i.e. biobolas contendo bactérias nitrificantes) que transforma a amónia excretada pelos organismos (tóxica quando em concentrações elevadas), em nitritos e, por fim, nitratos (compostos de azoto menos tóxicos para os organismos). Em seguida, a água passa para o terceiro compartimento através de um orifício no fundo (entre o segundo e terceiro compartimento) onde passa por mais um

conjunto de filtros biológicos e é bombeada novamente para o aquário correspondente, através de uma bomba de recirculação (Figura 7 E e F).

Este sistema permitiu, então, simular diferentes cenários de temperaturas em cada um dos aquários e controlá-los de modo independente durante toda a experiência.

2.1.2. Formulação de rações

Em colaboração com a empresa fornecedora de rações comerciais para peixes Sparos (Olhão), formulou-se uma ração com base nos requisitos nutricionais do robalo juvenil (ração controlo ou não contaminada; Tabela 4). A ração consistia em *pellets* extrudidos com óleo de peixe, com cerca de 2 mm de diâmetro (i.e. dimensão ideal para alimentação de indivíduos juvenis com cerca de 20 g de massa corporal). Esta ração controlo serviu como alimento aos animais dos aquários controlo (i.e. não contaminados), bem como para todos os animais durante as fases de aclimação e eliminação do MeHg.

Paralelamente, foi igualmente produzida uma ração contaminada com a mesma composição nutricional da ração controlo, incorporando-se no óleo de peixe (antes da extrusão dos *pellets*) uma solução de cloreto de metilmercúrio (95%, Merck) dissolvido em etanol (100%), de modo a obter-se uma concentração final de 8 mg kg⁻¹ de ração em peso seco, correspondendo a 2 mg kg⁻¹ em peso fresco. Esta ração foi fornecida aos animais dos aquários contaminados apenas durante a fase de exposição ao MeHg.

Tabela 4 – Composição nutricional da ração para robalos juvenis.

Ingredientes	Percentagem de matéria seca (%)
Matéria seca	94,3
Proteína total	51,7
Lípidos totais	18,9
Dos quais: Óleo de peixe	12,7
Cinza	9,6
Suplementos de vitaminas e sais minerais*	0,9

* Suplemento para peixes marinhos (PREMIX Lda., Portugal). Minerais (g ou mg kg⁻¹ de ração): 0,65mg carbonato de cobalto; 9mg sulfato de cobre; 6mg sulfato férrico; 0,5mg iodeto de potássio; 9,6mg óxido de manganês; 0,01mg de selenite de sódio; 7,5mg sulfato de zinco; 400mg cloreto de sódio; 1,86g carbonato de cálcio.

Ambas as rações foram armazenadas em recipientes fechados que se encontravam à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e humidade.

2.1.3. Transporte e aclimação dos organismos de estudo

Cerca de 300 robalos juvenis (massa corporal média ~20 g) produzidos na estação piloto de aquacultura do IPMA de Olhão (Algarve) foram transportados de carro desde as instalações do IPMA de Olhão até ao LMG (Lisboa; duração de ~3h), em contentores de PVC com oxigénio puro, de maneira a garantir níveis de oxigénio de 5 mg L⁻¹ e temperatura da água a 18 °C.

Uma vez no LMG, os robalos foram distribuídos aleatoriamente pelos 12 aquários do sistema experimental anteriormente descrito, onde permaneceram durante 30 dias de período de aclimação, com arejamento contínuo, mantendo o nível de oxigénio dissolvido superior a 5 mg L⁻¹, temperatura da água a 18 °C, pH 8,0 e salinidade a 35‰. Estabeleceu-se um fotoperíodo igual a 12:12 (i.e. 12 horas de iluminação e 12 horas de escuridão). De modo a não causar stresse fisiológico aos animais por excessiva densidade populacional, assegurou-se que a carga animal de cada aquário era inferior a 5 g (de peso corporal do animal) por L de água.

Durante esta fase de aclimação, os robalos foram alimentados 3 vezes por dia com a ração controlo (ver capítulo 2.1.2), numa quantidade equivalente a 2% do peso corporal médio dos peixes. Diariamente removeram-se os indivíduos mortos (calculando-se a taxa de mortalidade diária) e mediram-se em cada tanque os parâmetros físico-químicos da água: temperatura (Ebro, TFX 430 Pt100, Alemanha), pH (Mettler Toledo, SevenGo pro, Suíça), O₂ dissolvido (WTW handheld Meter Multi 350i, Alemanha), salinidade (V² Refractometer, TMC, Reino Unido) e concentrações de amónia, nitratos e nitritos (Tropic Marine, Expert Testset, EUA). De modo a assegurar a qualidade da água dos aquários, diariamente: a) as fezes de peixe eram removidas do fundo de cada aquário; b) os escumadores eram limpos; e c) a água era parcialmente substituída. Em relação à amónia, nitritos e nitratos, nunca se excederam os valores de 0,10; 0,10 e 10 mg L⁻¹, respetivamente, garantindo assim uma boa qualidade da água.

2.1.4. Fase 1: Exposição de MeHg

A Fase 1 da experiência decorreu durante 28 dias, tendo-se pretendido avaliar o processo de bioacumulação de MeHg pela via alimentar (i.e. incorporado na ração de peixe) em robalos juvenis, simulando simultaneamente o aumento da temperatura da água do mar ($\Delta T = 4$ °C) decorrente das alterações climáticas e previsto pelo Intergovernmental Panel on

Climate Change (IPCC), de acordo com o relatório de 2013. Para tal, foram colocados aleatoriamente 22 peixes em cada aquário do sistema de cultivo para simulação das alterações climáticas e definiram-se 3 cenários com condições diferentes, cada um deles sendo atribuído a 4 aquários ou replicados:

Cenário 1 (replicados/aquários 1a, 1b, 1c e 1d) – Cenário controlo I (condições atuais sem contaminação) – Alimentação com ração não contaminada + ausência de simulação de alterações climáticas, i.e. temperatura média usual aplicada no cultivo de robalo de 18 °C (permanecendo a $18,2 \pm 0,3$ °C; média \pm desvio padrão);

Cenário 2 (replicados/aquários 2a, 2b, 2c e 2d) – Cenário controlo II (contaminado) – Alimentação com ração contaminada com MeHg + Sem simulação de alterações climáticas, i.e. temperatura média usual aplicada no cultivo de robalo de 18 °C (permanecendo a $18,1 \pm 0,2$ °C; média \pm desvio padrão);

Cenário 3 (replicados/aquários 3a, 3b, 3c e 3d) – Cenário de alterações climáticas (contaminado) – Alimentação com ração contaminada com MeHg + Simulação do aumento da temperatura de acordo com as previsões do IPCC, ou seja, $\Delta T = 4$ °C, i.e. 22 °C (permanecendo a $21,9 \pm 0,8$ °C; média \pm desvio padrão).

O cenário 1 teve dois propósitos: a) controlar a taxa de mortalidade ao longo de toda a experiência, bem como o estado fisiológico dos animais (visualmente) em condições de normais (i.e. temperatura usual e alimentação não contaminada); b) indicar as concentrações de Hg total e MeHg existentes na ração não contaminada, bem como, a percentagem de MeHg/Hg total no músculo dos robalos em condições controladas (18 °C). Com o cenário 2 pretendeu-se avaliar o processo de bioacumulação do Hg no robalo juvenil, bem como, a sua especiação em condições de cultivo atuais (18 °C). No cenário 3 pretendeu-se avaliar o processo de bioacumulação do Hg no robalo juvenil, bem como a sua especiação face ao aumento da temperatura segundo o cenário A1FI do IPCC, sendo este o cenário mais drástico (22 °C). De modo a manter a temperatura da água a 22 °C nos aquários pertencentes ao cenário 3, foram colocadas resistências (Jager 3604, Eheim, GmbH & Co, Alemanha) nos terceiros compartimentos dos respetivos aquários (Figura 7 D).

Para uma constante monitorização do pH da água do sistema de cultivo foi utilizado um equipamento ProfiLux (ProfiLux 3.1N Starter-Set, Schuko, Alemanha) que efetuou a gestão automática do pH dentro dos aquários, injetando CO₂ quando o valor se encontrava elevado ou ar quando o valor era demasiado baixo, mantendo assim um pH constante de $8,0 \pm 0,2$ (média \pm desvio padrão). Adicionalmente, aferiu-se diariamente a exatidão dos valores de temperatura e pH fornecidos pelo aparelho ProfiLux, utilizando um termómetro

digital (Ebro, TFX 430 Pt100, Alemanha) e pH (Mettler Toledo, SevenGo pro, Suíça) externos ao sistema.

Nos três cenários, foi mantido um arejamento contínuo, oxigênio dissolvido superior a 5 mg L^{-1} , pH a 8.0, salinidade a 35 ‰ e os animais foram alimentados 3 vezes por dia com as respectivas rações (contaminada ou não contaminada) numa quantidade equivalente a 2% do peso corporal médio. Estabeleceu-se um fotoperíodo de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuridão. Os parâmetros físico-químicos da água foram medidos diariamente, conforme descrito anteriormente (Capítulo 2.1.3). De modo a assegurar a qualidade da água dos aquários, diariamente as fezes de peixe eram removidas do fundo de cada aquário, os escumadores eram limpos e a água era parcialmente substituída. Realizavam-se também a leitura da concentração de amônia, nitritos e nitratos, que nunca excederam os valores de 0,10; 0,10 e 10 mg L^{-1} , respectivamente, garantindo assim uma boa qualidade da água. Durante esta fase experimental, a taxa de mortalidade foi inexistente.

2.1.5. Fase 2: Eliminação MeHg

Após 28 dias de exposição ao MeHg, seguiu-se a Fase 2 que também compreendeu 28 dias e na qual se pretendeu avaliar o processo de eliminação do MeHg em robalos juvenis simulando o aumento da temperatura da água do mar que será expectável decorrente das alterações climáticas ($\Delta T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$). Para tal, mantiveram-se os robalos juvenis nas mesmas condições descritas no Capítulo 2.1.4., mas alimentando-os em todos os cenários com ração não contaminada ou controlo.

Para uma constante monitorização do pH da água do sistema de cultivo foi utilizado um equipamento ProfiLux (ProfiLux 3.1N Starter-Set, Schuko, Alemanha) que efetuou a gestão automática do pH dentro dos aquários, injetando CO_2 quando o valor se encontrava elevado ou ar quando o valor era demasiado baixo, mantendo assim um pH constante de $8,0 \pm 0,2$ (média \pm desvio padrão). Adicionalmente, aferiu-se diariamente a exatidão dos valores de temperatura e pH fornecidos pelo aparelho ProfiLux, utilizando um termómetro digital (Ebro, TFX 430 Pt100, Alemanha) e pH (Mettler Toledo, SevenGo pro, Suíça) externos ao sistema.

Nos três cenários, foi mantido o arejamento contínuo, oxigênio dissolvido superior a 5 mg L^{-1} , pH a 8.0, salinidade a 35‰ e os animais foram alimentados 3 vezes por dia com ração não contaminada numa quantidade equivalente a 2% do peso corporal médio. Estabeleceu-se um fotoperíodo de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuridão. Os parâmetros físico-químicos da água foram medidos diariamente, conforme descrito anteriormente (Capítulo 2.1.3). De modo a assegurar a qualidade da água dos aquários, diariamente as fezes de peixe eram removidas do fundo de cada aquário, os escumadores eram limpos e a água era

parcialmente substituída. Realizavam-se também a leitura da concentração de amónia, nitritos e nitratos, que nunca excederam os valores de 0,10; 0,10 e 10 mg L⁻¹, respetivamente, garantindo assim uma boa qualidade da água. Durante esta fase experimental, a taxa de mortalidade foi inexistente.

2.1.6. Amostragens

Ao longo da experiência, foram efetuadas 9 amostragens de robalo, isto é, nos dias 0 (início da Fase 1), 7, 14, 28 (fim da Fase 1 e início da Fase 2), 35, 42, 49 e 56 (fim da Fase 2 e último dia de experiência). Em cada ponto de amostragem, recolheram-se aleatoriamente 6 animais de cada cenário, bem como, uma amostra da água de cada aquário. De modo a minimizar o sofrimento animal e seguindo as práticas eticamente recomendadas, os peixes foram eutanasiados através de uma incisão na região dorsal imediatamente posterior à cabeça para cortar a coluna vertebral, assegurando a perda imediata de sensibilidade (CE, 2010; Figura 8).



Figura 8 – Corte da coluna vertebral.

Registou-se o peso e comprimento totais dos espécimes e recolheu-se para tubos de plástico (Falcon) o tecido muscular livre de pele e espinhas (Figura 9). As amostras foram congeladas a -80 °C e posteriormente liofilizadas durante 48h a -50 °C a baixas pressões (~10⁻¹ atm; Heto, PowerDry LL 3000, República Checa), com exceção das amostras de água. As amostras liofilizadas foram, por fim, homogeneizadas, utilizando almofarizes e pilões de porcelana e mantidas a -80 °C até serem analisadas.



Figura 9 – Procedimento de remoção de espinhas e pele da amostra de tecido muscular.

2.2. Análises químicas

2.2.1. Determinação do teor de mercúrio total

A determinação da concentração de Hg total presente nas amostras de músculo de robalo, bem como de água foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com o método descrito na norma US EPA 7473 (EPA, 2007b) e utilizando um analisador automático de mercúrio (LECO, AMA 254, EUA).

Esta técnica baseia-se na decomposição física e química da amostra em forno, onde a fração de mercúrio existente é seletivamente retida numa amálgama de ouro e depois libertada após aquecimento. O vapor de mercúrio é arrastado pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro, lendo-se o valor de absorção no comprimento de onda de 253,7 nm. O procedimento encontra-se descrito em detalhe no Anexo I. Cada amostra peixe e água foi lida em duplicado.

2.2.2. Determinação do teor de mercúrio orgânico (MeHg)

Procedeu-se à extração do MeHg presente nas amostras de músculo de robalo de acordo com o método descrito por Scerbo & Barghigiani (1998).

Resumidamente, este método consiste na utilização de cerca de 100 mg de amostra liofilizada à qual é adicionada 10 mL de ácido bromídrico (47%), seguida da extração de compostos de mercúrio orgânicos adicionando 20 mL de tolueno (99,8%). Os compostos de mercúrio orgânico, neste caso MeHg, são depois, removidos do tolueno a partir de uma solução de cisteína. Por fim, o teor de MeHg é determinado por absorção atômica no

analisador automático de mercúrio (LECO, AMA 254, EUA), conforme descrito no ponto anterior (2.2.1). O procedimento encontra-se descrito em detalhe no Anexo I. Cada amostra foi lida em duplicado.

O mercúrio orgânico foi considerado como MeHg, pois, segundo Scerbo & Barguigiani (1998) a percentagem média de MeHg em peixes é superior a 90%. Dado que a ração fornecida aos robalos apenas continha MeHg, considerou-se neste estudo que todo o mercúrio orgânico detetado correspondia a MeHg.

2.3. Análise estatística

Para a análise estatística do presente trabalho utilizaram-se os softwares Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, EUA, 2007) e Statistica 10 (Stat-sof, Inc. EUA, 2011). Para determinar a existência de diferenças nos teores de Hg total, MeHg, razão MeHg/Hg total, bem como, nos parâmetros biométricos dos indivíduos recolhidos nos cenários e dias de amostragem, recorreu-se à análise de variâncias (ANOVA de um factor), uma vez que os dados obedeciam aos pressupostos de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Para localizar as diferenças sempre que estas existiam, utilizou-se em seguida o teste de Tukey. Determinaram-se ainda as correlações entre os parâmetros biométricos, concentrações de Hg e relações MeHg/Hg total, utilizando o teste de correlação de Pearson. Os dados foram analisados para um intervalo de confiança de 95%, isto é, significância estatística foi considerada quando $p\text{-value} < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Controlo de qualidade dos resultados

De modo a validar a qualidade dos resultados obtidos, sempre que se efetuou a quantificação de Hg total e MeHg nas amostras, também se procedeu à análise do material de referência certificado (MRC) DORM-4 (dogfish muscle, fish protein, National Research Council Canada, Canadá). A escolha do MRC DORM-4 deveu-se ao facto de ser uma matriz com características semelhantes à estudada neste trabalho experimental (músculo de peixe). Os resultados obtidos no presente estudo são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação entre os valores certificados de Hg total e MeHg e os valores obtidos no presente estudo, no material de referência DORM-4 (média \pm desvio padrão; n=3).

MRC	Hg total (mg kg ⁻¹)		MeHg (mg kg ⁻¹)	
	Valores Certificados	Valores Obtidos	Valores Certificados	Valores Obtidos
DORM-4	0,41 \pm 0,06	0,39 \pm 0,03	0,35 \pm 0,03	0,35 \pm 0,06

Os valores de Hg total e MeHg obtidos no presente estudo encontram-se dentro das gamas de valores certificadas para estes compostos, pelo que se consideraram fiáveis os resultados obtidos nas amostras.

3.2. Estabilidade da ração

De modo a verificar o teor de Hg na ração controlo (i.e. não contaminada), bem como avaliar a estabilidade do Hg nas rações contaminadas (através de uma solução de cloreto de MeHg em etanol incorporada aos óleos usados na ração contaminada), quantificou-se o teor de Hg em ambas as rações nos dias 0, 28 e 56 da experiência. Determinou-se também o teor de Hg total em amostras de água recolhidas nos nove pontos de amostragem da experiência de modo a averiguar a possível transferência de Hg da ração para a água dos aquários. A Tabela 6 apresenta os teores de Hg total obtidos nas rações e nas amostras de água.

Nas várias determinações de Hg total, as concentrações situaram-se entre 0,57 mg kg⁻¹ na ração controlo (revelando que o óleo de peixe usado na formulação da ração continha Hg, embora dentro dos valores autorizados) e os 8,12 mg kg⁻¹ na ração contaminada, não evidenciando qualquer perda deste elemento ao longo do tempo em ambos os casos. As concentrações de Hg na ração contaminada encontram-se dentro dos teores de Hg

observados em alguns organismos aquáticos passíveis de bioacumular teores mais elevados de Hg, sobretudo quando habitam zonas bastante contaminadas e que fazem parte da dieta do robalo em ambiente selvagem, tais como crustáceos *Cyathura carinata* (1,0 a 2,5 mg kg⁻¹ peso fresco; Cardoso *et al.*, 2014).

Por outro lado, todas as amostras de água recolhida nos vários aquários do sistema, cenários e 9 pontos de amostragem revelaram teores de Hg total inferiores ao limite de deteção da metodologia utilizada (0,01 mg kg⁻¹). Deste modo, confirmou-se então a estabilidade do Hg nas rações preparadas artificialmente, podendo assumir-se que o Hg incorporado nas rações terá sido ingerido pelos robalos na totalidade. Este resultado deve-se, sobretudo, às características lipofílicas do MeHg, que impedem a sua migração a partir do óleo das rações para a água (Storelli *et al.*, 2002).

Tabela 6 – Concentração de Hg total (mg kg⁻¹) nas duas rações (em peso seco) e amostras de água ao longo do tempo (média ± desvio padrão; n=3).

Dia de amostragem	Ração		Água		
	Controlo	Contaminada	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3
0	0,57±0,02	8,12±0,07	< 0,01	< 0,01	< 0,01
28	0,58±0,01	8,08±0,03	< 0,01	< 0,01	< 0,01
56	0,57±0,01	8,09±0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01

3.3. Dados biométricos

Em cada um dos 9 pontos de amostragem, recolheram-se os dados biométricos dos indivíduos amostrados em cada cenário, mais concretamente comprimento total (cm) e peso total (g; Tabela 7). Nos três cenários os indivíduos cresceram ao longo do tempo, quer em comprimento quer em peso, embora só significamente no cenário 3. Todos os cenários obtiveram desvios padrão bastante elevados para o peso e comprimento. Esta variabilidade poderá dever-se a fatores intrínsecos como dominância de indivíduos, competição pelo alimento e/ou diferentes estados fisiológicos e metabólicos entre indivíduos no mesmo aquário.

Tabela 7 – Comprimento total (cm) e peso total (g) dos indivíduos amostrados em cada um dos cenários (n=6; entre parêntesis encontra-se a % de desvio).

	Dia de amostragem	Comprimento total (cm)		Peso total (g)	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Cenário 1	0	12,9	0,8 (6,2 %)	22,5	6,1 (27,1 %)
	7	12,2	1,5 (12,3 %)	21,3	11,7 (54,9 %)
	14	13,2	1,9 (14,4 %)	27,5	13,7 (49,8 %)
	21	14,3	0,3 (2,1 %)	26,2	5,8 (22,1 %)
	28	12,5	1,1 (8,8 %)	19,5	4,8 (24,6 %)
	35	13,1	1,6 (12,2 %)	28,3	11,4 (40,3 %)
	42	14,3	2,4 (16,8 %)	39,0	15,3 (39,2 %)
	49	12,6	1,5 (11,9 %)	21,8	11,3 (51,8 %)
	56	13,7	0,7 (5,1 %)	33,0	4,1 (12,4 %)
Cenário 2	0	12,9	0,8 (6,2 %)	22,5	6,1 (27,1 %)
	7	13,3	1,0 (7,5 %)	25,1	8,1 (32,3 %)
	14	14,3	1,1 (7,7 %)	34,6	7,8 (22,5 %)
	21	14,5	1,3 (9,0 %)	29,3	8,4 (28,7 %)
	28	14,0	1,2 (8,6 %)	32,1	8,3 (25,9 %)
	35	14,2	1,3 (9,2 %)	35,7	11,0 (30,8 %)
	42	14,3	1,3 (9,1 %)	36,9	9,9 (26,8 %)
	49	14,3	1,0 (7,0 %)	32,7	5,5 (16,8 %)
	56	14,9	1,1 (7,4 %)	39,8	6,3 (15,8 %)
Cenário 3	0	12,9	0,8 (6,2 %)	22,5	6,1 (27,1 %)
	7	13,2	0,6 (4,5 %)	24,6	4,2 (17,1 %)
	14	12,8	1,8 (14,1 %)	24,4	9,1 (37,3 %)
	21	13,5	1,5 (11,1 %)	23,6	9,5 (40,3 %)
	28	14,1	1,1 (7,8 %)	34,0	11,1 (32,6 %)
	35	15,3	0,7 (4,6 %)	44,4	4,0 (9,0 %)
	42	14,7	1,5 (10,2 %)	39,6	12,3 (31,1 %)
	49	14,1	1,3 (9,2 %)	32,3	9,3 (28,8 %)
	56	15,0	1,2 (8,0 %)	42,0	10,5 (25,0 %)

3.4. Exposição a MeHg

Os resultados obtidos durante 28 dias de exposição a MeHg através do alimento e referentes aos três cenários estudados (cenário 1 – controlo a 18 °C, cenário 2 – contaminado a 18 °C e cenário 3 – contaminado a 22 °C) encontram-se representados na Figura 10, bem como na Tabela 8 e Tabela 2.1 (Anexo II).

Tabela 8 – Diferenças significativas encontradas em relação às concentrações de Hg total, MeHg e relação MeHg/Hg total, para cada três cenário, durante a fase de exposição a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0.05$).

	Dias de amostragem	Hg total	MeHg	MeHg/Hg total
Cenário 1	0	a	a	a
	7	a	a	a
	14	a	a	a
	21	a	a	a
	28	a	a	b
Cenário 2	0	a	a	a
	7	ab	a	a
	14	bc	ab	a
	21	c	b	a
	28	d	c	a
Cenário 3	0	a	a	a
	7	a	a	a
	14	b	b	a
	21	c	c	a
	28	d	d	a

No cenário 1 os teores de Hg total rondaram os $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ao longo de toda a fase de exposição, mantendo-se constantes e sem grandes diferenças entre os cinco primeiros pontos de amostragem (Figura 10). Estes valores estão certamente relacionados com o facto da ração controlo não ser totalmente inócua de Hg (teor = $0,57 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco, correspondente a $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ peso fresco), uma vez que se utilizaram óleos de peixe na formulação da ração, que por si só contém Hg, em vez de óleos de origem vegetal. A constância de valores de Hg ao longo da experiência parece indicar um equilíbrio entre a quantidade de MeHg ingerida através da ração e a excretada pelos peixes.

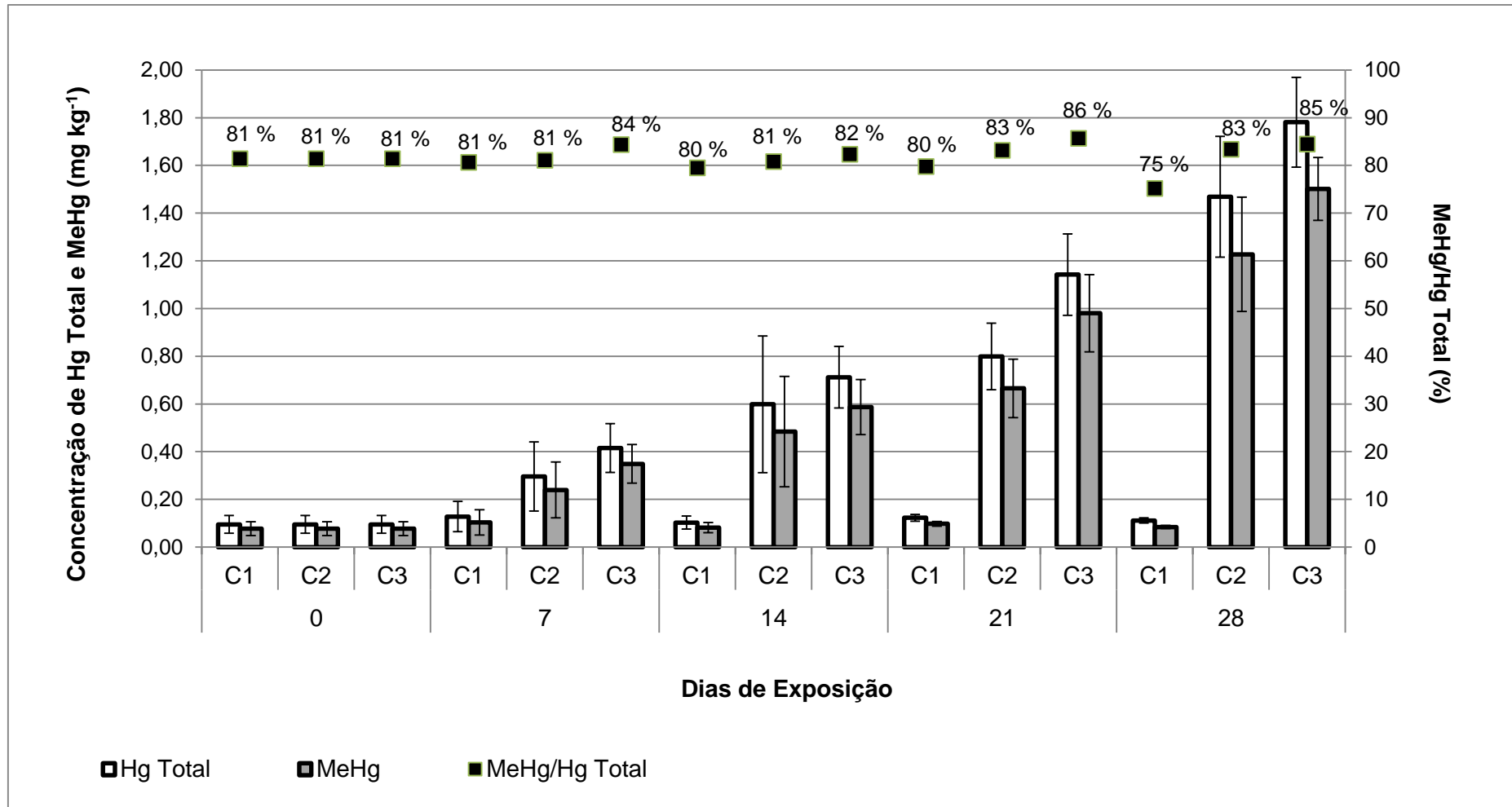


Figura 10 – Concentrações de Hg total e MeHg (mg kg⁻¹ peso fresco) e proporção MeHg/Hg total (%) nos três cenários, durante a fase de exposição a MeHg (C1 – Cenário 1; C2 – Cenário 2; C3 – Cenário 3).

As concentrações de Hg na ração não contaminada encontram-se dentro dos teores de Hg total observados em alguns organismos aquáticos que fazem parte da dieta do robalo em ambiente selvagem, tais como vermes aquáticos Polychaeta (0,005 a 0,108 mg kg⁻¹ peso fresco; Sizmur *et al.*, 2013) e mexilhão do mediterrâneo (0,059 a 0,140 mg kg⁻¹ peso fresco; Leo *et al.*, 2010). Também os teores de MeHg mantiveram-se sem diferenças significativas ao longo dos primeiros 28 dias do ensaio, situando-se em média nos 0,09 mg kg⁻¹. Segundo, Bjerregaard & Christensen (2012) a adição de selênio na alimentação de organismos marinhos permite reduzir os seus teores de MeHg. Tais conclusões foram obtidas a partir de um estudo com camarões (*Crangon crangon*) onde forneciam elevadas concentrações de selênio no alimento, sendo uma das formas selenite. No presente estudo, a ração continha na sua formulação selenite de sódio embora em baixas concentrações (10 µg kg⁻¹), sendo provavelmente esta a razão para a inexistência de aumento da quantidade de MeHg nos peixes durante a experiência. Por sua vez, a relação MeHg/Hg total reduziu significativamente dos 81 para os 75 %, o que implica que a maior fração de Hg no músculo dos robalos se encontrava na forma orgânica, isto é, na forma de MeHg. Valores idênticos foram encontrados por diversos autores para a razão MeHg/Hg total no músculo de peixes marinhos, como o tubarão (*Chimaera monstrosa*), enguia (*Torpedo nobiliana*) e raia (*Myliobatis aquila*; entre 72 e 83%; Storelli *et al.*, 2002), besugo (*Pagellus acarne*), carapau (*Trachurus picturatus*), abrótea (*Phycis phycis*), cherne (*Polyprion americanus*), safio (*Conger conger*), peixe-espada branco (*Lepidopus caudatus*) e salmonete preto (*Mora moro*; entre 81 e 91%; Magalhães *et al.*, 2007), dourada do Japão (*Pagrus major*), corvina (*Sciaenops ocellatus*) e robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*; entre 72 e 98%; Onsanit *et al.*, 2012). Já em bivalves a relação MeHg/Hg total é menor do que em peixes, usualmente entre 20 e 60%, possivelmente por ocupar um nível trófico mais baixo, bem como fisiologia e metabolismo diferentes (Carrasco *et al.*, 2008; Leo *et al.*, 2010).

Mieiro *et al.* (2011) verificaram que robalos provenientes da Ria de Aveiro apresentavam concentrações de MeHg na ordem dos 0,04 e 0,46 mg kg⁻¹ (peso fresco), dependendo do nível de contaminação da zona onde foram capturados. Deste modo, apesar da ração controlo preparada artificialmente conter Hg (0,14 mg kg⁻¹ peso fresco), no final, os robalos pertencentes ao cenário 1 revelaram concentrações de MeHg semelhantes às encontradas em robalos capturados no meio ambiente.

Relativamente ao cenário 2, foi possível observar através da Figura 10 que as concentrações de Hg total aumentaram significativamente durante a fase de exposição dada a ingestão regular de ração contaminada com este elemento, começando com 0,10 mg kg⁻¹ no dia 0 até 1,47 mg kg⁻¹ ao fim de 28 dias. Também os teores de MeHg aumentaram significativamente durante estes 28 dias de exposição, de 0,08 mg kg⁻¹ para 1,23 mg kg⁻¹. A percentagem de MeHg presente nos robalos durante os 28 dias de exposição não revelou

diferenças significativas, oscilando entre os 81 e os 83%, ou seja, o Hg encontrava-se maioritariamente sob a forma orgânica e em percentagem superior à encontrada no cenário 1. Igualmente no cenário 3 as concentrações de Hg total e MeHg aumentaram significativamente durante o período de exposição (Figura 10). Os teores de Hg total variaram entre $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ no dia 0 e $1,78 \text{ mg kg}^{-1}$ ao fim de 28 dias de exposição. Já o MeHg variou entre $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ no dia 0 e $1,50 \text{ mg kg}^{-1}$ ao fim de 28 dias de exposição. Os valores da relação entre MeHg e Hg total não apresentaram diferenças significativas, oscilando entre os 81 e os 86%. Assim, constataram-se valores mais elevados de Hg total, MeHg e da razão MeHg/Hg total no cenário 3 em relação aos restantes cenários, indicando a aparente existência de uma relação direta entre a temperatura da água e a acumulação de Hg e MeHg nos robalos juvenis. Devido ao facto da ração fornecida aos indivíduos de estudo dos cenários 2 e 3 ter concentrações elevadas de MeHg (2 mg kg^{-1} peso fresco), a razão de MeHg/Hg total de ambos os cenários não decresceu significativamente. Esta razão foi ligeiramente maior no cenário 3 embora não significativamente, possivelmente, a uma melhor absorção dos constituintes dos alimentos a temperaturas mais elevadas.

Foi efetuada a determinação da quantidade média (mg/semana/peixe) de Hg ingerido e a percentagem de Hg bioacumulado, isto é, Hg detetado no músculo do peixe/Hg presente na ração ingerida (em 2% do peso corporal médio do peixe). De acordo com a Tabela 9, o teor de Hg acumulado semanalmente nos peixes do cenário 1 foi bastante baixa, como seria de esperar, enquanto nos cenários 2 e 3 o teor de Hg acumulado semanalmente foi aumentando ao longo da fase de exposição, sendo evidente que no final de 28 dias os indivíduos no cenário 3 acumularam semanalmente quantidades mais elevadas de Hg do que no cenário 2. Em relação às percentagens de Hg acumulado (%), estas foram mais elevadas no cenário 1 (dia 7 e 21) comparativamente aos cenários 2 e 3 nestes dias. As taxas de bioacumulação (em função da quantidade de Hg presente na ração; %) para o cenário 2 aumentaram ao longo dos 28 dias, embora no cenário 3 esse aumento tenha sido geralmente superior (exceto no dia 14). A elevada variabilidade no teor de Hg e MeHg dos indivíduos selecionados em cada ponto de amostragem dos três cenários poderá estar associada à variabilidade observada nas biometrias dos respetivos peixes. Por sua vez, as diferentes características biométricas dos indivíduos amostrados estão naturalmente relacionadas com diferentes ingestões de alimento pelos peixes, motivadas por fatores intrínsecos como a dominância de indivíduos sobre outros. Apesar das percentagens de bioacumulação obtidas serem relativamente baixas, é de salientar que este estudo apenas pretendeu quantificar o teor de Hg na parte edível do peixe, ou seja, no músculo. Assim, poderá admitir-se que uma parte do Hg ingerido possa estar acumulado noutros órgãos (exemplo, fígado, cérebro) e outra parte possa ter sido excretada nas fezes.

Um estudo realizado por Abreu *et al.* (2000) em robalos da ria de Aveiro, onde quantificou o Hg presente no músculo, fígado e guelras, constatou que o fígado era o tecido que se acumulava maiores teores de Hg ($2,0 \text{ mg kg}^{-1}$), seguido do músculo ($1,1 \text{ mg kg}^{-1}$) e guelras ($0,71 \text{ mg kg}^{-1}$). Já Huang *et al.* (2012) realizaram um estudo com esturjão branco (*Acipenser transmontanus*), onde os peixes foram sujeitos a concentrações elevadas de Hg e foi observado que o tecido que continha mais Hg era no trato intestinal ($82,9 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco) e o menor era o músculo ($1,09 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco). Os tecidos mais contaminados encontram-se assim numa escala crescente de Hg: músculo < restante peixe < cérebro < fígado < coração < guelras < baço < rins < trato gastrointestinal.

Tabela 9 – Quantidade de Hg bioacumulado (mg kg^{-1} peso fresco) e taxas de bioacumulação de Hg (%) para os três cenários durante a fase de exposição.

	Dia de amostragem	Hg acumulado (mg/peixe/semana)	% Hg acumulado
Cenário 1	0	-	-
	7	0,0007	27,4
	14	0,0002	8,1
	21	0,0007	28,5
	28	0,0003	12,7
Cenário 2	0	-	-
	7	0,0050	15,0
	14	0,0174	25,9
	21	0,0206	20,5
	28	0,0441	32,8
Cenário 3	0	-	-
	7	0,0079	23,4
	14	0,0150	22,4
	21	0,0247	24,5
	28	0,0573	42,6

No final do dia 28, os indivíduos do cenário 3 bioacumularam 10% mais Hg no músculo que os do cenário 2, o que indica um aumento da taxa de bioacumulação a temperaturas mais elevadas ($22 \text{ }^\circ\text{C}$). De facto, estudos anteriores revelaram que o aumento da temperatura promove a ingestão de alimento e, conseqüentemente, de Hg (Harris & Bodaly, 1998; Dijkstra *et al.*, 2013). Por outro lado, de acordo com alguns modelos bioenergéticos desenvolvidos em estudos anteriores em peixes marinhos (por exemplo, Dijkstra *et al.*, 2013), o aumento da

temperatura provoca um acréscimo nas taxas de respiração dos peixes devido à aceleração do metabolismo dos indivíduos. A respiração é uma atividade dispendiosa energeticamente, pelo que obriga a uma maior ingestão de alimento, podendo afetar o crescimento dos peixes. Assim, a temperaturas mais elevadas os peixes que apresentam taxas de respiração mais elevadas geralmente comem mais, mas podem crescer mais lentamente (baixa eficiência de crescimento), traduzindo-se numa maior bioacumulação de MeHg (Dijkstra *et al.*, 2013).

Possivelmente, também poderá ter ocorrido um melhor aproveitamento dos nutrientes, bem como, de Hg presentes na ração por parte dos peixes expostos a temperaturas mais elevadas, à semelhança do que foi encontrado por Wijekoon *et al.* (2014) para o ácido eicosapentaenóico (EPA) em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com uma ração contendo óleo de arenque a temperaturas elevadas. Também Akhtar *et al.* (2014) verificaram que ocorreu um aumento de ácidos gordos polinsaturados, ómega-3 (PUFA n-3) a temperaturas mais elevadas do seu estudo (32 °C) em *Tor putitor*.

3.5. Eliminação de MeHg

Os resultados obtidos durante os 28 dias de eliminação do contaminante MeHg nos três cenários estudados (cenário 1 – controlo a 18 °C, cenário 2 – contaminado a 18 °C e cenário 3 – contaminado a 22 °C) encontram-se representados na Figura 11, bem como na Tabela 10 e Tabela 2.2 (Anexo II).

No cenário 1, como seria de esperar o padrão observado durante a fase de eliminação foi idêntico ao observado na fase de exposição, isto é, os teores de Hg total e MeHg permaneceram sem diferenças significativas (entre 0,10 e 0,08 mg kg⁻¹; Figura 11). A relação MeHg/Hg total revelou, tal como na fase de exposição, valores significativos entre 75 e 81%.

Em relação ao cenário 2, as concentrações de Hg total não sofreram alterações significativas, com concentrações a oscilar entre 1,39 e 1,70 mg kg⁻¹ (Figura 11). Os teores de MeHg também não apresentaram diferenças significativas durante o período de eliminação, variando entre 1,19 e 1,41 mg kg⁻¹ (Figura 11). Os valores da relação MeHg/Hg total (dias 42 e 49) aumentaram significativamente comparativamente aos da fase de exposição (dias 7 e 14), situando-se entre os 83 e 86%. Bjerregaard *et al.* (1999) verificaram que selénio incluído na ração (sob a forma de selenite), fornecido diariamente a trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) reduzia as concentrações de MeHg no fígado, rins e músculo. Dado que no presente estudo as concentrações de Hg Total e MeHg se mantiveram constantes ao longo dos 28 dias, tal suposição não se poderá aplicar neste contexto, possivelmente devido à reduzida concentração de selénio fornecido aos robalos.

Tabela 10 – Diferenças significativas encontradas em relação às concentrações de Hg total, MeHg e relação MeHg/Hg total, para cada cenário, durante a fase de eliminação a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0.05$).

	Dias de amostragem	Hg total	MeHg	MeHg/Hg total
Cenário 1	28	a	a	a
	35	a	a	ab
	42	a	a	b
	49	a	a	a
	56	a	a	b
Cenário 2	28	a	a	a
	35	a	a	a
	42	a	a	a
	49	a	a	a
	56	a	a	a
Cenário 3	28	a	a	a
	35	a	a	a
	42	a	a	a
	49	a	a	a
	56	a	a	a

As concentrações de Hg total e MeHg do cenário 3 também permaneceram sem diferenças significativas, embora mantendo valores mais elevados que no cenário 2 registados na fase de exposição (não significativamente). Os teores de Hg total neste cenário oscilaram entre os 1,70 e 1,97 mg kg⁻¹, enquanto os de MeHg variaram entre os 1,50 e 1,76 mg kg⁻¹ (Figura 11). A relação entre MeHg/Hg total neste cenário foi a mais elevada registada em toda a experiência (entre os 85 e 89%), ocorrendo diferenças significativas entre o dia 14 da fase de exposição e os dias 35 e 42 da fase de eliminação. Mesmo com a mudança de ração, ou seja, concentrações de Hg mais baixas na fase de eliminação (0,14 mg kg⁻¹ peso fresco), a concentração de Hg total e MeHg nos robalos manteve-se constante ao longo do tempo e a relação MeHg /Hg total aumentou. Supõe-se que a concentração de MeHg seria tão elevada no músculo dos robalos (possivelmente devido às temperaturas a que estavam sujeitos) que a concentração de selênio presente na ração provavelmente não demonstrou qualquer efeito antagonista sobre o Hg.

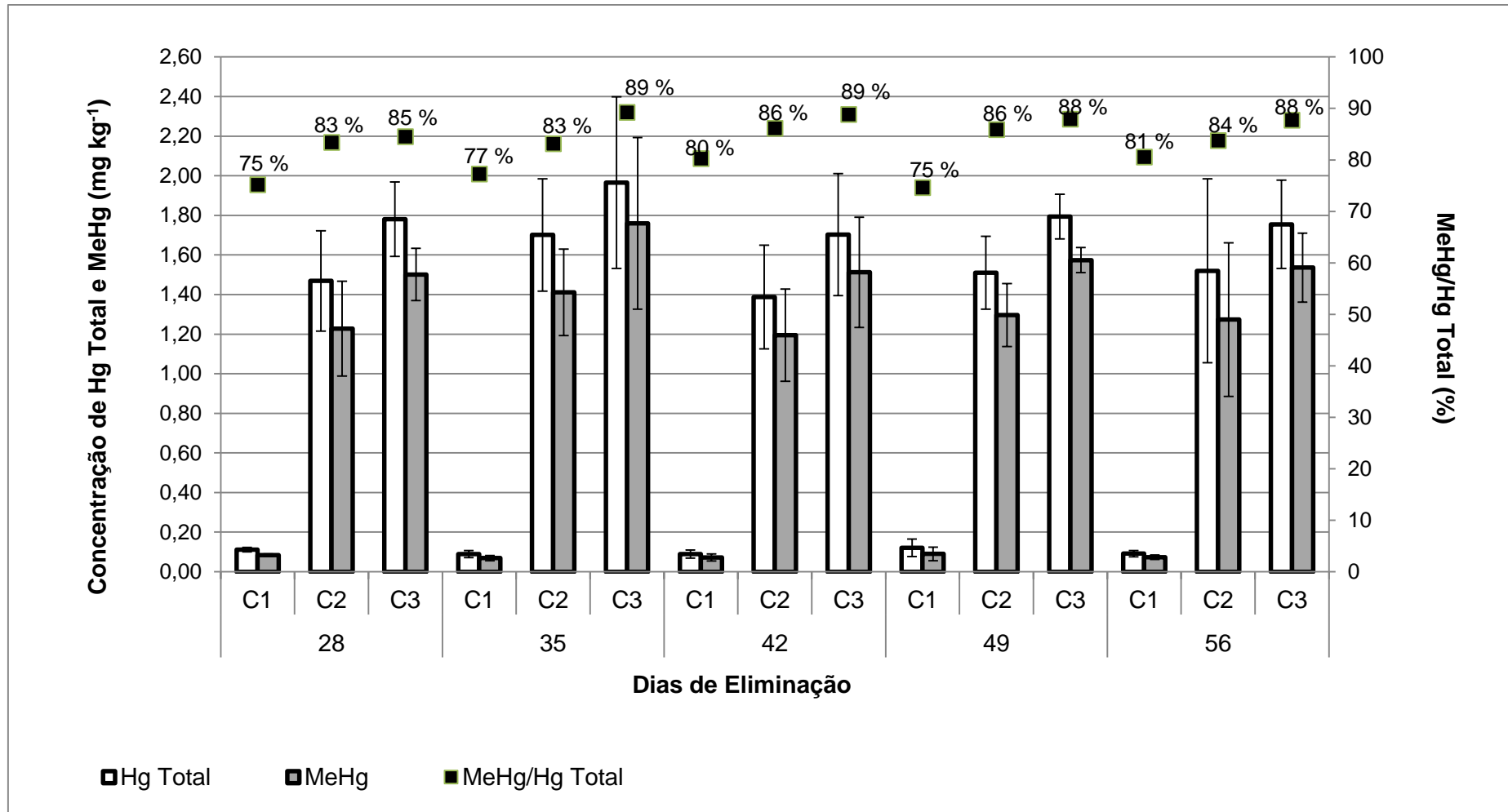


Figura 11 – Concentrações de Hg total e MeHg (mg kg⁻¹ peso fresco) e proporção MeHg/Hg total (%) nos três cenários, durante a fase de eliminação a MeHg (C1 – Cenário 1; C2 – Cenário 2; C3 – Cenário 3).

Chen *et al.* (2001) verificaram um efeito antagonista do selênio na assimilação de Hg em duas espécies de peixe (perca – *Perca flavescens* e walleye – *Sander vitreum*) apontando para uma diminuição exponencial da concentração de Hg aquando da acumulação de selênio no músculo dos peixes.

A estabilidade dos teores Hg (e MeHg) registada durante a fase de eliminação corrobora o que tem sido reportado, visto este metal ser biomagnificável ao longo da cadeia trófica (Bjerregaard *et al.*, 2011; Mieiro *et al.*, 2011).

A Tabela 11 apresenta os valores da taxa de eliminação semanal nos três cenários estudados, onde os valores positivos demonstram a eliminação de Hg e os valores negativos a bioacumulação de Hg.

De acordo com a Tabela 11, as taxas de eliminação semanais dos três cenários foram baixas ou inexistentes ao longo dos 28 dias da fase de eliminação. Assim, de um modo geral, não se observou eliminação de Hg em nenhum cenário, corroborando as conclusões obtidas em estudos anteriores (Mieiro *et al.*, 2011). Mais uma vez, isto deve-se ao facto do Hg ser um elemento com elevada capacidade de bioacumulação e biomagnificação.

Do mesmo modo, constatou-se a ausência de variações evidentes entre os cenários 2 e 3, revelando que o aumento de temperatura não facilita a eliminação do Hg nem promove a conversão de Hg orgânico em Hg inorgânico (menos tóxico).

Os resultados obtidos estão de acordo com Amlund *et al.* (2007), em que expôs espécimes de bacalhau do atlântico (*Gadus morhua* L.) a MeHg durante três meses, seguindo-se uma fase de eliminação com igual duração. Estes autores observaram que após três meses de eliminação a concentração de MeHg diminuía a uma velocidade muito reduzida e passando apenas de 0,38 para 0,29 mg kg⁻¹ (peso fresco), sendo assim uma eliminação parcial.

Tabela 11 – Quantidade de Hg eliminado (mg kg^{-1} peso fresco) e taxas de eliminação de Hg (%) para os três cenários durante a fase de eliminação.

	Dia de amostragem	Hg eliminado (mg/peixe/semana)	% Hg eliminado
Cenário 1	28	–	–
	35	+0,0006	+20,1
	42	+0,0009	+20,1
	49	-0,0002	-8,0
	56	+0,0007	+18,2
Cenário 2	28	–	–
	35	-0,0083	-15,8
	42	+0,0030	+5,5
	49	-0,0014	-2,8
	56	-0,0020	-3,5
Cenário 3	28	–	–
	35	-0,0082	-10,4
	42	+0,0031	+4,4
	49	-0,0004	-0,7
	56	+0,0011	+1,5

O sinal (+) indica eliminação e (-) bioacumulação

3.6. Correlações entre parâmetros biométricos e concentrações de Hg

Foram determinadas as correlações de Pearson, para o intervalo de confiança de 95%, entre os dados biométricos (comprimento e peso), concentrações de Hg total e MeHg e relação MeHg/Hg total, para cada cenário (Tabela 12).

No cenário 1, tal como esperado, ocorreu uma forte correlação (positiva) entre o comprimento e o peso dos peixes ($p < 0,05$). Também a correlação entre o Hg total e o MeHg foi positiva e significativa ($p < 0,05$). Encontraram-se também correlações (negativas) entre o comprimento/peso e as concentrações de Hg e MeHg ($p < 0,05$). A relação MeHg/Hg total não revelou estar correlacionada com o comprimento, peso, Hg total ou MeHg.

Em relação ao cenário 2, existiu igualmente uma forte correlação entre o peso e o comprimento ($p < 0,05$) e entre o Hg total e MeHg. O comprimento não revelou correlação com as concentrações de Hg e MeHg, ou seja, o aumento do comprimento dos peixes parece não ter influência na bioacumulação de Hg. Já o peso apresentou uma correlação moderada ($p <$

0,05) com as concentrações de Hg total, MeHg e relação MeHg/Hg total, embora baixa ($r=0,278$ a $r=0,364$).

Tabela 12 – Correlação de Pearson (* – significativa para $p < 0,05$).

Correlação	Cenário 1		Cenário 2		Cenário 3	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Comprimento X Peso	0,913	0,000*	0,836	0,000*	0,924	0,000*
Comprimento X Hg total	-0,439	0,022*	0,254	0,072	0,530	0,000*
Comprimento X MeHg	-0,424	0,027*	0,254	0,072	0,550	0,000*
Comprimento X MeHg/Hg total	0,061	0,761	0,202	0,155	0,493	0,000*
Peso X Hg total	-0,502	0,008*	0,359	0,010*	0,576	0,000*
Peso X MeHg	-0,476	0,012*	0,364	0,009*	0,597	0,000*
Peso X MeHg/Hg total	0,131	0,514	0,278	0,048*	0,474	0,000*
Hg total X MeHg	0,992	0,000*	0,998	0,000*	0,996	0,000*
Hg total X MeHg/Hg total	-0,028	0,889	0,460	0,001*	0,515	0,000*
MeHg X MeHg/Hg total	0,091	0,652	0,517	0,000*	0,585	0,000*

No cenário 3 todos os parâmetros analisados revelaram correlações (positivas) para um intervalo de confiança de 95%. Estes resultados revelam claramente uma influência da temperatura no crescimento e acumulação de Hg e MeHg em robalo.

Vários autores estudaram a correlação entre parâmetros biométricos (comprimento e peso) e as concentrações de Hg de várias espécies de peixes, não se observando um consenso nos resultados. Por exemplo, Afonso *et al.* (2013) encontraram correlações significativas entre tamanho (comprimento e peso) e a concentração de Hg, para duas espécies de peixe (*Lepidopus caudatus* e *Merluccius merluccius*). Por outro lado Maurice-Bourgoin *et al.* (2000) estudaram dezoito espécies de peixe (ex. *Oxydoras* sp., *Phractocephalus* sp., *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma tigrinum*) e não encontraram correlações significativas entre concentrações de Hg total e o peso em nenhum peixe. Já Burguer & Gochfeld (2011) revelaram a existência de correlações (positivas) entre a concentração de Hg e o comprimento para metade das dezanove espécies de peixes estudadas (ex. *Thunnus thynnus*, *Morone saxatilis*, *Micropogonias undulatus*, *Tautoga onitis*, *Thunnus albacares*, *Menticirrhus americanus*, *Centropristis striata*, *Cynoscion regalis*).

3.7. Implicações para a saúde humana

De modo a averiguar possíveis implicações para a saúde humana decorrente do consumo de pescado contaminado nos cenários expectáveis de alterações climáticas, usando o robalo juvenil como modelo, compararam-se os teores de Hg obtidos e os regulamentados (Regulamento nº 1881/2006 da Comissão Europeia). Este regulamento estabelece um valor máximo permitido de 0,5 mg Hg total kg⁻¹ (peso fresco) no pescado comercializado (ex. robalo), considerando apenas a parte edível do peixe, isto é, o músculo (CE, 2006a).

No cenário 1, os teores mais elevados de Hg total nunca foram superiores a 0,13 mg kg⁻¹ (dia 7) ao longo das duas fases estudadas neste trabalho, estando assim, em ambas as fases, claramente dentro dos valores estipulados pela legislação em vigor. Já em relação aos cenários 2 e 3, as concentrações de Hg total foram aumentando ao longo do tempo, ultrapassando o valor máximo estabelecido pela legislação vigente ao dia 14 de exposição, com concentrações de 0,60 mg kg⁻¹ no cenário 2 e 0,71 mg kg⁻¹ no cenário 3, não havendo uma diminuição destes teores durante a fase de eliminação.

No entanto, este regulamento da Comissão Europeia estabelece apenas o nível máximo de Hg total que poderá ocorrer em pescado comercializado, não considerando quer o teor correspondente à forma mais tóxica deste metal (i.e. MeHg), quer a frequência semanal com que o pescado é consumido e, conseqüentemente, a exposição dos consumidores ao MeHg durante o consumo de pescado contaminado. Assim, determinou-se também em que medida as alterações climáticas (neste caso, a temperatura), poderiam implicar uma maior exposição ao MeHg para os consumidores. Para tal, tomou-se como valores de referência o valor de ingestão semanal tolerável (TWI – tolerable weekly intake) de MeHg (1,3 µg/semana/kg de peso corporal) recomendado pela EFSA (2012). Para efeitos de cálculo, considerou-se ainda o peso médio da população Portuguesa adulta de 69 kg (CE, 2006b) e calcularam-se as médias da exposição ao MeHg, pois é o valor utilizado em análise de risco de contaminantes (cenário 2 – 0,97 mg kg⁻¹; cenário 3 – 1,22 mg kg⁻¹; EFSA, 2010) através do consumo de uma dose de robalo por semana, equivalente a 200g.

Assim, na ausência de aquecimento da água, o consumo semanal de 200g de robalo contaminado promoveria uma exposição ao MeHg equivalente a 0,19 mg, ao passo que o aumento de temperatura aumentaria a exposição ao MeHg para 0,24 mg. O valor de MeHg ingerido por semana, em condições de alteração climática seria assim cerca de 25% superior em relação ao cenário sem alteração climática.

Estes resultados evidenciam que as alterações climáticas poderão promover os riscos associados à ingestão de Hg a partir de pescado, podendo representar um problema para a saúde pública no futuro, visto que face ao aumento da temperatura, a probabilidade do consumidor ultrapassar o TWI para o MeHg através do consumo de pescado será acrescida.

Assim, diversificar a dieta é cada vez mais uma necessidade para garantir que os consumidores estejam em segurança.

4. Conclusões e perspetivas futuras

Devido aos efeitos das alterações climáticas que irão ocorrer nos ecossistemas aquáticos, pretendeu-se estudar os seus efeitos nos organismos marinhos e quais os riscos para a saúde humana. Dado que a população Portuguesa é a que tem um maior consumo de pescado na União Europeia *per capita*, decidiu-se verificar quais os efeitos do aumento da temperatura na bioacumulação de contaminantes químicos em robalos, um peixe bastante apreciado pelo povo Português e que foi usado como modelo.

Constatou-se um aumento da concentração de Hg e MeHg na fase de exposição de robalo quer a temperaturas de água de 18 °C ou 22 °C, confirmando-se a elevada bioacumulação do Hg. Na fase de eliminação os valores da concentração de Hg e MeHg mantiveram-se estáveis, sendo portanto evidente que este elemento é de eliminação muito lenta.

Robalos mantidos a temperaturas que simulavam as alterações expectáveis no futuro (22 °C) revelaram uma maior bioacumulação de Hg total e MeHg, bem como uma percentagem mais elevada da razão MeHg/Hg total. Este aumento da bioacumulação a temperaturas elevadas poderá estar associada ao metabolismo mais acelerado dos peixes.

Concluiu-se também com este estudo que o aumento expectável da temperatura dos oceanos poderá potenciar os riscos de contaminação por MeHg a partir do consumo de pescado, pois a probabilidade de ultrapassar o valor de TWI será mais elevada. Assim, sugere-se um consumo variado de pescado para assegurar uma alimentação saudável.

Trabalhos futuros, nesta área, deveriam incidir na quantificação de Hg total e MeHg noutros órgãos do peixe, como o fígado e o cérebro, pois estes órgãos podem não ser removidos aquando da sua preparação e confeção culinária. Seria igualmente interessante avaliar a quantidade destes contaminantes após o processamento culinários e verificar se estes se mantêm, aumentam ou diminuem de concentração, no músculo e restantes órgãos. Dada a relação selénio-mercúrio ainda não se encontrar bem esclarecida numa perspetiva de alterações climáticas, seria interessante a realização de estudos sobre a interação destes dois elementos face às alterações climáticas.

Bibliografia

Aboagye, D. L.; Allen, P. J. (2014). Metabolic and locomotor responses of juvenile paddlefish *Polyodon spathula* to hypoxia and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 169: 51–59.

Abreu, S. N.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, A. C. (2000). Accumulation of mercury in sea bass from a contaminated lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 40(4): 293-297.

Afonso, C.; Lourenço, H. M.; Cardoso, C.; Bandarra, N. M., Carvalho, M. L.; Castro, M.; Nunes, M. L. (2013). From fish chemical characterisation to the benefit-risk assessment – Part A. *Food Chemistry*, 137(1-4): 99-107.

Akhtar, M. S.; Pal, A. K.; Sahu, N. P.; Ciji, A.; Mahanta, P. C. (2014). Higher acclimation temperature modulates the composition of muscle fatty acid of *Tor putitora* juveniles. *Weather and Climate Extremes*, 4: 19-21.

Al-Odaini, N. A.; Zakaria, M. P.; Yaziz, M. I.; Surif, S. (2010). Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(44): 6791-6806.

Alasalvar, C.; Taylor, K. D. A.; Zubcov, E.; Shahidi, F.; Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 79(2): 145–150.

Amlund, H.; Lundebye, A.-K.; Berntssen, M. H. G. (2007). Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure. *Aquatic Toxicology*, 83(4): 323-330.

Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8): 1596-1605.

Antunes, J. C.; Frias, J. G. L.; Micaelo, A. C.; Sobral, P. (2013). Resin pellets from beaches of the Portuguese coast and adsorbed persistent organic pollutants. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130: 62-69.

Asadollahzadeh, M.; Tavakoli, H.; Torab-Mostaedi, M.; Hosseini, G.; Hemmati, A. (2014). Response surface methodology based on central composite design as a chemometric tool for

optimization of dispersive-solidification liquid–liquid microextraction for speciation of inorganic arsenic in environmental water samples. *Talanta*, 123: 25-31.

Bendtsen, J.; Hansen, J. L. S. (2013). Effects of global warming on hypoxia in the Baltic Sea–North Sea transition zone. *Ecological Modelling*, 264: 17–26.

Berger, R. G.; Lefèvre, P. L. C.; Ernest, S. R.; Wade, M. G.; Ma, Y. Q.; Rawn, D. F. K.; Gaertner, D. W.; Robaire, B.; Hales, B. F. (2014). Exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants affects fetal development in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 320: 56-66.

Bibby, R.; Widdicombe, S.; Parry, H.; Spicer, J.; Pipe, R. (2008). Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology*, 2: 67-74

Bjerregaard, P.; Andersen, B. W.; Rankin, J. C. (1999). Retention of methyl mercury and inorganic mercury in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (W): effect of dietary selenium. *Aquatic Toxicology*, 45(2-3): 171-180.

Bjerregaard, P.; Fjordside, S.; Hansen, M. G.; Petrova, M. B. (2011). Dietary Selenium Reduces Retention of Methyl Mercury in Freshwater Fish. *Environmental Science & Technology*, 45(22): 9793-9798.

Bjerregaard, P.; Christensen, A. (2012). Selenium Reduces the Retention of Methyl Mercury in the Brown Shrimp *Crangon crangon*. *Environmental Science & Technology*, 46(11): 6324-6329.

Boyd, G. R.; Palmeri, J. M.; Zhang, S.; Grimm, D. A. (2004). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*, 333(1-3): 137-148.

Breton, R.; Boxall, A. (2003). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: regulatory drivers and research needs. *Combinatorial Science*, 22(3): 399-409.

Burger, J.; Gochfeld, M. (2011). Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. *Science of the Total Environment*, 409(8): 1418-1429.

Burkhardt-Holm, P. (2010). Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art review. *International Journal of Water Resources Development*, 26(3): 477-493.

Caldeira, K.; Wickett, M. E. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research*, 110(C9): 1-12.

Cardoso, P. G.; Pereira, E.; Duarte, A. C.; Azeiteiro, U. M. (2014). Temporal characterization of mercury accumulation at different trophic levels and implications for metal biomagnification along a coastal food web. *Marine Pollution Bulletin*, 87(1-2): 39-47.

Carrasco, L.; Díez, S.; Soto, D. X.; Catalan, J.; Bayona, J. M. (2008). Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Science of the Total Environment*, 407(1): 178-184.

Carrasco, L.; Barata, C.; García-Berthou, E.; Tobias, A.; Bayona, J. M.; Díez, S. (2011). Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). *Chemosphere*, 84(11): 1642-1649.

Carrasco, L.; Vassileva, E. (2014). Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, 122: 106-114.

Castoldi, A. F.; Coccini, T.; Ceccatelli, S.; Manzo, L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Research Bulletin*, 55(2): 197-203.

Cauwenberghe, L. V.; Vanreusel, A.; Mees, J.; Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution*, 182: 495-499.

CE (2000). Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L327/1.

CE (2002). Diretiva 2002/95/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 2003 relativa à restrição do uso de determinadas substâncias perigosas em equipamentos elétricos e eletrónicos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L37/19.

CE (2006a). Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L 364/5.

CE (2006b). Health and food. Special eurobarometer 246/wave 64.3 – TNS Opinion & Social.

CE (2008). Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Diretivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Diretiva 2000/60/CE, Jornal Oficial da União Europeia, L 348/84.

CE (2010) Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L276/33.

CE (2013). Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013 que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. Jornal Oficial da União Europeia. L226/1.

Ceccatelli, S.; Daré, E.; Moors, M. (2010). Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2): 301-308.

Chakraborty, S.; Bhattacharya, T.; Singh, G.; Maity, J. P. (2014). Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100: 61-68.

Chen, Y-W.; Belzile, N.; Gunn, J. M. (2001). Antagonistic effect of selenium on mercury assimilation by fish populations near Sudbury metal smelters?. *Limnology and Oceanography*, 46(7): 1814-1818.

Claessens, M.; Vanhaecke, L.; Wille, K.; Janssen, C. R. (2013a). Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. *Marine Pollution Bulletin*, 71(1-2): 41-50.

Claessens, M.; Cauwenberghe, L. V.; Vandegheuchte, M. B.; Janssen, C. R. (2013b). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2): 227-233.

CNFCG (1994). Comité National Français du Changement global de l'Académie des Sciences. *Lettre pigb-pmrc France n°21 - changement global*. Programme international géo-sphère biosphère (PIGB); Programme mondial de recherches sur le climat (PMRC), Paris, 5-16 pp.

Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12): 2588-2597.

Covaci, A.; Harrad, S.; Abdallah, M. A. E.; Ali, N.; Law, R. J.; Herzke, D.; Wit, C. A. D. (2011). Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International*, 37(2): 532-556.

D'Silva, K.; Fernandes, A.; Rose, M. (2004). Brominated Organic Micropollutants—Igniting the Flame Retardant Issue. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34(2): 141-207.

Damásio, J.; Barceló, D.; Brix, R.; Postigo, C.; Gros, M.; Petrovic, M.; Sabater, S.; Guasch, H.; Alda, M. L.; Barata, C. (2011). Are pharmaceuticals more harmful than other pollutants to aquatic invertebrate species: A hypothesis tested using multi-biomarker and multi-species responses in field collected and transplanted organisms. *Chemosphere*, 85(10): 1548-1554.

Dawson, B.; Spannagel, M. (2009). *The complete guide to climate change*. London and New York: Routledge Taylor & Francis Group. 436 pp.

De Falco, M.; Sellitti, A.; Sciarrillo, R.; Capaldo, A.; Valiante, S.; Iacheta, G.; Forte, M.; Laforgia, V. (2013). Nonylphenol effects on the HPA axis of the bioindicator vertebrate, *Podarcis sicula* lizard. *Chemosphere*, 104: 190-196.

Devanathan, G.; Subramanian, A.; Sudaryanto, A.; Takahashi, S.; Isobe, T.; Tanabe, S. (2012). Brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk from several locations in India: Potential contaminant sources in a municipal dumping site. *Environment International*, 39(1): 87-95.

Diano, N.; Grano, V.; Fraconte, L.; Caputo, P.; Ricupito, A.; Attanasio, A.; Bianco, M.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; Manco, I.; Mita, L.; Del Pozzo, G.; Mita, D. G. (2007). Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. *Applied Catalysis B: Environmental*, 69(3-4): 252-261.

Díaz, R. J.; Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321(5891): 926-929.

Díaz, O.; Tapia, Y.; Muñoz, O.; Montoro, R.; Velez, D.; Almela, C. (2012). Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4): 744-749.

Dijkstra, J. A.; Buckman, K. L.; Ward, D.; Evans, D. W.; Dionne, M.; Chen, C. Y. (2013). Experimental and Natural Warming Elevates Mercury Concentrations in Estuarine Fish. *PLoS ONE* 8(3): e58401.

DNVGL (2014). DNV Extraordinary Innovation Project– Plastic Aquatic – On a mission to reduce marine litter. Disponível em: http://www.dnv.com/industry/maritime/servicessolutions/consulting/plastic_aquatic.asp.

Consulta efetuada em 24 de Setembro de 2014.

Dodder, N. G.; Maruya, K. A.; Ferguson, P. L.; Grace, R.; Klosterhaus, S.; La Guardia, M. J.; Lauenstein, G. G.; Ramirez, J. (2013). Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast and the influence of land use, storm water discharge, and treated wastewater effluent. *Marine Pollution Bulletin*, 81(2): 340-346.

Dolar, D.; Gros, M.; Rodriguez-Mozaz, S.; Moreno, J.; Comas, J.; Rodriguez-Roda, I.; Barceló, D. (2012). Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240: 64-69.

Doney, S. C.; Fabry, V. J.; Feely, R. A.; Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1: 169-192.

Doney, S. C.; Ruckelshaus, M.; Duffy, J. E.; Barry, J. P.; Chan, F.; English, C. A.; Galindo, H. M.; Grebmeier, J. M.; Hollowed, A. B.; Knowlton, N.; Polovina, J.; Rabalais, N. N.; Sydeman, W. J.; Talley, L. D. (2012). Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 4: 11-37.

Duarte, B.; Silva, G.; Costa, J. L.; Medeiros, J. P.; Azeda, C.; Sá, E.; Metelo, I.; Costa, M. J.; Caçador, I. (2014). Heavy metal distribution and partitioning in the vicinity of the discharge areas of Lisbon drainage basins (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of Sea Research*, 93: 101-111.

Duffus, J. H. (2002). “Heavy Metals”—A Meaningless term?. *Pure Applied Chemistry*, 74(5): 793-807.

Earth Systems Research Laboratory/National Oceanic and Atmospheric Administration (2013). Disponível em: <http://co2now.org/>. Consulta efetuada em 22 de janeiro de 2014.

Ellis, J. B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environmental Pollution*, 144(1): 184-189.

EFSA (2010). Scientific Opinion on preparation of a guidance document on pesticide exposure assessment for workers, operators, bystanders and residents. *EFSA Journal*, 8(2): 1501. 65 pp.

EFSA (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10(12): 2985. 241 pp.

EFSA (2014a). Call for continuous collection of chemical contaminants occurrence data in food and feed. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/datex101217.htm>. Consulta efetuada em 2 de Julho de 2014.

EFSA (2014b). *Bisphenol A*. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm>. Consulta efetuada em 24 de Março de 2014.

EPA (2007a). *Inorganic arsenic TEACH chemical summary*. U.S. EPA, USA, 20p.

EPA (2007b). *Method 7473 (SW-846): Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry*. Revision 0. Disponível em: <http://www.epa.gov/sam/pdfs/EPA-7473.pdf>. Consulta efetuada em 29 de Julho de 2014.

EOL (2014). *Dicentrarchus labrax*. Disponível em: <http://eol.org/pages/224729/details>. Consulta efetuada em 20 de Abril de 2014.

FAO (2008). *Climate Change: Implications for Food Safety*. FAO, Rome, 49p.

FAO (2009). *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 530 – Climate change implications for fisheries and aquaculture. Overview of current scientific knowledge. FAO, Rome, 212p.

FAO (2014a). *Fishery Statistical Collections – Consumption of Fish and Fishery Products*. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-consumption/en>. Consulta efetuada em 2 de Julho de 2014.

FAO (2014b). The state of world fisheries and aquaculture – opportunities and challenges. <http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>

FAO (2014c). *Species Fact Sheets*. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en>. Consulta efetuada em 20 de Abril de 2014.

FAO (2014d). *Part 2. Biology and life history*. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/x3980e/x3980e05.htm#bm05.2>. Consulta efetuada em 20 de Abril de 2014.

FAO (2014e). Cultured Aquatic Species Information Programme. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en. Consulta efetuada em 20 de Abril de 2014.

Farrel, P.; Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177: 1-3.

Fatta, D.; Nikolaou, A.; Achilleos, A.; Meriç, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(6): 515-533.

Fatta-Kassinou, D. (2010). K. Kummerer, Pharmaceuticals in the environment: source, fate, effects and risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2): 519-521.

Ferguson, P. J.; Bernot, M. J.; Doll, J. C.; Lauer, T. E. (2013). Detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in near-shore habitats of southern Lake Michigan. *Science of the Total Environment*, 458-460: 187-196.

Ferreira, M.; Caetano, M.; Antunes, P.; Costa, J.; Gil, O.; Bandarra, N.; Pousão-Ferreira, P.; Vale, C.; Reis-Henriques, M. A. (2010). Assessment of contaminants and biomarkers of exposure in wild and farmed seabass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(4): 579–588.

Figueira, E.; Cardoso, P.; Freitas, R. (2012). *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: Toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 156(2): 80-86

Fish Base (2014). *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) European seabass. Disponível em: <http://fishbase.org/summary/Dicentrarchus-labrax.html>. Consulta efetuada em 20 de Abril de 2014.

Frias, J. P. G. L.; Sobral, P.; Ferreira, A. M. (2010). Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11): 1988-1992.

Gates, A. E.; Blauvelt, R. P. (2011). *Encyclopedia of pollution*. New York: Facts on file, 823 pp.

Giusti, A.; Joaquim-Justo, C. (2013). Esterification of vertebrate like steroids in molluscs: A target of endocrine disruptors?. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 158(4): 187–198.

Gogina, M.; Darr, A.; Zettler, M. L. (2014). Approach to assess consequences of hypoxia disturbance events for benthic ecosystem functioning. *Journal of Marine Science*, 129: 203-213.

Greco, L.; Serrano, R.; Blanes, M. A.; Serrano, E.; Capri, E. (2010). Bioaccumulation markers and biochemical responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) raised under different environmental conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(1): 38–45.

Gros, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 70(4): 678-690.

Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2012). Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248: 104-121.

Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2013). Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1292: 173-188.

Harris, R. C.; Bodaly, R. A. D. (1998). Temperature, growth and dietary effects on fish mercury dynamics in two Ontario lakes. *Biogeochemistry*, 40(2-3): 175-187.

Hedgespeth, M. L.; Sapozhnikova, Y.; Pennington, P.; Clum, A.; Fairey, A.; Wirth, E. (2012). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Science of the Total Environment*, 437: 1-9.

Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernandez-Alba, A. R.; Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2): 334-342.

Herrroth, B.; Baden, S.; Thorndyke, M.; Dupont, S. (2011). Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. *Aquatic Toxicology*, 103(3-4): 222-224.

Hill, M. K. (2010). *Understanding Environmental Pollution*. New York: Cambridge University Press, 560 pp.

Hofmann, A. F.; Peltzer, E. T.; Waltz, P. M.; Brewer, P.G. (2011). Hypoxia by degrees: Establishing definitions for a changing ocean. *Deep-Sea Research I*, 58(12): 1212-1226.

Houde, M.; Berryman, D.; Lafontaine, Y. D.; Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, 479-480: 48-56.

Hsieh, C. Y.; Yang, L.; Kuo, W. C.; Zen, Y. P. (2013). Efficiencies of freshwater and estuarine constructed wetlands for phenolic endocrine disruptor removal in Taiwan. *Science of the Total Environment*, 463-464: 182-191.

Huang, S. S.-Y.; Strathe, A. B.; Fadel, J. G.; Lin, P.; Liu, T.-Y.; Hung, S. S. O. (2012). Absorption, distribution, and elimination of graded oral doses of methylmercury in juvenile white sturgeon. *Aquatic Toxicology*, 122-123: 163-171.

Huerta, B.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2012). Pharmaceuticals in biota in the aquatic environmental: analytical methods and environmental implications. *Analytical e Bioanalytical Chemistry*, 404(9): 2611-2624.

Huerta, B.; Marti, E.; Gros, M.; López, P.; Pompêo, M.; Armengol, J.; Barceló, D.; Balcázar, J. L.; Rodriguez-Mozaz, S.; Marcé, R. (2013a). Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Science of the Total Environment*, 456-457: 161-170.

Huerta, B.; Jakimska, A.; Gros, M.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2013b). Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288: 63-72.

IPCC (2007). *Climate Change 2007 – The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the International Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, USA. 996 pp.

IPCC (2013). *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the International Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, USA. 1535 pp.

INE (2013). *Estatísticas da Pesca 2012, Edição 2013*, Lisboa: Portugal. 133 pp.

Islam, M.S.; Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on costal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48(7-8): 624-649.

Ivar do Sul, J. A.; Costa, M. F.; Barletta, M.; Cysneiros, F. J. A. (2013). Pelagic microplastics around an archipelago of the Equatorial Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 75(1-2): 305-309.

Ivar do Sul, J. A.; Costa, M. F. (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution*, 185: 352-364.

Iyer, A.; Mody, K.; Jha, B. (2005). Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, 50(3): 340-343.

Jelic, A.; Petrovic, M.; Barceló, D. (2009). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 80(1): 363-371.

Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(1): 113-130.

Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. (2005). Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(4): 401-427.

Jonkers, N.; Kohler, H. P. E.; Dammhauser, A.; Giger, W. (2009). Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Environmental Pollution*, 157(3): 714-723.

K'Oreje, K. O.; Demeestere, K.; De Wispelaere, P.; Vergeynst, L.; Dewulf, J.; Langenhove, H. V. (2012). From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi river basin, Kenya. *Science of the Total Environment*, 437: 153-164.

Karouna-Renier, N. K.; Snyder, R. A.; Allison, J. G.; Wagner, M. G.; Rao K. R. (2007). Accumulation of organic and inorganic contaminants in shellfish collected in estuarine waters near Pensacola, Florida: Contamination profiles and risk to human consumers. *Environmental Pollution*, 145(2): 474-488.

Karydis, M.; Kitsiou, D. (2013). Marine water quality monitoring: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2): 23-36.

Kehrig, H. A.; Seixas, T. G.; Baêta, A. P.; Malm, O.; Moreira, I. (2010). Inorganic and methylmercury: Do they transfer along a tropical coastal food web?. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12): 2350-2356.

Kim, E.; Mason, R. P.; Bergeron, C. M. (2008). A modeling study on methylmercury bioaccumulation and its controlling factors. *Ecological Modelling*, 218(3-4): 267-289.

Kim, Y. R.; Harden, F. A.; Toms, L. M. L.; Norman, R. E. (2014). Health consequences of exposure to brominated flame retardants: A systematic review. *Chemosphere*, 106: 1-19.

Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Foekema, E. M. (2014). Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution*, 187: 49-54.

Kummerer, K. (2010). Pharmaceuticals in the environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35: 57-75.

Kyranas, V. R.; Lougovois, V. P. (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3): 319-328.

Law, R. J.; Covaci, A.; Harrad, S.; Herzke, D.; Abdallah, M. A. E.; Fernie, K.; Toms, L. M. M.; Takigami, H. (2014). Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. *Environment International*, 65: 147-158.

Lawson, N. M.; Mason, R. P.; Laporte, J. M. (2000). The fate and transport of mercury, methylmercury, and other trace metals in Chesapeake Bay tributaries. *Water Research*, 35(2): 501-515.

Le Bris, H.; Pouliquen, H. (2004). Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 48(5-6): 434-440.

Leo, A. D.; Cardellicchio, N.; Giandomenico, S.; Spada, L. (2010). Mercury and methylmercury contamination in *Mytilus galloprovincialis* from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy): Risk evaluation for consumers. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11): 3131-3136.

Levin, S. (2013). *Encyclopedia of biodiversity*, 2ª edição. USA: Academic Press. 851 pp.

Li, Z.; Zhang, H.; Gibson, M.; Li, J. (2012). An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay. *Toxicology in vitro*, 26(6): 769-774.

Liu, J.; Goyer, A.; Waalkes, M. P. (2008). Toxic Effects of Metals. In: *Toxicology – The basic science of poisons*. 7th edition, Ed. by KLAASSEN, C. D. – McGraw-Hill: 931-979.

Liu, J. L.; Wong, M. H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environmental International*, 59: 208-224.

- Loffredo, E.; Gattullo, C. E.; Traversa, A.; Senesi, N. (2010). Potential of various herbaceous species to remove the endocrine disruptor bisphenol A from aqueous media. *Chemosphere*, 80(11): 1274-1280.
- Lusher, A. L.; McHugh, M.; Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2): 94-99.
- Magalhães, M. C.; Costa, V.; Menezes, G. M.; Pinho, M. R.; Santos, R. S.; Monteiro, L. R. (2007). Intra- and inter-specific variability in total and methylmercury bioaccumulation by eight marine fish species from the Azores. *Marine Pollution Bulletin*, 54(10): 1654-1662.
- Maria, V. L.; Ahmad, I.; Oliveira, M.; Serafim, A.; Bebianno, M. J.; Pacheco, M.; Santos, M. A. (2009). Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7): 1861–1870.
- Marques, A.; Nunes, M. L.; Moore, S. K.; Strom, M. S. (2010). Climate change and seafood safety: Human health implication. *Food Research International*, 43(7): 1766-1779.
- Martín-Díaz, M. L.; Gagné, F.; Blaise, C. (2009). The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2): 237-242.
- Matoo, O. B.; Ivanina, A. V.; Ullstad, C.; Beniash, E.; Sokolova, I. N. (2013). Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 164(4): 545-553.
- Matozzo, V.; Marin, M. G. (2011). Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship?. *Information Systems Journal*, 8(1): 70–77.
- Maurice-Bourgoin, L.; Quiroga, I.; Chincheros, J.; Courau, P. (2000). Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *The Science of the Total Environment*, 260(1-3): 73-86.
- McBride, M.; Wyckoff, J. (2002). Emerging liabilities from pharmaceutical and personal care products. *Environmental Claims Journal*, 14(2): 175-189.
- McKinlay, R.; Plant, J. A.; Bell, J. N. B.; Voulvoulis, N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environmental International*, 34(2): 168-183.

- Microplastics in oceans [Editorial] (2011). *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1589-1591.
- Mieiro, C. L.; Pacheco, M.; Duarte, A. C.; Pereira, M.E. (2011). Fish consumption and risk of contamination by mercury – Considerations on the definition of edible parts based on the case study of European sea bass. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12): 2850-2853
- Muñoz, O.; Devesa, V.; Suñer, M. A.; Vélez, D.; Montoro, R.; Urieta, I.; Macho, M. L.; Jalón, M. (2000). Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9): 4369-4376.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) – Disponível em: <http://www.noaa.gov/>. Consulta efetuada em 16 de Fevereiro de 2014.
- Noone, K. J.; Sumaila, U. R.; Diaz, R. J. (2013). *Managing Ocean Environments in a Changing Climate*. USA: Elsevier, 343 pp.
- Nye, J. (2010). *Climate change and its effects on ecosystem, habitats and biota*. State of the gulf of maine report
- Onsanit, S.; Chen, M.; Ke, C.; Wang, W.-X. (2012). Mercury and stable isotope signatures in caged marine fish and fish feeds. *Journal of Hazardous Materials*, 203-204: 13-21.
- O’Shea, O. R.; Hamann, M.; Smith, W.; Taylor, H. (2014). Predictable pollution: An assessment of weather balloons and associated impacts on the marine environment – An example for the great barrier reef, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2): 61-68.
- Pastor, D.; Boix, J.; Fernandez, V.; Albaiges, J. (1996). Bioaccumulation of organochlorinated contaminants in three estuarine fish species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax*). *Marine Pollution Bulletin*, 32(3): 257-262.
- Patel, E.; Reynolds, M. (2013). Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*, 222(3): 265-272.
- Philander, S. G. (2008). *Encyclopedia of global warming and climate change*. United Kingdom: Sage Publications. 1136 pp.
- Pizarro-Barraza, C.; Gustin, M. S.; Peacock, M.; Miller, M. (2014). Evidence for sites of methylmercury formation in a flowing water system: Impact of anthropogenic barriers and water management. *Science of the Total Environment*, 478: 58-69.

Plastic Europe – *Plastic – the Facts 2013, An analysis of European latest plastics production, demand and waste data*. Disponível em: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2013.aspx?FolID=2>. Consulta efetuada em 23 de Março de 2014.

Poma, G.; Volta, P.; Roscioli, C.; Bettinetti, R.; Guzzella, L. (2014). Concentrations and trophic interactions of novel brominated flame retardants, HBCD, and PBDEs in zooplankton and fish from Lake Maggiore (Northern Italy). *Science of the Total Environment*, 481: 401-408.

Porte, C.; Janer, G.; Lorusso, L. C.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Cajaraville, M. P.; Fossi, M. C.; Canesi, L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(3): 303-315.

Pulkrabová, J.; Hrádková, P.; Hajslová, J.; Poustka, J.; Nápravníková, M.; Poláček, V. (2009). Brominated flame retardants and other organochlorine pollutants in human adipose tissue samples from the Czech Republic. *Environmental International*, 35(1): 63-68.

Rabouille, C.; Conley, D. J.; Dai, M. H.; Cai, W. J.; Chen, C. T. A.; Lansard, B.; Green, R.; Yin, K.; Harrison, P. J.; Dagg, M.; McKee, B. (2008). Comparison of hypoxia among four river-dominated ocean margins: The Changjiang (Yangtze), Mississippi, Pearl, and Rhône rivers. *Continental Shelf Research*, 28(12): 1527–1537.

Rahman, M. F.; Yanful, E. K.; Jasim, S. Y.; Bragg, L. M.; Servos, M. R.; Ndongue, S.; Borikar, D. (2010). Advanced oxidation treatment of drinking water: part I. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds from lake Huron water. *Ozone: Science & Engineering*, 32(5): 217-229.

Range, P.; Chicharo, M. A.; Ben-Hamadou, R.; Piló, D.; Matias, D.; Joaquim, S.; Oliveira, A. P.; Chicharo, L. (2011). Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased pCO₂ and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 396(2): 177–184.

Riva, C.; Porte, C.; Binelli, A.; Provini, A. (2010). Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, 152(2): 175-181.

Ronisz, D.; Finne, E. F.; Karlsson, H.; Forlin, L. (2004). Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquatic Toxicology*, 69(3): 229–245.

Rosa, R.; Marques, A.; Nunes, M. L. (2012a). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4(3): 163-177.

Rosa, R.; Pimentel, M. S.; Boavida-Portugal, J.; Teixeira, T.; Trubenbach, K.; Diniz, M. (2012b). Ocean Warming Enhances Malformations, Premature Hatching, Metabolic Suppression and Oxidative Stress in the Early Life Stages of a Keystone Squid. *PLoS ONE*, 7(6): e38282.

Rosa, R.; Seibel, B. A. (2008). Synergistic effects of climate-related variables suggest future physiological impairment in a top oceanic predator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52): 20776-20780.

Ruttens, A.; Blanpain, A. C.; Temmerman, L. D.; Waegeneers, N. (2012). Arsenic speciation in food in Belgium Part 1: Fish, molluscs and crustaceans. *Journal of Geochemical Exploration*, 121: 55-61.

Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.; Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 45-95.

Santos, L. H. M. L. M.; Gros, M.; Rodriguez-Mozaz, S.; Delerue-Matos, C.; Pena, A.; Barceló, D.; Montenegro, M. C. B. S. M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461-462: 302-316.

Sarmiento, A.; Guilhermino, L.; Afonso, A. (2004). Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(5): 489-498.

Sarmiento, A. M.; Nieto, J. M.; Casiot, C.; Elbaz-Poulichet, F.; Egal, M. (2009). Inorganic arsenic speciation at river basin scales: The Tinto and Odiel Rivers in the Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Environmental Pollution*, 157(4): 1202-1209.

Scerbo, R.; Barghigiani, C. (1998). Organic mercury determination in fish samples using an automatic mercury analyser. *Environmental Technology*, 19(3): 339-342.

Schnitzler, J. G.; Thomé, J. P.; Lepage, M.; Das, K. (2011). Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Science of the Total Environment*, 409(9): 3680-3686.

Schulz, M.; Neumann, D.; Fleet, D. M.; Matthies, M. (2013). A multi-criteria evaluation system for marine litter pollution based on statistical analyses of OSPAR beach litter monitoring time series. *Marine Environmental Research*, 92: 61-70.

Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185: 77-83.

Sirés, I.; Brillas, E. (2012). Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. *Environment International*, 40: 212-229.

Sizmur, T.; Canário, J.; Gerwing, T. G.; Mallory, M. L.; O'Driscoll, N. J. (2013). Mercury and methylmercury bioaccumulation by polychaete worms is governed by both feeding and ecology and mercury bioavailability in coastal mudflats. *Environmental Pollution*, 176: 18-25.

Sjodin, A.; Patterson, D. G.; Bergman, A. (2003). A review on human exposure to brominated flame retardants—particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International*, 29(6): 829-839.

Snyder, S. A.; Wert, E. C.; Rexing, D. J.; Zegers, R. E.; Drury, D. D. (2006). Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 28(6): 445-460.

Spada, L.; Annicchiarico, C.; Cardellicchio, N.; Giandomenico, S.; Leo, A. D. (2012). Mercury and methylmercury concentrations in Mediterranean seafood and surface sediments, intake evaluation and risk for consumers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 215(3): 418–426.

Spicer, J. L.; Raffo, A.; Widdicombe, S. (2007). Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. *Marine Biology*, 151(3): 1117-1125.

Stapleton, H. M.; Misenheimer, J.; Hoffman, K.; Webster, T. F. (2014). Flame retardant associations between children's handwipes and house dust. *Chemosphere*, 116: 54-60.

Steele, J. H.; Turekian, K. K.; Thorpe, S. A. (2001). *Encyclopedia of ocean sciences*. Academic Press. 3399 pp.

Stieger, G.; Scheringer, M.; Ng, C. A.; Hungerbühler, K. (2014). Assessing the persistence, bioaccumulation potential and toxicity of brominated flame retardants: Data availability and quality for 36 alternative brominated flame retardants. *Chemosphere*, 116: 118-123.

- Storelli, M. M.; Giacomini-Stuffler, R.; Marcotrigiano, G. O. (2002). Total and methylmercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 44(12): 1354-1358.
- Talmage, S. C.; Gobler, C. J. (2010). Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40): 17246-17251.
- Talmage, S. C.; Gobler, C. J. (2011). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of Northwest Atlantic bivalves. *PLoS ONE*, 6(10): e26941.
- Thomsen, C.; Stigum, H.; Frohaug, M.; Broadwell, S. L.; Becher, G.; Eggesbo, M. (2010). Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environment International*, 36(1): 68-74.
- Valcárcel, Y.; Alonso, S. G.; Rodríguez-Gil, J. L.; Maroto, R. R.; Gil, A.; Catalá, M. (2011). Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere*, 82(7): 1062-1071.
- Vandenberg, L. N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2): 139-177.
- Venkatesan, A. K.; Halden, R. U. (2014). Brominated flame retardants in U.S. biosolids from the EPA national sewage sludge survey and chemical persistence in outdoor soil mesocosms. *Water Research*, 55: 133-142.
- Verger, P.; Houdart, S.; Marette, S.; Roosen, J.; Blanchemanche, S. (2007). Impact of a risk-benefit advisory on fish consumption and dietary exposure to methylmercury in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 48(3): 259–269.
- Vianello, A.; Boldrin, A.; Guerriero, P.; Moshino, V.; Rella, R.; Sturaro, A.; Da Ros, L. (2013). Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130: 54-61.
- Vitousek, P. M.; Mooney, H. A.; Lubchenco, J.; Melillo, J. M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325): 494-499.

- Widdicombe, S.; Spicer, J. I. (2008). Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366(1-2): 187–197.
- Wijekoon, M. P. A.; Parrish, C. C.; Mansour, A. (2014). Effect of dietary substitution of fish oil with flaxseed or sunflower oil on muscle fatty acid composition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at varying temperatures. *Aquaculture*, 433: 74-81.
- Williams, A. L.; Desesso, J. M. (2010). The potential of selected Brominated Flame Retardants to affect neurological development. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 13(5): 411-448.
- Wit, C. A. D.; Herzke, D.; Vorkamp, K. (2014). Brominated flame retardants in the Arctic environment — trends and new candidates. *Science of the Total Environment*, 408(15): 2885-2918.
- Wright, S. L.; Thompson, R. C.; Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178: 483-492.
- Wu, H.; Ding, Z.; Liu, Y.; Liu, J.; Yan, H.; Pan, J.; Li, L.; Lin, G.; Lu, H. (2011). Methylmercury and sulfate-reducing bacteria in mangrove sediments from Jiulong River Estuary, China. *Journal of Environmental Sciences*, 23(1): 14-21.
- Wu, J.; Zhang, Y.; Luo, X.; She, Y.; Yu, L.; Chen, S.; Mai, B. (2012). A review of polybrominated diphenyl ethers and alternative brominated flame retardants in wildlife from China: Levels, trends, and bioaccumulation characteristics. *Journal of Environmental Sciences*, 24(2): 183–194.
- Yamamura, S.; Amachi, S. (2014). Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118 (1): 1-9.
- Zhang, W., Huang, L.; Wang, W. X. (2011). Arsenic bioaccumulation in a marine juvenile fish *Terapon jarbua*. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4): 582-588.
- Zhang, W., Huang, L.; Wang, W. X. (2012). Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in a marine juvenile fish *Terapon jarbua* after waterborne and dietborne exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 221-222: 162-169.
- Zhang, D.; Gersberg, R. M.; Ng, W. J.; Tan, S. K. (2014). Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 184: 620-639.

Zhu, A.; Zhang, W.; Xu, Z.; Huang, L.; Wang, W. X. (2013). Methylmercury in fish from the South China Sea: Geographical distribution and biomagnifications. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2): 437-444.

Zouboulis, A. I.; Loukidou, M. X.; Matis, K. A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39(8): 909-916.

Anexos

Anexo I – Técnicas analíticas

A) Determinação do teor de mercúrio total

Material e equipamentos:

- Material de uso corrente no Laboratório
- Balança com precisão de 0,0001g (Mettler Toledo, AG 204, Suíça)
- Analisador automático de mercúrio (Leco, AMA 254, EUA)
- Barquinhas de níquel

Reagentes e soluções:

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

Solução padrão:

A solução padrão (100 mL) de concentração 10 µg mL⁻¹, foi preparada a partir de uma solução de mercúrio (1000 mg L⁻¹), utilizando como solvente ácido nítrico a 1%. A partir desta solução de 10 µg mL⁻¹ foi preparada uma solução padrão de 0,1 µg mL⁻¹ e outra de 0,005 µg mL⁻¹.

Procedimento:

Na determinação do mercúrio total, pesaram-se cerca de 5 mg de amostra, previamente liofilizada, para uma barquinha. Adicionou-se um pouco de óxido de alumínio até cobrir a amostra, de modo a reduzir as interferências do aparelho. A barquinha foi colocada no analisador automático de mercúrio e efectou-se a leitura. Entre cada leitura a barquinha era limpa manualmente. No final das leituras a barquinha era descontaminada em mufla a 700 °C, durante uma hora.

Ensaio em branco:

Os ensaios em branco foram efetuados com a barquinha limpa e vazia.

Curva de calibração:

A curva de calibração utilizada encontra-se inserida no software do analisador automático de mercúrio (0,10; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00; 20,00; 30,00; 36,00 ng de mercúrio).

Tratamento de resultados através do Software:

O tratamento de resultados foi realizado através do software do analisador automático de mercúrio e a concentração de mercúrio (mg kg^{-1}), foi calculada através da seguinte relação:

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

Sendo:

A – Leitura fornecida pelo analisador em ng;

m – Massa de amostra analisada no aparelho em mg.

B) Determinação do teor de mercúrio orgânico (MeHg)

Material e equipamentos:

- Material de uso corrente no Laboratório
- Balança com precisão de 0,0001g (Mettler Toledo, AG 204, Suíça)
- Centrífuga (Sigma, 3K 30, Alemanha)
- Tubos de centrífuga em FEP com tampa de rosca em ETFE (Nalgene)
- Vortex (Heidolph, REAX 2000, Alemanha)
- Analisador automático de mercúrio (Leco, AMA 254, EUA)
- Barquinhas de níquel

Reagentes e soluções:

- Ácido bromídrico 47 % (Merck)
- Tolueno $\geq 99,8$ % (Roth)
- Solução de cisteína (1 % cisteína em 12,5 % Na_2SO_4 e 0,8 % de NaCH_3CO_2)
- Ácido nítrico a 65 % (Merck)
- Solução de ácido nítrico 1 % (v/v)
- Solução padrão de mercúrio 1000 mg L^{-1} (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico)

Solução Padrão:

A solução padrão (100 mL) de concentração $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparada a partir de uma solução de mercúrio (1000 mg L^{-1}), utilizando como solvente ácido nítrico a 1%. A partir desta solução de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada uma solução padrão de $0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra de $0,005 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Procedimento:

Todo o processo descrito de seguida foi realizado na hotte e com material descontaminado.

Para a determinação da concentração de MeHg numeraram-se trêsavas de tubos de centrífuga (Nalgene) e pesaram-se 100 mg de amostra previamente liofilizada para a primeira leva de tubos. Adicionaram-se 10 mL de ácido bromídrico a 47% a cada tubo da primeira leva e deixou-se a digerir a amostra por 30 minutos. Enquanto isso, preparou-se a solução de cisteína (NaSO_4 ; NaCH_3CO_2 ; Anexo I-C). Após a digestão, agitaram-se bem os tubos, manualmente e no vortex por 30 segundos cada um. Posteriormente adicionaram-se 20 mL de tolueno e agitou-se novamente a solução, manualmente e no vortex (30 segundos cada). De seguida centrifugaram-se os tubos (10000 rpm, 15 min., 10 °C).

Aos tubos da segunda leva foram adicionados 6 mL da solução de cisteína e 15 mL da fase superior (orgânica) dos tubos que sofreram centrifugação. Após a primeira centrifugação, adicionaram-se 15 mL de tolueno (na primeira leva) tendo sido agitados novamente, manualmente e no vortex por 30 segundos cada. Estes sofreram uma nova centrifugação (10000 rpm, 15 min., 10 °C). Retiraram-se outros 15 mL da fase superior (orgânica) dos tubos da primeira leva para os tubos correspondentes da segunda leva.

Centrifugaram-se os tubos da segunda leva (10000 rpm, 15 min., 10 °C) e de seguida foram retirados 3 mL da fase inferior (cisteína) para os tubos da terceira leva.

Finalmente, a concentração foi lida num analisador automático de mercúrio (LECO, AMA 254, EUA) onde foram colocados 100 µL de solução. O processo de leitura é idêntico ao descrito no anexo I-A.

Ensaio em branco:

Os ensaios em branco foram efetuados através da solução descrita acima, exceto o passo da adição de amostra, que não se efetua.

Curva de calibração:

A curva de calibração utilizada encontra-se inserida no software do analisador automático de mercúrio (0,10; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00; 20,00; 30,00; 36,00 ng de mercúrio).

Tratamento de resultados através do Software:

O tratamento de resultados foi realizado através do software do analisador automático de mercúrio. Estes foram dados através da média aritmética de, pelo menos, duas determinações realizadas (replicados).

O cálculo da concentração de mercúrio orgânico, expresso em percentagem, é dada pela seguinte relação:

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

Sendo:

V_a – Volume de amostra analisada no aparelho em µL;

a – Leitura fornecida pelo analisador da amostra em ng;

b – Leitura fornecida pelo analisador do branco em ng;

m – Massa de amostra analisada no aparelho, em g;

c – Leitura fornecida pelo analisador de mercúrio total em mg kg⁻¹ de peso seco.

O cálculo da concentração de mercúrio orgânico (Hg_{Org}), expresso em mg kg⁻¹ peso fresco, é dado pela relação abaixo indicada:

$$\frac{C \times Hg_{Org} \%}{100}$$

Sendo:

C – concentração de mercúrio total fornecida pelo aparelho em mg kg⁻¹ de peso fresco;

Hg_{Org} % - percentagem de mercúrio orgânico na amostra;

E o cálculo da concentração de mercúrio inorgânico (Hg_{Inorg}), expresso em mg kg⁻¹, é dado pela relação:

$$Hg_T - Hg_{Org}$$

Sendo:

Hg_T - concentração de mercúrio total na amostra em mg kg⁻¹ peso fresco;

Hg_{Org} - concentração de mercúrio orgânico na amostra em mg kg⁻¹ peso fresco;

C) Preparação da solução de Cisteína

Material e equipamento:

- Material de uso corrente no Laboratório
- Balança com precisão de 0,0001g (Mettler Toledo, AG 204, Suíça)
- Sistema de purificação de água (Merck Millipore, Milli-Q Integral 3, Espanha)

Soluções e reagentes:

- Cloridrato monohidratado de L-cisteína $\geq 99,0$ % (Merck)
- Sulfato de sódio anidro $\geq 99,99$ % (Merck)
- Acetato de sódio $\geq 99,99$ % (Merck)
- Água milli-Q

Num balão volumétrico de 100 mL adicionaram-se 1 g de cisteína, 0,8 g de acetato de sódio, 12,5 g de sulfato de sódio e água milli-Q até perfazer o volume. Agitou-se até total dissolução da solução.

D) Descontaminação de material

Material e equipamento:

- Material de uso corrente no Laboratório
- Placa de aquecimento (Heidolph MR Hei-Standard, Alemanha)
- Sistema de purificação de água (Merck Millipore, Milli-Q Integral 3, Espanha)

Soluções e reagentes:

- Ácido nítrico a 65 % (Merck)
- Água milli-Q

Na descontaminação do material, todas as soluções foram colocados nos respectivos frascos de resíduos. De seguida todo o material era passado muito bem por água corrente e colocado na máquina de lavar. Foi preparada uma solução de ácido nítrico a 20%, com ácido nítrico a 65% e água morna, para descontaminar todo o material durante a noite. Após este processo despejava-se a solução de ácido nítrico em frascos de resíduos e todo o material era passado por água da torneira e por fim água milli-Q.

Anexo II – Resultados

Tabela 2.1 – Concentrações médias de Hg total e MeHg (mg kg^{-1} peso fresco; entre parêntesis encontra-se a % de desvio) e relação MeHg/Hg total média e respetivos desvios padrão, para cada um dos três cenários, durante a fase de exposição a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0.05$).

	Dias de amostragem	Hg total		MeHg		MeHg/Hg total	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Cenário 1	0	0,10 ^a	0,04 (40,0 %)	0,08 ^a	0,03 (37,5 %)	81,4 ^a	0,9 (1,1 %)
	7	0,13 ^a	0,06 (46,2 %)	0,10 ^a	0,05 (50,0 %)	80,6 ^a	1,5 (1,9 %)
	14	0,10 ^a	0,03 (30,0 %)	0,08 ^a	0,02 (25,0 %)	79,5 ^a	1,6 (2,0 %)
	21	0,12 ^a	0,01 (8,3 %)	0,10 ^a	0,01 (10,0 %)	79,8 ^a	1,6 (2,0 %)
	28	0,11 ^a	0,01 (9,1 %)	0,08 ^a	0,01 (12,5 %)	75,2 ^b	1,3 (1,7 %)
Cenário 2	0	0,10 ^a	0,04 (40,0 %)	0,08 ^a	0,03 (37,5 %)	81,4 ^a	0,9 (1,1 %)
	7	0,30 ^{ab}	0,14 (46,7 %)	0,24 ^a	0,12 (50,0 %)	81,0 ^a	1,3 (1,6 %)
	14	0,60 ^{bc}	0,29 (48,3 %)	0,48 ^{ab}	0,23 (47,9 %)	80,8 ^a	1,8 (2,2 %)
	21	0,80 ^c	0,14 (17,5 %)	0,67 ^b	0,12 (17,9 %)	83,2 ^a	1,2 (1,4 %)
	28	1,47 ^d	0,25 (17,0 %)	1,23 ^c	0,24 (19,5 %)	83,4 ^a	4,1 (4,9 %)
Cenário 3	0	0,10 ^a	0,04 (40,0 %)	0,08 ^a	0,03 (37,5 %)	81,4 ^a	0,9 (1,1 %)
	7	0,42 ^a	0,10 (23,8 %)	0,35 ^a	0,08 (22,9 %)	84,3 ^a	2,7 (3,2 %)
	14	0,71 ^b	0,13 (18,3 %)	0,59 ^b	0,12 (20,3 %)	82,3 ^a	3,2 (3,9 %)
	21	1,14 ^c	0,17 (14,9 %)	0,98 ^c	0,16 (16,3 %)	85,7 ^a	2,4 (2,8 %)
	28	1,78 ^d	0,19 (10,7 %)	1,50 ^d	0,13 (8,7 %)	84,5 ^a	3,6 (4,3 %)

Tabela 2.2 – Concentrações médias de Hg total e MeHg (mg kg^{-1} peso fresco; entre parêntesis encontra-se a % de desvio) e relação MeHg/Hg total média e respectivos desvios padrão, para cada um dos três cenários, durante a fase de eliminação a MeHg. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas para cada cenário ($p < 0.05$).

	Dias de amostragem	Hg total		MeHg		MeHg/Hg total	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Cenário 1	28	0,11 ^a	0,01 (9,1 %)	0,08 ^a	0,01 (12,5 %)	75,2 ^a	1,3 (1,7 %)
	35	0,09 ^a	0,02 (22,2 %)	0,07 ^a	0,01 (14,3 %)	77,2 ^{ab}	1,3 (1,7 %)
	42	0,09 ^a	0,02 (22,2 %)	0,07 ^a	0,02 (28,6 %)	80,2 ^b	2,2 (2,7 %)
	49	0,12 ^a	0,04 (33,3 %)	0,09 ^a	0,03 (33,3 %)	74,6 ^a	1,8 (2,4 %)
	56	0,09 ^a	0,02 (22,2 %)	0,07 ^a	0,01 (14,3 %)	80,5 ^b	2,0 (2,5 %)
Cenário 2	28	1,47 ^a	0,25 (17,0 %)	1,23 ^a	0,24 (19,5 %)	83,4 ^a	4,1 (4,9 %)
	35	1,70 ^a	0,28 (16,5 %)	1,41 ^a	0,22 (15,6 %)	83,1 ^a	2,4 (2,9 %)
	42	1,39 ^a	0,26 (18,7 %)	1,19 ^a	0,23 (19,3 %)	86,1 ^a	2,6 (3,0 %)
	49	1,51 ^a	0,18 (11,9 %)	1,30 ^a	0,16 (12,3 %)	85,9 ^a	2,2 (2,6 %)
	56	1,52 ^a	0,46 (30,3 %)	1,27 ^a	0,39 (30,7 %)	83,7 ^a	1,4 (1,7 %)
Cenário 3	28	1,78 ^a	0,19 (10,7 %)	1,50 ^a	0,13 (8,7 %)	84,5 ^a	3,6 (4,3 %)
	35	1,97 ^a	0,43 (21,8 %)	1,76 ^a	0,43 (24,4 %)	89,2 ^a	3,9 (4,4 %)
	42	1,70 ^a	0,31 (18,2 %)	1,51 ^a	0,28 (18,5 %)	88,8 ^a	2,0 (2,3 %)
	49	1,79 ^a	0,11 (6,1 %)	1,57 ^a	0,06 (3,8 %)	87,9 ^a	3,7 (4,2 %)
	56	1,75 ^a	0,22 (12,6 %)	1,54 ^a	0,17 (11,0 %)	87,7 ^a	2,8 (3,2 %)