

# **Influência da bioacessibilidade do selénio, mercúrio e metilmercúrio na identificação do benefício/perigo associado ao consumo de Tintureira crua e cozinhada**

**Joana Patrícia da Silva Matos**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientador: Doutora Cláudia Isabel Medeiros Afonso, Investigadora do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

Coorientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

## **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.

- Doutora Cláudia Isabel Medeiros Afonso, Investigadora do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

## **Agradecimentos**

Cumpro-me primeiramente agradecer à Senhora Doutora Cláudia Afonso, Investigadora do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pela inextinguível disponibilidade no longo período que levou à conclusão do presente trabalho. Agradeço de igual modo a forma tão gentil com que me recebeu e me aconselhou na presente dissertação nunca deixando de me incentivar e confiar nas minhas capacidades. Foi sem dúvida um apoio incondicional que jamais esquecerei e pelo qual me sinto extremamente grata.

Agradeço ao IPMA pelo afável acolhimento, permitindo um contato direto com a área de investigação. De igual forma agradeço ao projeto ECsafeSEAFOOD (EC FP7, Grant Agreement N.º 311820) por ter financiado este trabalho, e ao Doutor António Marques que coordenou o projeto.

Agradeço ao Doutor Brito da DivOA - Divisão Oceanografia Ambiental e Bioprospeção do IPMA, pela ajuda na determinação do selénio.

À Dr.ª Helena e à Sra Margarida Muro, do IPMA, pela sua disponibilidade, ajuda e simpatia.

Desejo ainda agradecer a todas as pessoas que na conceção do meu trabalho diariamente comigo contataram com simpatia e boa disposição, facilitando a minha integração.

Agradeço à Sra Professora Dr.ª Luísa Louro Martins pelo seu apoio, carinho e acompanhamento ao longo de todo o meu percurso académico e também nesta etapa.

Agradeço também aos meus pais pelo investimento na minha formação académica por sempre me apoiarem e acreditarem em mim e nas minhas decisões. Também um obrigado muito especial aos meus avós por me apoiarem incondicionalmente desde sempre.

Por fim, agradeço aos meus amigos e colegas, que me acompanharam ao longo deste percurso académico, pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

## Glossário de abreviaturas

De seguida listam-se as abreviaturas utilizadas ao longo da dissertação, por ordem alfabética, seguidas do seu significado e na forma como são reconhecidas internacionalmente.

**BSA** – Albumina do soro bovino (Bovine Serum Albumin)

**DHA** – Ácido docosahexaenóico (Docosahexaenoic acid) (22:6  $\omega$ 3)

**DivAV** – Divisão de Aquacultura e Valorização

**CE** – Comissão Europeia

**EFSA** – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

**EPA** – Ácido eicosapentaenóico (Eicosapentaenoic acid) (20:5  $\omega$ 3)

**UE** – União Europeia

**FAO** – Organização para a Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**GI** – Gastrointestinal

**HBV<sub>Se</sub>** – Valor Benéfico de Selénio para a saúde (Selenium Health Benefit Value)

**Hg<sub>org</sub>** – Mercúrio Orgânico

**IPMA** – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

**NPN** – Azoto Não Proteico (*Non-Protein Nitrogen*)

**PTWI** – Ingestão Semanal Tolerável Provisória (*Provisional Tolerable Weekly Intake*)

**PUFAs** – Ácidos gordos polinsaturados (Polyunsaturated fatty acids)

**RDA** – Ingestão Alimentar Recomendada (*Recommended Dietary Allowances*)

**Sec** – Selenocisteína

**Sel** – Selenoenzima

**TWI** – Ingestão Semanal Tolerável (*Tolerable weekly intake*)

**WHO** – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

## Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo identificar o perigo associado ao consumo de tintureira crua e cozinhada atendendo à bioacessibilidade do Se, Hg e MeHg, utilizando para tal um modelo de digestão *in vitro*.

Verificou-se que após os tratamentos culinários ocorreu um aumento relativo do teor de Se, Hg e MeHg, em que a tintureira grelhada apresentou os teores mais elevados.

Os resultados da avaliação da bioacessibilidade do Se, Hg e MeHg na tintureira crua e sujeita a diferentes tratamentos culinários, indicaram que a percentagem de Se bioacessível foi superior a 83% (tintureira grelhada), mas o Hg e MeHg apresentaram uma bioacessibilidade baixa, nomeadamente na tintureira grelhada, de 52 e 53%, respetivamente.

A avaliação do perigo associado ao consumo de tintureira com base no teor de MeHg na amostra inicial e após simulação da digestão humana foi realizada. Considerando um adulto de 60 kg e uma criança de 20 kg de peso corporal, verificou-se que todas as amostras analisadas excederam o PTWI e TWI estabelecidos pela FAO/WHO e pela EFSA, respetivamente. Por outro lado, o Valor Benéfico do Selénio para a Saúde ( $HBV_{Se}$ ) calculado foi negativo indicando que o consumo desta espécie pode representar um risco.

**Palavras-chave:** tintureira, tratamento culinário, selénio, metilmercúrio, bioacessibilidade, identificação do perigo.

## **Abstract**

This study aimed to identify the hazard associated with raw and cooked blue shark consumption given the bioaccessibility of Se, Hg and MeHg, using *in vitro* digestion method.

After culinary treatments were verified, an increase of Se, Hg and MeHg content, where in grilled blue shark was the one displaying highest values.

The results of the bioaccessibility assessment of Se, Hg and MeHg in raw and cooked blue shark showed that Se bioaccessibility was higher than 83% (grilling treatment), but for Hg and MeHg showed a lower bioaccessibility, namely on grilled blue shark, which was the one displaying lowest values of 52 and 53%, respectively.

A hazard assessment of raw and cooked blue shark consumption on the basis of the MeHg content on initial sample and after human digestion simulation was carried out. Considering an adult with 60 kg and infant 20 kg body weight, showed that all samples analysed exceeded the PTWI and TWI ratios established by FAO/WHO and EFSA, respectively. However, all Se-Health Beneficial Values were negative, thus meaning a high MeHg health risk in the consumption of this species.

**Keywords:** blue shark, culinary treatment, selenium, methylmercury, bioaccessibility, hazard identification.

## Extended Abstract

Fish is a nutrient-rich food source that is widely available, being its consumption advised due to several nutritional benefits. Indeed, it is an important source of proteins of high biological value, long chain fatty acids, namely EPA e DHA, some vitamins and essential minerals (like selenium). However, fish is also the main route of exposure in diet to some contaminants, particularly methylmercury, that can represents a risk to human health. Additionally, selenium is a natural component of fish and in recent decades there have been progress in knowledge and understanding of the biological role of this component and its importance in human nutrition. Nowadays selenium is recognized for having a protective effect against MeHg toxicity.

So, it is of great importance to determinate the content of some essential elements and contaminants in fish (such Se and MeHg, respectively). Moreover, since consumer usually eat fish after being cooked, is relevant to know the influence of culinary treatments in the Se and MeHg content. On the other hand, only the contaminants that are released from the food matrix can be available for absorption by the organism. Thus, to make a more realistic evaluation of human toxicological risk of MeHg from fish consumption, it's necessary to estimate its bioaccessibility.

Since, this master dissertation intends to acquire information about the effect of culinary treatments (boiling and grilling) on the levels of Se, Hg and MeHg in raw and cooked blue shark before and after digestion. Based on that information, it was also evaluated the effect of the presence of selenium on the methylmercury toxicity. To determinate the bioaccessibility, defined as the fraction of a compound that is released from the food matrix in the gastrointestinal tract being available for absorption by the intestinal mucosa, it was used an *in vitro* digestion. This *in vitro* method simulate the digestive process in the mouth, stomach and small intestine, in a simplified manner by applying pH conditions, residence time periods for each compartment and chemical composition of digestive fluids.

After boiling and grilling procedure, is was verified that the culinary treatments had a strong influence on the chemical composition of blue shark, due to the high temperatures of the procedures that promoted the loss of moisture and thus a relative increase of the other components. Since, after culinary treatments is verified that these

also have a strong effect on Se, Hg and MeHg content, where in grilled blue shark was the one displaying highest values.

After the *in vitro* digestion, the Se bioaccessibility was high in grilled and boiled blue shark, 83 and 85%, respectively. On the contrary, Hg and MeHg showed lower bioaccessibility values, in which grilled blue shark was the one displaying lowest values, 52 and 53%, respectively.

One of the objectives of this study was to identify the hazard associated to the consumption of raw and cooked blue shark, based on the MeHg content before and after digestion. Accordingly, it was estimated the daily intake of MeHg by the consumption of blue shark for an adult with 60 kg body weight and a child with 20 kg body weight, with a daily intake of 169 g and 75 g of fish, respectively, and considering the defined thresholds for MeHg (PTWI and TWI).

The results showed that MeHg from raw and cooked blue shark exceeded the defined thresholds for this contaminant. In addition, all Se-Health Beneficial Values were negative, thus meaning a high MeHg health risk in the consumption of this species.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Extended Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Importância do pescado em Portugal .....	1
1.2 Biologia da Tintureira ( <i>Prionace glauca</i> ) .....	5
Nomenclatura e características anatómicas .....	5
Distribuição geográfica e capturas .....	5
1.3 Benefícios associados ao consumo dos produtos de pesca .....	6
<i>Composição química e valor nutricional</i> .....	6
<i>Lípidos</i> .....	7
<i>Selénio</i> .....	8
1.4 Perigos e riscos associados ao consumo dos produtos de pesca.....	11
<i>Contaminantes químicos</i> .....	12
<i>Mercúrio</i> .....	12
<i>Vias de exposição</i> .....	15
Efeitos na saúde e grupos de risco.....	15
Relação mercúrio-selénio.....	18
1.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes e contaminantes .	20
1.6 Objetivos .....	21
<b>2 Material e métodos</b> .....	<b>22</b>
2.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários .....	22
2.2 Bioacessibilidade – Método de digestão <i>in vitro</i> .....	24
2.3 Análise da composição química.....	27
<i>Humidade</i> .....	27
<i>Cinza Total</i> .....	28
<i>Proteína Bruta</i> .....	29

2.4	Mercúrio Total.....	30
2.5	Metilmercúrio.....	32
2.6	Selénio .....	34
2.7	Avaliação do perigo do consumo de tintureira .....	36
2.8	Tratamento dos resultados .....	36
<b>3</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>37</b>
3.1	Efeito dos tratamentos culinários .....	37
3.1.1	<i>Teores de humidade, cinza e proteína.....</i>	<i>37</i>
3.1.2	<i>Concentração e bioacessibilidade do selénio, mercúrio e metilmercúrio .....</i>	<i>38</i>
3.2	Influência do selénio .....	44
3.3	Perigos associados ao consumo de tintureira.....	47
<b>4</b>	<b>Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Fontes bibliográficas.....</b>	<b>53</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Evolução da captura anual global de <i>Prionace glauca</i> .....	3
<b>Figura 2</b> - Principais espécies de peixe capturadas por Portugal no ano de 2011 ..	3
<b>Figura 3</b> - Consumo médio de pescado mundial per capita entre 2008-2010 .....	4
<b>Figura 4</b> - <i>Prionace glauca</i> .....	5
<b>Figura 5</b> - Distribuição geográfica da <i>Prionace glauca</i> .....	6
<b>Figura 6</b> - Ciclo global do mercúrio .....	13
<b>Figura 7</b> - Biomagnificação do metilmercúrio. ....	14
<b>Figura 8</b> - Metabolismo e disposição do metilmercúrio numa mulher grávida .....	17
<b>Figura 9</b> - Mecanismo de toxicidade do mercúrio.....	19
<b>Figura 10</b> - Esquema do trabalho desenvolvido no que respeita ao estudo da bioacessibilidade .....	23
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática do modelo de digestão in vitro. ....	26
<b>Figura 12</b> - Teor de Selénio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média ± desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada .....	40
<b>Figura 13</b> - Teor de Mercúrio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média ± desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada .....	41
<b>Figura 14</b> - Teor de Metilmercúrio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média ± desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada .....	43

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Soluções e enzimas utilizadas na metodologia <i>in vitro</i> .....	24
<b>Tabela 2</b> - Material e equipamentos utilizados na metodologia <i>in vitro</i> .....	24
<b>Tabela 3</b> - Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos ....	25
<b>Tabela 4</b> - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de humidade ....	28
<b>Tabela 5</b> - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de cinza total....	29
<b>Tabela 6</b> - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de proteína .....	30
<b>Tabela 7</b> - Material e reagentes utilizados na análise do teor de mercúrio .....	31
<b>Tabela 8</b> - Material e reagentes utilizados na análise do teor de metilmercúrio.....	32
<b>Tabela 9</b> - Material e reagentes utilizados na análise do teor de selénio.....	34
<b>Tabela 10</b> - Valores médios e desvio-padrão do teor de humidade, cinza e proteína (g/100 g peso fresco) da tintureira crua e cozinhada.....	37
<b>Tabela 11</b> - Percentagem de Se Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada .....	41
<b>Tabela 12</b> - Percentagem de Hg Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada .....	43
<b>Tabela 13</b> - Percentagem de MeHg Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada.....	44
<b>Tabela 14</b> - Valores médios e desvio-padrão da razão molar Hg:Se e do índice HBV <sub>Se</sub> nas frações inicial e bioacessível (antes e após a digestão, respetivamente) ...	46
<b>Tabela 15</b> - Valores médios e desvio-padrão da razão molar MeHg:Se (inicial e bioacessível) e do índice HBV <sub>Se</sub> (Inicial e bioacessível) .....	47
<b>Tabela 16</b> - Concentração média de MeHg (inicial e bioacessível) no músculo de tintureira, em mg/kg, e a dose diária estimada, expressa em µg/kg peso corporal, para um adulto de 60 kg com uma ingestão diária de 169 g de peixe, e para uma criança de 20 kg com uma ingestão diária de 75 g de peixe. ....	49

# 1 Introdução

## 1.1 Importância do pescado em Portugal

### *Setor da Pesca*

Portugal destaca-se, de entre os países da União Europeia (UE), pela sua localização periférica e pela sua vasta Zona Económica Exclusiva, que resulta de uma extensa linha de costa continental e da natureza arquipelágica das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira. Com uma superfície total de 91 909 km<sup>2</sup> (cerca de 2,3% da UE) e com um comprimento de linha de costa de 2 830 km, a pesca e o consumo de pescado têm um papel de grande importância socioeconómica para Portugal. O sector da pesca em Portugal funciona como um fator de fixação das populações, existindo ao longo da costa portuguesa comunidades que têm na pesca a sua principal atividade e que apresentam notórias dificuldades de reconversão e/ou diversificação profissional (DGPA, 2007).

A produção da pesca e aquacultura da UE representa cerca de 3,5% do total mundial, o que faz dela o quinto produtor mundial. No seio da UE, os três maiores produtores em termos de volume são a Espanha (18,46%), o Reino Unido (13,00%) e a Dinamarca (12,54%). Portugal tem uma produção de pesca e de aquacultura de cerca de 3,65%, sendo assim o nono produtor mundial (Comissão Europeia, 2014).

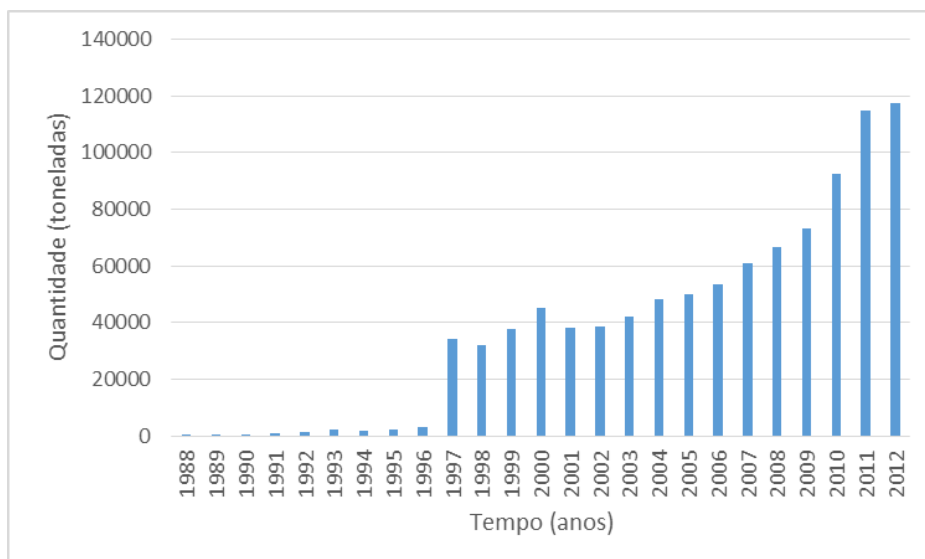
Em Portugal, o sector da pesca e da indústria transformadora dos produtos da pesca tem associado um longo historial cultural, social, técnico, económico e gastronómico que mantém vivas importantes comunidades costeiras e piscatórias, consideráveis efetivos de mão-de-obra em todos os sectores de atividade, e significativas valias económicas e de infraestruturas. O facto de se tratar de uma atividade económica na área da produção alimentar e, portanto, relevante para o abastecimento da população, confere ao sector uma importância estratégica, considerando a elevada apetência nacional pelo consumo de produtos da pesca. A Indústria Transformadora da Pesca e Aquacultura apresentou em 2012 uma produção conjunta de “congelados”, “secos e salgados” e “preparações e conservas” que totalizou 212 mil toneladas. Foram vendidas 176 mil toneladas, isto é, cerca de 83% da produção nacional. O subsector dos frescos e congelados é o que assume maior expressão em termos de volume de produção (49,9%), seguido dos “secos e salgados” (29,0%) e das “preparações e conservas”, o grupo com menor peso (21,1%) (DGPA, 2007; INE, 2014).

## ***Produção da pesca e aquacultura***

Em 2012, a produção nos setores da pesca e aquacultura aumentou cerca de 10 milhões de toneladas em comparação com o ano de 2010, alcançando as 158 milhões de toneladas em todo o mundo. Para este aumento contribuiu sobretudo a aquacultura, incluindo pequenos produtores, uma vez que a produção das pescas encontra-se atualmente estável (FAO, 2014a).

No setor da pesca, as capturas da União Europeia são provenientes sobretudo do Atlântico nordeste e centro-este. Os principais países pescadores são a Espanha, a Dinamarca, o Reino Unido e a França, que perfazem no seu conjunto mais de metade das capturas da UE. Em Portugal, no ano de 2013, foram capturadas 195 065 toneladas de pescado. Do total capturado, 144 654 toneladas corresponderam a pescado fresco ou refrigerado, transacionado em lota, no valor de 253 148 mil euros, o que representa um decréscimo de 4,4% em volume e de 10,0% em valor, relativamente a 2012. A redução registada a nível nacional em 2013 deveu-se à menor captura de peixes marinhos (-7,3%), sobretudo de sardinha, atum, peixe espada preto, que registaram menores volumes de captura (-11,7%, -7,8% e -15,5%, respetivamente). No entanto, registaram-se ligeiros aumentos de outras espécies, nomeadamente de pescada (+5,9%) e de verdinho (+2,5%) bem como de espécies capturadas pela frota do cerco, como o carapau (+3,0%) e a cavala (+0,5%) (Comissão Europeia, 2014; INE, 2014).

No que respeita à tintureira, na **figura 1** pode-se observar os valores relativos à captura global desta espécie de 1988 a 2012, podendo assim verificar-se que tem havido um aumento da sua captura em todo o mundo até aos dias de hoje (FAO, 2014b).

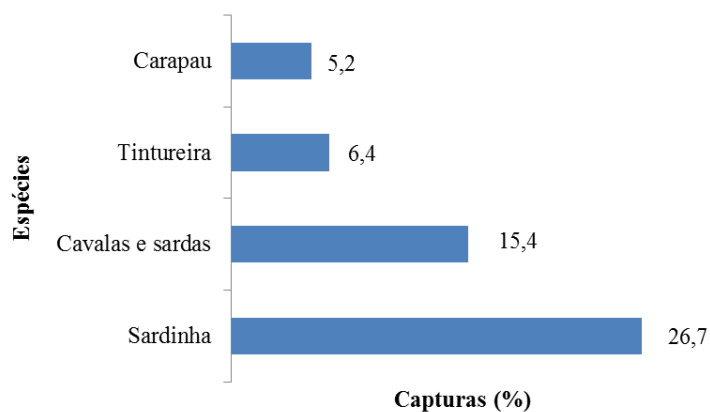


**Figura 1** - Evolução da captura anual global de *Prionace glauca*

**Fonte:** FAO Fishery Statistics

A nível Europeu, segundo dados da Comissão Europeia (2014) as três espécies mais capturadas pela UE são o arenque (10,46%), a espadilha (8,48%) e as sardas e cavalas (7,72%), onde a tintureira é a 13ª espécie mais capturada pela UE (2,06%).

No caso Português, as principais espécies capturadas, segundo dados relativos ao ano de 2011, estão indicadas na **figura 2**, sendo que a tintureira é a terceira espécie mais capturada.



**Figura 2** - Principais espécies de peixe capturadas por Portugal no ano de 2011

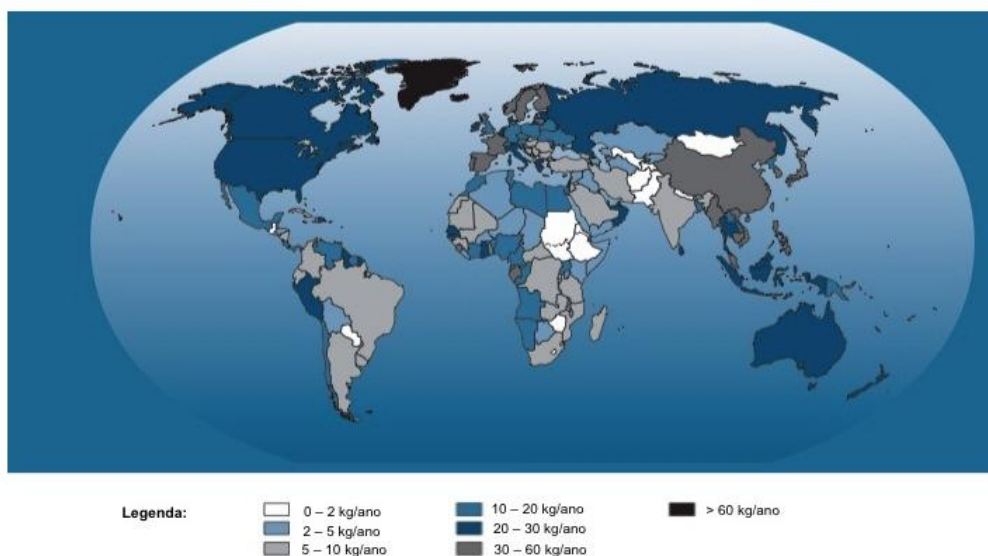
**Fonte:** Comissão Europeia (2014)

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), no ano de 2013, Portugal capturou no Atlântico Centro-Este 851 toneladas de tintureira, no Atlântico Sudoeste 1 900 toneladas, no Atlântico Sudeste 241 toneladas, no Oceano Índico Oeste 680 toneladas, no Oceano Índico Este 106 toneladas, e noutros pesqueiros externos 163 toneladas. Tendo assim capturado no ano de 2013 um total de cerca de 3 941 toneladas de tintureira (INE, 2014).

### **Consumo de pescado per capita**

Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), o consumo de pescado representa cerca de 17% do consumo global de proteína (FAO, 2014a).

A **figura 3** ilustra o consumo médio de pescado mundial *per capita* entre 2008-2010 (FAO, 2014a). A nível mundial, esse consumo representa cerca de 19 kg/ano. No que respeita à UE, esse consumo centra-se nos 22 kg/ano, sendo Portugal o país da UE que apresenta o consumo *per capita* mais elevado com cerca de 56,7 kg/ano (Comissão Europeia, 2014; FAO, 2014a).



**Figura 3** - Consumo médio de pescado mundial *per capita* entre 2008-2010

**Fonte:** FAO (2014a)

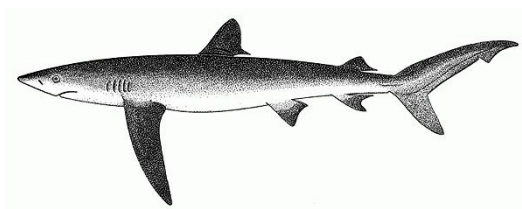
Apesar da oportunidade que o sector de pescas e aquacultura representa em todo o mundo, este ainda enfrenta alguns desafios que passam principalmente pela redução do desperdício, pelo controlo de algumas práticas danosas e pela melhoria da rastreabilidade (FAO, 2014a).

## 1.2 Biologia da Tintureira (*Prionace glauca*)

### **Nomenclatura e características anatómicas**

A tintureira (**Figura 4**), também designada por tubarão-azul (de acordo com a FAO), é classificada taxonomicamente da seguinte forma:

- **Classe:** *Chondrichthyes*
- **Ordem:** *Carcharhiniformes*
- **Família:** *Carcharhinidae*
- **Gênero:** *Prionace*
- **Espécie:** *P. glauca* (FAO, 2014b).



**Figura 4** - *Prionace glauca*

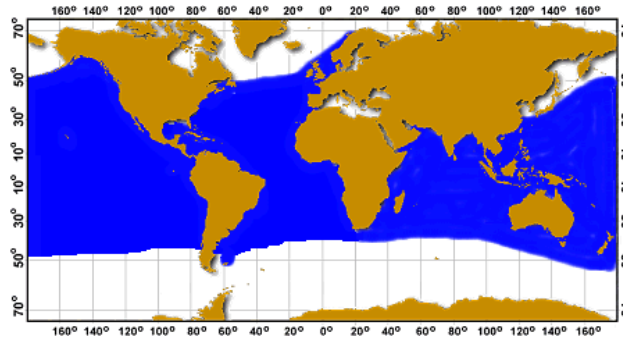
**Fonte:** FAO Fisheries and Aquaculture Department (FAO, 2014b)

A tintureira possui uma coloração azul escura, sendo que a sua parte lateral tem uma cor azul brilhante e a parte dorsal é branca. Geralmente possui um corpo esguio e um focinho longo. Um macho geralmente pode medir entre 182 e 281 cm, podendo atingir tamanhos até cerca de 311 cm. As fêmeas adolescentes atingem tamanhos entre 173 a 221 cm, e no estado adulto atingem cerca de 221 a 323 cm. À nascença o tamanho varia entre os 35 e 44 cm (FAO, 2014b).

### **Distribuição geográfica e capturas**

A tintureira é a espécie de tubarão marinha mais difundida e com uma vasta abundância global. Relativamente à sua distribuição geográfica, a tintureira habita em águas temperadas e tropicais, ocupando uma vasta área em todo o globo: Atlântico Ocidental, Atlântico Central, Atlântico Oriental, Indo-Pacífico Ocidental e Pacífico Central. Toda a sua distribuição geográfica pode ser observada na **figura 5**.

A tintureira habita normalmente entre a superfície e águas com cerca de 152 metros de profundidade. Normalmente prefere águas com temperaturas entre os 7 a 16 °C, podendo tolerar temperaturas superiores a 21 °C (FAO, 2014b).



**Figura 5** - Distribuição geográfica da *Prionace glauca*

**Fonte:** FAO Fisheries and Aquaculture Department (FAO, 2014b)

A tintureira alimenta-se de pequenas presas, especialmente de peixes e lulas, embora ocasionalmente também se possa alimentar de outros invertebrados, pequenos tubarões, e aves marinhas que captura na superfície da água (FAO, 2014b)

### **1.3 Benefícios associados ao consumo dos produtos de pesca**

#### ***Composição química e valor nutricional***

O peixe é uma importante fonte de nutrientes devido à presença de proteínas de elevado valor biológico, ácidos gordos polinsaturados, minerais e vitaminas (FAO, 2014c).

As proteínas do peixe possuem um elevado valor biológico, pois apresentam na sua constituição aminoácidos essenciais. As proteínas do músculo do peixe podem ser divididas em três grupos: proteínas sarcoplasmáticas (como a mioalbumina, globulina e enzimas), que representam cerca de 20 a 30% do total de proteínas do músculo; proteínas estruturais (como a actina, miosina, actomiosina e tropomiosina), que constituem cerca de 70 a 80% do total, e as proteínas do tecido conjuntivo (nomeadamente o colagénio) que atingem valores próximos de 3% nos peixes teleósteos (peixes ósseos) e 10% nos elasmobrânquios (peixes cartilágneos) (FAO, 2014c).

As proteínas do peixe possuem uma elevada digestibilidade, esta é medida através da percentagem de proteína ingerida que é efetivamente absorvida no trato gastrointestinal. A elevada digestibilidade das proteínas do peixe deve-se ao facto deste possuir uma baixa percentagem em tecido conjuntivo quando comparado com as carnes vermelhas e de aves (Nunes *et al.*, 2003).

O peixe também possui uma fração de azoto não-proteico (NPN), de baixo peso molecular e solúvel em água. Este fração constitui cerca 9-18% do azoto total nos teleósteos ao passo que nos elasmobrânquios (como a tintureira) pode variar entre 33 e 38%. Apesar de existir em níveis baixos, os constituintes da fração NPN desempenham um papel importante na qualidade do pescado (FAO, 2014c). Estes compostos são, na sua maioria, encontrados no sarcoplasma e incluem péptidos, aminoácidos livres, óxido de trimetilamina e ureia, entre outros (Belitz *et al.*, 2009)

O teor de gordura varia consoante o tipo de peixe, a época do ano e a sua alimentação. Os peixes brancos, como o bacalhau, geralmente têm teores de gordura entre os 0 e 2%, no entanto, peixes gordos como a cavala, podem ter um teor de cerca de 16%. O teor de gordura do peixe é maioritariamente constituído por ácidos gordos polinsaturados (PUFAs). As principais vitaminas presentes no peixe são as vitaminas A, D e E e as vitaminas do complexo B. O peixe apresenta também uma enorme variedade de elementos minerais, dos quais se destacam o iodo e o selénio (BIM, 2014).

### *Lípidos*

Atualmente, o pescado é considerado um alimento de grande importância, pois contribui para uma dieta equilibrada e fornece compostos essenciais para o organismo. Uma das características nutricionais mais relevante no peixe é o seu teor em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) de cadeia longa do tipo ómega-3, principalmente o ácido eicosapentanóico (EPA) e o ácido docosahexanóico (DHA). Apresenta ainda baixos níveis de colesterol (Belitz *et al.*, 2009; BIM, 2014).

Apesar de o corpo humano conseguir utilizar hidratos de carbono, gorduras ou proteínas para sintetizar todos os ácidos gordos de que necessita, existem duas exceções: o ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido gordo ómega-6 e ómega-3, respetivamente). Ambos são essenciais para a saúde, pois o corpo humano não consegue sintetizar estes ácidos gordos (BIM, 2014). Por outro lado, estima-se que a taxa de conversão de  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3n-

3) em EPA seja inferior a 5%, e deste último em DHA inferior a 0,05% (Wang *et al.*, 2006) e por isso estes dois ácidos gordos são muitas vezes considerados essenciais. O DHA e EPA encontram-se em abundância nos óleos de peixe e no pescado tais como na cavala, truta, salmão e sardinha. Estes ácidos gordos são usados pelo nosso organismo na produção de substâncias que regulam uma ampla variedade de funções, tais como, pressão arterial, coagulação sanguínea, teor de lípidos no sangue e resposta imunológica e inflamatória. Os ácidos gordos essenciais também funcionam como partes estruturais das membranas celulares e são fundamentais no crescimento normal dos lactentes e crianças (Sizer e Whitney, 2003; BIM, 2014).

Os benefícios para a saúde do consumo de peixe são bastante consideráveis estando a sua ingestão regular associada à prevenção de diversas doenças incluindo as cardiovasculares. Nesse sentido, a *American Heart Association* recomenda um consumo de peixe gordo pelo menos duas vezes por semana para adultos saudáveis, a indivíduos sem histórico de doenças cardiovasculares, a fim de atingir a ingestão diária de ácidos gordos ómega-3 recomendados. No caso de indivíduos que apresentem alto risco, essa recomendação é, no mínimo, de três vezes por semana (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). De facto, os ácidos gordos ómega-3 presentes nos peixes têm vindo a demonstrar muitos benefícios para a saúde, particularmente na redução da pressão arterial, do risco de arritmia e trombose, dos níveis de triacilgliceróis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue, das respostas inflamatórias, da aterosclerose coronária e cerebral, aumentam também as lipoproteínas de alta densidade (HDL) que são benéficas para o nosso organismo, e também contribuem para a diminuição do risco de certos tipos de cancro (Sidhu, 2003; Castro-González e Méndez-Armenta, 2008; BIM, 2014).

### *Selénio*

O peixe apresenta uma variedade de elementos minerais, dos quais se destaca o selénio (Se). Dois dos vinte e dois aminoácidos primários são distinguidos por possuírem selénio: a selenometionina (que não pode ser sintetizada pelo homem, sendo inicialmente sintetizada por plantas) que é bioquimicamente equivalente à metionina e é considerada um compartimento de armazenamento irregular de Se, e a selenocisteína, que é altamente regular e está incorporada especificamente em muitas proteínas de modo a desempenhar funções biológicas essenciais (Afonso *et al.*, 2012).

Ao contrário de outros elementos que interagem com proteínas na forma de cofatores, o Se está incorporado na cadeia polipeptídica como parte do aminoácido selenocisteína (Sec). As proteínas que contêm Sec como parte integrante da sua cadeia polipeptídica são designadas de selenoproteínas (Sel). O selênio está incorporado nas proteínas e encontra-se ligado por ligações covalentes com o aminoácido Sec. As selenoproteínas são essenciais para a vida, sendo que várias Sel têm vindo a ser caracterizadas como enzimas antioxidantes, protegendo contra danos causados por radicais livres. Assim sendo, o selênio é fundamental para a vida, sendo que quantidades adequadas deste elemento são necessárias para uma ótima saúde (Ralston e Raymond, 2010; Aomori e Hokkaido, 2012). De acordo com Belitz *et al.* (2009), os níveis de Se presentes no corpo humano variam entre 10 a 15 mg e a ingestão deste micronutriente é de cerca de 50 a 100 µg/dia.

A dieta alimentar é a principal fonte de ingestão de selênio para a população em geral, onde a carne e o peixe são as principais fontes. Ambos contêm selênio na sua forma funcional: selenoproteínas. Teoricamente, todas as proteínas animais contêm selenometionina, que é obtida pelo consumo de vegetais. O peixe é o alimento que contém mais selênio (comparativamente com a carne vermelha e de aves), este está presente em todas as espécies de peixe, sendo que as espécies marinhas são as que contêm mais selênio. De fato, devido à sua capacidade de acumular quantidades consideráveis de selênio, o peixe é considerado a melhor fonte deste elemento presente na dieta do homem e dos animais (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Aomori e Hokkaido, 2012). Segundo a EFSA, a ingestão diária recomendada (RDA) de selênio para homens e mulheres é de 55 µg/dia (EFSA, 2008).

A maior parte do selênio presente no pescado provém da sua dieta (fitoplâncton e zooplâncton) e da água. A concentração de selênio no peixe varia amplamente de acordo com a espécie, local e nível trófico do peixe (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Aomori e Hokkaido, 2012). As atividades industriais e a agricultura levaram a um aumento da libertação de compostos de Se a partir de fontes geológicas, tornando-as disponíveis para o pescado e para os ecossistemas em todo o mundo (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008). De acordo com a *National Research Council*, o selênio está amplamente distribuído em baixas concentrações na água (0,2-10 µg/L) e no mar (perto de 0,09 µg/L) (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Aomori e Hokkaido, 2012).

No que toca à relação entre o nível trófico e a quantidade de Se presente nos organismos marinhos, um estudo realizado por Burger *et al.* (2012) concluiu que, ao contrário do mercúrio, os níveis de selénio eram maiores em espécies com níveis mais baixos na cadeia trófica. Por outro lado, um estudo realizado por Phibbs *et al.* (2011), sugeriu que a proporção de compostos orgânicos de selénio (predominantemente selenometionina) é provável que aumente em níveis mais altos da cadeia trófica. Mesmo na mesma espécie de pescado, a quantidade de Se pode variar amplamente, não apenas devido a fatores ambientais, mas também devido a certas características da espécie (tamanho, idade, disponibilidade do alimento, estado fisiológico, etc). De um modo geral, a concentração de Se no pescado varia entre 10 e 100 µg/100 g de parte edível sendo que no peixe essa variação usualmente é de 0,2 a 0,9 µg/g (Aomori e Hokkaido, 2012).

Este elemento é considerado benéfico para a saúde humana, devido, sobretudo, à sua capacidade antioxidante, uma vez que a sua presença está relacionada com a redução de certos tipos de cancro e de outras doenças. O Se tem propriedades quimio-preventivas, anti-inflamatórias e antivirais, e está relacionado com o melhoramento da imunidade e redução de distúrbios relacionados com a idade, e contribui ainda para um normal funcionamento da homeostase da hormona da tiróide, imunidade e fertilidade (Raymond e Ralston, 2004; Pedrero e Madrid, 2008; Ralston e Raymond, 2010; Afonso *et al.*, 2012).

Os efeitos benéficos do selénio para a saúde humana estão fortemente relacionados com a sua concentração. Foi estimado que a ingestão de alimentos contendo um teor de selénio superior a 1 mg/kg pode induzir a toxicidade, no entanto uma concentração abaixo de 0,1 mg/kg conduz a deficiência em Se. Por este motivo é importante saber a sua abundância ou escassez na dieta alimentar, podendo assim efetuar-se o balanço do Se nos seres humanos. É também de grande importância saber qual a biodisponibilidade do Se ou qual a quantidade absorvida e usada pelo organismo, pois usualmente apenas uma fração é absorvida e transformada numa forma biologicamente disponível. A biodisponibilidade do Se presente nos alimentos depende da sua forma química e de outros fatores, tais como, a proteína total, quantidade de gordura, e presença de contaminantes químicos inorgânicos, da temperatura e duração do tratamento culinário, e também depende de fatores fisiológicos tais como o estado nutricional, crescimento e gravidez. Idealmente, uma completa avaliação da biodisponibilidade deve envolver medições da quantidade total do componente, fração absorvida, quantidade absorvida, e percentagem utilizada pelo organismo (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Pedrero e Madrid, 2008; Pilarczyk, *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram que a ingestão de Se proveniente do peixe está correlacionada com o aumento da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e com a concentração de selenoproteína. Uma baixa biodisponibilidade do Se pode resultar na acumulação de contaminantes nos tecidos do peixe, que inibem significativamente a absorção deste (Pilarczyk *et al.*, 2012). No geral, a absorção das espécies de selênio ingeridas na dieta é elevada (70-85%), e está comprovado que as espécies orgânicas estão mais biodisponíveis que as espécies inorgânicas de selênio. A selenometionina é uma das espécies que se acumula mais eficientemente em diferentes órgãos. A medição de bioacessibilidade do Se pode ser feita por métodos de digestão *in vitro*, que são métodos úteis para avaliar o potencial da fração bioacessível do alimento, e tem vindo a ser amplamente utilizado para o Se (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Pedrero e Madrid, 2008).

#### **1.4 Perigos e riscos associados ao consumo dos produtos de pesca**

Tal como referido anteriormente, o consumo de peixe é recomendável devido aos seus benefícios (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008). Porém, este alimento pode também ser uma via de exposição a diversos contaminantes, que podem representar um risco para a saúde do consumidor. De entre estes salientam-se os contaminantes químicos ambientais, como o mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (ASAE, 2008). A quantidade de um determinado contaminante presente no pescado depende da espécie, da dimensão, da origem geográfica, da idade, do padrão alimentar e da altura do ano (ASAE, 2008). De um modo geral, estes contaminantes concentram-se nos tecidos do peixe por processos de bioacumulação e/ou biomagnificação. No caso da biomagnificação, quanto mais elevada for a posição do peixe na cadeia trófica, maior é a concentração encontrada nos tecidos alvo (ASAE, 2008).

No sentido de salvaguardar a saúde pública, têm sido estabelecidos limites máximos permitidos para diversos contaminantes pelas autoridades reguladoras (UE, 2008) bem como recomendações de ingestão toleráveis (FAO/WHO, 2010; EFSA, 2012). Por outro lado, uma informação sobre a espécie de peixe consumida e dos seus possíveis níveis de contaminantes químicos inorgânicos, pode ser benéfico para diminuir o risco para a saúde pública. A fim de evitar o consumo de quantidades excessivas destes, a população deve consumir uma diversidade de pescado, ingerindo apenas pequenas quantidades de peixes conhecidos por acumularem maiores concentrações de contaminantes químicos.

## **Contaminantes químicos**

A fonte de contaminantes químicos no meio ambiente pode ser de origem natural ou antropogénica. Devido à sua persistência e tendência de se acumularem na água e nos solos, estes compostos quando em concentrações elevadas podem bioacumular-se e tornarem-se tóxicos para todos os organismos vivos (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008).

A dieta é a principal via de exposição do homem aos contaminantes químicos inorgânicos, tendo vindo a ser observado um aumento da concentração de mercúrio, cádmio e chumbo, o que é um dado alarmante, uma vez que a concentração de metais na água correlaciona-se positivamente com a concentração nos peixes. O nível de bioacumulação destes contaminantes nos tecidos dos peixes é influenciado por fatores bióticos e abióticos, como o habitat biológico dos peixes, a forma química dos contaminantes presentes na água, a temperatura e pH da água, a concentração de oxigénio dissolvido, bem como a idade do peixe, sexo, massa corporal e as condições fisiológicas (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008).

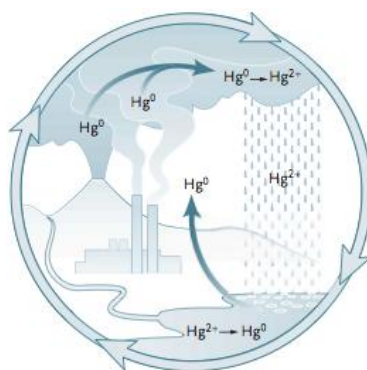
### **Mercúrio**

O mercúrio (Hg) é um contaminante químico inorgânico de origem natural (atividade vulcânica e erosão de depósitos minerais nas rochas e solos) ou antropogénica (como a mineração, queima de combustíveis fósseis, fundição de metais, produção de carvão, estações de energia, produção de celulose, sistemas de aquecimento residencial e industrial e eliminação de resíduos) e pode ser encontrado no ar, água e solo (Holmes *et al.*, 2009). As emissões de mercúrio provenientes de fontes naturais têm-se mantido relativamente constantes, resultando num aumento constante de mercúrio ambiental, no entanto as atividades humanas desde o início da era industrial causaram uma libertação adicional de mercúrio para o meio ambiente. As estimativas do total das emissões de mercúrio anuais que resultam das atividades humanas variam de um terço a dois terços do total das emissões de mercúrio. A grande incerteza nestas estimativas é a quantidade de mercúrio que é libertado a partir de água e solos que foram previamente contaminados por atividades humanas, em contraste com novas libertações naturais (ATSDR, 1999).

O mercúrio está presente no meio ambiente sob diversas formas, mercúrio metálico ou elementar, inorgânico, e orgânico, podendo se encontrar em três estados de oxidação distintos (0, +1, +2), em que cada forma possui propriedades físico-químicas e perfis de

toxicidade diferentes (Clarkson *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2009). O mercúrio no estado líquido é pouco absorvido e apresenta um risco mínimo para a saúde. No entanto, é altamente volátil no estado de vapor, em que é absorvido pelo pulmão, tendo vindo a ser responsável por inúmeros casos de intoxicação, geralmente devido a exposições ocupacionais (Clarkson *et al.*, 2007). Cerca de 80% do mercúrio libertado por atividades humanas para a atmosfera está na forma de mercúrio elementar, cerca de 15% do total é libertado para o solo a partir de fertilizantes, fungicidas e resíduos sólidos urbanos e um adicional de 5% é libertado a partir de efluentes industriais para a água (ATSDR, 1999).

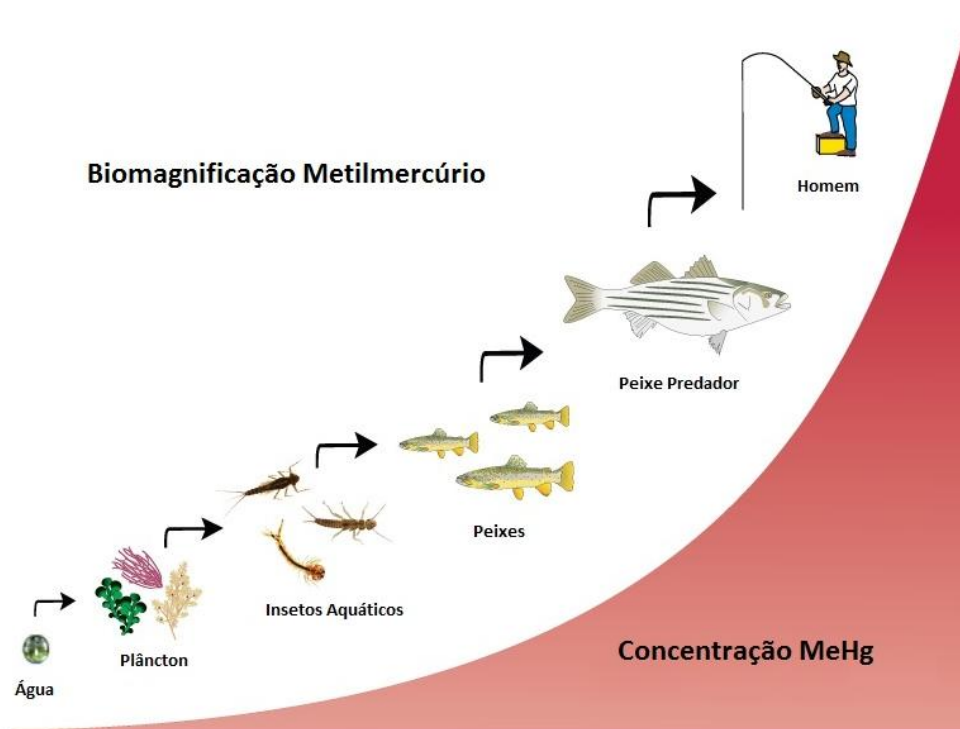
Uma vez libertado no ambiente, inicia-se um transporte à escala global denominado “ciclo do mercúrio” (**Figura 6**), em que as várias formas de mercúrio estão sujeitas a transformações químicas e físicas complexas, principalmente através de reações de redução e oxidação, e de metilação e desmetilação que envolvem microrganismos (WHO, 2008; Holmes *et al.*, 2009). No meio ambiente, o vapor de mercúrio ( $\text{Hg}^0$ ), um gás monoatômico estável, evapora-se a partir da superfície terrestre (água e solo). O  $\text{Hg}^0$  pode ser emitido por vulcões para a atmosfera ou a partir de fontes antropogénicas como emissões de indústrias de queima de carvão. Após aproximadamente um ano, o vapor de mercúrio é convertido numa forma solúvel ( $\text{Hg}^{2+}$ ) através de reações com oxidantes atmosféricos, tais como oxigénio, ozono e cloro. Uma vez convertido em  $\text{Hg}^{2+}$ , o mercúrio é muito mais solúvel e, assim volta à superfície terrestre através da precipitação. Pode ser novamente convertido à forma de vapor no solo e na água através de microrganismos e depois é reemitido para a atmosfera. Assim, o mercúrio pode recircular no meio ambiente por longos períodos de tempo (Clarkson *et al.*, 2003; Gochfeld, 2003; Choi e Grandieean, 2008).



**Figura 6** - Ciclo global do mercúrio

Fonte: Clarkson *et al.* (2003).

O mercúrio inorgânico pode também entrar na água ou no solo a partir da desagregação das rochas, de fábricas ou instalações de tratamento de água que liberam água contaminada com este contaminante (ATSDR, 1999). O mercúrio inorgânico presente no meio ambiente que se encontra ligado a sedimentos aquáticos é alvo de transformações microbianas, por reações de biometilação por bactérias, dando origem ao metilmercúrio (MeHg). Este está prontamente biodisponível, sendo libertado a partir dos microrganismos e entrando assim na cadeia alimentar aquática. Esta biotransformação do mercúrio inorgânico representa um sério risco para o ambiente e para a saúde, uma vez que conduz a uma biomagnificação, isto é, a uma bioacumulação progressiva de MeHg ao longo da cadeia trófica (**Figura 7**). Desta forma, os peixes do topo da cadeia trófica, predadores e com maior tempo de vida (como o tubarão, peixe-espada, barracuda, grande atum), são os que apresentam concentrações mais elevadas de metilmercúrio nos seus tecidos. Assim sendo, o consumo de peixe representa a principal fonte de exposição alimentar ao metilmercúrio, pelo que pessoas que ingerem grandes quantidades de pescado podem acumular níveis significativos de MeHg no seu organismo (ATSDR, 1999; Clarkson *et al.*, 2003; Gochfeld, 2003; Choi e Grandieean, 2008; WHO, 2008).



**Figura 7** - Biomagnificação do metilmercúrio.

Fonte: Adaptado de National Park Service (2014)

O crescente aumento dos níveis de mercúrio tornou-se uma preocupação, tanto para os países desenvolvidos como em desenvolvimento, devido à sua alta toxicidade, translocação e capacidade de se bioacumular/biomagnificar na cadeia alimentar, sendo assim uma ameaça contínua para a saúde humana bem como para o meio ambiente (Jan *et al.*, 2009). Apesar dos riscos associados, o mercúrio continua a ser utilizado numa variedade de produtos e processos em todo o mundo (WHO, 2008).

### *Vias de exposição*

Atualmente a principal via de exposição humana ao mercúrio é através do consumo de pescado. Nas espécies de peixe predadoras marinhas, cerca de 90% do mercúrio total encontra-se sob a forma de metilmercúrio (WHO, 2008; Torres-Escribano *et al.*, 2010; EFSA, 2012).

O ser humano pode estar exposto ao mercúrio através da respiração de ar contaminado, da ingestão de água ou alimentos contaminados, ou por contacto direto com a pele (ATSDR, 1999; Gochfeld, 2003). A maioria das pessoas está exposta ao mercúrio elementar, inorgânico ou orgânico, como resultado das suas atividades diárias, e quase todas têm vestígios de mercúrio (principalmente de metilmercúrio) no seu organismo. Geralmente, estas exposições são baixas e não são suscetíveis de causar efeitos adversos à saúde (ATSDR, 1999; WHO 2008). A ingestão de mercúrio depende não só do teor presente no pescado, mas também da frequência e da quantidade consumida. O consumo moderado de uma variedade de peixes não é suscetível de resultar em exposições preocupantes, no entanto, um consumo de grandes quantidades de peixe contaminado pode causar efeitos adversos na saúde do consumidor. A *Food and Drug Administration* (FDA) estima que a maioria das pessoas está exposta, em média a cerca de 3,5 mg de mercúrio por dia, considerando um adulto de peso médio (ATSDR, 1999; WHO, 2008). Por outro lado, a EFSA (2012), estima que os europeus adultos entre os 18 e 65 anos estão expostos na dieta alimentar, em média, a cerca de 1,08 µg/kg de metilmercúrio por semana.

### *Efeitos na saúde e grupos de risco*

O mercúrio pode causar efeitos adversos significativos na saúde humana se os níveis de exposição excederem os níveis de segurança estabelecidos pelas autoridades reguladoras (UE, 2008; FAO/WHO, 2010; EFSA, 2012). Os fatores que determinam a ocorrência de efeitos adversos para a saúde e a sua gravidade, são a forma química do mercúrio, a dose, a idade

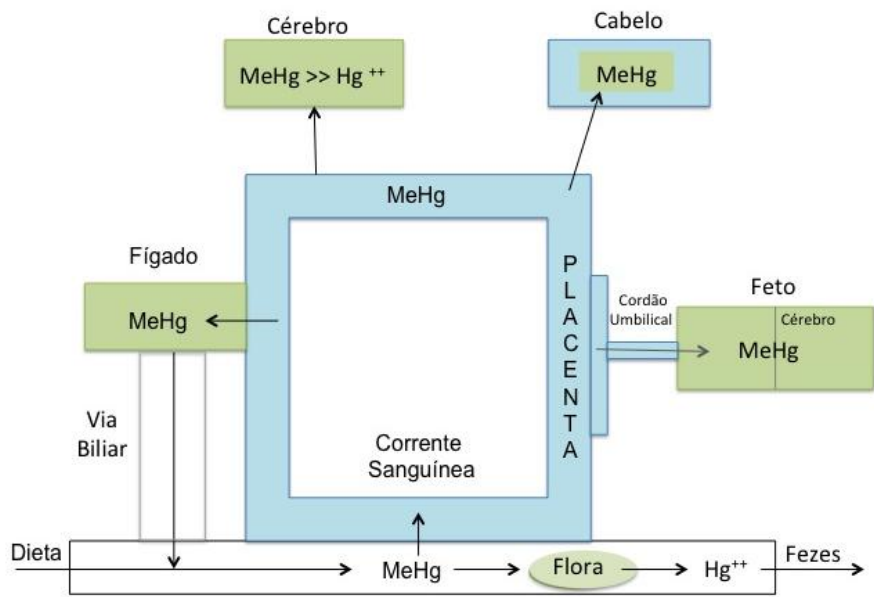
da pessoa exposta, a duração da exposição, a via de exposição (inalação, ingestão ou absorção cutânea) e os padrões alimentares de consumo de pescado. Os alvos principais de toxicidade do mercúrio são o sistema nervoso, os rins e o sistema cardiovascular (WHO, 2008).

O metilmercúrio é a forma de mercúrio mais facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal (cerca de 95-100%). No entanto, a absorção deste contaminante pode variar de acordo com a idade, a frequência das refeições e outras variáveis dietéticas (Gochfeld, 2003). De um modo geral, após a ingestão de pescado contaminado com metilmercúrio, este é absorvido e entra facilmente na corrente sanguínea, sendo assim amplamente distribuído por todo o corpo, na maioria dos tecidos e facilmente atravessa a barreira do cérebro (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008; WHO, 2008).

Nos últimos 15 anos, vários estudos epidemiológicos têm-se centrado sobre os efeitos da exposição pré-natal, os quais concluíram que o mercúrio pode produzir alterações que afetam o desenvolvimento neurológico das crianças. Tanto o cérebro do adulto como o do feto estão suscetíveis à toxicidade do metilmercúrio, porém o sistema nervoso em desenvolvimento é particularmente mais sensível a este composto (WHO, 2008). Crianças expostas a baixos níveis de metilmercúrio por longos períodos de tempo podem apresentar dificuldades de aprendizagem. Quando expostas a altos níveis de mercúrio, diversos estudos mostraram que o metilmercúrio produz efeitos neurológicos adversos, tais como, paralisia cerebral, instabilidade mental, perda da capacidade de coordenação de movimentos, convulsões, perda de visão e audição, atraso no desenvolvimento, distúrbios da linguagem e perda de memória. Todos estes efeitos ocorrem devido a um atraso no desenvolvimento psicomotor. O metilmercúrio inibe a divisão e migração de células neuronais e interrompe a citoarquitetura do córtex cerebral em desenvolvimento (Clarkson *et al.*, 2003; ASAE 2008; Torres-Escribano *et al.*, 2010). O metilmercúrio presente no sangue de uma mulher grávida passa facilmente para o sangue do feto (WHO, 2008). O metilmercúrio presente no corpo de uma mãe também passa para o leite materno e conseqüentemente para o bebê (ATSDR, 1999).

#### *Modo de ação*

A partir da corrente sanguínea, é facilmente distribuído por todos os tecidos, atravessando assim a barreira placentária e hematoencefálica (BHE), onde reage com o órgão alvo - o cérebro (**Figura 8**). Após uma única refeição de pescado, a absorção e distribuição de metilmercúrio estará completa dentro de 3 dias (Clarkson *et al.*, 2007).



**Figura 8** - Metabolismo e disposição do metilmercúrio numa mulher grávida

**Fonte:** Adaptado de Clarkson *et al.* (2007)

Uma vez no interior do trato gastrointestinal, a fração do metilmercúrio que entra em contacto com a microflora intestinal é desmetilada e convertida em mercúrio inorgânico (Clarkson *et al.*, 2007). O metilmercúrio que é absorvido e entra na corrente sistémica, atravessa as membranas celulares através de difusão passiva. Pensa-se que o complexo metilmercúrio L-cisteína (MeHgCys) atravessa as membranas via os transportadores de aminoácidos, pois assemelha-se bioquimicamente à metionina (Met) e à Se-metionina (SeMet), mimetizando-a (EFSA, 2012). Este complexo pode passar não só através da barreira hematoencefálica, mas também da placental.

A elevada mobilidade do metilmercúrio no corpo deve-se à formação de complexos com grupos tiol de baixo peso molecular que são facilmente transportados através das membranas celulares. O mercúrio intracelular ao ligar-se ao grupo tiol (-SH) de resíduos de proteínas, resulta na ativação do enxofre e bloqueia enzimas relacionadas, cofatores e hormonas. Além disso pode ocorrer a superprodução de radicais livres, resultado de interações indiretas do metilmercúrio em zonas celulares críticas ou da inibição de mecanismos de proteção (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008).

O metilmercúrio é excretado, principalmente pela via fecal, sendo que menos de um terço do total é libertado através da urina. Também é excretado através do leite humano (em níveis muito baixos), e também através da biliar. O metilmercúrio tem um tempo de semi-vida relativamente longo nos seres humanos, de cerca de 44 a 80 dias (WHO, 2008).

A Comissão do *Codex Alimentarius* recomenda que os valores de 0,5 mg/kg de metilmercúrio em peixes não predadores e 1 mg/kg de metilmercúrio em peixes predadores não sejam excedidos (WHO, 2008). Segundo o Regulamento da Comissão Europeia (CE) nº 629/2008, de 2 de Julho de 2008 que fixa os teores máximos de contaminantes presentes nos géneros alimentícios, o nível máximo de mercúrio é de 0,5 mg/kg no pescado em geral, com algumas exceções (por exemplo, todas as espécies de tubarão, atum, espadarte, peixe vermelho, raia e marlim, em que os níveis máximos permitidos de mercúrio são de 1,0 mg/kg de peso húmido) (UE, 2008).

A EFSA, a FDA e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) aconselham os grupos populacionais mais vulneráveis (mulheres grávidas, lactantes e jovens crianças) a evitar espécies de peixe que possam acumular elevados níveis de metilmercúrio, como a tintureira, o peixe espada e a cavala (Clarkson *et al.*, 2003; Torres-Escribano *et al.*, 2010).

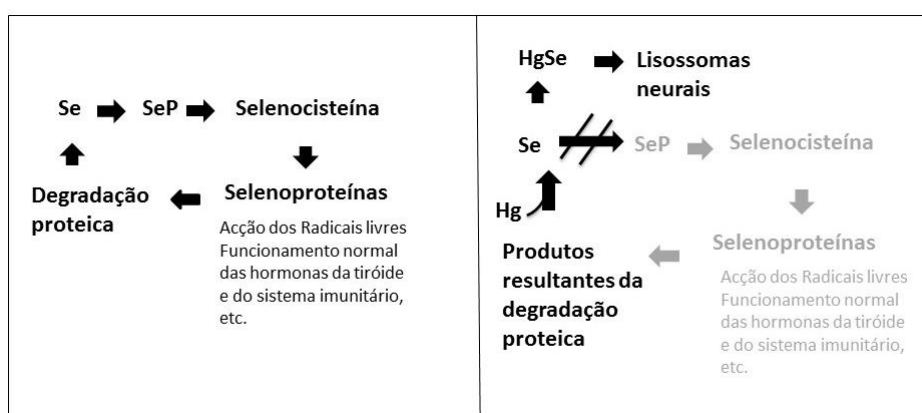
### **Relação mercúrio-selénio**

O Se interage com vários elementos metálicos, e estas interações podem ser de adição, antagonismo ou sinergismo. Uma interação de antagonismo de particular importância é a interação entre o Se e o Hg, pois o Se é reconhecido por diminuir a toxicidade do Hg quando ambos os elementos são simultaneamente administrados.

O efeito do selénio na prevenção da toxicidade do Hg tem vindo a ser reconhecido desde há cerca de 40 anos. O primeiro relatório sobre o efeito protetor do Se contra a toxicidade do Hg surgiu em 1967 e desde então, inúmeros estudos mostraram que o selénio tem um efeito protetor contra os efeitos adversos da exposição ao Hg (Kaneko e Ralston, 2007; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

A forma química do selénio e mercúrio são importantes na toxicologia de ambos os elementos, mas a presença de outros elementos e compostos pode afetar a interação entre o Hg e o Se. De entre os vários mecanismos de proteção do Se contra a toxicidade do Hg, os mais importantes são a redistribuição do Hg na presença de Se, a competição entre o Se e Hg por sítios de ligação, a formação do complexo HgSe, a conversão de formas tóxicas de Hg em outras formas e a prevenção do Se contra o dano oxidativo (Aomori e Hokkaido, 2012).

Na **figura 9**, encontra-se representado o esquema do mecanismo da toxicidade do mercúrio. No lado esquerdo da figura está representado de uma forma simplificada o ciclo normal de síntese da selenoproteína. A perturbação deste ciclo por exposição a quantidades tóxicas de Hg está representada no lado direito da figura. O seleneto é libertado durante a decomposição da selenoproteína e liga-se ao Hg, formando o complexo mercúrio-seleneto (HgSe) que se acumula nos lisossomas celulares. Se o Hg estiver estequiometricamente presente em excesso, ocorre a formação de HgSe insolúveis que diminui a biodisponibilidade do Se para a síntese de proteína (indicado a cor cinzenta na figura), resultando na perda de funções fisiológicas normais que requerem a atividade das selenoproteínas (Ralston e Raymond, 2010).



**Figura 9** - Mecanismo de toxicidade do mercúrio

Fonte: Adaptado de Ralston e Raymond (2010)

A toxicidade do Hg está relacionada com a elevada afinidade para os grupos sulfidrilo (-SH) das proteínas. O Se é conhecido por se ligar ao Hg numa razão molar de 1:1, formando um complexo biológico inativo: mercúrio-seleneto (HgSe). Devido à alta afinidade entre o Hg e Se que resulta da ligação e ambos, é razoável assumir que o Se tem efeitos na biodisponibilidade do Hg mas este também interfere na disponibilidade para síntese e normal atividade das enzimas selénio-dependentes (selenoenzimas). Isto demonstra a importância de se manter quantidades suficientes de selénio no organismo (Ralston e Raymond, 2010; Afonso *et al.*, 2012). O efeito protetor do Se dietético adicional contra a toxicidade do Hg parece ocorrer porque este é capaz de compensar o Se que se liga ao mercúrio e, assim, manter as atividades normais de enzimas antioxidantes cerebrais (Ralston *et al.*, 2008). Uma deficiência em Se pode contribuir para aumentar a toxicidade causada pelo mercúrio. Vários estudos sugerem que a quebra da molécula MeHg leva à formação de radicais livres, o que afeta as membranas lipídicas das células neuronais, causando danos nestas. Então, neste caso não é de estranhar que os efeitos tóxicos do MeHg possam ser reduzidos por antioxidantes tal como o selénio (Afonso *et al.*, 2012).

Uma dieta saudável e adequada que inclua minerais essenciais, em particular o selênio, é a forma mais fácil de prevenir várias doenças. Assim, parece ser necessário desenvolver programas apropriados para prevenir a deficiência em Se (Pilarczyk *et al.*, 2012).

## 1.5 Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes e contaminantes

A bioacessibilidade é definida como a fração de um dado composto que é libertada do alimento para o fluido gastrointestinal após o processo digestivo, ficando disponível para absorção pela mucosa intestinal e entrada na circulação sistêmica – biodisponível. Assim, a quantidade total ingerida de um contaminante pode não refletir a quantidade que está biodisponível, apenas a fração do contaminante que é libertada do alimento e que está biodisponível é que pode exercer efeitos tóxicos no organismo (Versantvoort *et al.*, 2005).

Segundo Versantvoort *et al.* (2004), a biodisponibilidade de um composto pode ser subdividida em três partes:

- Liberação do composto da matriz alimentar para o lúmen intestinal (Bioacessibilidade);
- Transporte através do epitélio intestinal;
- Degradação do composto no fígado (Metabolismo).

### *Avaliação da bioacessibilidade de compostos: modelo de digestão in vitro*

A mobilização do composto da matriz alimentar para o trato gastrointestinal é um processo dinâmico com constantes mudanças nas condições fisiológicas. Com o modelo de digestão *in vitro*, o processo digestivo é simulado de uma forma simplificada por aplicação/simulação de condições fisiológicas, isto é, composição química de fluidos digestivos, pH e períodos típicos de tempo de residência para cada compartimento (Versantvoort *et al.*, 2004).

O modelo de digestão *in vitro* desenvolvido por Versantvoort *et al.* (2004) permite simular o processo digestivo no trato gastrointestinal (boca, estômago e intestino delgado). Em cada compartimento, a matriz é incubada a 37 °C. A digestão é iniciada pela adição de saliva artificial à matriz em estudo. Subsequentemente, os sucos gástrico e duodenal e biliar são adicionados para simular os processos digestivos no estômago e no intestino delgado, respetivamente. Posteriormente, a concentração do contaminante no quilo previamente separado em duas frações, bioacessível e não digerido, é determinada no bioacessível (Versantvoort *et al.*, 2004).

Atualmente, é possível através dos modelos *in vitro* adquirir informação acerca da bioacessibilidade dos nutrientes e contaminantes provenientes do consumo de pescado, tais como o mercúrio (Afonso *et al.*, 2015)

## 1.6 Objetivos

Considerando que:

- ✓ A tintureira é uma espécie de peixe cada vez mais consumida em Portugal e na medida em que esta espécie pode acumular elevados teores de mercúrio, nomeadamente de metilmercúrio, torna-se importante efetuar uma identificação do perigo associado ao seu consumo. Contudo, o peixe apresenta micronutrientes em quantidades elevadas, como o Se, que modulam os efeitos tóxicos da exposição ao Hg/MeHg.
- ✓ O peixe é consumido usualmente cozinhado, e o tratamento culinário pode afetar os níveis de Se, Hg e MeHg presente neste.
- ✓ A quantificação da bioacessibilidade de nutrientes e contaminantes, provenientes do consumo de pescado, cru e cozinhado, permite um maior rigor na avaliação do perigo quando comparada com a concentração do contaminante nos alimentos, na medida em que só a fração de um determinado composto que é libertada do alimento após digestão e absorvida no trato GI pode exercer o seu efeito benéfico ou tóxico (Versantvoort *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2015).
- ✓ E que atualmente, é possível através de métodos *in vitro* inovadores, que simulam a digestão humana, adquirir informação acerca da bioacessibilidade dos nutrientes e contaminantes.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os benefícios e perigos associados ao consumo de tintureira, com base nos resultados obtidos de Se, Hg e MeHg no peixe cru e cozinhado, e considerando a bioacessibilidade desses elementos.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Preparação das amostras e tratamentos culinários

No presente trabalho, a espécie em estudo foi a tintureira (*Prionace glauca*). A amostragem foi realizada entre Abril e Junho de 2014 em diferentes superfícies comerciais e foi constituída por 15 postas de tintureira (com cerca de 300 g cada) embaladas individualmente de diferentes marcas ou lotes, com origem de captura no Atlântico Nordeste (FAO 27).

Ao chegar ao laboratório, procedeu-se à lavagem e remoção de cartilagem e pele das postas de tintureira. Cada posta foi dividida em três partes iguais (cerca de 100 g cada) a serem utilizadas para as análises em cru e cozinhado (grelhado e cozido).

#### ***Tratamento culinário***

As postas de tintureira foram sujeitas aos tratamentos culinários mais comuns utilizados na confecção desta espécie pelos consumidores, grelhar e cozer, bem como o modo de preparação culinária. Assim, antes de se proceder ao tratamento culinário foi adicionado sal (1,5 g de sal por cada 100 g de filete) às postas a grelhar e a cozer.

#### **Grelhar**

Para grelhar a tintureira foi utilizado um grelhador doméstico (Flama Sketch) com 2 000 W de potência e aplicou-se o processamento térmico durante 7 a 8 minutos de cada lado do filete, a uma temperatura que rondou os 180 °C.

#### **Cozer a vapor**

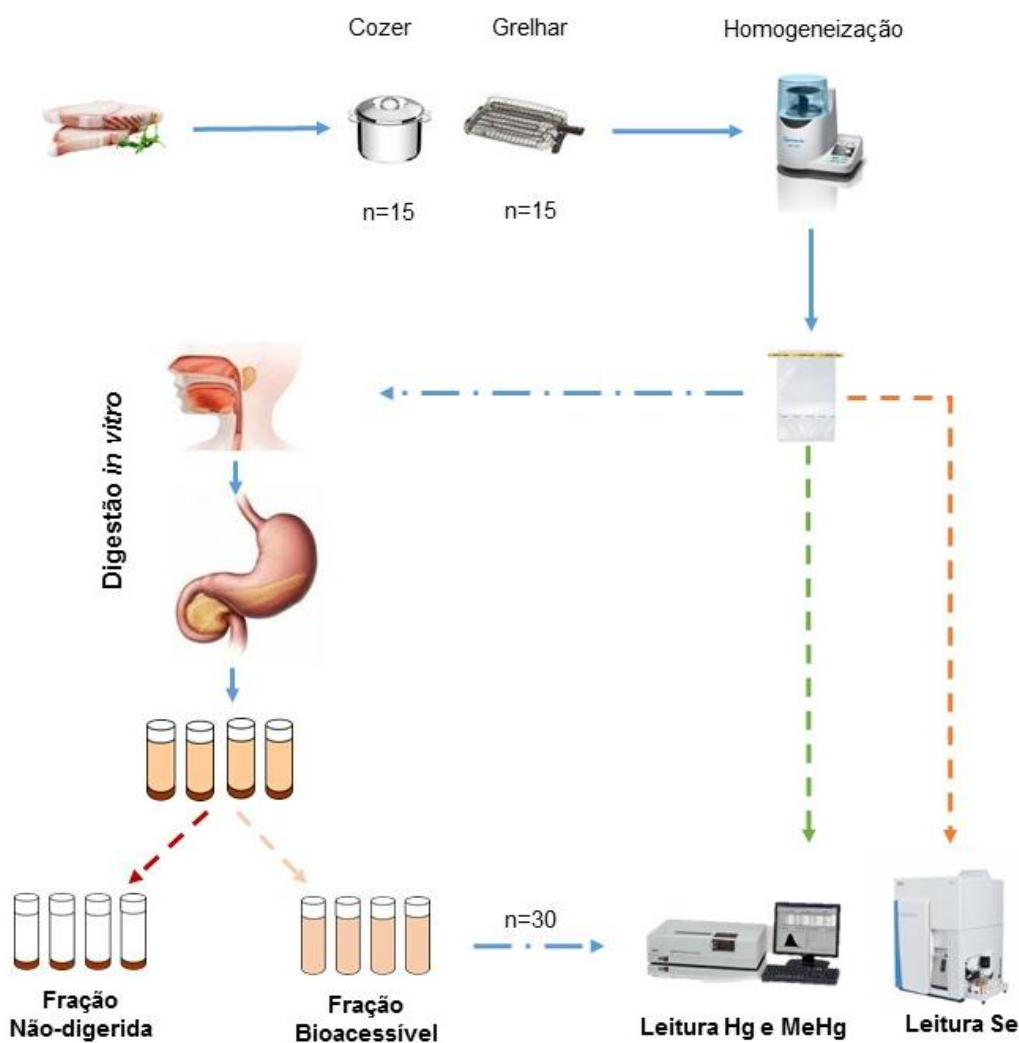
Os filetes de tintureira foram cozidos a vapor numa panela de inox durante 10 minutos a 100 °C.

Para cada tratamento culinário, incluindo o cru, foram feitas cinco *pools*, cada uma composta por três postas. Na preparação das amostras cruas e cozinhadas para análises químicas e de bioacessibilidade a realizar, o músculo foi homogeneizado num moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200) e posteriormente colocado em sacos de plástico previamente identificados.

De seguida, foram armazenadas a -20 °C, até realização das análises pretendidas. As amostras destinadas à análise de metilmercúrio foram congeladas a -60 °C e depois, liofilizadas durante 48 horas a -45 °C, a uma pressão de aproximadamente 10<sup>-1</sup> atm, sendo no final, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C até posterior análise.

Com as amostras já previamente preparadas, o plano de investigação passou pelo ensaio de bioacessibilidade, através do método de digestão *in vitro*, que simula as várias etapas da digestão humana de forma a se obter uma fração bioacessível e não digerida correspondente a cada amostra de tintureira.

Todo o procedimento está esquematizado, de forma resumida, na **figura 10**.



**Figura 10** - Esquema do trabalho desenvolvido no que respeita ao estudo da bioacessibilidade

## 2.2 Bioacessibilidade – Método de digestão *in vitro*

A bioacessibilidade foi determinada com recurso ao modelo de digestão *in vitro* descrito por Versantvoort *et al.* (2004) e modificado por Afonso *et al.* (2015).

Todos os reagentes utilizados estão indicados na **tabela 1**, e foi usada água ultra pura (sistema Milli-Q Plus Millipore).

**Tabela 1** - Soluções e enzimas utilizadas na metodologia *in vitro*

Soluções inorgânicas	Soluções orgânicas	Enzimas
KCl (89,6 g/L)		$\alpha$ -amilase
KSCN (20 g/L)		Ácido úrico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88,8 g/L)		Mucina
NaSO <sub>4</sub> (57 g/L)	Ureia (25 g/L)	BSA
NaCl (175,3 g/L)	Ácido glicurónico (2 g/L)	Pepsina
NaHCO <sub>3</sub> (84,7 g/L)	Glucose (65 g/L)	Pancreatina
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (22,2 g/L)	Hydrocloroeto de glucosamina (33 g/L)	Lipase
NH <sub>4</sub> Cl (30,6 g/L)		Bílis
kH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/L)		Tripsina
MgCl <sub>2</sub> (5 g/L)		$\alpha$ -quimotripsina
HCl 37% (g/g)		

Todo o material, indicado na **tabela 2**, foi previamente descontaminado com uma solução de 20% de ácido nítrico (Merck) e água ultra pura.

**Tabela 2** - Material e equipamentos utilizados na metodologia *in vitro*

<b>Material e equipamentos</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>○ Material de uso corrente de laboratório</li><li>○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)</li><li>○ Estufa de secagem, regulável a 105 ± 2 °C (Memmert, ULE 500)</li><li>○ Vortex</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Agitador rotativo</li><li>○ Banho-maria com agitação e acessórios (Memmert)</li><li>○ Medidor de pH e temperatura (HANNA Instruments, HI 221)</li><li>○ Placa de aquecimento (Schott-Geräte, CK 111)</li></ul>

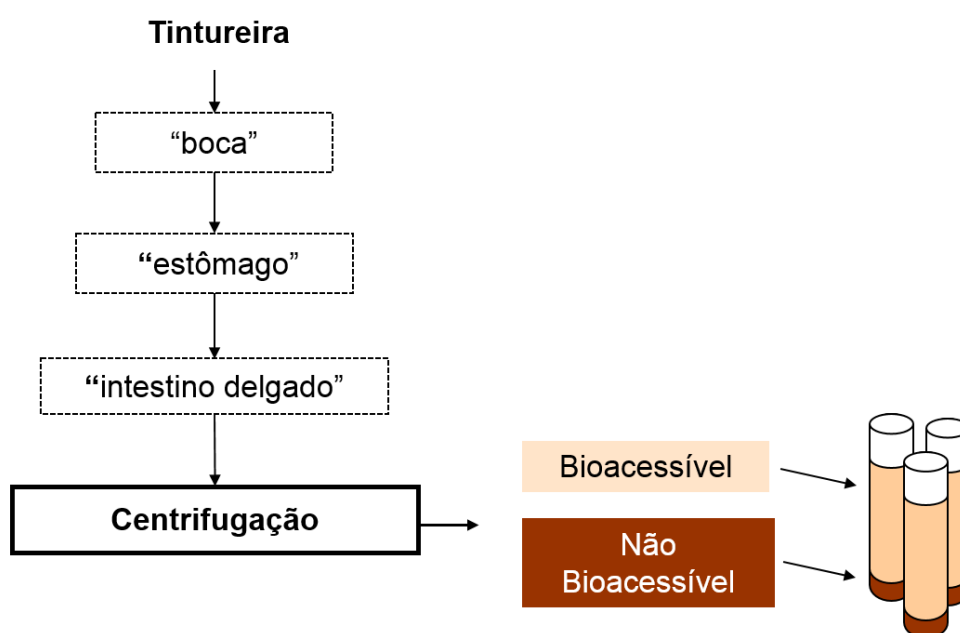
As soluções que simulam os sucos digestivos (soluções digestivas) foram preparadas segundo o descrito por Versantvoor *et al.* (2004) e Afonso *et al.* (2015) (**tabela 3**). O pH das soluções foi ajustado com soluções de HCl e NaOH de acordo como o indicado por Versantvoor *et al.* (2005).

**Tabela 3** - Soluções e enzimas utilizadas na preparação dos sucos digestivos

Soluções e enzimas		Saliva (50 mL)	Suco Gástrico (100 mL)	Suco Duodenal (100 mL)	Suco Biliar (50 mL)
Soluções inorgânicas	KCl (89,6 g/L)	1 mL	1,84 mL	1,26 mL	0,42 mL
	KSCN (20 g/L)	1 mL	-	-	-
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (88,8 g/L)	1 mL	0,6 mL	-	-
	NaSO <sub>4</sub> (57 g/L)	1 mL	-	-	-
	NaCl (175,3 g/L)	0,17 mL	3,14 mL	8 mL	3 mL
	NaHCO <sub>3</sub> (84,7 g/L)	2 mL	-	8 mL	6,83 mL
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (22,2 g/L)	-	3,6 mL	1,8 mL	1 mL
	NH <sub>4</sub> Cl (30,6 g/L)	-	2 mL	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (8 g/L)	-	-	2 mL	-
	MgCl <sub>2</sub> (5 g/L)	-	-	2 mL	-
	HCl 37% (g/g)	-	1,3 mL	0,036 mL	0,015 mL
Soluções orgânicas	Ureia (25 g/L)	0,8 mL	0,68 mL	0,8 mL	1 mL
	Ácido glucorónico (2 g/L)	-	2 mL	-	-
	Glucose (65 g/L)	-	2 mL	-	-
	Hidrocloreto de glucosamina (33 g/L)	-	2 mL	-	-
Adicionar à mistura das Sol. Inorg + Org	α-amilase	29 mL	-	-	-
	Ácido úrico	1,5 mL	-	-	-
	Mucina	2,5 mL	0,6 mL	-	-
	BSA	-	0,2 mL	0,2 mL	0,18 mL
	Pepsina	-	0,66 mL	-	-
	Pancreatina	-	-	1,8 mL	-
	Lipase	-	-	0,3 mL	-
	Bílis	-	-	-	3 mL
	Tripsina	-	-	0,032 mL	-
	α-quimotripsina	-	-	0,348 mL	-
<b>pH final</b>		6,8 ± 0,2	1,3 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

Inicialmente, pesou-se 1,5 g de amostra homogeneizada para os tubos de centrifuga, adicionou-se 4 mL de uma solução que simula a saliva (pH = 6,5) a cada tubo e agitou-se a mistura no *vortex* durante 30 segundos. De seguida, juntou-se 8 mL de uma solução que simula o suco gástrico (pH = 1,3 ± 0,02) e foi novamente a agitar. Procedeu-se ao acerto do pH (2.0 ± 0.1), seguido de banho-maria durante 15 minutos a 37 °C ± 2 °C . Posteriormente, colocaram-se os tubos de centrifuga no agitador rotativo dentro da estufa durante 2 horas.

Seguidamente, colocou-se os tubos em gelo. De seguida, adicionou-se os sucos intestinais, em que se juntou 8 mL de uma solução que simula o suco duodenal ( $\text{pH} = 8,1 \pm 0,2$ ), 4 mL de bÍlis ( $\text{pH} 0 8,2 \pm 0,2$ ) e 1,3 mL de bicarbonato de sÓdio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Procedeu-se ao acerto do pH ( $6.5 \pm 0.5$ ) e seguiu para banho-maria durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . No fim, colocaram-se os tubos novamente no agitador rotativo dentro da estufa durante 2 horas. ApÓs a 2ª digestÓo, colocou-se os tubos de centrÍfuga a arrefecer à temperatura ambiente e pesaram-se. Posteriormente, os tubos foram a centrÍfugar durante 5 minutos a 2 750 g, onde ocorreu a separaçÓo do sobrenadante (fraçÓo bioacessÍvel) do *pellet* (fraçÓo nÓo-digerida), e de seguida pesou-se o mesmo. Na **figura 11**, encontra-se o esquema do ensaio de bioacessibilidade usado.



**Figura 11** - RepresentaçÓo esquemática do modelo de digestÓo *in vitro*.

### **Cálculo do Se e Hg bioacessÍvel e nÓo-digerido**

A percentagem (%) do Se e do Hg (NC) no bioacessÍvel e na fraçÓo nÓo-digerida foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ NC bioacessÍvel} = [\text{NC}] \text{ bioacessÍvel} \times 100 / [\text{S}]$$

$$\% \text{ NC nÓo-digerido} = [\text{NC}] \text{ nÓo-digerido} \times 100 / [\text{S}]$$

Sendo que:

[NC] = Concentração do nutriente (selênio) e contaminante (mercúrio)

[S] = [NC] na fração bioacessível + [NC] na fração não-digerida

A recuperação (%) do Se e Hg foi calculada da seguinte forma:  $S \times 100 / NC$  em que S é a quantidade de Se e Hg na fração bioacessível + a quantidade de Se ou Hg na fração não-digerida e em que NC é a quantidade de Se e Hg na amostra de peixe (cru e cozinhado) antes da digestão.

#### ***Cálculo de MeHg bioacessível***

A percentagem (%) de MeHg (C) na fração bioacessível foi estimada da seguinte forma:  
 $\% \text{ NC bioacessível} = [\text{NC}] \text{ bioacessível} \times 100 / [\text{NC}] \text{ na amostra de peixe (cru ou cozinhado)}$  antes da digestão.

#### ***Eficiência da digestão do método de digestão in vitro***

A eficiência do método de digestão utilizado foi avaliada através da recuperação do teor de azoto nas amostras cruas e cozinhadas como também na fração bioacessível.

### **2.3 Análise da composição química**

#### **Humidade**

O teor de humidade foi determinado com base no método descrito na NP 2282 (2009) e no procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização (DivAV) do IPMA. Todo o material e equipamentos utilizado está indicado na **tabela 4**.

**Tabela 4** - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de humidade

---

<b>Material e equipamentos</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>○ Material de uso corrente no laboratório</li><li>○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)</li><li>○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Cristalizadores de vidro com cerca de 90 mm de diâmetro e 15 mm de altura</li><li>○ Estufa de secagem, regulável a <math>105 \pm 2</math> °C (Memmert, ULE 500)</li><li>○ Exsicador</li></ul>

---

Pesou-se cerca de 5 g da amostra de peixe homogeneizado, com um rigor de  $\pm 0.001$  g, para um cristalizador de vidro previamente tarado. De seguida, as amostras foram secas em estufa a  $105 \pm 2$  °C, durante a noite. No dia seguinte, retirou-se da estufa o cristalizador para um exsicador, deixou-se arrefecer até peso constante, pelo menos 30 minutos, e pesou-se.

A humidade do produto, expressa em grama por 100 g de amostra, é dada pela seguinte fórmula:

$$100 - \left[ \frac{m_3 - m_1}{m_2} \right] \times 100$$

sendo que:

$m_1$  – massa do cristalizador (g);

$m_2$  – massa da amostra (g);

$m_3$  – massa do conjunto do cristalizador e da amostra, após secagem (g).

### **Cinza Total**

O teor de cinza total foi determinado com base no método descrito na NP 2032 (2009) e no procedimento técnico em uso na DivAV do IPMA. Todo o material e equipamentos utilizado está indicado na **tabela 5**.

**Tabela 5** - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de cinza total

<b>Material e equipamentos</b>	
○ Material de uso corrente no laboratório	○ Cadinho de porcelana
○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)	○ Estufa de secagem (Cassel)
○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)	○ Placa de aquecimento (Schott-Geräte, CK 111)
	○ Mufla, regulável a 500 ± 25 °C (Heraeus, MR 170 E)
	○ Exsicador

Pesou-se cerca de 5 g de amostra homogeneizada, com rigor de ± 0,001 g, para o cadinho previamente tarado. Colocou-se o cadinho na estufa, para secagem da amostra, a pelo menos 100 °C, durante uma noite. De seguida, transferiu-se o cadinho para a mufla, elevando a temperatura muito lentamente, até atingir uma temperatura de 500 ± 25 °C. Deixou-se durante 16 horas (uma noite) para incineração. Retirou-se o cadinho da mufla, arrefecendo-o no exsicador (durante cerca de meia hora), e de seguida pesou-se o cadinho. Repetiu-se as operações de incineração, arrefecimento e pesagem até que duas pesagens sucessivas não diferissem entre si em mais de 1 mg.

Calculou-se o teor de cinza total, expresso em grama por 100 g de amostra, usando a seguinte equação:

$$\frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times 100$$

Sendo que:

$m_1$  – massa do cadinho vazio (g);

$m_2$  – massa do cadinho com a amostra (g);

$m_3$  – massa do cadinho com o resíduo (g).

### **Proteína Bruta**

O teor de proteína bruta foi quantificado com base no descrito por Saint-Denis e Goupy (2004) (Método de Combustão de Dumas), utilizando para tal um aparelho analisador de azoto (LECO, FP-528). Todo o material e equipamentos utilizado está indicado na **tabela 6**.

**Tabela 6** - Material e equipamentos utilizados na análise do teor de proteína

---

<b>Material e equipamentos</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>○ Material de uso corrente no laboratório</li><li>○ Balança analítica com precisão de 0,0001g (Mettler Toledo modelo AT 200)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Analisador automático de azoto/proteína (Leco modelo FP-528)</li><li>○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, modelo GM 200)</li><li>○ Cápsulas pesagem (Leco)</li></ul>

---

Pesou-se para a cápsula cerca de 0,3 g de amostra homogeneizada e depositou-se a amostra no carregador do analisador automático de azoto/proteína e efetuou-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho. Seguindo a técnica descrita nas instruções do aparelho, efetuou-se 15 ensaios de brancos, para obter valor inferior ou igual a 24 000.

A calibração é realizada de forma automática. Realiza-se apenas a comprovação da mesma, utilizando uma amostra padrão de ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA).

No analisador automático de azoto/proteína FP-528, a amostra encapsulada sofreu uma combustão total em forno, seguida de arrastamento por um fluxo de oxigénio até ao depósito de homogeneização. Retirou-se uma alíquota após homogeneização sendo esta transportada por uma corrente de hélio para uma célula. O teor de azoto é medido por termocondutividade diferencial.

O teor de proteína em percentagem foi dado pelo equipamento, sendo o resultado expresso em g por 100 g de peso fresco.

## **2.4 Mercúrio Total**

A determinação do teor de mercúrio total foi baseada no método descrito na norma EPA (2007), e no procedimento técnico em uso na DivAV do IPMA. Todo o material e reagentes utilizado está indicado na **tabela 7**.

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

**Tabela 7** - Material e reagentes utilizados na análise do teor de mercúrio

<b>Material</b>	<b>Reagentes</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>○ Material de uso corrente no laboratório</li><li>○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)</li><li>○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)</li><li>○ Barquinhas de níquel</li><li>○ Analisador de mercúrio (Leco, AMA 254)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Óxido de alumínio 90 ativo básico (0,063-0,200) (Merck)</li><li>○ Ácido nítrico 65% (m/m) (Merck)</li><li>○ Solução de ácido nítrico 1% (v/v)</li><li>○ Solução padrão de mercúrio 1000 mg/L (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico) (Merck)</li></ul>

Preparou-se 100 mL de uma solução padrão de concentração de 10 µg/mL a partir da solução padrão de mercúrio (1 000 mg/L), utilizando como solvente ácido nítrico a 1%. A partir da solução de 10 µg/mL foi preparada uma solução padrão de 0,1 µg/mL e outra de 0,005 µg/mL. Para leitura do teor de mercúrio total no material liofilizado, congelou-se uma fração da amostra homogeneizada, distribuída uniformemente numa caixa de Petri, e colocada posteriormente no liofilizador durante 48 horas (a uma temperatura de -45 °C, a uma pressão de 10<sup>-1</sup> atmosferas, aproximadamente).

As amostras liofilizadas foram novamente homogeneizadas e colocadas em sacos de plástico devidamente identificados, sendo posteriormente embalados em vácuo e armazenados a uma temperatura de -20 °C, até posterior análise.

Pesou-se, aproximadamente, 10 mg de amostra para a barquinha (previamente descontaminada a 700 °C) e adicionou-se um pouco de óxido de alumínio até cobrir a amostra. Posteriormente, colocou-se a barquinha no analisador de mercúrio e efetuou-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho.

Inicialmente é feita uma decomposição térmica e química da amostra em forno. De seguida, uma retenção seletiva do mercúrio numa amálgama de ouro seguida de libertação após aquecimento. Ocorre o arrasto do vapor de mercúrio pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro. E por fim, leitura da absorção no comprimento de onda de 253,7 nm.

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

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

Sendo que:

m – massa da toma para análise (mg);

A – leitura dada pelo analisado (ng).

## 2.5 Metilmercúrio

A determinação do teor de mercúrio orgânico (metilmercúrio) foi baseado no método descrito por Scerbo e Barghigiani (1998) e modificada por Afonso *et al.* (2008).

Todo o material e reagentes utilizado está indicado na **tabela 8**. Todos os reagentes utilizados possuem um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plug Millipore).

**Tabela 8** - Material e reagentes utilizados na análise do teor de metilmercúrio

<i>Material</i>	<i>Reagentes</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Material de uso corrente no laboratório</li> <li>○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)</li> <li>○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)</li> <li>○ Vortex (Heidolph, ReAX)</li> <li>○ Tubos de centrífuga em FEP com tampa de rosca em ETFE (Nalgene)</li> <li>○ Centrífuga (Sigma, 3K29)</li> <li>○ Barquinha de níquel</li> <li>○ Analisador de mercúrio (AMA 254, Leco)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ácido bromídrico 47% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Tolueno ≥ 99,9% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Cloridrato monohidratado de L-cisteína ≥ 99,9(m/m) (Merck)</li> <li>○ Sulfato de sódio anidro ≥ 99,9% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Acetato de sódio ≥ 99,9% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Solução de cisteína (1% cisteína em 12,5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,8% de NaCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)</li> <li>○ Óxido de alumínio 90 ativo básico (0,063-0,200) (Merck)</li> <li>○ Ácido nítrico a 65% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Solução de ácido nítrico 1% (v/v)</li> <li>○ Solução padrão de mercúrio 1000 mg/l (Nitrato de mercúrio II em 0,5 M de ácido nítrico)</li> </ul>

Preparou-se 100 mL de uma solução padrão de concentração de 10 µg/mL a partir da solução padrão de mercúrio (1 000 mg/L), utilizando como solvente ácido nítrico a 1%. A partir da solução a 10 µg/mL foi preparada uma solução padrão de 0,1 µg/mL e uma de 0,005 µg/mL.

Pesou-se cerca de 100 mg de amostra liofilizada ou cerca de 5 g de bioacessível, para os tubos. Adicionou-se 10 mL de ácido bromídrico e 20 mL de tolueno. A remoção dos compostos orgânicos de mercúrio foi feita usando uma solução de cisteína. Agitou-se a mistura durante aproximadamente 1 minuto (manualmente e em *vórtex*) e centrifugou-se durante 20 minutos a 10 500 g. No final da centrifugação retirou-se 15 mL da fase orgânica e colocou-se nouro tubo ao qual se adicionou previamente 6 mL de solução de cisteína. Adicionou-se 15 mL de tolueno ao tubo inicial contendo o ácido bromídrico e repetiu-se o processo. De seguida, agitou-se (manualmente e em *vórtex*) o tubo contendo a solução de cisteína e tolueno (30 mL) e centrifugou-se durante 20 minutos a 10 500 g. Transferiu-se para outro tubo de centrífuga 3 ml de solução de cisteína para posterior análise. Dessa solução retirou-se 50 µL para amostras e 100 µL de brancos para a Barquinha. Colocou-se a Barquinha no analisador de mercúrio e efetuou-se a leitura de acordo com as instruções do aparelho.

A decomposição térmica e química da amostra (cisteína contendo os compostos orgânicos de mercúrio) foi feita num forno. Após o aquecimento, há uma retenção seletiva do mercúrio numa amálgama de ouro seguida de libertação. O vapor de mercúrio é arrastado pelo oxigénio até à célula de absorção do espectrofotómetro e a leitura da absorção é realizado com um comprimento de onda de 253,7 nm.

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

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

Sendo que:

V<sub>a</sub> – volume de amostra (µL), analisado no equipamento;

a – concentração lida (ng), da amostra;

b – concentração lida (ng) do branco;

m – massa (g), de toma para análise;

c – concentração lida (mg/kg), de mercúrio total.

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

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

Sendo que:

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

MeHg % - percentagem de mercúrio orgânico na amostra.

## 2.6 Selénio

A determinação do teor de selénio foi baseada no método descrito na norma EN 15763:2009, e no procedimento técnico em uso na DivAV e Divisão Oceanografia Ambiental e Bioprospeção (DivOA) do IPMA. Todo o material e reagentes utilizados estão indicados na **tabela 9**. Todos os reagentes utilizados possuíam um elevado grau de pureza e foi utilizada água ultra pura (obtida pelo sistema Milli-Q Plus Millipore).

**Tabela 9** - Material e reagentes utilizados na análise do teor de selénio

<i>Material</i>	<i>Reagentes</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Material de uso corrente no laboratório descontaminado com solução de ácido nítrico a 20%</li> <li>○ Balança com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo, AG 204)</li> <li>○ Moinho granulador de laboratório (Retsch, GM 200)</li> <li>○ Micro-ondas (CEM, MARS 5)</li> <li>○ Vasos de digestão (PTFE), capacidade de 100 ml, com resistência até 2,4 MPa</li> <li>○ Balões volumétricos de 25 mL em PMP</li> <li>○ ICP-MS (Thermo Elemental, X-series, UK)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ácido nítrico a 65% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Peróxido de hidrogénio a 30% (m/m) (Merck)</li> <li>○ Solução de ácido nítrico a 5% (v/v)</li> <li>○ Solução padrão de selénio (Alfa Aesar)</li> <li>○ Solução multi-elemento (Analytika, UNICAM)</li> <li>○ Solução padrão de plasma (Indium) (Alfa Aesar)</li> </ul>

Pesou-se cerca de 1 g da amostra (inicial, bioacessível e não digerido) para os vasos de digestão. Adicionou-se 4 mL de ácido nítrico (65% v/v) e 1 mL de peróxido de hidrogénio (30% v/v). Selou-se o vaso, e colocou-se o mesmo no micro-ondas. De seguida seleccionou-se o programa para iniciar a digestão (temperatura de 210 °C, durante 15 minutos, a uma pressão de 350 psi).

Após a digestão, removeu-se os vasos de digestão do micro-ondas e deixou-se arrefecer antes de os abrir. De seguida, abriu-se os vasos e passou-se os mesmos por água ultrapura (tampa e paredes). Perfez-se em balão volumétrico de 25 mL com água ultrapura.

A análise do Se foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A calibração foi feita usando soluções padrão de Se certificadas, com concentração de 1 000 mg/L. Esta concentração padrão de Se é dissolvida em HNO<sub>3</sub> a 5%. A afinação do equipamento foi realizada com uma solução multi-elemento diluída de concentração de 10 mg/L. A solução padrão de plasma (Indium), com uma concentração de 1 000 mg/L, foi escolhida para corrigir o desvio instrumental. O nível de detalhe utilizado foi de 50 µg/kg de peso húmido.

### ***Cálculo HBV<sub>Se</sub>***

Para o cálculo do Valor Benéfico de Selénio para a saúde (HBV<sub>Se</sub>), proposto por Ralston e Raymond (2014), o Hg total, MeHg e Se, expressos em mg/kg, foram convertidos em concentrações molares (µmol/kg).

$$HBV_{Se} = ([Se] - [Hg]) / [Se] \times ([Se] + [Hg])$$

$$HBV_{Se} = ([Se] - [MeHg]) / [Se] \times ([Se] + [MeHg])$$

As razões molares Hg:Se e MeHg:Se também foram calculadas.

## **2.7 Avaliação do perigo do consumo de tintureira**

O perigo derivado do consumo de tintureira foi quantificado através da percentagem em que a dose de ingestão diária ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) excede a ingestão semanal tolerável (TWI) ou a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) do contaminante. Para isso calculou-se a quantidade ingerida de mercúrio, através do cálculo da dose de ingestão diária ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal), utilizando para tal os valores médios obtidos de metilmercúrio ( $\text{mg}/\text{kg}$ ), considerando um adulto de 60 kg com uma ingestão diária de 169 g de peixe, e uma criança com um peso corporal de 20 kg e uma ingestão diária de 75 g de peixe (Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2011).

## **2.8 Tratamento dos resultados**

A análise estatística dos dados foi feita usando o software estatístico STATISTICA 6,0 © (Statsoft, Tulsa, EUA). Todos os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Para comparar os teores dos diversos elementos analisados entre as amostras cruas e sujeitas a tratamentos culinários recorreu-se à análise de variâncias “One-way” ANOVA e ao teste de “Tukey”. Para tal, foram previamente testados os pressupostos desta análise, i.e, normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene F-test). Sempre que não se verificaram os pressupostos foram utilizados testes de análise de variância não paramétricos “Krustall-Wallis”, seguido de testes de comparações múltiplas. Para comparar se existia diferenças nos teores dos diversos elementos analisados entre a amostra inicial (antes da digestão) e após a digestão (bioacessível), utilizou-se testes paramétricos “T-test e testes não paramétricos “Mann-Witney U-test”. Foi utilizado um nível de significância ( $\alpha$ ) de  $p < 0,05$  em todas as comparações.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Efeito dos tratamentos culinários

##### 3.1.1 Teores de humidade, cinza e proteína

Uma vez que a maioria dos produtos alimentares, que fazem parte da dieta humana, são submetidos a diferentes tratamentos culinários antes de serem consumidos, de modo a aumentar o seu aroma e sabor e torná-lo digerível e microbiologicamente seguro, uma análise dos efeitos dos tratamentos culinários na composição química do peixe é importante para uma correta avaliação do valor nutricional e também para avaliar a disponibilidade dos contaminantes. Durante o tratamento culinário, o músculo do peixe sofre várias mudanças químicas e físicas, estas incluem perda de peso, alteração da textura, encolhimento da fibra muscular, entre outras, que por sua vez estão fortemente ligadas à desnaturação da proteína e perda de água (Costa *et al.*, 2013). Assim, neste estudo, foi analisado o efeito de dois tratamentos culinários (cozer e grelhar) no teor de humidade, cinza e proteína na tintureira. Os resultados obtidos estão indicados na **tabela 10**.

**Tabela 10** - Valores médios e desvio-padrão do teor de humidade, cinza e proteína (g/100 g peso fresco) da tintureira crua e cozinhada

	<b>Cru</b>	<b>Cozido</b>	<b>Grelhado</b>
<b>Humidade</b>	79,5 ± 1,2 <sup>A</sup>	73,6 ± 1,4 <sup>B</sup>	64,7 ± 2,2 <sup>C</sup>
<b>Cinza</b>	1,16 ± 0,03 <sup>A</sup>	2,11 ± 0,2 <sup>B</sup>	3,42 ± 0,3 <sup>C</sup>
<b>Proteína</b>	21,8 ± 1,5 <sup>A</sup>	26,0 ± 1,8 <sup>B</sup>	36,8 ± 2,2 <sup>C</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários (p <0,05).

Os teores de humidade diminuíram após os tratamentos culinários, em que esta diminuição foi mais evidente na tintureira grelhada (**Tabela 10**). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Weber *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2013), onde verificaram também um decréscimo do teor de humidade no peixe grelhado. Esta diminuição leva a que os teores dos outros componentes como a proteína e a cinza aumentem significativamente no peixe cozinhado, o que corrobora os resultados obtidos (Weber *et al.*, 2008).

Assim, relativamente ao teor de cinza, este aumentou nos dois tratamentos culinários, tendo sido a tintureira grelhada a que apresentou o valor mais elevado. Segundo Bandarra *et al.* (2009), este aumento de cinza deve-se não só à perda de água como também à adição de sal durante os tratamentos culinários.

Analisando os resultados indicados na **tabela 10**, verificou-se que o teor de proteína aumentou, comparativamente à tintureira crua (cerca de 21,8%), na tintureira grelhada (36,8%), seguindo-se a cozida a vapor (26,0%). Como referido anteriormente, este aumento de proteína deveu-se principalmente à perda de água durante o tratamento culinário, que pode ter ocorrido devido à evaporação e também, provavelmente, devido à desnaturação da proteína induzida pelo calor durante o aquecimento, o que faz com que menos água fique retida na estrutura da proteína (Costa *et al.*, 2013).

No que respeita ao teor de proteína observado nas amostras cruas, num estudo levado a cabo pelo Instituto Nacional de Investigação das Pescas, foram estudadas algumas espécies de tubarão, entre elas a tintureira, e verificou-se que os teores mais elevados de proteína registaram-se em tubarões-sardo e anequim (cerca de 19%) e o mais baixos na tintureira (cerca de 12%), pelo que os valores obtidos na tintureira crua no presente estudo são superiores aos obtidos por Nunes, *et al.* (1989).

Segundo Belitz *et al.* (2009), o teor de azoto proteico no tecido muscular do peixe varia entre 2-3%, e o teor de azoto não proteico varia entre 9-18% do teor de azoto total nos teleósteos e cerca de 33-38% nos elasmobrânquios (como tubarão e raia). Pelo que o elevado teor de proteína registado na tintureira deve-se às quantidades elevadas de azoto não proteico (ureia) que é característico dos elasmobrânquios e que neste estudo foi medido como proteína, tal como verificado por Brennam e Gormley (1999), em que os teores de proteína registados em várias espécies de tubarão foram também elevados (aproximadamente 22%).

### **3.1.2 Concentração e bioacessibilidade do selénio, mercúrio e metilmercúrio**

Apesar do seu alto valor nutricional, tal como referido anteriormente, o peixe pode acumular concentrações de substâncias tóxicas de mercúrio, nos seus tecidos. Por esta razão este é considerado a maior fonte deste elemento na dieta alimentar humana. O pescado é assim, considerado um produto para o qual devem ser tomadas medidas adequadas para garantir o controlo químico dos riscos decorrentes do seu consumo (Cabañero *et al.*, 2004).

A concentração total de poluentes e a taxa de consumo de peixe são tradicionalmente índices usados na avaliação de perigo/risco para a saúde derivado do consumo de peixe, mas a quantidade total de poluentes ingeridos com os alimentos pode nem sempre refletir a verdadeira biodisponibilidade dos poluentes. Quando um poluente é ingerido via alimento, é primeiro libertado da matriz alimentar (bioacessibilidade), sendo que só depois absorvido através do epitélio intestinal, e ao entrar na corrente sistémica exerce os seus efeitos tóxicos (He e Wang, 2011). No entanto, é importante lembrar que a biodisponibilidade e bioacessibilidade são afetadas pelo tipo e composição do alimento, pela idade e estado de saúde do consumidor e também pela distribuição do composto no alimento (Moreda-Piñeiro *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, vários estudos têm vindo a ser publicados sobre a biodisponibilidade do mercúrio presente no peixe e sobre o efeito dos tratamentos culinários sobre o seu teor. Hoje sabe-se que os tratamentos culinários podem afetar a quantidade de contaminantes químicos presentes nos alimentos (Ouédraogo e Amyot, 2011; Costa *et al.*, 2014).

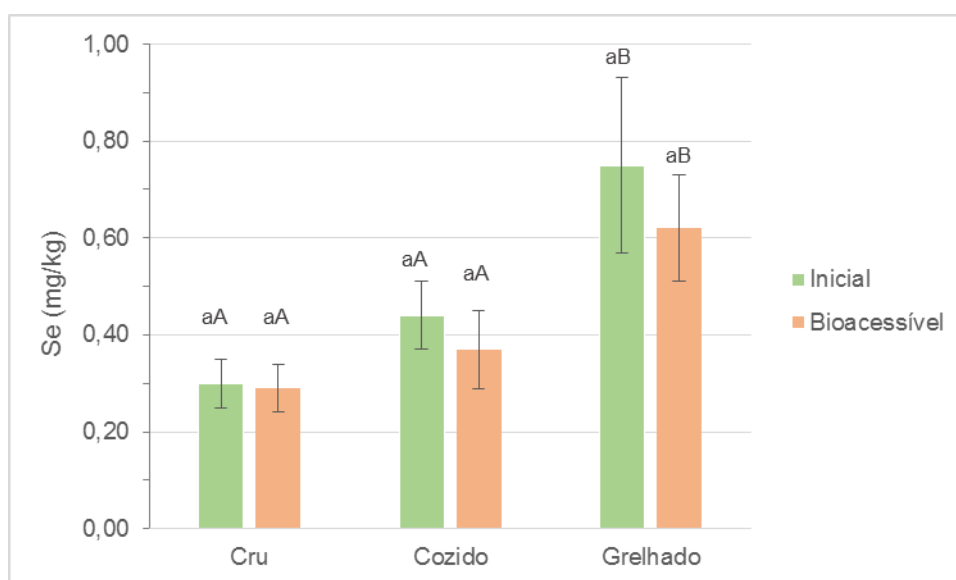
No presente estudo foi analisado o efeito de dois tratamentos culinários (cozer e grelhar) na concentração e bioacessibilidade do selénio, mercúrio e metilmercúrio.

#### *Hidrólise das proteínas*

A eficiência do método *in vitro* de digestão utilizado no presente trabalho foi avaliada através da determinação do azoto solúvel na fração bioacessível. Assim, após a digestão *in vitro* do peixe a recuperação de azoto (%) na fração bioacessível foi de  $96,4 \pm 1,0\%$  no cru,  $94,6 \pm 0,5\%$  no cozido,  $93,8 \pm 1,2\%$  no grelhado. Portanto, pode afirmar-se que praticamente todas as proteínas do peixe foram hidrolisadas, e conclui-se que o método de digestão da proteína foi eficiente, visto que mais de 94% do teor de azoto encontravam-se bioacessível após a digestão da tintureira crua e cozinhada. De facto, quando ingeridas, as proteínas do peixe apresentam uma alta digestibilidade e podem apresentar percentagens que rondam os 100% (Usydus *et al.*, 2009). Apesar de a maior parte ter sido digerido, a tintureira grelhada apresentou uma percentagem de azoto menor do que a crua, tal como verificado por Afonso *et al.* (2015), pelo que verificou-se que o grelhado é menos bioacessível que o cru (cru>cozido>grelhado).

## Selénio

No que respeita ao Se, verificou-se que após os tratamentos culinários ocorreu um aumento do teor deste elemento, em que a tintureira grelhada apresentou os valores médios superiores ( $0,75 \pm 0,18$  mg/kg), seguindo da tintureira cozida a vapor ( $0,44 \pm 0,07$  mg/kg), tal como se pode observar na **figura 12**. Costa *et al.* (2013) também verificou que o peixe grelhado foi o que apresentou teores de Se mais elevados. O aumento da concentração de Se nas amostras cozinhadas deve-se à perda de água que ocorre durante o tratamento térmico (Martins *et al.*, 2011).



**Figura 12** - Teor de Selénio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média  $\pm$  desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre frações iniciais e bioacessíveis ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

Comparativamente com os tratamentos culinários, verificou-se (**tabela 11**) que o Se está mais bioacessível na tintureira crua (98%). Segundo Afonso *et al.* (2015) estes resultados sugerem que este elemento está ligado às proteínas prontamente disponíveis para as enzimas digestivas utilizadas no modelo digestivo, permitindo assim uma libertação completa do Se da matriz alimentar. O valor mais baixo foi registado na tintureira grelhada ( $83 \pm 8,58\%$ ), o que está de acordo com a recuperação mais baixa de proteína registado no peixe grelhado (93,8%), mencionado anteriormente. Deve ser ressaltado que no pescado mais de 91% do Se total encontra-se na forma orgânica (Afonso *et al.*, 2015).

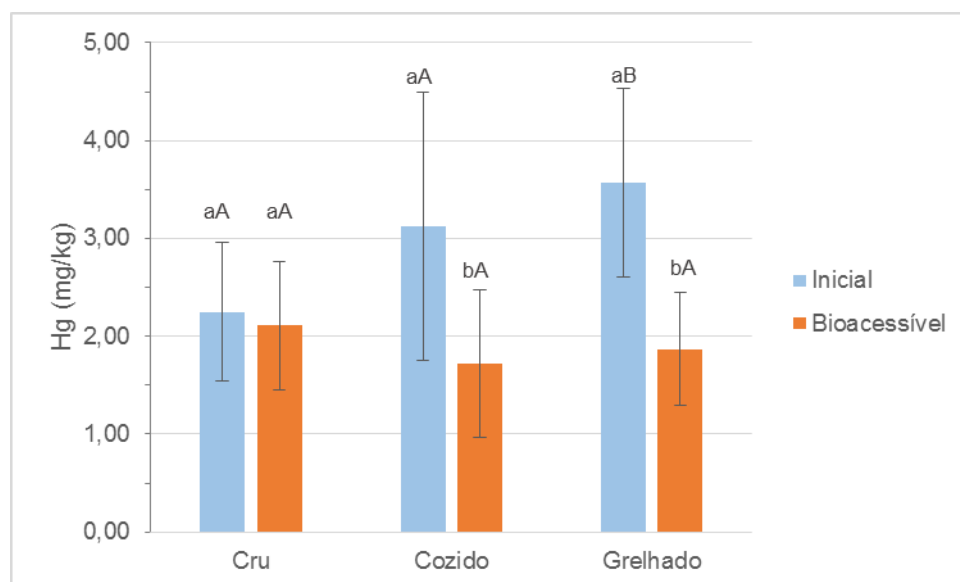
**Tabela 11** - Percentagem de Se Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada

Se	Cru	Cozido	Grelhado
% Bioacessível	98 ± 1,00 <sup>A</sup>	85 ± 6,40 <sup>B</sup>	83 ± 8,58 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

### **Mercúrio**

Tal como ilustrado na **figura 13**, verificou-se que após os tratamentos culinários ocorreu um aumento do teor de Hg, na medida em que a tintureira grelhada e cozida apresentaram teores mais elevados ( $3,57 \pm 0,96$  e  $3,12 \pm 1,37$  mg/kg, respetivamente), comparativamente com a amostra crua ( $2,25 \pm 0,71$  mg/kg).



**Figura 13** - Teor de Mercúrio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média ± desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre frações iniciais e bioacessíveis ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos no presente estudo, foram superiores aos verificados por Branco *et al.* (2007), uma vez que no músculo da tintureira crua obteve teores de Hg que variavam entre os 0,22-1,3 mg/kg ao passo que no presente estudo essa variação foi de 2,25-3,57 mg/kg.

Vários estudos revelaram que os tratamentos culinários geralmente tendem a aumentar os níveis de mercúrio devido a perdas de água (Burger *et al.*, 2003; Perelló *et al.*, 2008; Maulvault *et al.*, 2011), o que assim, corrobora os resultados obtidos. Segundo Quédraogo e Amyot (2011), o mercúrio presente nos músculos dos peixes parece não ser libertado significativamente durante o tratamento culinário, permanecendo provavelmente ligado às proteínas.

Os teores de Hg foram mais elevados nas amostras grelhadas, possivelmente por este ser um tratamento culinário mais drástico quando comparado com a cozedura, visto que o tempo de confeção da tintureira grelhada foi cerca de 7-8 minutos de cada lado do filete a uma temperatura rondou os 180 °C, enquanto que o tempo de confeção da tintureira cozida a vapor foi de 10 minutos a 100 °C. Por esta razão foi nas amostras de tintureira grelhada que se verificou uma perda de água mais acentuada. Perelló *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2013) verificaram resultados semelhantes, uma vez que foi observado um aumento da concentração de Hg nas amostras de peixe grelhado.

O Hg encontra-se mais bioacessível (**Tabela 12**) na tintureira crua (94%). Torres-Escribano *et al.* (2011) constataram que o tratamento culinário tem um efeito significativo sobre a bioacessibilidade do mercúrio durante a digestão *in vitro*. Os tratamentos culinários associados a tratamentos térmicos mais severos, como assar ou grelhar, geralmente levam a uma diminuição da bioacessibilidade deste contaminante (Afonso *et al.*, 2015), tendo sido esta diminuição mais acentuada na tintureira grelhada ( $52 \pm 4,64\%$ ). A baixa bioacessibilidade do Hg no peixe cozinhado pode estar relacionada com a desnaturação da proteína induzida pela temperatura. As proteínas desnaturadas tornam-se menos disponíveis à atividade das enzimas gastrointestinais usadas no método *in vitro* e conseqüentemente menos Hg é libertado na fração digerida (Maulvault *et al.*, 2011; EFSA, 2012). A desnaturação da proteína é maior quando o tratamento culinário é mais severo, como o caso da grelhagem (Costa *et al.*, 2013), que é precisamente aquele que apresenta as percentagens mais baixas de Hg bioacessível como de Se (Afonso *et al.*, 2015).

Por outro lado, Laird *et al.* (2009) concluiu que a absorção de Hg pelo trato GI não é limitada pela concentração de Hg presente no alimento, o que está de acordo com os estudos *in vivo* de biodisponibilidade (Nielsen, 1992). Assim, tal como o verificado no presente trabalho, a baixa bioacessibilidade do Hg parece não estar relacionada com o teor inicial de Hg.

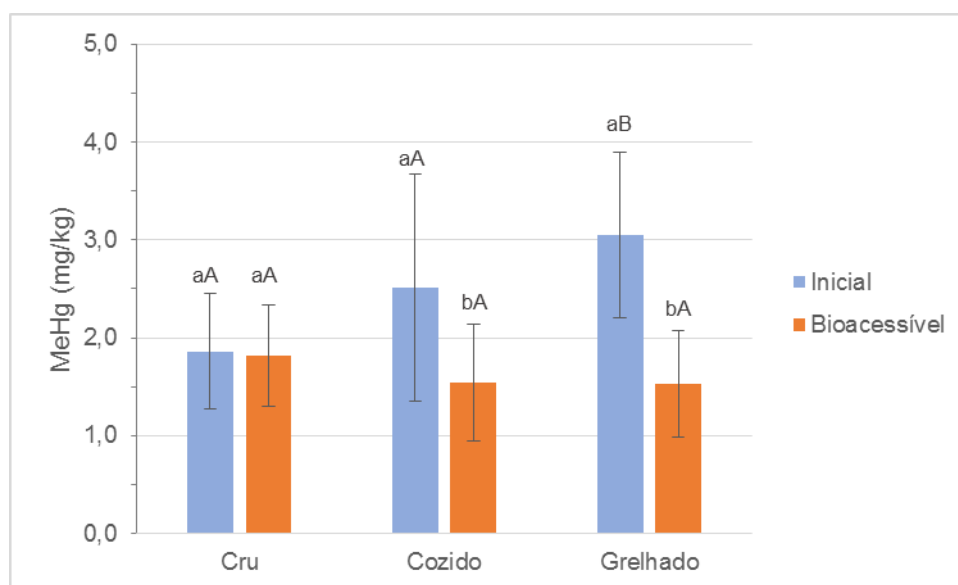
**Tabela 12** - Percentagem de Hg Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada

Hg	<i>Cru</i>	<i>Cozido</i>	<i>Grelhado</i>
% Bioacessível	94 ± 3,18 <sup>A</sup>	55 ± 5,12 <sup>B</sup>	52 ± 4,64 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

### Metilmercúrio

A maior parte do Hg presente no peixe, encontra-se na forma orgânica de MeHg (cerca de 80-90%) (EFSA, 2012). De facto, enquanto as concentrações iniciais de Hg variaram em média entre 2,25-3,57 mg/kg (valores de Hg para a tintureira crua e grelhada, respetivamente), as do metilmercúrio variaram entre 1,86-3,05 mg/kg (valores de MeHg para a tintureira crua e grelhada, respetivamente) (**Figura 13 e 14**). Estes valores representaram percentagens de MeHg acima de 80% do nível de Hg total.



**Figura 14** - Teor de Metilmercúrio (mg/kg) na fração inicial e bioacessível (média ± desvio padrão), determinado no músculo da tintureira crua e cozinhada. *Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre frações iniciais e bioacessíveis ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).*

Por outro lado, a percentagem de MeHg bioacessível variou entre 98% (tintureira crua) e 53% (tintureira grelhada) (**Tabela 13**). Este fato pode mais uma vez ser explicado pela desnaturação da proteína que ocorre após o tratamento culinário. Como referido por He e Wang (2011), a desnaturação das proteínas das fibras do músculo levam a um encolhimento do tecido e à formação de frações insolúveis, que tornam as proteínas menos digeríveis e os seus componentes menos bioacessíveis.

**Tabela 13** - Percentagem de MeHg Bioacessível (média e desvio-padrão) na tintureira crua e cozinhada

MeHg	<i>Cru</i>	<i>Cozido</i>	<i>Grelhado</i>
% Bioacessível	98 ± 5,01 <sup>A</sup>	59 ± 3,56 <sup>AB</sup>	53 ± 3,41 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários (p <0,05).

Os resultados mostraram que praticamente todo o MeHg presente no peixe cru é bioacessível (98%), o que está de acordo com o que foi relatado pela EFSA (2012), que afirma que a biodisponibilidade oral do MeHg é superior a 80%. A ATSDR (1999) e a FAO/WHO (2004) referem que aproximadamente 95 a 100% do MeHg presente no peixe é absorvido no trato GI. No entanto, tal como o verificado no presente trabalho e por outros autores (Afonso *et al.*, 2015), os tratamentos culinários podem levar a uma diminuição da bioacessibilidade deste contaminante, que é mais evidente no peixe grelhado. Pelo que, é excessivo afirmar que existe pouco impacto sobre o conteúdo de Hg nos alimentos processados ou cozinhados, e que os dados de Hg nos alimentos crus são adequados para uso em estimativas de exposição alimentar (EFSA, 2012).

Este estudo baseado em dois tratamentos culinários sugere que o MeHg não está tão prontamente disponível para absorção intestinal e, ainda mais importante, evidencia que uma porção elevada de Se presente no peixe pode potencialmente ser absorvido pelo trato GI.

### 3.2 Influência do selênio

Tal como já foi referido, o selênio é um dos componentes naturais do pescado, sendo reconhecido por possuir um efeito protetor contra a toxicidade do mercúrio (particularmente do metilmercúrio) (Ralston e Raymond, 2010).

A toxicidade do mercúrio está relacionada com a sua grande afinidade para os grupos sulfídrico das proteínas, mas apesar do enxofre ser mais abundante do que o selénio, o mercúrio liga-se seletivamente a este último, devido à grande afinidade existente entre estes dois elementos. Por esta razão, admite-se que o selénio reduz os efeitos adversos provocados pelo mercúrio, e desta forma, devido à interação existente entre estes dois elementos, o selénio parece ter um efeito na biodisponibilidade do mercúrio. No entanto, o Hg também pode exercer um efeito sobre a disponibilidade do Se. Pelo que o “efeito protetor” do selénio contra a toxicidade do mercúrio pode assim refletir a importância da manutenção de quantidades suficientes de selénio no organismo para suportar a normal síntese das selenoproteínas e da sua atividade (Raymond e Ralston, 2004; Afonso *et al.*, 2012).

A bioacessibilidade do selénio está fortemente relacionada com a espécie química presente no alimento. Geralmente a absorção das espécies de selénio é elevada (cerca de 70-85%), sendo que está descrito que as espécies orgânicas, presentes maioritariamente no peixe, estão mais biodisponíveis que as espécies inorgânicas de selénio (Pedrero e Madrid, 2008). De facto o teor de Se bioacessível presente na tintureira foi superior a 80%.

Uma ferramenta útil para uma melhor avaliação do risco relacionado com a ingestão de peixe é a razão molar entre o teor de Se e Hg. Por outro lado, foi desenvolvido o índice  $HBV_{Se}$ , que indica diretamente os benefícios da ingestão de Se como também os riscos de Hg (Ralston e Raymond, 2010; Ralston e Raymond, 2014). Pescado que apresente um índice  $HBV_{Se}$  negativo indica que o seu consumo aumenta o risco de efeitos adversos. No entanto, um valor positivo indica que o seu consumo pode trazer efeitos benéficos. A magnitude de valores positivos ou negativos indica os benefícios ou riscos relativos (Ralston e Raymond, 2014).

### ***Hg vs Se***

Verificou-se que todas as razões molares obtidas, entre o mercúrio e o selénio, foram superiores a 1 (**Tabela 14**), o que indica que o teor de mercúrio excede, numa base molar, o teor em selénio encontrado no músculo da tintureira, em ambas as frações (inicial e bioacessível). O contrário foi verificado, em amostra de peixe cru, por Afonso *et al.* (2008, 2013) em diversas espécies predadoras. Por outro lado, o índice  $HBV_{Se}$  foi negativo, indicando que o consumo desta espécie aumenta o risco de efeitos adversos para a saúde potenciados pelo Hg.

Apesar de o grelhado ter apresentado uma razão molar Hg:Se bioacessível próxima de 1, o índice HBV<sub>Se</sub> do mesmo é negativo, continuando a representar um perigo para o consumidor.

**Tabela 14** - Valores médios e desvio-padrão da razão molar Hg:Se e do índice HBV<sub>Se</sub> nas fração inicial e bioacessível (antes e após a digestão, respetivamente)

<b>Hg vs Se</b>				
<b>Tratamentos</b>	<b>Hg:Se</b>		<b>HBV<sub>Se</sub></b>	
	<b>Inicial</b>	<b>Bioacessível</b>	<b>Inicial</b>	<b>Bioacessível</b>
<b>Cru</b>	3,08 ± 1,08 <sup>a A</sup>	2,94 ± 1,02 <sup>a A</sup>	-33,58 ± 21,24 <sup>a A</sup>	-29,52 ± 19,17 <sup>a A</sup>
<b>Cozido</b>	2,86 ± 1,12 <sup>a A</sup>	1,82 ± 0,62 <sup>b AB</sup>	-45,19 ± 33,83 <sup>a A</sup>	-12,60 ± 10,93 <sup>b AB</sup>
<b>Grelhado</b>	1,92 ± 0,54 <sup>a A</sup>	1,18 ± 0,27 <sup>b B</sup>	-26,42 ± 18,71 <sup>a A</sup>	-3,66 ± 5,30 <sup>b B</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as razões molares iniciais e bioacessíveis e entre índice inicial e bioacessível ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

### **MeHg vs Se**

Verificou-se também que o teor de metilmercúrio excede o teor de selénio encontrado nas frações iniciais e bioacessíveis da tintureira, uma vez que todas as razões molares são maiores que 1 (**Tabela 15**). Por outro lado, todos os índices HBV<sub>Se</sub> foram negativos, indicando também que o consumo desta espécie aumenta o risco de efeitos adversos para a saúde. Num estudo efetuado em corvina crua e cozinhada verificou-se que os índices HBV<sub>Se</sub> obtidos na amostra (antes e após a digestão) foram todos positivos (Afonso *et al.*, 2015), ao contrário do verificado na tintureira

Tal como o verificado para o mercúrio total, apesar da razão molar MeHg:Se bioacessível ser igual a 1 para a tintureira grelhada, o índice HBV<sub>Se</sub> do mesmo é negativo, pelo que não se considera este tratamento culinário preferencial em comparação ao cozido.

**Tabela 15** - Valores médios e desvio-padrão da razão molar MeHg:Se (inicial e bioacessível) e do índice HBV<sub>Se</sub> (Inicial e bioacessível)

<b>MeHg vs Se</b>				
<b>Tratamentos</b>	<b>MeHg:Se</b>		<b>HBV<sub>Se</sub></b>	
	<b>Inicial</b>	<b>Bioacessível</b>	<b>Inicial</b>	<b>Bioacessível</b>
<b>Cru</b>	2,55 ± 0,90 <sup>a A</sup>	2,53 ± 0,86 <sup>a A</sup>	-21,77 ± 14,66 <sup>a A</sup>	-20,76 ± 13,46 <sup>a A</sup>
<b>Cozido</b>	2,26 ± 0,94 <sup>a A</sup>	1,55 ± 0,53 <sup>a AB</sup>	-26,80 ± 23,67 <sup>a A</sup>	-7,87 ± 7,77 <sup>a AB</sup>
<b>Grelhado</b>	1,63 ± 0,46 <sup>a A</sup>	1,00 ± 0,23 <sup>b B</sup>	-16,41 ± 13,46 <sup>a A</sup>	-0,35 ± 3,93 <sup>b B</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as razões molares iniciais e bioacessíveis e entre índice inicial e bioacessível ( $p < 0,05$ ); Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos culinários ( $p < 0,05$ ).

Atendendo o facto de todas as razões molares efetuadas entre o Hg ou MeHg e o Se (Hg:Se e MeHg:Se, respetivamente) terem sido superiores a 1 e todos os índices HBV<sub>Se</sub> serem negativos, isto leva a sugerir que o consumo de tintureira pode apresentar um perigo para a saúde, uma vez que o Se não consegue contrabalançar os efeitos negativos do Hg e MeHg sobre as selenoenzimas (Ralston e Raymond, 2010; Ralston e Raymond, 2014). Muito embora a tintureira grelhada tenha apresentado os valores mais baixos de Hg e MeHg bioacessíveis, o seu consumo pode representar também um perigo para a saúde humana.

### 3.3 Perigos associados ao consumo de tintureira

Como já foi referido, o mercúrio é um contaminante químico que causa uma crescente preocupação a nível mundial, uma vez que este se bioacumula nos organismos aquáticos ao longo da cadeia alimentar representando assim um risco toxicológico em particular para o Homem, uma vez que este ocupa o final da cadeia trófica. O consumo de pescado é assim responsável por ser a principal via de exposição do homem a este contaminante (Balshaw *et al.*, 2008).

Atendendo aos valores de Hg obtidos, verifica-se que as amostras de tintureira estudadas apresentam teores de mercúrio muito superiores aos limites estabelecidos pela Comissão Europeia (UE, 2008).

Desta forma, a tintureira apresentou concentrações de Hg superiores ao valor legislado de 1,0 mg/kg, de cerca de 225% na tintureira crua, enquanto essas percentagens foram de 312% e 357% na tintureira cozida a vapor e grelhada, respetivamente. Estas percentagens são muito mais elevadas do que as referidas por outros autores para espécies predadoras do topo da cadeia trófica (Afonso *et al.*, 2008; Afonso *et al.*, 2013).

Com base na avaliação dos resultados de vários estudos epidemiológicos envolvendo populações que se alimentam de peixe e sobre o desenvolvimento da neurotoxicidade, o Comité Perito em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JEFCA) da FAO/WHO (Organização para a Alimentação e Agricultura/Organização Mundial de Saúde) recomenda uma Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) de 4 µg/kg de peso corporal para o mercúrio inorgânico para alimentos em geral, exceto pescado. Relativamente ao pescado, estabeleceu uma dose semanal tolerável provisória para o MeHg de 1,6 µg/kg de peso corporal (FAO/WHO, 2010). Recentemente, o Painel dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) da EFSA, estabeleceu uma dose semanal admissível (TWI) para o MeHg de 1,3 µg/kg de peso corporal, expresso em Hg (EFSA, 2012).

Sendo Portugal um dos países europeus com maior consumo de pescado por habitante, cerca de 56,7 kg por ano (Comissão Europeia, 2014) a 61,6 kg/ano (Comissão Europeia, 2012) (o que corresponde a um consumo médio de cerca de 169 g de peixe *per capita*), no presente trabalho estimou-se a quantidade ingerida de metilmercúrio proveniente do consumo de tintureira. Esta estimativa foi feita através do cálculo da dose de ingestão diária (µg/kg de peso corporal) com base nos teores de MeHg obtidos na amostra inicial (antes da digestão) e bioacessível, nos teores de PTWI e TWI estabelecidos, e considerando um adulto de 60 kg com uma ingestão diária de 169 g de peixe e uma criança de 20 kg com uma ingestão diária de 75 g de peixe (Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2011) (**Tabela 16**).

**Tabela 16** - Concentração média de MeHg (inicial e bioacessível) no músculo de tintureira, em mg/kg, e a dose diária estimada, expressa em µg/kg peso corporal, para um adulto de 60 kg com uma ingestão diária de 169 g de peixe, e para uma criança de 20 kg com uma ingestão diária de 75 g de peixe.

<b>MeHg</b>											
<b>Tratamentos</b>		<b>Inicial</b>					<b>Bioacessível</b>				
		<b>Inicial (mg/kg)</b>	<b>Dose Diária Estimada (µg/kg de peso corporal)</b>				<b>Inicial (mg/kg)</b>	<b>Dose Diária Estimada (µg/kg de peso corporal)</b>			
			<b>Adulto</b>	<b>% excedida</b>	<b>Criança</b>	<b>% excedida</b>		<b>Adulto</b>	<b>% excedida</b>	<b>Criança</b>	<b>% excedida</b>
<b>Cru</b>	<b>PTWI<sup>1</sup></b>	1,86	5,24	328	6,98	436	1,82	5,13	320	6,83	427
	<b>TWI<sup>2</sup></b>			403		537			394		525
<b>Cozido</b>	<b>PTWI<sup>1</sup></b>	2,51	7,07	442	9,41	588	1,54	4,34	271	5,78	361
	<b>TWI<sup>2</sup></b>			544		724			334		444
<b>Grelhado</b>	<b>PTWI<sup>1</sup></b>	3,05	8,59	537	11,44	715	1,53	4,31	269	5,74	359
	<b>TWI<sup>2</sup></b>			661		880			332		441

<sup>1</sup> Considerando o PTWI de 1,6 µg/kg (FAO/WHO, 2010)

<sup>2</sup> Considerando o TWI de 1,3 µg/kg (EFSA, 2012)

A partir dos resultados obtidos, pode constatar-se que tanto o PTWI como o TWI estabelecido para o metilmercúrio (1,6 e 1,3 µg/kg de peso corporal, respetivamente), quando se considera um indivíduo de 60 kg são ultrapassados com o consumo de uma dose de 169 g de tintureira crua ou cozinhada. O mesmo se verificou no caso de uma criança de 20 kg com um consumo de uma dose de 75 g.

Tendo em conta que para um adulto, uma refeição de 169 g de tintureira cozida excede o PTWI em 442% e excede o TWI em 544%, leva a concluir que esta espécie de pescado pode representar um risco para a saúde humana. No caso do bioacessível, para a mesma refeição, é excedido o PTWI em 271% e o TWI em 334%, o que continua a ser valores muito elevados e preocupantes.

No caso de uma criança, os resultados ainda são mais alarmantes. Uma vez que numa refeição de 75 g de tintureira cozida tanto na fração inicial como na bioacessível, o PTWI e o TWI são excedidos em mais de 500 e 300%, respetivamente.

No que respeita ao teor de MeHg provenientes do consumo de tintureira grelhada verifica-se que, tanto para um adulto como para uma criança, os PTWI e TWI são excedidos, respetivamente, em 537 e 661% no adulto, e em 715 e 880% na criança. Se considerado o teor de MeHg bioacessível as percentagens encontradas são de 269 e 332% no caso do adulto e 359 e 441% no caso da criança, respetivamente para o PTWI e TWI.

Atendendo a estes resultados e à simulação efetuada para a tintureira, crua, cozida a vapor ou grelhada, o consumo desta espécie pode representar um risco para a saúde do consumidor.

## 4 Conclusão e perspectivas futuras

Ao analisar a influência dos tratamentos culinários, concluiu-se que as elevadas temperaturas promovem a perda de humidade, e por consequência, um aumento relativo dos outros constituintes, como a proteína e cinza.

Relativamente ao teor de Hg, a tintureira crua apresentou os valores mais baixos, com cerca de 225% da tintureira crua a exceder o limite estipulado pela Comissão Europeia de 1,0 mg/kg. Enquanto a tintureira cozida a vapor e grelhada ultrapassam o este limite em 312% e 357%, respetivamente.

Na avaliação da digestão na bioacessibilidade do Hg proveniente da tintureira sujeita a diferentes tratamentos culinários, constatou-se que o Hg fica mais bioacessível na tintureira crua (94%). Os resultados obtidos para a bioacessibilidade do Hg, indicam que grelhar a tintureira é o tratamento culinário que induz menor bioacessibilidade do Hg.

Como todas as razões molares entre o Se e Hg (MeHg) foram superiores a 1 e todos os índices  $HBV_{Se}$  foram negativos, conclui-se que pode existir um perigo elevado para a saúde proveniente do consumo de tintureira, uma vez que o Se não consegue contrabalançar os efeitos tóxicos do Hg. Para além disso o PTWI e TWI foram excedidos em mais de 400 e 200%, respetivamente, quando se considera um adulto de 60 kg e uma refeição de 169 g, e em mais de 300 e 500%, respetivamente, quando se considera uma criança de 20 kg e um consumo de 75 g de peixe.

Relativamente à espécie em estudo, conclui-se que a tintureira pode representar um perigo elevado para a saúde dos consumidores, levando a crer que em Portugal não existe qualquer controlo dos teores de contaminantes químicos no pescado.

Com este estudo, evidenciou-se a importância de se aprofundar os estudos sobre a bioacessibilidade de contaminantes químicos no pescado recorrendo a modelos de digestão *in vitro*, uma vez que estes podem ser um importante instrumento na avaliação do perigo/risco à exposição dos mesmos. Isto para que no futuro possa existir um controlo da presença destes contaminantes no pescado, tornando assim possível alertar os consumidores e aplicar medidas para um consumo de pescado mais adequado e que não traga riscos para a saúde dos consumidores.

No âmbito do tema desta Dissertação de Mestrado foi escrito um artigo, "Influence of bioaccessibility of MeHg and Se on the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked blue shark (*Prionace glauca*), a ser submetido para a revista Environmental Research, na edição especial no âmbito do projeto ECsafeSEAFOOD (EC FP7).

## 5 Fontes bibliográficas

AFONSO, C.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L., 2012. **Selenium in seafood and aquaculture products**. Em: Aomori, C & Hokkaido, M (Eds.), *Selenium: Sources, functions and health effects* (pp. 75-100). New York, NY, USA: Nova Science Publishers Inc.

AFONSO, C.; COSTA, S.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; COELHO, I.; CASTANHEIRA, I.; NUNES, M. L., 2015. **Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model**. *Food Chemistry*, vol. 170, 249-256.

AFONSO, C.; LOURENÇO, H. M.; PEREIRA, C.; MARTINS, M. F.; CARVALHO, M. L.; CASTRO, M.; NUNES, M. L., 2008. **Total and organic mercury, selenium and  $\alpha$ -tocopherol in some deep-water fish species**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 88, 2543-2550 p.

AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; 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*, vol. 137, 99–107 p.

AOMORI, C.; HOKKAIDO, M., 2012. **Selenium: Sources, functions and health effects**. 1.<sup>a</sup> Ed. Nova Science Publishers Inc., New York; 287 p.

ASAE, 2008. **Perigos Químicos nos Alimentos: Caso Especifico do Pescado**.

Ministério da Economia e da Inovação. Disponível em:

<http://www.asae.pt/?cn=59605963AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA>. Acesso em: 18/02/2014.

Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2011. **Alimentação Adequada: Faça mais pela sua Saúde!** Disponível em:

[http://www.apn.org.pt/xFiles/scContentDeployer\\_pt/docs/Doc783.pdf](http://www.apn.org.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc783.pdf). Acesso em: 3/10/2014.

ATSDR (1999). **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and

Disease Registry. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>. Acesso em: 27/02/2014.

BALSHAW, S.; EDWARDS, J.W.; ROSS, K.E.; DAUGHTRY, B.J., 2008. **Mercury distribution in the muscular tissue of farmed southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) is inversely related to the lipid content tissues.** *Food Chemistry*, vol. 111, 616-621 p.

BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L., 2009. **Chemical composition and nutritional value of raw and cooked black scabbardfish (*Aphanopus carbo*).** *Scientia Marina*, vol. 73, 105-113 p.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P., 2009. **Food Chemistry.** 4<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin, 1070 p.

BIM – Bord Iascaigh Mhara, 2014. **Nutritional Aspects of Fish.** Irish Sea Fisheries Board: Dublin, 40 p. Disponível em: <http://www.aquamedia.info/consensus/BIMNutrAspFish.pdf>. Acesso em: 24/02/2014.

BRANCO, V.; VALE, C.; CANÁRIO, J.; SANTOS, M. N., 2007. **Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L. 1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean.** *Environmental Pollution*, vol. 150, 373-380 p.

BRENNAM, M. H.; GORMLEY, T.R., 1999. **The quality of under-utilised deep-water fish species.** The National Food Centre. Dublin, 22 p. ISBN 1-84170-149-1. Disponível em: <http://t-stor.teagasc.ie/handle/11019/107>. Acesso em: 24/06/2014.

BURGER, J.; DIXON, C.; BORING, S.; GOCHFELD, M., 2003. **Effect of Deep-Frying Fish on Risk from Mercury.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 66, 817-828 p.

BURGER, J.; GOCHFELD, M.; JEITNER, C.; DONIO, M.; PITTFIELD, T., 2012. **Interspecific and intraspecific variation in selenium: mercury molar ratios in saltwater fish from the Aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium.** *Science of the Total Environment*, vol. 431, 46 – 56 p.

CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÁMARA, C., 2004. **Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestión method.** *Analytica Chimica Acta*, vol. 526, 51-61 p.

CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÁMARA, C., 2007. **Mercury–Selenium Species Ratio in Representative Fish Samples and Their Bioaccessibility by an In Vitro Digestion Method.** *Biological Trace Element Research*, vol. 119, 195–211 p.

CASTRO-GONZÁLEZ, M. I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M., 2008. **Heavy metals: Implications associated to fish consumption.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 26, 263–271 p.

CHOI, A. L.; GRANDJEAN P., 2008. **Methylmercury exposure and health effects in humans.** *Environmental Chemistry*, vol. 5, 112-120 p.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G.J., 2003. **The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations.** *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, 1731-1737 p.

CLARKSON, T.W.; VYAS, J.B.; BALLATORI, N., 2007. **Mechanisms of Mercury Disposition in the Body.** *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 50, 757-764 p.

Comissão Europeia. **A política comum da pesca em números - Dados estatísticos de base.** Luxemburgo, 2012. 52 p. ISSN 1830-9151. Disponível em: <https://infoeuropa.euocid.pt/registo/000049382/>. Acesso em: 31/01/2014.

Comissão Europeia. **A política comum da pesca em números - Dados estatísticos de base.** Luxemburgo, 2014. 52 p. ISBN 978-92-79-22753-0. Disponível em: [http://www.infoeuropa.euocid.pt/opac/?func=service&doc\\_library=CIE01&doc\\_number=000061188&line\\_number=0001&func\\_code=WEB-FULL&service\\_type=MEDIA](http://www.infoeuropa.euocid.pt/opac/?func=service&doc_library=CIE01&doc_number=000061188&line_number=0001&func_code=WEB-FULL&service_type=MEDIA). Acesso em: 23/09/2014.

COSTA, S.; AFONSO, C.; BANDARRA, N. M.; GUEIFÃO, S.; CASTANHEIRA, I.; CARVALHO, M. L.; CARDOSO, C.; NUNES, M. L., 2013. **The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): How culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 60, 277-285 p.

DGPA, 2007. **Plano estratégico nacional para a pesca 2007-2013.** MADRP – Direcção Geral das Pescas e Aquicultura. 84 p. Disponível em: [http://www.promar.gov.pt/Download/PROMAR/PEN\\_Pesca.pdf](http://www.promar.gov.pt/Download/PROMAR/PEN_Pesca.pdf). Acesso em: 21/02/2014.

EFSA, 2008. **Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes.** *The EFSA Journal*, vol. 766, 42 p. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/afc\\_ej766\\_se-yeasts\\_op\\_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/afc_ej766_se-yeasts_op_en.pdf?ssbinary=true). Acesso em: 31/01/2014.

EFSA, 2012. **Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food.** EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal*, vol. 10, 2985 p. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2985.pdf>. Acesso em: 21/02/2014.

EN 15763: 2009. Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of arsenic, cadmium, mercury and lead in foodstuffs by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after pressure digestion. ICS 67.050, UK, 22 p.

EPA, 2007. Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. SW-846, USA, Environment Protection Agency, 17 p.

FAO Fisheries and Aquaculture Department (2014a). **The State of World Fisheries and Aquaculture.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. ISBN: 978-92-5-108275-1. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso em: 25/09/2014.

FAO Fisheries and Aquaculture Department (2014b). ***Prionace glauca (Linnaeus, 1758).*** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/2018/en>. Acesso em: 31/07/2014.

FAO Fisheries and Aquaculture Department (2014c). ***Composition of fish.*** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en>. Acesso em: 31/07/2014.

FAO/WHO, 2004. **Evaluation of certain food additives and contaminants.** Geneva: 61<sup>st</sup> report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_922.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_922.pdf). Acesso em: 24/02/2014.

FAO/WHO, 2010. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-second meeting, Rome, 16–25 February 2010. Summary and Conclusions. Issued 16th March 2010. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72\\_rev.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf). Acesso em: 21/02/2014.

GOCHFELD, M., 2003. **Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, 174–179 p.

HE, M.; WANG, W., 2011. **Factors Affecting the Bioaccessibility of Methylmercury in Several Marine Fish Species.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, 7155-7162 p.

HOLMES, P.; JAMES, K.A.F.; LEVY, L.S., 2009. **Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?** *Science of the Total Environment*, vol. 408, 171–182 p.

INE, 2014. **Estatísticas da pesca 2013.** Instituto Nacional de Estatística, 135 p. Disponível em: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=210756920&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=210756920&PUBLICACOESmodo=2). Acesso em: 28/07/2014.

JAN, A.T.; MURTAZA, I.; ALI, A.; MOHD, Q.; HAQ, R., 2009. **Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategie.** *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 25, 1529–1537 p.

KANEKO, J.J.; RALSTON, N. V. C., 2007. **Selenium and Mercury in Pelagic Fish in the Central North Pacific Near Hawaii.** *Biology Trace Element Research*, vol. 119, 242–254 p.

LAIRD, B.D., SHADE, C., GANTNER, N., CHAN, H. M., SICILIANO, S. D., 2009. **Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration.** *Science of the Total Environmental*, vol. 407. 6003-6008 p.

MARTINS, C.; ALMEIDA, C. M.; ALVITO, P. C., 2011. **Selenium Content of Raw and Cooked Marine Species Consumed in Portugal.** *Food Analytical Methods*, vol.4, 77-83 p.

MAULVAULT, A. L.; MACHADO, R.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H. M.; NUNES, M. L.; COELHO, I.; LANGERHOLC, T.; MARQUES, A., 2011. **Bioaccessibility of Hg, Cd e As in cooked black scabbard fish and edible crab.** *Food and Chemistry Toxicology*, vol. 49, 2808-2815 p.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PÉREZ, C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LOURENZO, S.; BERMEJO-BARRERA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D., 2011. **In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples.** *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, n.º 2, 324-345 p.

National Park Service, 2014. Disponível em: [http://www.nature.nps.gov/air/AQBasics/understand\\_toxics.cfm](http://www.nature.nps.gov/air/AQBasics/understand_toxics.cfm). Acesso em: 06/10/2014.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C., 2008. **Selenium in food and the human body: A review.** *Science of the Total Environment*, vol. 400, 115-141 p.

NESHEIM, M. C.; YAKTINE, A. L., 2007. **Seafood Choices: Balancing Benefits and Risks.** Institute of Medicine (IOM). The National Academies Press (NAP). Washington, DC.

NIELSEN, J. B., 1992. **Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice.** *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 37, 85–122 p.

NP 2032, 2009. Determinação do teor de cinza total. Lisboa, Instituto Português da Qualidade, 7p.

NP 2282, 2009. Determinação do teor de humidade. Lisboa, Instituto Português da Qualidade, 7p.

NUNES, M. L.; BANDARRA, N. M.; BATISTA, I., 2003. **Fish Products: Contribution for a Healthy Food.** *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. ISSN 1579-4377: 453-457 p.

NUNES, M. L.; BATISTA, I.; CAMPOS, R. M.; VIEGAS, A., 1989. **Aproveitamento e valorização de algumas espécies de tubarão.** Instituto nacional de investigação das pescas. Relatórios técnicos e científicos, Lisboa.

OLMEDO, P.; HERNÁNDEZ, A.F.; PLA, A.; FEMIA, P.; NAVAS-ACIEN, A.; GIL, F., 2013. **Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury–selenium balance.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 62, 299–307 p.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C.J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C.J. G.; PEREBOOM, D.P. K.H.; SIPS, A.J. A.M., 2003. **Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 44, 281-287 p.

PEDRERO, Z.; MADRID, Y., 2008. **Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review.** *Analytica Chimica Acta*, vol. 634, 135–152 p.

PERELLÓ, G.; MARTÍ-CID, R.; LLOBET, J. M.; DOMINGO, J. L., 2008. **Effects of Various Cooking Processes on the Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Foods.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, 11262-11269 p.

PHIBBS, J.; FRANZ, E.; HAUCK, D.; GALLEGRO, M.; TSE, J. J.; PICKERING, I. J.; LIBER, K.; JANZ., D. M., 2011. **Evaluating the trophic transfer of selenium in aquatic ecosystems using caged fish, X-ray absorption spectroscopy and stable isotope analysis.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74, 1855–1863 p.

PILARCZYK, B.; TOMZA-MARCINIAK, A.; MARCINIAK, A., 2012. Products of Animal Origin as a Source of Se in Human Diet. Em: **Selenium: sources, functions and health effects.** 1.<sup>a</sup> Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York.

QUÉDRAOGO, O.; AMYOT, M., 2011. **Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish.** *Environmental Research*, vol. 111, 1064-1069 p.

RALSTON, N. V. C.; RALSTON, C. R.; BLACKWELL III, J. L.; RAYMOND, L. J., 2008. **Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity.** *Neuro Toxicology*, vol. 29, 802–811 p.

RALSTON, N. V. C.; RAYMOND, L. J., 2014. **Selenium status and intake influences mercury exposure risk assessments.** In Bañuelos, Lin, & Yin (Eds), *Selenium in the Environment and Human health* (pp. 203-205). London: Taylor & Francis Group.

RALSTON, N.V.C.; RAYMOND, L.J., 2010. **Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity.** *Toxicology*, vol. 278, 112–123 p.

RAYMOND, L. J.; RALSTON, N., 2004. **Mercury: selenium interactions and health implications.** *SMDJ Seychelles Medical and Dental Journal*, vol. 7, N.º 1, 72-77 p.

SAINT-DENIS, T.; GOUPY, J., 2004. **Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method.** *Ana. Chim. Acta* 515, 191–198 p.

SCERBO, R.; BARGHIGIANI, C., 1998. **Organic mercury determination in fish samples using an automatic mercury analyser.** *Environmental Technology*, 19: 339-342.

SIDHU, K.S., 2003. **Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 38, 336-344 p.

SIZER, F.S.; WHITNEY, E.N., 2003. **Nutrição - Conceitos e controvérsias.** 8ª ed. Manole, São Paulo. 785 p.

TORRES-ESCRIBANO, S.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R., 2010. **Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish.** *Food Additives and Contaminants*, vol. 27, n.º 3, 327–337 p.

UE, 2008. Regulamento (CE) n.º 629/2008 da Comissão de 2 de Julho de 2008. L 173 de 2.07.2008, 9 p.

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT; ADAMCZYK, M., 2009. **Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland.** *Food Chemistry*, vol. 112, 139-145 p.

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M., 2005. **Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food.** *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, 31-40 p.

VERSANTVOORT, C. H. M.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M., 2004. **Development of an in vitro digestion model to determine the bioaccessibility of contaminants from food.** Report nº 320102002, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

WANG, C.; HARRIS, W. S.; CHUNG, M.; LICHTENSTEIN, A. H.; BALK, E. M.; KUPELNICK, B.; JORDAN, H. S.; LAU, J., 2006. **n-3 Fatty acids from fish or fish-oil**

**supplements, but not alfa-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 84, 5-17 p.

WEBER, J.; BOCHI, V. C.; RIBEIRO, C. P.; VICTÓRIO, A. M.; EMANUELLI, T., 2008. **Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets.** *Food Chemistry*, vol. 106, 140-146 p.

WHO, 2008. **Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure.** Geneva, 176 p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf>. Acesso em: 20/02/2014.