INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGETICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Bioacessibilidade de Hg em peixes de diferentes níveis tróficos, originário da
Amazônia**

MARIANA AYUMI SIBUYA NAKATSUBO

Dissertação apresentada como parte dos
Requisitos para obtenção do Grau De
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza
Sarkis

SÃO PAULO
2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGETICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Bioacessibilidade de Hg em peixes de diferentes níveis tróficos, originário da
Amazônia**

Versão corrigida

MARIANA AYUMI SIBUYA NAKATSUBO

Dissertação apresentada como parte dos
Requisitos para obtenção do Grau De
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais
Orientador:
Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza
Sarkis

SÃO PAULO
2017

DEDICATÓRIA

Primeiramente gostaria de dedicar este trabalho aos meus pais, **Iracema Mitiko Sibuya e Yoshiyuki Nakatsubo**, por tudo aquilo que fizeram e fazem por mim, pelo carinho, amor, amizade, ensinamentos, paciência fundamentais para o meu crescimento pessoal e de caráter.

**“Contudo ele partiu. Afinal não estava procurando um novo lar. Era um viajante.
Um navegador. Alguém que segue traçando um curso e procurando o caminho. E ele
ainda procurava seu caminho”
Em algum lugar nas estrelas – Clare Vanderpool**

AGRADECIMENTOS

- Ao IPEN, pela oportunidade deste trabalho;
- Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis, pela orientação, ensinamentos, confiança, apoio na execução do trabalho e pela paciência de me aguentar desde a iniciação científica;
- Aos companheiros de laboratório: Marcos, João, Cristina, Mauricio, Rafael, Marcelo, Ana, Bianca pela paciência, bate papo e dicas para vida.
- A Bianca Pirilo, por anos de amizade (só a gente se entende);
- Aos professores que passaram na minha vida e ao longo das disciplinas do mestrado;
- Aos funcionários da limpeza e da copa, fundamentais para a qualidade de vida e do trabalho;
- Ao apoio financeiro CAPES;
- Aos amigos e familiares que me incentivaram e que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

BIOACESSIBILIDADE DE HG EM PEIXES DE DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS, ORIGINÁRIO DA AMAZÔNIA

Mariana Ayumi Sibuya Nakatsubo

RESUMO

No Brasil, principalmente na região Amazônica, o pescado representa uma importante fonte proteica, especialmente para as populações indígenas e ribeirinhas. Por outro lado, estudos demonstram altos níveis de mercúrio (Hg), nos pescados desta região. O Hg é conhecido por ser altamente neurotóxico e por possuir efeito bioacumulativo, sendo os peixes a principal via de contaminação pelo homem. Neste trabalho, foi realizado um estudo de bioacessibilidade *in vitro* de Hg total em espécies originadas da Amazônia central. O Hg foi determinado utilizando-se o analisador direto de mercúrio (DMA-80, Milestone Inc) com limite de detecção de 0,003 ng. Neste trabalho foi realizada a validação da metodologia e a validação da bioacessibilidade, juntamente com os cálculos de incerteza de ambos os processos. A validação analítica seguiu o DOQ-CGCRE-008-004 (INMETRO, 2016), tendo uma incerteza de 14,7%. Já a bioacessibilidade foi validada através da análise do material de referencia certificado: Dourada – 1 (*Brachyplatystoma Flavicans*) (IPEN-Brasil), certificado para mercúrio total ($0,271 \pm 0,057 \mu\text{g g}^{-1}$) considerando a quantidade de Hg recuperado em cada etapa do processo e o balanço de massa final do processo. Os resultados obtidos demonstraram a robustez do procedimento com uma recuperação >90%, coeficiente de variação < 10%, limite de detecção de $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e o limite de quantificação de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ e incerteza de 25%. O estudo indicou que a média bioacessível do mercúrio total é de 60%, para as espécies carnívoras, e 45% para os não carnívoros, demonstrando que o mercúrio presente no tecido não é absorvido pelo organismo em sua totalidade. A especiação do MeHg, indicou que do total bioacessível apenas uma parcela de 80% é MeHg demonstrando que a absorção de Hg pelo corpo pode ser ainda menor. Estudos como esse são fundamentais para influenciar nas decisões regulatórias, agências de controle dos níveis permissíveis de contaminantes nos alimentos, visto que, somente avaliar a concentração total do contaminante e não considerar a sua bioacessibilidade pode levar a um equívoco quanto à segurança de consumo do alimento.

Palavras chave – Bioacessibilidade, peixe, mercúrio, Amazônia

BIOACCESSIBILITY OF Hg IN FISH FROM DIFFERENT TROPHIC LEVELS, ORIGINATING FROM THE AMAZON

Mariana Ayumi Sibuya Nakatsubo

ABSTRACT

In Brazil, mainly in the Amazon region, fish represent an important protein source mainly for the indigenous and riverside populations. On the other hand, studies showed high levels of mercury in the fish of this place. Hg is known to be highly neurotoxic and bioaccumulative. Fishes are well known for being the main source of Hg for humans. In this work, an *in vitro* bioaccessibility of total Hg was carried out in species originating from Amazonia central. Mercury was determined using the mercury direct analyzer (DMA-80, Milestone Inc) with a detection limit of 0.003 ng. In this work, it was performed methodological and bioaccessibility validation, and the calculation for uncertainty in both processes. Analytical validation followed the DOQ-CGCRE-008-004 (INMETRO, 2016), presenting uncertainty of 14.7%. Validation for bioaccessibility considered the recovery Hg in each step of the process and mass balance from each stage of the process. The certified reference material: Dourada - 1 (*Brachyplatystoma Flavicans*) (IPEN-Brazil), certified for total mercury ($0.277 \pm 0.057 \mu\text{g g}^{-1}$). The result obtained show a great robustness, a recovery > 90%, the coefficient of variation <10%, limit of detection of $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ and limit of quantification of $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ and a uncertainty of 25%. The study indicated that the mean bioaccessible fraction of total mercury is 60% for carnivorous species and 45% of non-carnivorous species, demonstrating that not all is absorbed by the human body. The speciation of MeHg indicated that from the total bioaccessible only a portion of 80% is MeHg demonstrating that the uptake of Hg by the body may be even lower. Studies like this are fundamental to influence the regulatory decisions by agencies to control the permissible levels of contaminants in food, since evaluating the concentration of contaminants and not considering their bioaccessibility may lead to a misunderstanding regarding the safety of food consumption.

Keywords: Bioaccessibility, Amazonia, fish, Hg

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Consumo de pescado Mundial	12
1.2 Importância econômica dos pescados	13
1.3 Contaminação de mercúrio (Hg)	13
1.4 Contaminação por Hg na Amazônia	15
1.5 Importância do peixe na alimentação da população da Amazônia	16
2 OBJETIVO	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 Bioacessibilidade, bioatividade e biodisponibilidade	20
3.2 Estudos de Bioacessibilidade	21
3.3 Modelo <i>in vitro</i> de bioacessibilidade	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Amostragem e coleta	25
4.2 Organismos de estudo	25
4.3 Instrumentação	27
4.4 Geração de Vapor Frio acoplado ao Espectrômetro de Absorção Atômica com injeção em fluxo (FIA-CV-AAS)	28
4.5 Analisador de Hg DMA -80	28
4.6 Especiação do Mercúrio	29
4.7 Metodologias de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	30
4.8 Validação	31
4.8.1 Validação analítica	32
4.9 Incerteza da medição	33
4.9.1 Cálculo de incerteza da medição	34
4.9.2 Cálculo de incerteza analítica	34
4.10 Validação e incerteza da bioacessibilidade	36
4.11 Análises dos Resultados	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

5.1 Validação da Metodologia Analítica DMA -80	38
5.2 Incerteza Associada ao Método Analítico DMA-80	39
5.3 Concentração total de Hg nas espécies estudadas.....	40
5.4 Experimentos iniciais de bioacessibilidade com peixe <i>in natura</i>	41
5.4.1 Primeiro experimento: Cabañero (2004)	41
5.4.2 Segundo experimento: redução proporcional da quantidade de amostra e solução	43
5.4.3 Terceiro experimento: redução de amostra e aumento de solução	44
5.4.4 Comparação entre os experimentos 1 a 3	45
5.5 Validação de Metodologia de bioacessibilidade: Cabañero (2004).....	46
5.6 Incerteza no processo de bioacessibilidade.....	47
5.7 Bioacessibilidade de Hg total.....	47
5.8 Ensaios adicionais	50
6 CONCLUSÃO	52
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
APENDICE 1	54
APENDICE 2.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Nível de consumo de pescado pessoal* de acordo com a região do Brasil, 2008/2009.	16
Tabela 2 - Visão geral dos modelos mais significantes usados para avaliar a bioacessibilidade em peixes.....	24
Tabela 3 – Concentração de mercúrio em dois materiais de referencia de acordo com suas massas	38
Tabela 4 – Concentração de Hg total no tecido muscular dos peixes.....	40
Tabela 5 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %.....	41
Tabela 6 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %.....	42
Tabela 7 Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e o resíduo gastrointestinal e sua total recuperação em %, do primeiro experimento.	42
Tabela 8 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %.....	43
Tabela 9 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %.....	43
Tabela 10 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e pellet gastrointestinal e sua total recuperação em %	44
Tabela 11 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %.....	44
Tabela 12 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %	45
Tabela 13 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e o resíduo gastrointestinal e sua total recuperação em % , do terceiro experimento	45
Tabela 14 - Desempenho do laboratório no MRC Dourada 1	47
Tabela 15 - Valores de Hg bioacessível em todas as frações do ensaio <i>in vitro</i>	47
Tabela 16 - Desempenho do laboratório no MRC Dourada 1	50
Tabela 17- Valores de MeHg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da Solução Gástrica e da Solução Intestinal e sua total recuperação em %	51

LISTA DE FIGURAS

Figura1- Taxa de consumo de pescado <i>per capita</i> mundial dos anos de 2011 – 2013.....	12
Figura 2 - Diferentes fontes de mercúrio.	14
Figura 3 - Produção de pescado da pesca extrativa continental em toneladas em 2010 e 2011 discriminada por Unidade da Federação.	17
Figura 4 - Esquema com a definição de bioacessibilidade, bioatividade e biodisponibilidade.....	20
Figura 5 - Mapa indicativo dos pontos de amostragens no Rio Tapajós	25
Figura 6 – Imagens dos peixes estudados	27
Figura 7 - Diagrama esquemático do funcionamento do analisador de Hg DMA -80	29
Figura 8 - Metodologia proposta por Cabañero (2004), composta da digestão gástrica e intestinal.....	31
Figura 9: Diagrama de Ishikawa para determinação de Hg.	33
Figura 10 - Contribuição da incerteza em cada etapa do processo analítico.	39
Figura 11- Imagem do gráfico da recuperação em % de fase dos 3 experimentos.....	46

1 INTRODUÇÃO

A alimentação é um processo vital para o funcionamento e manutenção da vida. Através dos alimentos é possível obter elementos essenciais e nutrientes tais como: cálcio, ferro, zinco, magnésio, proteínas, vitaminas, carboidratos e lipídios. (VERSANTVOORT et al., 2004; WOLLSTONECROFT et al., 2008). No entanto, devido à contaminação ambiental proveniente de fenômenos naturais e da ação humana, os alimentos podem tornar-se veículos de exposição a substâncias indesejáveis, muitas vezes potencialmente tóxicas, resultando graves problemas de saúde (PERES et al., 2003; DAL SOGLIO e KUBO, 2009).

Entre os principais alimentos consumidos pelo homem, os peixes são uma importante alternativa nutricional, uma vez que apresentam altos níveis de minerais (fósforo, iodo e potássio), lipídios insaturados (ômega 9, ômega 6 e ômega 3), fosfolipídios, vitaminas (A e D) e proteínas de elevado valor biológico. Dessa forma é considerado um componente ideal para uma dieta saudável e equilibrada (PRUSKI e DIXON, 2002).

1.1 Consumo de pescado Mundial

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) o nível global de consumo de pescados pode variar muito de país para país. Para as populações insulares, ribeirinhas e nos países que possuem extensas fronteiras marítimas os peixes são considerados alimentos de primeira necessidade (FAO, 2016) (Figura 1).

Figura1- Taxa de consumo de pescado *per capita* mundial dos anos de 2011 – 2013.

FONTE - FAO, 2016.

Nos últimos anos, o nível de consumo de pescados também tem sido influenciado pela globalização. Avanços nas áreas de transporte, comercialização, distribuição, aquicultura e na ciência trouxeram eficiência e, conseqüentemente, redução nos custos de comercialização, sendo possível aumentar a oferta de pescados, para os consumidores. O mercado que antes apresentava padrões regionais, hoje é mais homogêneo e globalizado (FAO, 2016).

1.2 Importância econômica dos pescados

Os maiores produtores de pescado do mundo são os países asiáticos: China, Indonésia, Índia e o Japão considerando dados do ano de 2014 (FAO, 2016). Já o Brasil, em 2011, se encontrava em 19º lugar com 0,75% da produção mundial de pescado, o que equivale a cerca de 1.264.765 toneladas/ano. Os principais destinos para exportação dos pescados brasileiros são os Estados Unidos da América, Tailândia, Espanha, Coreia do Sul e a China (SEBRAE, 2014).

Quando comparado a 2010, a produção mundial apresentou um aumento de 13,3%, sendo a pesca extrativista marinha responsável por 38,7%, à aquicultura continental 38%, a pesca extrativista continental 17,4 % e a aquicultura marinha é de aproximadamente 6% (BRASIL, 2011). Para 2030, o Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA) tem como objetivo ampliar e diversificar a produção de espécies que vão desde a tilápia até espécies da Amazônia como o tambaqui e o pirarucu, fazendo com que o Brasil fique entre os maiores do mundo (SEBRAE, 2014).

Entretanto, apesar de ser de grande importância econômica e nutricional os pescados possuem alta capacidade de bioacumular elementos potencialmente tóxicos tais como, mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As) em seu tecido (CANO-SANCHO et al., 2015; MAULVAULT et al., 2011; MATOS et al., 2015). No caso específico do Hg, os peixes são considerados a maior fonte de obtenção deste elemento pelo organismo humano (MAULVAULT et al., 2011., TORRES-ESCRIBANO et al., 2011).

1.3 Contaminação de mercúrio (Hg)

O mercúrio (Hg) é um metal de cor prateada, é o único elemento do grupo metálico a apresentar-se em condições naturais de temperatura e pressão sob a forma líquida, quando aquecido forma vapores incolores e inodoros (MARINS et al., 2002). Possui elevada volatilidade e solubilidade em água e lipídios, o que facilita a transposição

através dos alvéolos pulmonares e da barreira hematoencefálica, levando à fixação e lesão do sistema nervoso. É conhecido por ser altamente neurotóxico e por possuir efeito bioacumulativo nos tecidos biológicos (FARIA, 2003; WHO, 1991).

A presença no meio ambiente pode ocorrer de forma natural, através de erupções vulcânicas, lixiviação do solo, ou através de atividades antropogênicas como produto e processo nas áreas de mineração, queima de combustível fóssil, pesticidas e fertilizantes (BRASIL, 2013; UNEP, 2008; AZEVEDO, 2003) (Figura 2).

Figura 2 - Diferentes fontes de mercúrio.

FONTE - AZEVEDO, 2003.

A contaminação antropogênica de Hg no Brasil provém principalmente das atividades das indústrias eletro-eletrônicas responsáveis pela produção de lâmpadas fluorescentes e baterias, indústrias de tinta e indústrias químicas. A contaminação por mercúrio ocorre principalmente devido ao descarte inadequado do produto final, aterros sanitários ou depósitos de produtos sólidos (LACERDA, 1997; DURÃO e WINDMOOLLER, 2008). Outra grande fonte de contaminação é a ação de mineradores e garimpeiros na região Amazônica, que utilizam o metal para separar o ouro de outros elementos quando extraído do leito dos rios. Essa atividade é uma das maiores causas de contaminação de Hg no meio aquático (ULRICH, 2001; NEVADO et al., 2010).

Uma vez liberado para o ambiente, o Hg inorgânico pode sofrer um processo de metilação que consiste na interação de radicais metil (CH_3) com o Hg, formando o

composto organo-metálico, metilmercúrio (CH_3Hg^+), considerado a forma mais tóxica deste metal (MAURO et al., 1999; ULRICH, 2001; AZEVEDO, 2003; BISINOTI e JARDIM, 2004).

A metilação pode ocorrer tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, através de dois mecanismos: biológico, envolvendo microrganismos e fungos; e o químico, ocorrendo por via de reação e transmetilação, radiação ultravioleta na presença de compostos orgânicos ou pela reação com ácido fúlvico e húmico (BISINOTI e JARDIM, 2004; GOMES, 2014). O metilmercúrio (MetilHg), permanece na hidrosfera até ser incorporado nas cadeias alimentares passando pelo processo de biomagnificação (AZEVEDO, 2003). Quando ingerido, o suco gástrico influencia na formação de cloreto ou sulfetos que são facilmente absorvidos pela parede do epitélio intestinal e, ao entrar na corrente sanguínea, atravessa com facilidade as células dos tecidos. Devido à sua lipossolubilidade, acumula-se principalmente no sistema nervoso central, inibindo a divisão e a migração das células neurais e interrompendo a citoarquitetura do desenvolvimento do cérebro, levando a disfunção neural, paralisia e até a morte (AZEVEDO, 2003, BRASIL, 2016).

1.4 Contaminação por Hg na Amazônia

A Floresta Amazônica possui a maior biodiversidade de plantas e animais do planeta. Localiza-se numa área de aproximadamente sete milhões de quilômetros quadrados e engloba nove nações (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Venezuela). Cerca de 60% de sua área está localizada no Brasil. Dependendo do período do ano, seu complexo ecossistema aquático é capaz de variar drasticamente em tamanho, localização geográfica e geoquímica. Nela, está presente a maior diversidade de peixes fluviais do planeta, estimada em aproximadamente 2500 a 3000 espécies (DOREA, 2003; DOREA et al., 2006).

O histórico de contaminação por Hg na Amazônia vem desde o final da década de 70 até a década de 80, onde ocorreu o ápice da corrida do ouro. Estima-se que 80 a 250 toneladas de mercúrio foram utilizadas, nas principais bacias do rio Tapajós e Madeira (BASTOS, 1997; CAHETÉ, 2008; LACERDA E SALOMONS, 1992; PADOVANI, 1995; AZEVEDO-SILVA et al., 2016).

Ao longo das últimas décadas, uma nova ameaça de contaminação vem ganhando força: pastagens e plantações de soja (MARGULIS, 2004; VERGARA e SCHOLZ, 2011) vêm ocupando gradativamente o lugar de florestas e, conseqüentemente,

aumentando o desmatamento na região. Essas atividades de alguma forma trazem um risco adicional de contaminação, uma vez que, desenvolvidas de forma desordenadas, podem liberar grandes quantidades de Hg no meio ambiente. Além disso, a geoquímica do solo da Amazônia libera mercúrio de forma natural o que leva o aceleramento dos danos ambientais (ROULET et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2000; RODRIGUES, 1994; MORENO-BRUSH et al., 2016).

1.5 Importância do peixe na alimentação da população da Amazônia

Em uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2011, intitulada Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) dos 2008/2009, verificou-se que o consumo de pescados na região norte foi o maior quando comparado às outras regiões do Brasil, com cerca de 38,1 kg/ *per capita*/ ano (BRASIL, 2011) (Tabela 1). Dentre as espécies mais consumidas podemos destacar os peixes como os *Cichla* spp., *Mylossoma* spp., *Leporinus*, sp., *Prochilodus nigricans*, *Semaprochilodus* sp., *Plagioscion* sp., *Brycon cephalus*, *Triportheus* spp. y *Pseudoplatystoma fasciatum* (ISAC e DE ALMEIDA, 2011).

Tabela1 - Nível de consumo de pescado pessoal* de acordo com a região do Brasil, 2008/2009.

Tipo	Regiões					
	Brasil	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste
Pescado total	10,0	38,1	14,6	5,4	3,1	3,4
Peixes frescos e preparações	8,5	34,7	12,8	4,2	2,5	3,1
Peixes em conserva	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1
Peixes salgados	1,1	2,5	1,4	0,9	0,3	0,2
Outros pescados	0,3	0,8	0,2	0,2	0,3	0,0

* Quantidade em quilograma por ano.

FONTE – BRASIL, 2011.

Segundo um levantamento realizado por Isaac e de Almeida (2011), em um período de 24 horas o consumo de pescado está presente em 70% das refeições diárias. O consumo per capita ao ano varia entre 18,3 kg no interior do Amazonas a 294 kg no alto do Solimões. Dessa forma os pescados podem ser considerados uma das principais fontes de proteínas na dieta da população, principalmente para os moradores de menor poder aquisitivo das regiões ribeirinhas. Esse alto consumo, deve-se não somente pela sua abundância, mas também à fácil aquisição e pela falta de outros alimentos, uma vez que não há uma prática eficiente e diversificada da agropecuária e o sistema de abastecimento da região é muito precário, como consequencia, é comum à falta de outros tipos de

alimentos que complementariam a dieta dos moradores da região (CERDEIRA et al., 1997; EMBRAPA, 2011).

Segundo o levantamento realizado pelo Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA) a região Norte é responsável por 55% da produção total de pesca extrativista continental com 137.144,5 toneladas, na qual o somente o estado do Amazonas é responsável por cerca de 63.743,3 toneladas no ano de 2011 (BRASIL, 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Produção de pescado da pesca extrativa continental em toneladas em 2010 e 2011 discriminada por Unidade da Federação.

FONTE - BRASIL, 2011.

Entretanto, diversos estudos já tem mostrado elevados níveis de Hg em peixes da região (PADOVANI et al., 1995; DOS SANTOS et al., 2000; DA SILVA BRABO et al., 1999; DE SOUZA LIMA et al., 2000, LIMA et al., 2005; NEVADO et al., 2010). Os níveis estão diretamente correlacionados com os hábitos alimentares, peixes do topo de cadeia trófica (carnívoros) apresentam uma concentração média de Hg mais elevada quando comparada à concentração observada nos indivíduos presentes na base da cadeia alimentar (SILVA BRABO, 1999; AZEVEDO-SILVA et al., 2016). Segundo He e Wang (2011) cerca de 80 a 90 % do Hg total ingerido pelo pescado fica retido no tecido muscular do peixe.

O risco à saúde quanto ao consumo desses indivíduos está diretamente correlacionado com a concentração total de Hg em seu tecido, a quantidade e a frequência de consumo (WAITZBERG, 2009; HE e WANG, 2011).

Assim, faz-se necessário não somente a aplicação de medidas de controle adequadas quanto à produção e comercialização desses indivíduos, mas também, a

realização de estudos que visam compreender o processo de absorção desses potenciais contaminantes pelo organismo humano.

Nos últimos anos, ensaios *in vitro* de bioacessibilidade tem se mostrado como importante ferramenta para estimar a quantidade do elemento que é liberada da matriz alimentar durante o processo de digestão (CABAÑERO et al., 2004; VERSANTVOORT et al., 2004; PRUSKI e DIXON, 2002).

2 OBJETIVO

Estudo, *in vitro*, da bioacessibilidade de Hg em amostras de tecido muscular nos peixes mais consumidos da Amazônia.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bioacessibilidade, bioatividade e biodisponibilidade

Os estudos de biodisponibilidade, bioacessibilidade e bioatividade são importantes ferramentas para avaliar os teores totais e/ou bioacessíveis e biodisponíveis da dieta passível para absorção pelo organismo (FERNÁNDEZ-GRACÍA et al., 2009; CARDOSO et al., 2015) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema com a definição de bioacessibilidade, bioatividade e biodisponibilidade.

FONTE: FERNANDEZ-GARCÍA et al. (2009)

A biodisponibilidade pode ser definida através de dois conceitos (FERNÁNDEZ-GARCIA et al., 2009; CARDOSO et al., 2015; REIN et al., 2013):

Nutricional, refere-se à proporção de um nutriente obtida pelo corpo através de um alimento e utilizada em algum processo fisiológico (BENITO e MILLER, 1998).

Farmacológico, correspondente à taxa de absorção de uma droga ou de um composto bioativo, e sua disponibilidade para o local de ação (FOOD and DRUG ADMINISTRATION, 2003).

O conceito de bioatividade representa a fração do composto que foi absorvido e que será transportado (corrente sanguínea) até o tecido alvo. Após alcançar o tecido ocorre um processo de interações com as biomoléculas ou o metabolismo ou até mesmo uma biotransformação, levando a uma resposta fisiológica (FERNÁNDEZ- GARCIA et al., 2009).

A bioacessibilidade é definida como a fração de um composto que é liberado da matriz para o trato gastrointestinal, ficando disponível para absorção. Inclui não somente esta etapa, como também a sequência de eventos durante o processo de digestão que transforma o alimento em um composto que pode ser assimilado e metabolizado pelo

organismo (CABAÑERO et al., 2004, 2007; VERSANTVOORT et al., 2005; MAULVAULT et al., 2011; OUÉDRAGON e AMYOT, 2011; TORRES-ESCRIBANO et al., 2011; CALATAYUD et al., 2012; LEUFROY et al., 2012; LAIRD et al., 2009; LAIRD e CHAN, 2013).

3.2 Estudos de Bioacessibilidade

A presença e ingestão de um composto não significa que este será totalmente absorvido pelo organismo. Assim, apesar do conhecimento da concentração total do composto ser muito útil, os níveis de bioacessibilidade podem ser bem diferentes (CARDOSO et al., 2015; PEIXOTO et al., 2016).

Para que a bioacessibilidade ocorra é necessário que o composto se encontre em uma matriz que o organismo consiga digeri-la, tornando assim possível a liberação e absorção pelo mesmo (MENEZES, 2010; WAITZBERG, 2001). A bioacessibilidade é altamente influenciada por estruturas físico-química, na qual algumas substâncias podem agir como barreira física para a digestão e absorção dos nutrientes intracelulares (PARADA e AGUILERA, 2007; SLAUGHTER et al., 2001).

O estudo de bioacessibilidade pode ser realizado em diversos tipos de matrizes, desde solos, vegetais, peixes, carnes, cereais, mel, chá, leite, achocolatado, água até drogas, para cada matriz podem ser avaliados compostos diversos, tais como: carotenoides, elementos essenciais e não essenciais, metais potencialmente tóxicos, poluentes orgânicos persistentes, polifenóis e antioxidantes (DEAN E MA, 2007; HELAL et al., 2014; LIMA, 2015; DA SILVA et al., 2015; PEIXOTO et al., 2016). Porém, esses estudos não apresentam uma metodologia padronizada, ou seja, para cada elemento e matriz a ser estudado existe uma metodologia diferenciada (MAULVAULT et al., 2011; LAIRD et al., 2009; CARDOSO et al., 2015).

Dessa forma, nos últimos anos a bioacessibilidade tem sido utilizada por diversos autores em tecido de peixe, avaliando: ácido graxo, metais potencialmente tóxicos, etc (CABAÑERO et al., 2004, 2007; VERSANTVOORT et al., 2005; LAIRD et al., 2009; MAULVAULT et al., 2011; OUÉDRAGON E AMYOT, 2011; TORRES-ESCRIBANO et al., 2011; CALATAYUD et al., 2012; LEUFROY et al., 2012; LAIRD et al., 2013; WANG et al., 2013; AFONSO et al., 2015^a, 2015^b ; CANO-SANCHO et al., 2015; COSTA et al., 2015; MATOS et al., 2015; PIETRA et al., 2016; SIEDLIKOWSKI et al., 2016).

Estes estudos podem ser realizados através de testes *in vivo* ou *in vitro*. Testes *in vivo*, caracterizados por envolver a utilização de animais no experimento, consistem no monitoramento da biodisponibilidade de um composto após sua exposição ao organismo. Esses ensaios podem ser administrados por via oral, intravenosa, sonda gástrica ou por incorporação na alimentação. Sua principal vantagem é a proximidade com realidade, no entanto este estudo demanda tempo, pessoas especializadas e apresenta um alto custo para manter os animais a infraestrutura (ROSTAMI e JUHASZ, 2011; CARDOSO et al., 2015).

Estudos *in vitro*, consistem na exposição de uma matriz a soluções artificiais que simulam a digestão humana, avaliando a quantidade que pode ser potencialmente absorvida. Considerado uma importante alternativa para os estudos *in vivo*, possui a vantagem de não ser limitada por nenhuma questão ética, ter baixo custo e melhores condições de controle das variáveis experimentais. No entanto, este método apresenta a desvantagem de não ser capaz de representar a maioria dos fatores fisiológicos envolvidos na absorção dos nutrientes pelo organismo (HE E WANG, 2011; RODRIGUEZ et al., 1999; RUBY et al., 1996, 1999; DENYS et al., 2007, 2009; CARDOSO et al., 2015).

3.3 Modelo *in vitro* de bioacessibilidade

A metodologia *in vitro* pode ser utilizada para auxiliar os estudos *in vivo*. Os resultados destes estudos podem ser tomados como índices relativos à biodisponibilidade, e estabelecendo uma base quanto à tendência de absorção para o organismo (CARDOSO et al., 2015; JUHASZ, et al., 2014; BASTA e JUHASZ, 2014).

Os modelos de digestão *in vitro* podem ser classificados em estático e dinâmico. No modelo estático é realizada uma sequência de simulações gastro intestinais avaliando as reações bioquímicas. Nesse caso, é necessário simular o pH e a temperatura do organismo, porém a parte fisiológica que ocorre dentro do sistema gastrointestinal não é levada em consideração. Já o modelo dinâmico, tende a ser mais realista e complexo, simulando as mudanças de condições durante o processo de digestão (boca, estomago e intestino), os parâmetros de enzimas, pH, viscosidade, tamanho das partículas, temperatura, movimento peristáltico, secreções, dentre outros, são alterados conforme a passagem da matriz em cada estágio da digestão (CARDOSO et al., 2015) (Tabela 2).

Para uma metodologia *in vitro* mais próxima à fisiologia humana, podem ser utilizadas culturas de células do epitélio intestinal da linhagem Caco-2, que mimetizam a barreira celular do intestino, simulando a absorção através da mucosa (CARDOSO et al., 2015).

Assim, a escolha do modelo de digestão deve ser avaliada cuidadosamente, considerando a simulação das condições fisiológicas humanas e a adequação da infraestrutura disponível (BOSSO e ENZWEILER, 2008).

Segundo um trabalho realizado por Torres-Escribano (2011), quando comparados os modelos estáticos e dinâmicos, há uma diferença na bioacessibilidade de Hg. Os fatores que mais podem influenciar neste processo são as condições aplicadas: pH, tempo de digestão, concentração, tipo de enzima e a quantidade de amostra. Este mesmo autor recomenda a criação de uma metodologia similar ao Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE) no solo, que realiza uma metodologia bem validada e um modelo padronizado.

Tabela 2 - Visão geral dos modelos mais significantes usados para avaliar a bioacessibilidade em peixes

MODELO	REFERÊNCIA	PAIS
Estático (estômago, intestino)	Cabañero et al., 2004, 2007	Espanha
Estático (estômago, intestino e cólon) + SHIME	Laird et al., 2009	Canada
Estático (boca, estômago, intestino)	Maulvault et al., 2011	Portugal
Estático (boca, estômago, intestino)	Ouédragon e Amyot, 2011	Canada
Estático (estômago, intestino) + Dinâmico (estômago, intestino)	Torres-Escribano et al., 2011	Espanha
Estático (estômago, intestino) + Células Caco-2	Calatayud et al, 2012	Espanha
Dinâmico (boca, estômago, intestino)	Leufroy et al., 2012	França
Estático (estômago, intestino)	Laird e Chan., 2013	Canada
Estático (estômago, intestino)	Wang et al., 2013	China
Estático (boca, estômago, intestino)	Afonso ^{a/b} et al., 2015	Portugal
Estático (boca, estômago, intestino)	Cano-Sancho et al., 2015	Espanha
Estático (boca, estômago, intestino)	Costa et al., 2015	Portugal
Estático (boca, estômago, intestino)	Matos et al., 2015	Portugal
Estático (estômago, intestino)	Pietra et al., 2016	Espanha

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e coleta

Os peixes foram coletados e identificados na margem do Rio Tapajós, localizado no Estado do Pará na cidade de Itaituba (Figura 5). A coleta foi realizada por pescadores locais que se utilizam de redes ou de outras técnicas de pesca.

Figura 5 - Mapa indicativo dos pontos de amostragens no Rio Tapajós

Fonte: Autor da Dissertação

Os peixes foram mantidos sob aeração em água do local da amostragem para que posteriormente fossem colocados em local refrigerado e transportados para os mercados locais. Todos os procedimentos preliminares como a coleta do material biológico (músculo) e pesagem foram realizadas em parceria com o Instituto Evandro Chagas, órgão vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) com ênfase nas ciências relacionadas da Amazônia Legal.

4.2 Organismos de estudo

As espécies estudadas são facilmente identificadas e considerados bons bioindicadores de Hg, além disso, apresentam grande importância econômica, fazem parte da dieta da população da região, sendo consumidas várias vezes na semana. Dessa forma, a população ribeirinha está mais suscetível à exposição do mercúrio e do metil mercúrio, considerados potencialmente tóxicos para os seres que os consomem (KEHRIG et al., 2008; KULLANDER e FERREIRA, 2006).

As espécies utilizadas para a realização dos experimentos foram das seguintes: tucunaré (*Cichla spp.*) (n=6), traíra (*Hoplias sp.*) (n=3), piranha (*Mylossoma aureum.*) (n=5), tamuatá (*Callichthys callichthys*) (n=3), piranha 2 (*Pygocentrus sp.*) (n=3) e pescada branca (*Cynoscion leiarchus*) (n=4) (Figura 6).

As espécies de *Cichla spp.*, conhecidas popularmente como tucunaré - açu, tucunaré-paca, tucunaré-pinima, tucunaré-pitanga, tucunaré-vermelho ou tucunaré-pretinho. São indivíduos sedentários e piscívoros, ou seja, alimentam-se de outros peixes, porém podem também alimentar-se de pequenos crustáceos, assim também podem ser considerados predadores vorazes, ocupando os níveis superiores da cadeia alimentar. Abundantes em rios da América do Sul de águas lentas ou paradas, não realizam migrações, e quando pequenos são encontrados em grandes cardumes, na fase adulta são encontrados sozinhos ou aos pares (DE AZEVEDO SANTOS et al., 2010). Sua produção pesqueira nos anos de 2009 a 2011 foi de aproximadamente 9.142,367 toneladas (BRASIL, 2011).

A espécie *Hoplias malabaricus* (Boch, 1794) é conhecida popularmente como traíra ou traíra-preta, encontrada em todas as bacias hidrográficas da América do Sul, é adaptada ao ambiente de água parada, considerada um predador sedentário, uma vez que, fica a espreita das suas presas. Alimenta-se basicamente de outros peixes como lambaris, peixe-rei, cará, podendo também alimentar-se de crustáceos e insetos (FROESE, 2009; LOUREIRO e HANH, 1996). Sua produção pesqueira nos anos de 2009 a 2011 foi de aproximadamente 9.721,63 toneladas (BRASIL, 2011).

As espécies *Pygocentrus sp.* e *Mylossoma aureum*, conhecidas popularmente como piranha, vivem em grandes cardumes, são consideradas um dos principais predadores dos lagos e várzeas do rio Amazonas. São extremamente territorialistas e apresentam dentição em formato triangular e afiada, uma vez que seu objetivo é rasgar e engolir pedaços de sua presa e não mastigar (FINK, 1993). Sua produção pesqueira nos anos de 2009 a 2011 foi de aproximadamente 3.608,77 toneladas (BRASIL, 2011).

A espécie *Callichthys callichthys*, popularmente conhecida como Tamuatá, nome de origem do Tupi, tem o corpo revestido por duas séries de placas ósseas verticais, possui hábitos alimentares noturnos, alimentando-se principalmente de insetos e plantas, são considerados onívoros. Uma das principais características desta espécie é que na época de seca este peixe possui a habilidade de respirar fora d'água, e procurar outro ambiente aquático (BURGUESS, 1989). Por ser um peixe mais regional, sua produção nos anos de

2009 a 2011 é menor que os demais, mas sua pesca extrativista é de aproximadamente 560,97 toneladas (BRASIL, 2011).

A espécie, *Cynoscion leiarchus*, é comumente conhecida como pescada – branca, perna de moça, pescada de rede e pescadinha. Apresenta coloração prateada, pode ser encontrada no rio Amazonas ou em áreas estuarinas e sua alimentação consiste basicamente de pequenos peixes e camarões (CERVIGÓN, 1993). Sua produção nos anos de 2009 a 2011 foi de aproximadamente 969,27 toneladas (BRASIL, 2011).

Para todos os indivíduos adquiridos foi realizado o mesmo procedimento. Primeiramente foram retirados de freezer e descongelados, aferiu-se a massa e o comprimento de cada indivíduo (da cabeça a cauda) e logo após foram filetados. Após a filetagem, as amostras de músculo, pele, vísceras, brânquias e gônadas foram envasadas e pesadas individualmente em embalagens atóxicas (Apêndice 1).

Figura 6 – Imagens dos peixes estudados

A: Tucunaré (*Cichla sp.*) B: Traíra (*Hoplias sp.*), C: Piranha (*Serrasalmus sp.*), D: Piranha (*Pygocentrus sp.*), E: Pescada Branca (*Cynoscion leiarchus*), F: Tamuatá (*Callichthys callichthys*),

Fonte: O autor da dissertação

4.3 Instrumentação

A determinação de Hg foi realizada primeiramente no Laboratório de Caracterização Química e Isotópica, onde o procedimento é acreditado pelo INMETRO na

norma ISO 17025. As análises foram realizadas por meio da técnica de injeção em fluxo com geração de vapor frio acoplado a um espectrômetro de absorção atômica marca Varian (modelo-Spectra AA-220-Fast Sequencial), FI-CV-AAS (LIMA et al, 2005).

Já para o procedimento de hidrólise enzimático, o Tris-HCl e a protease não específica de *Streptomyces griseus*, pronase E, (Merck) foram utilizadas para que fosse possível a preparação das amostras de tecido dos peixes.

Posteriormente, as determinações de Hg foram realizadas no equipamento DMA-80 dual-cell (Milestone). Equipamento dedicado para a determinação de Hg, usando o princípio de decomposição térmica, amalgamação e absorção atômica (GOMES et al., 2011).

As soluções de padrão de mercúrio utilizadas foram preparadas a partir da diluição da solução estoque, numa concentração de 1000 mg L^{-1} (Merck). Sua diluição foi realizada com água Mili-Q deionizada (Millisul).

4.4 Geração de Vapor Frio acoplado ao Espectrômetro de Absorção Atômica com injeção em fluxo (FIA-CV-AAS)

A técnica CV-AAS foi utilizada para a determinação de Hg, pois é um processo rápido, reprodutível, com sensibilidade e exatidão. A determinação de Hg foi realizada através de um protocolo pré-estabelecido sendo este procedimento acreditado pelo INMETRO na norma ISO 17025.

Em um balão de vidro pesou-se aproximadamente 0,4 g da amostra e adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 mL de ácido nítrico concentrado, 1 mL de ácido perclórico concentrado e 1 mL de água desmineralizada. Os balões foram colocados em uma chapa aquecedora, a 100°C , durante 30 minutos. Após esfriarem, a solução foi diluída até 20 g com água desmineralizada e transferida para tubos do tipo falcon e reservados até a realização da análise.

4.5 Analisador de Hg DMA -80

Durante a execução do trabalho foi utilizada uma segunda técnica para determinar de Hg, um analisador de Hg DMA-80 dual-cell da Milestone. Este equipamento é dedicado à análise total de Hg em amostras tanto sólidas quanto líquidas, onde se utiliza a decomposição térmica, amalgamação e absorção atômica (GOMES et al., 2011).

O princípio do funcionamento de analisador de Hg está apresentado na Figura 7. O processo de análise é composto pela introdução de uma pequena quantidade de

amostra em barquinhas de níquel ou quartzo, é iniciada uma rampa de aquecimento de até 750°C em um forno enriquecido com oxigênio. Após a decomposição da amostra o Hg é liberado e transportado pelo fluxo de O₂ para uma secção catalítica do forno, o vapor então é carregado para uma célula de amalgamação, que prende o Hg de forma seletiva. Após ser realizada uma purga para a remoção de quaisquer produtos de decomposição, a célula de amalgamação é rapidamente aquecida liberando assim o vapor de Hg. O fluxo de O₂ leva o Hg até uma célula de absorção que está localizada no caminho óptico de um feixe monocromático de radiação, com detector UV fotodiodo aumentado (U.S. EPA Method 7473, 2007).

Figura 7 - Diagrama esquemático do funcionamento do analisador de Hg DMA -80

Fonte: MILESTONE, 2017

4.6 Especificação do Mercúrio

O método baseia-se no trabalho de Ulrich (2011) para a determinação do MeHg. Uma coluna de troca iônica é usada para separar o composto MeHgCl não iônico do complexo HgCl_4^{2-} , que fica preso na resina. O preparo da coluna de troca iônica é realizado colocando-se um chumaço de lã de quartzo no final da coluna com a ajuda de uma pinça e um bastão, logo em seguida é adicionada 1,5 cm de resina de troca iônica, tipo aniônica, Dowex 1x8 100-200 Mesh. Para o condicionamento da resina foram percoladas as seguintes soluções sequencialmente: 2 vezes 10 mL de ácido nítrico 8 mol L⁻¹, 2 vezes 10 mL de água desmineralizada, 2 vezes 10 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹, descartando todas as soluções efluentes.

Após o condicionamento das colunas, um tubo de quartzo é colocado na parte inferior da coluna, as luzes do laboratório são apagadas e é colocada uma proteção contra a

luz diante das colunas. São percolados 10 mL da amostra, a solução eluente é coletada e armazenada até a realização da análise.

4.7 Metodologias de digestão gastrointestinal *in vitro*

O estudo de bioacessibilidade foi realizado através da técnica de digestão *in vitro* proposta por Cabañero et al. (2004), que simula dois processos: estômago e intestino delgado (Figura 8).

Todos os reagentes utilizados para a realização desta etapa foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, Sp, Brasil): Pepsina (Porcine; nº do catalogo P-7000), Pancreatina (Porcine; nº do catalogo P-1750), e os Sais Biliares (nº do catalogo B-8756).

Cerca de 12g da amostra (musculo de peixe) foram colocadas em um frasco de polietileno de 100 mL, ao qual foram adicionados 37,5 mL de suco gástrico (6% m/v pepsina em 0,15 M NaCl, acidificado a um pH de 1,8 com HCl), agitado durante 1 minuto para que fosse iniciada a digestão. O frasco com a mistura foi colocado em banho maria com agitação (TE-053/Tecnal) durante 4 horas a 37° C. Após 1 hora o pH foi verificado e ajustado para pH de 3 com ácido clorídrico (HCl-6M).

Após a digestão gástrica, foi adicionado bicarbonato de sódio saturado para ajuste de pH (6,8) e 25 mL de suco intestinal (1,5 % m/v pancreático, 0,5% m/v amilase e 0,15% w/v sais de bile em 0,15 M de NaCl) agitado por 1 minuto, voltando para o banho maria por 4 horas a 37° C. Uma vez completada a digestão gastrointestinal, a solução gástrica e a gastrointestinal foram colocadas em um tubo falcon de 50 mL e centrifugadas a 1500 RPM durante 30 min. O sobrenadante foi separado da parte residual e armazenado a 4° C até a realização da análise.

Figura 8 - Metodologia proposta por Cabañero (2004), composta da digestão gástrica e intestinal.

Fonte: CABAÑERO et al., 2004

A fração solúvel foi obtida em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peixe sendo derivada do processo de digestão *in vitro*. A bioacessibilidade total de Hg foi obtida através da proporção de Hg disponível no peixe para absorção e foi calculada de acordo com a equação (Eq.1):

$$\frac{[\text{Hg na fração bioacessível}]}{\text{Hg no peixe}} \times 100 = \text{bioacessibilidade} \quad (1)$$

4.8 Validação

A validação é uma importante ferramenta para garantir a qualidade dos dados. O objetivo principal consiste no conhecimento de todos os parâmetros analíticos envolvidos no processo de mensuração de um analito de interesse, assegurando que uma determinada metodologia apresente resultados reprodutíveis, comparáveis e adequados aos fins para os quais foram planejados.

Numa visão mais abrangente a validação não se limita apenas ao processo de mensuração, mas a todos os fatores que podem vir a influenciar a qualidade dos resultados ai inclusos: condições de meio ambiente, higiene laboral, conservação de materiais, reagentes e equipamentos garantindo com isso a confiabilidade dos resultados obtidos em uma instalação.

Neste trabalho foram realizados dois tipos de validação: analítica e da bioacessibilidade.

4.8.1 Validação analítica

A validação analítica foi baseada no documento DOQ-CGCRE-008-004 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2016). Foram considerados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, recuperação, precisão, robustez e cálculo de incertezas.

- Seletividade: capacidade do método de medir exatamente um composto, mesmo que na presença de outros interferentes;
- Linearidade: capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra;
- Limite de Detecção: menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectado, porém não quantifica-lo (Eq.2);

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (2)$$

$\bar{X}$ = média dos valores dos brancos da amostra;

T = distribuição de Student, para 7 alíquotas temos $7-1 = 6$ graus de liberdade (99% de confiança = 3,143)

s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

- Limite de Quantificação: a menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado com precisão e acuracidade aceitáveis sob condições experimentais declaradas (Eq.3);

$$LQ = \bar{X} + 5s \quad (3)$$

$\bar{X}$ = média dos valores dos brancos

s = desvio-padrão amostral dos brancos

- Recuperação: realizado a partir de um material de referência certificado (MRC), onde é avaliado o valor esperado com o valor encontrado (Eq.4);

$$\frac{\text{Valor esperado} \times 100\%}{\text{Valor observado}} \quad (4)$$

- Precisão: grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra;
- Robustez: capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método;

- Cálculo de incertezas: nenhuma medida é absoluta. Cada etapa do processo de mensuração possui uma incerteza associada às condições operacionais. O somatório das incertezas parciais presentes em cada etapa de qualquer procedimento traduz a incerteza total no resultado final.

4.9 Incerteza da medição

Conforme mencionado anteriormente, os procedimentos aplicados para a validação dependem das condições do laboratório, do método, da amostra, dos equipamentos, da qualidade do material de referência, do processo de mensuração, calibração e etc. Cada uma dessas condições pode influenciar no resultado final. Para avaliar o nível de influência de cada parâmetro é feito o cálculo de incerteza. Segundo Ellison et al. (2012) a incerteza não condiz com a veracidade dos resultados, mas sim com a confiabilidade dos resultados de medição.

É importante notar que o cálculo de incertezas auxilia ao analista identificar a influência de cada etapa do processo analítico adotado e a partir daí, havendo necessidade, tomar providências no sentido de melhorá-lo.

Assim, inicialmente, é necessário identificar as fontes de incerteza da metodologia e, para isso, é recomendada a utilização do diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe, facilitando a visualização das principais causas que podem interferir na qualidade dos resultados.

Na figura 9 são apresentados os principais fatores associados à incerteza analítica adotada nesse trabalho.

Figura 9: Diagrama de Ishikawa para determinação de Hg.

4.9.1 Cálculo de incerteza da medição

Os cálculos de incerteza de cada etapa basearam-se nas normas definidas no Guia EURACHEM/CITAC, 2012.

O cálculo de incerteza total de uma medição é independente de outras incertezas, ou seja, para se calcular a incerteza é necessária a incerteza analítica e a incerteza da amostragem. Ao obter essas incertezas é possível realizar a seguinte equação: (Eq.5)

$$u_{\text{medição}} = \sqrt{u_{\text{amostragem}}^2 + u_{\text{analises}}^2} \quad (5)$$

$u_{\text{medição}}$ = Incerteza da medição

$u_{\text{amostragem}}$ = Incerteza da amostragem

$u_{\text{medição}}$ = Incerteza analítica

No presente trabalho, o tecido de cada indivíduo analisado foi integralmente homogeneizado, sendo assim foi considerada nula a incerteza da amostragem.

4.9.2 Cálculo de incerteza analítica

Para calcular a incerteza na alíquota analisada no equipamento DMA-80, foi primeiramente calculado o desvio padrão através da curva de calibração com a seguinte equação: (Eq.6)

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 c_i)]^2}}{n-2} \quad (6)$$

onde:

S = desvio padrão;

A_j = CPS para o padrão de calibração

B₀ = intercepto da curva

B₁ = slope da curva

n = numero de medidas para a calibração

C_i = concentração teórica

Na sequencia é possível calcular a incerteza na alíquota analisada no DMA-80, através da seguinte equação: (Eq. 7)

$$u(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{Q_{XX}}} \quad (7)$$

S = desvio padrão;

B1 = slope da curva;

p = número de medidas para determinar Co

n = numero de medidas para a calibração

Co = concentração do analito determinada na solução de análise;

c médio = concentração média das soluções da curva;

Qxx = somatório concentrações

A incerteza da recuperação do Material de referencia é realizada com a seguinte equação: (Eq.8)

$$\mu_{Rm} = R_m \times \left(\frac{\mu_{Rm}}{C_{Rm}} \right)^2 + \frac{(S_{obs})^2}{n \times (C_{obs})^2} \quad (8)$$

Rm = taxa de recuperação (Rm = Cobs/ CCRM);

μ_{sol} = incerteza da solução do MRC preparada;

S_{obs} = desvio padrão das medidas realizadas;

Cobs = concentração observada ou obtida (real) da solução do MCR analisada;

n = número de medidas realizadas

Incerteza das soluções estoque para a realização da curva de calibração é realizada através do seguinte cálculo: (Eq.9)

$$\mu_{Cdil_{10}} = C_{Cdil_{10}Rm} \times \sqrt{\left(\frac{U_{estoque}}{C_{estoque}} \right)^2 + \left(\frac{U_{mt}}{m_t} \right)^2 + \left(\frac{U_{mf}}{m_f} \right)^2} \quad (9)$$

Onde:

Cdil_10 = concentração real calculada da solução padrão estoque ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$\mu_{estoque}$ = incerteza da solução padrão informada no certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$);

C_{estoque} = concentração da solução padrão informada no certificado;

μ_{mt} = incerteza da massa da solução padrão pesada (g);

m_t = massa da solução padrão pesada (g);

μ_{mf} = incerteza da massa final da solução padrão preparada (g);

m_f = massa final da solução padrão preparada (g).

A incerteza da massa final e da amostra é calculada através da seguinte equação: (Eq.10)

$$U(m) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2} \quad (10)$$

u_1 = incerteza da balança fornecida pelo certificado de calibração;

u_2 = desvio padrão obtido do gráfico de controle (GC) da balança (repetitividade).

Incerteza analítica foi realizada através da seguinte equação: (Eq.11)

$$\mu_{c_{pt}} = CHg \times \sqrt{\left(\frac{u(c_o)}{c_o}\right)^2 + \left(\frac{u(Sol_{100ppb})}{Sol_{100ppb}}\right)^2 + \left(\frac{u(Sol_{5ppb})}{Sol_{5ppb}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{rec})}{P_{rec}}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \left(\frac{u(massa_{amostra})}{massa_{amostra}}\right)^2}$$

(11)

A incerteza expandida (U) foi obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada pelo fator k=2, com 95% de confiança. (Eq.12)

$$U = u(a) \times k$$

(12)

U = incerteza expandida

u (a) = incerteza da amostra

4.10 Validação e incerteza da bioacessibilidade

Para o procedimento adotado nesse trabalho, propõe-se a validação do procedimento de bioacessibilidade a partir do balanço de massa das quantidades de mercúrio mensuradas em cada etapa do processo. Para tanto foi utilizado o seguinte material de referencia: Dourada-1, certificado em Hg ($0,271 \pm 0,057 \mu\text{g g}^{-1}$) (ULRICH, 2011; ULRICH e SARKIS, 2013).

Dessa maneira, a incerteza da bioacessibilidade será definida como (Eq.13):

$$Bioac = Hg_{total} - SG + SI + R$$

(13)

Bioac = incerteza da bioacessibilidade

Hg total = concentração de Hg total

SG = Solução gástrica

(SI) = Solução intestinal

R = Resíduo

A partir daí, e considerando cada etapa do procedimento de bioacessibilidade, propõe-se para o calculo de incertezas (Eq. 14) o somatório de cada etapa individual: na solução gástrica, na solução intestinal e finalmente no resíduo insolúvel, multiplicada pela concentração total de mercúrio.

$$\mu_{bioac} = CHg \times \sqrt{\left(\frac{u(SG)}{SG}\right)^2 + \left(\frac{u(SI)}{SI}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2}$$

(14)

μ_{bioac} = incerteza da bioacessibilidade

cHg = concentração total de Hg

uSG = incerteza solução gástrica

SG = solução gástrica

u_{SI} = incerteza solução intestinal

SI = solução intestinal

u_R = incerteza resíduo

R = resíduo

4.11 Análises dos Resultados

Todos os resultados obtidos nesse trabalho estão expressos, como valores médios $\pm$ incerteza expandida. Foi avaliada a presença de Hg total e em cada fração estudada (solução e resíduo).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação da Metodologia Analítica DMA -80

De modo a avaliar a robustez da metodologia foram analisados dois materiais de referência certificados para Hg: Dourada 1 (ULRICH e SARKIS, 2013) e o DORM – 4 (National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario). Cada padrão foi analisado em triplicata sendo cada resultado individual média de 6 ensaios independentes. No processo avaliou-se a quantidade de amostra ideal para análise (0,05g; 0,07g e 0,1g) considerando que a validação para equipamento utilizado foi feita simultaneamente.

Os resultados estão apresentados na tabela 3 como a média de cada ensaio e sua incerteza associada.

Como pode ser observado, os dados obtidos para Dourada 1, individualmente, apresentaram uma boa reprodutibilidade, repetitividade e robustez. Entretanto, observando o conjunto dos valores, verifica-se uma recuperação de 119% ($0,324 \pm 0,016 \mu\text{g g}^{-1}$). Apesar deste valor estar dentro da faixa de incerteza do certificado ($0,271 \pm 0,057$), observa-se claramente que a quantidade de material analisado influenciou significativamente no resultado. Importante notar que a limitação do uso de 0,1 grama de amostra pelo equipamento, é inferior a quantidade mínima estabelecida pelo provedor do material o que pode ter influenciado no resultado final.

Já o DORM-4 possui uma faixa de certificação de média $\pm$ incerteza $0,412 \pm 0,036 \mu\text{g g}^{-1}$. A metodologia apresentou-se reprodutibilidade, repetitividade e a robustez, a recuperação em média $\pm$ incerteza $0,386 \pm 0,030 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma recuperação correspondente a 93%, uma vez que, não apresentou as limitações quanto a quantidade amostra foi considerado o mais adequado para a realização do cálculo de incerteza do método analítico.

Tabela 3 – Concentração de mercúrio em dois materiais de referencia de acordo com suas massas

Material de referencia ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Massa (g)	Média $\pm$ U* ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Dourada 1 $0,271 \pm 0,057$	0,05	0,349 $\pm$ 0,05
	0,07	0,320 $\pm$ 0,04
	0,1	0,312 $\pm$ 0,04
		Média geral $\pm$U* ($\mu\text{g g}^{-1}$) 0,324 $\pm$ 0,047

DORM – 4	0,05	0,378± 0,02
0,412±0,036	0,07	0,376±0,05
	0,1	0,404±0,02
Média geral ±U*		
(µg g⁻¹)		
0,391±0,032		

*Incerteza

O método apresentou-se exato, preciso, reprodutivo e robusto com recuperação obtida para ambos os MRCs > 90%, com coeficiente de variação < 10%. O limite de detecção foi de 0,001 µg g⁻¹ e o limite de quantificação de 0,02 µg g⁻¹.

5.2 Incerteza Associada ao Método Analítico DMA-80

A partir dos cálculos descritos no item 4.9 foi possível identificar a contribuição de cada etapa no cálculo de incerteza global relacionada ao processo de mensuração dos níveis de Hg (Figura 10).

Figura 10 - Contribuição da incerteza em cada etapa do processo analítico.

$u(P)/P$: incerteza da precisão

$u(Rec)/Rec$: incerteza da recuperação do MRC

$u(Cdil1)/Cdil1$: incerteza do padrão de 1 µg kg⁻¹ (curva de calibração)

$u(Cdil5)/Cdil5$: incerteza do padrão de 5 µg kg⁻¹ (curva de calibração)

$u(Cdil10)/Cdil10$: incerteza do padrão de 10 µg kg⁻¹ (curva de calibração)

$u(Cdil100)/Cdil100$: incerteza do padrão de 100 µg kg⁻¹ (curva de calibração)

Curva calibração $u(C0)/C0$: incerteza associada a curva de calibração

Neste gráfico, podemos observar que a maior contribuição da incerteza total da metodologia está associada à recuperação do mercúrio do material de referencia certificado (MRC). Importante notar que a incerteza no valor de Hg no material utilizado DORM-4

(National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario) é de 13,4%. Assim, considerando que as contribuições dos demais parâmetros estão dentro dos melhores valores encontrados nas condições de trabalho do laboratório do Grupo de Caracterização Química e Isotópica, uma melhoria na incerteza total dessa metodologia exigiria o uso de um material certificado com uma incerteza menor. Entretanto, para os fins desse trabalho, esse valor foi considerado satisfatório.

O valor da incerteza expandida relativa às análises foi correspondente a 14,7%.

5.3 Concentração total de Hg nas espécies estudadas

As concentrações totais de Hg estiveram abaixo do limite máximo para consumo humano determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que, através da Portaria N° 685/1998 (Brasil, 1988), determina que para os peixes predatórios o nível de Hg deve ser abaixo de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e para os não predatórios de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Dessa forma, todas as espécies de peixes avaliadas neste estudo estão próprias para consumo da população (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de Hg total no tecido muscular dos peixes

Amostra	N	Concentração de Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$) *
Tucunaré (A)	3	0,08±0,01
Traíra (B)	3	0,47±0,16
Piranha (C)	3	0,07±0,02
Piranha (D)	3	0,34±0,05
Pescada Branca (E)	3	0,39±0,09
Tamuatá (F)	3	0,13±0,04

*Valores apresentados em média $\pm$ incerteza expandida ($\mu_{\text{analítica}}=14,7\%$).

Os valores de concentração de Hg encontrados neste trabalho para as espécies analisadas estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014; BASTOS et al., 2008, 2015; DOS SANTOS et al., 2000; SOARES et al., 2016).

5.4 Experimentos iniciais de bioacessibilidade com peixe *in natura*

Inicialmente procurou-se ajustar o processo de bioacessibilidade descrito por Cabañero et al. (2004) às condições Laboratoriais do Grupo de Caracterização Química e Isotópica. Assim os seguintes parâmetros foram testados: quantidade de amostra e volume de solução.

Foram realizados experimento em triplicata 3 com tecido de peixe de três indivíduos da espécie *Cichla spp.*, (Tucunaré), perfazendo um total de 9 ensaios. A técnica de análise foi de injeção em fluxo com geração de vapor frio acoplado a um espectrômetro de absorção atômica marca Varian (modelo-Spectra AA-220-Fast Sequencial), FI-CV-AAS (LIMA et al; 2005).

5.4.1 Primeiro experimento: Cabañero (2004)

O primeiro ensaio foi realizado de acordo com a proposta de Cabañero et al. (2004): 25g de amostra, 75 mL de solução gástrica e 50 mL de solução intestinal.

Na tabela 5 mostra em $\mu\text{g g}^{-1}$ e em % a concentração de Hg total que estaria disponível para absorção nas frações gástricas e intestinal.

Tabela 5 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	SG	SG	SI	SI	SGI	SGI
	($\mu\text{g g}^{-1}$)	%	($\mu\text{g g}^{-1}$)	%	($\mu\text{g g}^{-1}$)	%
ENSAIO 1	8,19	56	1,68	11	9,87	67
ENSAIO 2	7,37	50	1,72	12	9,08	61
ENSAIO 3	7,82	50	0,91	6	8,73	55

SG – representa à fração na Solução gástrica, SG% - representa o porcentual da fração gástrica, SI – representa a fração na Solução intestinal, SI% - representa o porcentual da fração intestinal, SGI – representa a fração na Solução gastrointestinal, SG% - representa o porcentual da fração gastrointestinal

Comparando-se os resultados de bioacessibilidade obtidos desse trabalho com aqueles descritos por Cabañero (2004), encontramos uma marcante diferença na fração gástrica, mas, na fração intestinal, os resultados foram comparáveis. Enquanto para Cabañero (2004), cujas espécies avaliadas foram atum, peixe espada e sardinha a bioacessibilidade da fração gástrica variou de 9 a 20 % e a bioacessibilidade da fração intestinal variou 9 e 20%, neste trabalho, a bioacessibilidade média na solução gástrica, observada para as espécies carnívoras, chegou a 56% e na solução intestinal a 12 %.

Em seu trabalho, Cabañero (2004) sugere que a baixa recuperação encontrada pode ser atribuída à baixa atividade das enzimas utilizadas ou, ainda, ao estado e composição da matriz. Nesse trabalho não foram avaliados elementos que pudessem corroborar tais informações

Tabela 6 concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ e em % de Hg total no resíduo, ou seja, parte que não seria absorvida pelo organismo e não seria metabolizado.

Tabela 6 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	RSG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSG %	RSI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSI %	RSGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSGI %
ENSAIO 1	1,61	12	0,73	5	1,68	17
ENSAIO 2	2,24	15	0,59	4	2,83	19
ENSAIO 3	1,82	11	0,72	5	2,54	16

RSG – representa à fração no resíduo gástrico, RSG% - representa o percentual da fração residual gástrica, RSI – representa à fração na residual intestinal, RSI% - representa o percentual da fração residual intestinal, RSGI – representa à fração no resíduo gastrointestinal, RSGI% - representa o percentual da fração residual gastrointestinal

Os resultados encontrados por Cabañero (2004) não estão em concordância com os deste trabalho. A parte residual de Cabañero (2004) corresponde a aproximadamente 70%, enquanto que no presente trabalho é de aproximadamente 13%. Segundo o autor, o alto valor encontrado na parte residual pode ser explicado devido à baixa ação enzimática, fazendo com que o Hg ficasse retido do substrato.

Segundo o balanço de massa realizada no trabalho de Cabañero (2004) a recuperação apresenta valores: $97\% \pm 9\%$ (atum), $91\% \pm 8\%$ (sardinha) e $110\% \pm 7\%$ (peixe espada). A recuperação para este trabalho (Tabela 7) encontra-se 10% abaixo e pode ser explicado pelo tipo de matriz.

Tabela 7 Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e o resíduo gastrointestinal e sua total recuperação em %, do primeiro experimento.

	SOL GI + PGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SOL GI + PGI %
ENSAIO 1	11,55	84
ENSAIO 2	11,91	80
ENSAIO 3	11,27	71

SOL GI+PSI – representa a fração da soma da Solução Gastrointestinal com Resíduo Gastrointestinal, SOL GI+PSI % - representa a fração porcentual da soma da Solução Gastrointestinal com o resíduo Gastrointestinal

5.4.2 Segundo experimento: redução proporcional da quantidade de amostra e solução

Com o intuito de otimizar o experimento e reduzindo a quantidade de reagentes e resíduos gerados foram realizados experimentos com redução proporcional da amostra e dos reagentes para a solução gástrica e intestinal: 12,5 g de amostra, 37,5 mL de solução gástrica e 25 mL de solução intestinal.

As Tabelas 8 e 9 apresentam a parte solúvel e a parte residual o ensaio apresentou os mesmos padrões observado no procedimento anterior.

Tabela 8 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	SG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SG %	SI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SI %	SGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SGI %
ENSAIO 1	3,14	53	0,59	10	3,19	63
ENSAIO 2	3,75	58	0,58	9	3,81	67
ENSAIO 3	3,83	59	0,71	11	3,90	70

SG – representa à fração na Solução gástrica, SG% - representa o porcentual da fração gástrica, SI – representa a fração na Solução intestinal, SI% - representa o porcentual da fração intestinal, SGI – representa a fração na Solução gastrointestinal, SG% - representa o porcentual da fração gastrointestinal

Tabela 9 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	RSG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSG %	RSI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSI %	RSGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSGI %
ENSAIO 1	0,67	12	0,22	4	0,89	16
ENSAIO 2	0,65	10	0,27	6	0,92	16
ENSAIO 3	0,64	9	0,24	5	0,88	14

RSG – representa à fração no resíduo gástrico, RSG% - representa o porcentual da fração residual gástrica, RSI – representa à fração na residual intestinal, RSI% - representa o porcentual da fração residual intestinal, RSGI – representa à fração no resíduo gastrointestinal, RSG% - representa o porcentual da fração residual gastrointestinal

A tabela 10 apresenta os níveis de recuperação, os valores encontram-se muito próximos ao experimento anterior, demonstrando que a redução proporcional mantem as mesmas características e, ao mesmo tempo, a massa residual final menor.

Tabela 10 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e pellet gastrointestinal e sua total recuperação em %

	SOL GI + PGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SOL GI + PGI %
ENSAIO 1	4,08	79
ENSAIO 2	4,73	83
ENSAIO 3	4,78	84

SOL GI+PSI – representa a fração da soma da Solução Gastrointestinal com Resíduo Gastrointestinal, SOL GI+PSI % - representa a fração porcentual da soma da Solução Gastrointestinal com o resíduo Gastrointestinal

5.4.3 Terceiro experimento: redução de amostra e aumento de solução

Este ensaio teve o intuito de verificar se com o aumento da solução a bioacessibilidade teria alguma melhoria ou se os padrões seriam mantidos: 12,5g de amostra, 75 mL de solução gástrica e 50 mL de solução intestinal.

Os resultados apresentados na tabela 11, mostram que as frações bioacessíveis de Hg mantiveram-se bem próximos a ambos os experimentos anteriores.

Tabela 11 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	SG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SG %	SI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SI %	SGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SGI %
ENSAIO 1	3,6	54	0,65	10	4,25	64
ENSAIO 2	4,28	65	0,22	3	4,50	68
ENSAIO 3	3,00	45	0,88	13	3,88	58

SG – representa a fração na Solução gástrica, SG% - representa o porcentual da fração gástrica, SI – representa a fração na Solução intestinal, SI% - representa o porcentual da fração intestinal, SGI – representa a fração na Solução gastrointestinal, SG% - representa o porcentual da fração gastrointestinal

No entanto quando se verifica a parte não bioacessível (Tabela 12) observa-se uma baixa recuperação, provavelmente devido a grande quantidade de solução que levou à diluição da amostra.

Tabela 12 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ separados por fase e sua recuperação em %

	RSG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSG %	RSI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSI %	RSGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSGI %
ENSAIO 1	0,19	3	0,420	6	1	9
ENSAIO 2	0,24	4	0,440	7	1	10
ENSAIO 3	0,07	1	0,540	8	1	9

RSG – representa à fração no resíduo gástrico, RSG% - representa o porcentual da fração residual gástrica, RSI – representa à fração na residual intestinal, RSI% - representa o porcentual da fração residual intestinal, RSGI – representa à fração no resíduo gastrointestinal, RSG% - representa o porcentual da fração residual gastrointestinal

Quando é observada a recuperação total de Hg (Tabela 13) também é possível notar que a recuperação não foi tão eficiente quando comparada com os experimentos anteriores.

Tabela 13 - Valores de Hg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fase gastrointestinal e o resíduo gastrointestinal e sua total recuperação em % , do terceiro experimento

	SOL GI + PGI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SOL GI + PGI %
ENSAIO 1	4,86	73
ENSAIO 2	5,18	78
ENSAIO 3	4,49	68

SOL GI+PSI – representa a fração da soma da Solução Gastrointestinal com Resíduo Gastrointestinal, SOL GI+PSI % - representa a fração porcentual da soma da Solução Gastrointestinal com o resíduo Gastrointestinal

5.4.4 Comparação entre os experimentos 1 a 3

Os resultados obtidos nos 3 experimentos anteriormente descritos estão resumidos na figura 11. Como pode ser observado, os experimentos apresentaram uma boa robustez e reprodutibilidade. O segundo experimento foi o que apresentou o melhor rendimento e otimização dos reagentes e da amostra sem alterar a recuperação final, sendo esta a metodologia adotada para os demais ensaios.

Figura 11- Imagem do gráfico da recuperação em % de fase dos 3 experimentos

5.5 Validação de Metodologia de bioacessibilidade: Cabañero (2004)

A validação foi realizada através da bioacessibilidade no MRC Dourada 1 (*Brachyplatystoma Flavicans*) (ULRICH e SARKIS, 2013). Como a amostra é liofilizada foram utilizados 5 g o que seria proporcional a 25 g de amostra úmida de peixe, 75 mL de solução gástrica e 50 mL de solução intestinal.

O ensaio foi realizado em triplicata e as análises consideraram o balanço de massa de cada etapa do processo, os valores de Hg em cada fase e os seus valores de massa com faixa de certificação de mercúrio total de media $\pm$ incerteza = $0,271 \pm 0,057 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 14).

A recuperação obtida foi $> 90\%$, com coeficiente de variação $< 10\%$. O limite de detecção na solução gastrointestinal foi de $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$; e o limite de quantificação de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 14 - Desempenho do laboratório no MRC Dourada 1

Amostra	Bioacessibilidade			Resíduo Gastrointestinal		Total	Recuperação
	Gástrico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Intestinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	(%)	Gastrointestinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	(%)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	(%)
Dourada -1	0,20± 0,04	0,05± 0,003	70	0,008± 0,001	23	0,258± 0,022	93

Valores apresentados em média ± incerteza expandida

Não foi possível comparar entre os valores encontrados no presente trabalho, com aqueles obtidos por Cabañero (2004), uma vez que o processo de validação não é descrito pelo autor.

5.6 Incerteza no processo de bioacessibilidade

Como proposto no item 4.8.2 foi realizado calculo de incerteza da bioacessibilidade.

$$\mu b i o a c = 0,2583 \times \sqrt{\left(\frac{0,0147}{0,2}\right)^2 + \left(\frac{0,0037}{0,05}\right)^2 + \left(\frac{0,0006}{0,008}\right)^2}$$

$$\mu b i o a c = 0,0329$$

$$U_{\text{exp}} = 0,0329 \times 2$$

$$U_{\text{exp}} = 0,0658 = 25,5\%$$

Todos os resultados obtidos nesse trabalho estão expressos, como valores médios ± μbioac = 25%

5.7 Bioacessibilidade de Hg total

Todos os valores de bioacessibilidade e do resíduo apresentados estão representados em valores médios e em incerteza amostral (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de Hg bioacessível em todas as frações do ensaio *in vitro*

Espécies*	Bioacessibilidade Hg		Resíduo		Recuperação %
	Gastrointest inal ($\mu\text{g g}^{-1}$) ***	Gastrointes tinal (%)**	Gastroint estinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)***	Gastroint estinal ** (%)	
¹ Tucunaré A1	0,009±0,001	61	0,002±0,0007	17	80
¹ Tucunaré A2	0,005±0,008	52	0,002±0,0006	31	88
¹ Tucunaré A3	0,006±0,001	52	0,002±0,0008	25	77
¹ Traíra B1	0,02±0,04	62	0,9±0,2	20	82

¹ Traíra B2	0,04±0,07	66	0,7±0,5	24	80
¹ Traíra B3	0,01±0,02	55	0,4±0,2	24	79
¹ Piranha C1	0,10±0,02	50	0,04±0,01	24	75
¹ Piranha C2	0,10±0,02	51	1,2±0,3	21	77
¹ Piranha C3	0,10±0,02	51	0,05±0,01	25	78
¹ Pescada	0,05±0,1	82	0,34±0,1	11	92
Branca E1					
¹ Pescada	0,01±0,03	62	0,33±0,09	18	80
Branca E2					
¹ Pescada	0,01±0,01	74	0,2±0,06	13	91
Branca E3					
² Tamuatá F1	0,06±0,01	36	0,04±0,01	36	73
² Tamuatá F2	0,1±0,03	47	0,12±0,03	34	82
² Tamuatá F3	0,14±0,02	41	0,11±0,03	31	74

¹Carnívoro / ²Onívoro

*Triplicata do mesmo espécime de cada espécie (n=3)

**Valores apresentados em média considerando $\mu_{bioac} = 25\%$

*** Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão ($\mu_{analitica} = 14,7\%$).

Os dados obtidos apresentam uma recuperação média de 80%. Esses valores são ligeiramente inferiores àqueles obtidos com o DORM -4. Atribui-se isso ao fato do material certificado ser homogêneo, desengordurado e liofilizado enquanto que as amostras analisadas, embora passadas por um processo de homogeneização, apresentam variações comuns a materiais *in natura*.

Observa-se também que, considerando o valor de incerteza total do processo de bioacessibilidade (25%), e aos valores médios para cada as espécies carnívoras; Tucunaré (55%), Traíra (61%), Piranha (50%) e Pescada Branca (72%) estão dentro da mesma faixa, com um grupo distinto quando compara a espécie onívora de Tamuatá (41%) . Ou seja: os resultados indicam que a bioacessibilidade está relacionada aos hábitos alimentares e posição na cadeia trófica de cada espécie.

É possível observar que a parte não absorvida representa uma quantidade substancial da quantidade inicial de material estudada, cerca de 11% a 36%, dependendo da espécie e do nível trófico. Quando observamos somente a fração bioacessível é possível notar que existe um padrão nas espécies carnívoras (Tucunaré, Piranha, e Traíra), onde a concentração de Hg disponível é maior que 50%. No entanto, para a espécie não carnívora (Tamuatá) a fração solúvel é $< 50\%$, demonstrando que esta espécie possui uma bioacessibilidade de Hg menor. Diversos fatores podem explicar este acontecimento uma

vez que esta espécie apresenta hábitos alimentares e fisiologia diferente das demais espécies.

Não foram encontrados dados de bioacessibilidade de Hg para as espécies descritas neste trabalho ou para peixes localizados próximos a região de coleta, tornando difícil a sua comparação. No entanto, Wang et al. (2013) avaliou a bioacessibilidade de Hg em pescados de água doce e marinhos presentes nos mercados da China. Comparando os dados apresentados na tabela 13 com os aqueles apresentados por Wang et al (2013), verifica-se que para as espécies carnívoras os valores de bioacessibilidade são inferiores aqueles aqui encontrados, enquanto para os onívoros estão na mesma ordem de magnitude.

Quando comparado a outros trabalhos da literatura, a bioacessibilidade de Hg em os peixes *in natura* de ambiente marinho como o atum (72%), tubarão (80%), peixe espada (87%), anchova (77%), merluza (81%) e o salmão (90%) apresentam uma bioacessibilidade maior (OUÉDRAGON E AMYOT, 2011; TORRES-ESCRIBANO et al., 2011; CALATAYUD et al, 2012; COSTA et al., 2015). No entanto, outras espécies apresentaram porcentagens de bioacessibilidade menor como, por exemplo, o bonito (20%), *tope shark* (57%), *black scabbared* (45%) e a sardinha (17%) (TORRES-ESCRIBANO, et al., 2010; CANO-SANCHO et al., 2015; WANG et al., 2013).

É importante salientar que na literatura encontram-se dados divergentes sobre a bioacessibilidade de mercúrio em tecido de peixes. Para a espécie *Trichiurus lepturus* (peixe espada), por exemplo, há valores desde <20% a >70% de Hg bioacessível (TORRES- ESCRIBANO, et al., 2010, CABAÑERO et al., 2004; MAULVAUT, et al., 2011). O mesmo para o atum, considerado com baixa biodisponibilidade (9%) por Cabañero et al. (2004), entretanto Ouédragon & Amyot (2011) apresentou para o mesma espécie uma bioacessibilidade de 72%. Esta variação nos dados pode estar correlacionada com as diferentes metodologias de digestão *in vitro* utilizada nesses estudos, em que a concentração e a atividade da enzima utilizada, somadas com o volume da solução, a quantidade e o estado em que se encontra a amostra podem fazer com que ocorram estes resultados diferentes.

Esse problema vem sendo discutido no âmbito do projeto INFOGEST (Internationa Conference of Food Digestion) financiada pelo programa intergovernamental denominado COST (European Corporation in Science & Tecnology). Iniciado em 2011 reuniu mais de 200 especialistas de 32 países, com o intuito de elaborar um protocolo harmonizado de digestão *in vitro* (DUPONT et al., 2011). Minekus et al. (2014), propuseram uma metodologia harmonizada em que o processo de digestão *in vitro* deveria

ser básico e pratico mas que envolvesse o conjunto de condições próximas as da fisiologia, tornando os resultados das pesquisas comparáveis. A validação da metodologia proposta foi realizada para matrizes de leite em pó (EGGER et al., 2016). Até o momento nenhum estudo envolvendo espécies de pescados foi realizado.

5.8 Ensaios adicionais

Como já se sabe o metil mercúrio é caracterizado como, uma das formas mais tóxicas do mercúrio (WANG et al., 2013; COSTA et al., 2015). Sabendo que do mercúrio total encontrado de 80 a 90 % é metilmercúrio, foram realizados ensaios preliminares e adicionais com a especiação do Hg para peixes carnívoros.

De modo a avaliar a bioacessibilidade de metilmercúrio, todo processo foi repetido utilizando o material de referencia: Dourada 1 (*Brachyplatystoma Flavicans*) (ULRICH e SARKIS, 2013). O ensaio foi realizado em triplicata, da mesma forma como realizado anteriormente as análises consideram o balanço de massa de cada etapa do processo, os valores de MetilHg em cada fase e os seus valores de massa com faixa de certificação de metilmercúrio total de media $\pm$ incerteza = $0,245 \pm 0,038 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 16).

Tabela 16 - Desempenho do laboratório no MRC Dourada 1

Amostra	Bioacessibilidade	Resíduo	Total	Recuperação
	Gastrointestinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Gastrointestinal ($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	%
Dourada -1	$0,222 \pm 0,034$	$0,09 \pm 0,02$	$0,231 \pm 0,031$	90

Valores apresentados em média $\pm$ incerteza

Para o tucunaré, o ensaio de bioacessibilidade obteve valores em conformidade com aos resultados anteriores, na qual a solução gastrointestinal apresentava valores médios de $< 50\%$ e o resíduo $> 30\%$.

Quando foi realizada a especiação de Hg na parte solúvel (gastrointestinal), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Valores de MeHg em $\mu\text{g g}^{-1}$ da Solução Gástrica e da Solução Intestinal e sua total recuperação em %

	SG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SG%	SI ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SI%	SIG ($\mu\text{g g}^{-1}$)	SIG%
ENSAIO 1	0,002	33	0,003	51	0,005	84
ENSAIO 2	0,002	35	0,003	47	0,005	82
ENSAIO 3	0,002	33	0,003	49	0,005	82

SG – representa a fração na Solução gástrica, SG% - representa o percentual da fração gástrica, SI – representa a fração na Solução intestinal, SI% - representa o percentual da fração intestinal, SIG – representa a fração na Solução gastrointestinal, SIG% - representa o percentual da fração gastrointestinal

Quando somente os valores de bioacessibilidade de Hg total são levados em consideração a média bioacessível é de 50%, mas quando é realizada a especiação desta mesma solução é possível obtermos 80% de MetilHg, indicando que o metil mercúrio absorvido pelo organismo pode ser ainda menor.

6 CONCLUSÃO

Encontram-se, na literatura diversos estudos identificando altos níveis de Hg em pescados da região do Amazonas. Muitos destes trabalhos apresentam restrições ao consumo mesmo sendo o pescado uma importante, talvez a maior, fonte de proteínas principalmente para a população indígena e ribeirinha. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que parte substancial do mercúrio presente neste alimento não é absorvida pelo organismo humano quando ingerida *in natura*. Dados preliminares com metil mercúrio vão na mesma direção.

Isso demonstra a importância de estudos dessa natureza em contribuição nas análises de risco de consumo e em uma etapa adiante, até uma reavaliação nas decisões regulatórias relacionadas aos níveis permissíveis de contaminantes nos alimentos.

Para tanto, faz-se necessário o estabelecimento de procedimentos metrologicamente confiáveis que permitam não somente a rastreabilidade dos resultados obtidos, sua reprodução e finalmente comparação com aqueles obtidos por laboratórios, Instituições de Pesquisa ou mesmo Agências Regulatórias. Conforme verificado na literatura, sem o estabelecimento desses torna-se difícil à comparação dos mesmos.

Nesse trabalho, propõe-se uma metodologia para a validação do processo de bioacessibilidade baseada, inicialmente, na validação analítica segundo normas internacionais, expandindo as incertezas para cada etapa do processo. O valor obtido de incerteza foi de 25% e não havendo outros em comparação, foi considerado satisfatório para os objetivos desse trabalho, uma vez, ter sido possível distinguir, claramente, a bioacessibilidade entre as espécies estudadas. A redução desta incerteza só seria possível com a criação de materiais de referencia com uma menor incerteza ou a realização de uma metodologia diferente a do presente trabalho.

Em conclusão, recomenda-se a aplicação desses estudos com uma clara definição sobre a padronização metodológica e validação, permitindo com isso a comparação de dados de forma mais confiável.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com exceção de alguns países asiáticos os peixes não são consumidos *in natura*, passando sempre por algum tipo de tratamento culinário (frito, assado, cozido) e com a adição de alguns compostos (farinhas, frutas, condimentos). Tais atividades podem afetar a bioacessibilidade, assim, é interessante a realização destes tratamentos culinários e/ou com a adição. Assim será possível verificar como estes fatores afetariam na liberação do contaminante ou se ocorre à inibição da absorção do Hg para o organismo humano.

A aplicação de uma metodologia mais próxima à fisiologia humana, com a utilização de células do epitélio intestinal (Caco-2,), também seria um importante passo para propiciar um melhor entendimento quanto à absorção destes compostos oferecendo uma estimativa mais real.

APENDICE 1

Medidas de comprimento e largura em centímetros e pesagem de cada amostra derivada do peixe em gramas:

Traíra:

	1	2	3
Peso Total (g)	279,590	348,299	349,526
Diâmetro (cm)	4	5	4
Comprimento (cm)	25	29	32
Musculo (g)	98,345	131,108	130,206
Brânquia (g)	5,077	8,345	8,817
Vísceras (g)	10,517	10,448	21,966
Pele (g)	31,365	34,430	23,217

Piranha:

	1	2	3	4	5
Peso Total (g)	222,645	235,147	232,27	212,032	174,425
Diâmetro (cm)	1	1,5	2	1,5	1,5
Comprimento (cm)	21	20	20,5	19	19
Musculo (g)	65,617	75,409	80,74	69,933	55,028
Brânquia (g)	3,637	3,575	3,46	3,432	2,587
Vísceras (g)	5,023	5,184	7,92	5,114	4,331
Pele (g)	20,285	22,953	18,17	15,533	16,028
Gônadas (g)		5,321	5,05	5,114	2,312

Tamuatá:

	1	2	3
Peso Total (g)	139,482	137,362	153,848
Diâmetro (cm)	4	3,5	4
Comprimento (cm)	20	18,5	19

Musculo (g)	37,419	39,188	38,585
Brânquia (g)	2,370	3,173	2,151
Vísceras (g)	7,860	6,820	8,070
Pele (g)	27,786	39,188	38,585

Piranha:

	1	2	3
Peso Total (g)	217,634	174,853	183,857
Diâmetro (cm)	1,5	1,5	1,5
Comprimento (cm)	20	19	18
Musculo (g)	57,843	54,402	53,325
Brânquia (g)	4,551	3,711	3,514
Vísceras (g)	12,593	9,742	9,585
Pele (g)	16,917	13,910	12,419
Gônadas (g)	10,299	2,225	13,892

Pescada Branca:

	1	2	3	4
Peso Total (g)	110,02	93,912	93,723	108,295
	4			
Diâmetro (cm)	1,5	2	1,8	1,5
Comprimento (cm)	23	23	22	22
Musculo (g)	48,762	38,354	34,403	45,847
Brânquia (g)	3,166	3,237	2,898	3,045
Vísceras (g)	3,431	3,571	3,471	3,289
Pele (g)	8,539	7,462	6,125	7,014
Gônadas (g)	1,470	1,261	1,298	1,633

APENDICE 2

Peso de cada estrutura e determinação de Hg nas estruturas dos peixes através do analisador de Hg DMA -80.

Traíra:

	1 (g)	µg/kg	2 (g)	µg/kg	3 (g)	µg/kg
Musculo	98,345	290,19	131,108	572,24	130,206	569,10
Brânquia	5,077	72,00	8,345	206,08	8,817	157,48
Vísceras	10,517	58,41	10,448	272,65	21,966	240,47
Pele	31,365	207,04	34,430	352,45	23,217	190,87

Piranha:

	1 (g)	µg/kg	2(g)	µg/kg	3(g)	µg/kg
Musculo	65,617	48,99	75,409	46,25	80,739	73,76
Brânquia	3,637	18,12	3,575	15,47	3,466	15,81
Vísceras	5,023	25,70	5,184	20,15	7,924	8,98
Pele	20,285	19,63	22,953	8,50	18,175	12,79
Gônadas			5,321	19,51	5,047	31,90

	4(g)	µg/kg	5(g)	µg/kg
Musculo	69,933	116,77	55,028	72,53
Brânquia	3,432	16,10	2,587	14,23
Vísceras	5,114	5,84	4,331	9,35
Pele	15,533	6,06	16,028	7,68
Gônadas	5,114	14,15	2,312	46,15

Tamuatá:

	1 (g)	µg/kg	2 (g)	µg/kg	3 (g)	µg/kg
Musculo	37,42	182,684	39,19	104,055	38,58	113,898

Brânquia	2,37	28,778	3,17	15,5337	2,15	26,824
Vísceras	7,86	13,833	6,82	22,966	8,07	14,142
Pele	27,78	19,116	39,19	7,516	38,58	9,988

Piranha:

	1 (g)	µg/kg	2 (g)	µg/kg	3 (g)	µg/kg
Musculo	57,843	286,741	54,402	382,166	53,325	353,854
Brânquia	4,551	167,843	3,711	192,058	3,514	214,248
Vísceras	12,593	175,128	9,742	143,535	9,585	122,503
Pele	16,917	53,447	13,910	91,670	12,419	63,977
Gônadas	10,299	128,797	2,225	280,115	13,892	115,434

Pescada Branca:

	1 (g)	µg/kg	2 (g)	µg/kg	3 (g)	µg/kg	4 (g)	µg/kg
Musculo	48,762	331,77	38,354	505,05	34,403	287,49	45,847	442,04
Brânquia	3,166	43,03	3,237	141,00	2,898	88,16	3,045	78,60
Vísceras	3,431	35,92	3,571	179,44	3,471	79,54	3,289	60,03
Pele	8,539	55,53	7,462	121,75	6,125	66,65	7,014	37,92
Gônadas	1,470	76,75	1,261	214,97	1,298	112,20	1,633	198,62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 15 p.
- ^aAFONSO, C., COSTA, S., CARDOSO, C., BANDARRA, N. M., BATISTA, I., COELHO, I., ... & NUNES, M. L. 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**, v. 170, p. 249-256, 2015.
- ^bAFONSO, C., COSTA, S., CARDOSO, C., OLIVEIRA, R., LOURENCO, H. M., VIULA, A., ... & NUNES, M. L. . Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus spp.*) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. **Environmental research**, v. 143, p. 130-137, 2015.
- AZEVEDO, F. A. D. Toxicologia do mercúrio. In: **Toxicologia do mercúrio**. RIMA/INTERTOX, 2003.
- AZEVEDO-SILVA, C. E., ALMEIDA, R., CARVALHO, D. P., OMETTO, J. P., DE CAMARGO, P. B., DORNELES, P. R., ... & TORRES, J. P. Mercury biomagnification and the trophic structure of the ichthyofauna from a remote lake in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, 151, 286-296. 2016
- de AZEVEDO SANTOS, V. M., NETO, E. M. C., & de LIMA STRIPARI, N. . Concepção dos pescadores artesanais que utilizam o reservatório de Furnas, Estado de Minas Gerais, acerca dos recursos pesqueiros: um estudo etnoictiológico. **Biotemas**, v. 23, n. 4, p. 135-145, 2010.
- BASTA, N. T., & JUHASZ, A Using in vivo bioavailability and/or in vitro gastrointestinal bioaccessibility testing to adjust human exposure to arsenic from soil ingestion. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 79, n. 1, p. 451-472, 2014.
- BASTOS, W. R. **Métodos de Digestão Utilizando Microondas para Determinação Automatizada de Hg em Amostras Ambientais e Humanas: Implantação de Laboratórios e Avaliação da Qualidade Analítica**. 1997. Tese para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica). UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- BASTOS, W. R., REBELO, M. D. F., FONSECA, M. D. F., ALMEIDA, R. D., & MALM, O. A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 431-438, 2008.
- BASTOS, W. R., DÓREA, J. G., BERNARDI, J. V. E., LAUTHARTTE, L. C., MUSSY, M. H., LACERDA, L. D., & MALM, O. Mercury in fish of the Madeira river

- (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. **Environmental research**, v. 140, p. 191-197, 2015.
- BRASIL. Ministério de Meio Ambiente. **Segurança Química – Mercúrio**. Brasília: MMA, 2016: Disponível em: <http://www.mma.gov.br/perguntasfrequentes?catid=28>. Acesso em: 18 Maio 2016
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. 60p. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf. Acesso em: 1 Out 2015.
- BRASIL, Resolução ANVISA RDC “nº31, de 13 de janeiro de 1998”. **Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Republicada por ter saído com incorreção, do original. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, de 30 de março de 1998**. Seção 1-E, p 4. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em: 6 abril 2015
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Mercúrio. **MMA**, São Paulo 2013. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>> Acesso em: 20 Abril. 2015.
- BENITO, P., & MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.
- BISINOTI, M. C., & JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.
- BOSSO, S. T., & ENZWEILER, J. Ensaios para determinar a (bio) disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**. Vol. 31, No. 2, 394-400, 2008.
- BURGESS, W. **An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes**. tfh publications (Ref. 6868)
- CABAÑERO, A. I., MADRID, Y., & CÁMARA, C. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, n. 1, p. 51-61, 2004.
- CABAÑERO, A. I., MADRID, Y., & CÁMARA, C. Mercury–selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. **Biological Trace Element Research**, v. 119, n. 3, p. 195-211, 2007.
- CAHETÉ, F. S. A Extração do Ouro na Amazônia e Implicações para o meio ambiente. **Novos Cadernos NAEA**, 1(2). 2008.
- CALATAYUD, M., DEVESA, V., VIRSEDA, J. R., BARBERÁ, R., MONTORO, R., & VÉLEZ, D. Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2696-2702, 2012.

- CANO-SANCHO, G., PERELLÓ, G., MAULVAULT, A. L., MARQUES, A., NADAL, M., & DOMINGO, J. L. Oral bioaccessibility of arsenic, mercury and methylmercury in marine species commercialized in Catalonia (Spain) and health risks for the consumers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 34-40, 2015.
- CARDOSO, C., AFONSO, C., LOURENÇO, H., COSTA, S., & NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 5-23, 2015.
- CERDEIRA, R.G.P.; RUFFINO, M.L.; ISAAC, V.J. Consumo de pescado e outros alimentos pela população ribeirinha do Lado Grande de Monte Alegre, PA-Brasil. **Acta Amazonica** v.27, n.3, p.213-228, 1997
- CERVIGÓN, Fernando; LOS ROQUES, Fundación Científica. **Los peces marinos de Venezuela**. Fundación Científica Los Roques
- COSTA, S., AFONSO, C., CARDOSO, C., BATISTA, I., CHAVEIRO, N., NUNES, M. L., & BANDARRA, N. M. Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: effect of culinary treatment. **Food Chemistry**, v. 185, p. 268-276, 2015.
- DEAN, J. R., & MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1399-1407, 2007.
- DENYS, S., CABOCHE, J., TACK, K., & DELALAIN, P. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 42, n. 9, p. 1331-1339, 2007.
- DENYS, S., TACK, K., CABOCHE, J., & DELALAIN, P. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. **Chemosphere**, v. 74, n. 5, p. 711-716, 2009.
- DOREA, J.G. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? **Environmental Research**, v. 92, n. 3, p. 232-244, 2003.
- DOREA, J. G., BARBOSA, A. C., & SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 275-283, 2006.
- DURÃO JR, W.A. e WINDMOOLLER, C. C. A questão do mercúrio em lâmpadas fluorescentes. **Química Nova na Escola**, p. 15-19, n. 28, maio 2008
- DUPONT, D., BORDONI, A., BRODKORB, A. et al. An International Network for Improving Health Properties of Food by Sharing our Knowledge on the Digestive Process. *Food Dig.* 2: 23. 2011.

- EGGER, L., MÉNARD, O., DELGADO-ANDRADE, C., ALVITO, P., ASSUNÇÃO, R., BALANCE, S., ... & COMI, I. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. **Food Research International**, v. 88, p. 217-225, 2016.
- ELLISON, S. L. R. and WILLIAMS A (Eds). Eurachem/CITAC guide: **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2011) – Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/setembro/2a-semana/estudo-mostra-elevado-valor-nutritivo-de-peixes-da-amazonia/>> Acessado dia: 1 de Out. 2016
- FARIA, M. D. A. M. Mercurialismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 116-127, 2003.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751-760, 2009.
- FINK, W.L. Revision of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei, Characiformes). **Copeia**, p. 665-687, 1993.
- FROESE, R.; PAULY, D. (2009) FishBase, **World Wide Web** – Disponível em : <<http://www.fishbase.org/>> Acessado em 20 de Maio 2015
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries dept. **The state of world fisheries and aquaculture, 2016**. Food & Agriculture Org, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/d1eaa9a1-5a71-4e42-86c0-f2111f07de16/i3720e.pdf>> Acesso em: 02 de Abril. 2016
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. **Food and Drug Administration, Washington, DC**, 2003.
- GOMES, V.M. **Estudo da distribuição e do potencial de metilação do mercúrio em solos e sedimentos de áreas a serem inundadas para aproveitamento hidrelétrico**. 2014. Tese (Área de Química Analítica e Ambiental) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de Araraquara, São Paulo
- GOMES, K. D.; CÚSTODIO, L. G.; BONIFÁCIO, R. L. Validação de Metodologia de Análise de Mercúrio Total em Águas, Solos e Sedimentos, Conforme Método EPA 7473. In: **SEMINÁRIO PIBIC/PROBI. 2011**. Laboratório de Poços de Caldas – LAPOC. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/pibic/cd-virtual/2012%20-%20JOHANNES%20GUTENBERG/pdf/lapoc_03_resumo.pdf> Acessado em 18 de Out. 2015

- HE, M. e WANG, W.X. Factors affecting the bioaccessibility of methylmercury in several marine fish species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7155-7162, 2011.
- HELAL, A., TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., & CONTE, A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to in vitro gastro-pancreatic digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 506-516, 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: **Aquisição alimentar domiciliar per capita**. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. v. 8, p. 09-11, 2014. Disponível em: [www. ibge. gov. br/censo2010](http://www.ibge.gov.br/censo2010). Acessado em: 14 de Set.2015
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA ((INMETRO), NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. rev. 05, Rio de Janeiro: INMETRO, Agosto – 2016. (DOQ-CGCRE-008)
- ISAAC, Victoria J.; DE ALMEIDA, Morgana C. **El consumo de pescado en la amazonía brasileña**. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación., 2011.
- JUHASZ, A. L., WEBER, J., STEVENSON, G., SLEE, D., GANCARZ, D., ROFE, A., & SMITH, E. In vivo measurement, in vitro estimation and fugacity prediction of PAH bioavailability in post-remediated creosote-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 473, p. 147-154, 2014.
- KEHRIG, H. D. A., HOWARD, B. M., & MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (Cichla spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**, v. 154, n. 1, p. 68-76, 2008.
- KULLANDER, S. O.& FERREIRA, E. J. A review of the South American cichlid genus Cichla, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 17, n. 4, p. 289-398, 2006.
- LACERDA, L. D.; SALOMONS, W. (1992) Mercúrio na Amazônia: uma bomba relógio química?. In: **Tecnologia Ambiental**. CETEM, 1992.
- LACERDA, L.D. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 196-199, 1997.
- LAIRD, B. D., SHADE, C., GANTNER, N., CHAN, H. M., & SICILIANO, S. D. Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 23, p. 6003-6008, 2009.
- LAIRD, B. D., & CHAN, H. M. Bioaccessibility of metals in fish, shellfish, wild game, and seaweed harvested in British Columbia, Canada. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 381-387, 2013.

- LEUFROY, A., N.L. L., BEAUCHEMIN, D., & GUÉRIN, T. Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 623-633, 2012.
- LIMA, F. A. D. **Estudo da biotransformação da farinha de centeio por tratamento enzimático e avaliação da bioaccessibilidade de ácidos fenólicos pelo modelo de digestão'in vitro'e de absorção por células intestinais Caco-2**. 2015. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
- LIMA, A. P. S., SARKIS, J. E. S., SHIHOMATSU, H. M., & MÜLLER, R. C. S Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piria Municipality, Para State, Brazil. **Environmental Research**, v. 97, n. 3, p. 236-244, 2005.
- LOUREIRO, V. E., & HAHN, N. S. Dieta e atividade alimentar da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)(Osteichthyes, Erythrinidae), nos primeiros anos de formação do reservatório de Segredo-PR. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 195-205, 1996.
- MARINS, R. V., PARAQUETTI, H. H. M., & AYRES, G. A. Alternativa analítica para especiação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 372-378, 2002.
- MARGULIS, Sergio. **Causes of deforestation of the Brazilian Amazon**. World Bank Publications, 2004.
- MARTÍN-DOIMEADIOS, R. R., NEVADO, J. B., BERNARDO, F. G., MORENO, M. J., ARRIFANO, G. P. F., HERCULANO, A. M., ... & CRESPO-LÓPEZ, M. E. Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7466-7479, 2014.
- MATOS, J., LOURENÇO, H. M., BRITO, P., MAULVAULT, A. L., MARTINS, L. L., & AFONSO, C. Influence of bioaccessibility of total mercury, methyl-mercury and selenium on the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked blue shark (*Prionace glauca*). **Environmental Research**, v. 143, p. 123-129, 2015.
- MAULVAULT, A. L., MACHADO, R., AFONSO, C., LOURENÇO, H. M., NUNES, M. L., COELHO, I., ... & MARQUES, A. Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2808-2815, 2011.
- MAURO, J. B. N.; GUIMARÃES, J. R. D.; MELAMED, R. Aguapé agrava contaminação por mercúrio. **Ciência Hoje**, v. 25, n. 150, p. 68-71, 1999.
- MENEZES, E. DE A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg, Zn em Amostras de Carnes Bovinas, Suínas e de Frango In natura e Processadas Termicamente**. 2010. Tese de Doutorado pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS.

- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T. O. R. S. T. E. N., BOURLIEU, C., ... & DUFOUR, C. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.
- MORENO-BRUSH, M., RYDBERG, J., GAMBOA, N., STORCH, I., & BIESTER, H. Is mercury from small-scale gold mining prevalent in the southeastern Peruvian Amazon?. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 150-159, 2016.
- DO NASCIMENTO DA SILVA, E., HEERDT, G., CIDADE, M., PEREIRA, C. D., MORGON, N. H., & CADORE, S. Use of in vitro digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 152-158, 2015.
- NEVADO, J. B., MARTÍN-DOIMEADIOS, R. R., BERNARDO, F. G., MORENO, M. J., HERCULANO, A. M., DO NASCIMENTO, J. L. M., & CRESPO-LOPEZ, M. E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environment International**, v. 36, n. 6, p. 593-608, 2010
- OUÉDRAOGO, O., & AMYOT, M. Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. **Environmental Research**, v. 111, n. 8, p. 1064-1069, 2011.
- PADOVANI, C.R.; FORSBERG, B. R.; PIMENTEL, T.P. Contaminação Mercurial em Peixes do Rio Madeira: Resultados e Recomendações para Consumo Humano. **Acta Amazonica** v.25 n.1/2, p. 127 – 136, 1995
- PARADA, J., & AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.
- PEIXOTO, R. R., DEVESA, V., VÉLEZ, D., CERVERA, M. L., & CADORE, S. Study of the factors influencing the bioaccessibility of 10 elements from chocolate drink powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 41-47, 2016.
- PERES, F., MOREIRA, J. C., & DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. **É veneno ou é remédio**, p. 21-41, 2003.
- PIEDRA, C. J., SÁNCHEZ, V., VÉLEZ, D., & DEVESA, V. Reduction of mercury bioaccessibility using dietary strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 10-16, 2016.
- PRUSKI, A. M., & DIXON, D. R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 57, n. 3, p. 127-137, 2002.
- REIN, M. J., RENOUF, M., CRUZ-HERNANDEZ, C., ACTIS-GORETTA, L., THAKKAR, S. K., & DA SILVA PINTO, M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588-602, 2013.

- RODRIGUES, R.M.; MASCARENHAS, A.F.S; ICHIHARA, A.H. ; SOUZA, T.M.C.; BIDONE, E.D.; BELLA, V.; HACON, S.; SILVA, A.R.B.; BRAGA, J.B.P.; STILIANIDI, B. **Estudo dos Impactos Ambientais Decorrentes do Extrativismo Mineral e Poluição Mercurial no Tapajós — Pré Diagnóstico** No. 4, 218 pp. Série Tecnologia Ambiental, STA, CETEM/CNPq, Rio de Janeiro, 1994
- RODRIGUEZ, R. R., BASTA, N. T., CASTEEL, S. W., & PACE, L. W. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 4, p. 642-649, 1994.
- ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; PASSOS, C.J.S.; DA SILVA, E.D.; ANDRADE, P.S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J.R.D.; AMORIM, M. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in Amazonian ecosystems. **Water, air, and soil pollution**, v. 112, n. 3-4, p. 297-313, 1999.
- ROSTAMI, I., & JUHASZ, A. L. Assessment of persistent organic pollutant (POP) bioavailability and bioaccessibility for human health exposure assessment: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 623-656, 2011.
- RUBY, M. V., DAVIS, A., SCHOOF, R., EBERLE, S., & SELLSTONE, C. M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 2, p. 422-430, 1996.
- RUBY, M. V., SCHOOF, R., BRATTIN, W., GOLDADE, M., POST, G., HARNOIS, M., ... & EDWARDS, D. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 21, p. 3697-3705, 1999.
- DOS SANTOS L.S.N.; MÜLLER R.C.S.; SARKIS J.E.S.; ALVES C.N.; BRABO E.S.; SANTOS E.O.; BENTES M.H. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajos River Basin, Para, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 261, n. 1, p. 1-8, 2000.
- Serviço Brasileiro de apoio as Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura – Brasil 2014**. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf. Acessado em: 19 de Junho de 2015
- SIEDLIKOWSKI, M., BRADLEY, M., KUBOW, S., GOODRICH, J. M., FRANZBLAU, A., & BASU, N. Bioaccessibility and bioavailability of methylmercury from seafood commonly consumed in North America: In vitro and epidemiological studies. **Environmental Research**, v. 149, p. 266-273, 2016.
- DA SILVA BRABO, E., DE OLIVEIRA SANTOS, E., DE JESUS, I. M., MASCARENHAS, A. F., & FAIAL, K. F. Níveis de mercúrio em peixes consumidos pela comunidade indígena de Sai Cinza na Reserva Munduruku,

- Município de Jacareacanga, Estado do Pará, Brasil Mercury levels in fish consumed by the Sai Cinza. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 325-331, 1999.
- SLAUGHTER, S. L., ELLIS, P. R., & BUTTERWORTH, P. J. An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1525, n. 1, p. 29-36, 2001.
- DAL SOGLIO, F., & KUBO, R. R. **Agricultura e sustentabilidade**. PLAGEDER, 2009.
- SOARES, J. L. F., DE FREITAS GOCH, Y. G., PELEJA, J. R. P., FORSBERG, B. R., DE SOUZA LEMOS, E. J., & DE SOUSA, O. P. Bioacumulação de Mercúrio Total (hgt) e Hábitos Alimentares de Peixes da Bacia do Rio Negro, Amazônia, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 6, n. 1, p. 102-106, 2016.
- DE SOUZA LIMA, A. P., MÜLLER, R. C. S., DE SOUZA SARKIS, J. E., ALVES, C. N., DA SILVA BENTES, M. H., BRABO, E., & DE OLIVEIRA SANTOS, E. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. **Environmental Research**, v. 83, n. 2, p. 117-122, 2000.
- TORRES-ESCRIBANO, S., RUIZ, A., BARRIOS, L., VÉLEZ, D., & MONTORO, R. Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 6, p. 981-986, 2011.
- ULRICH, J. C. **Preparação e Caracterização de um metal de referencia de peixe**. 2011. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.
- ULRICH, J. C.; SARKIS, J. E. S. Preparation and certification of a reference material for the total mercury and methylmercury mass fractions in fish. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 18, n. 6, p. 511-516, 2013.
- UNEP **The Global Atmospheric Mercury Assessment: Sources, Emissions and Transport**, United Nations Environmental Programme, Chemicals Branch, DTIE, Geneva, Switzerland, December 2008.
- U.S. EPA Method 7473 **Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition. Amalgamation and Atomic Absorption Spectrophotometry**, USEPA, Washington (DC), 2007.
- VERGARA, W., & SCHOLZ, S. M. (Eds.). **Assessment of the risk of Amazon dieback**. World Bank Publications, 2010.
- VERSANTVOORT, C. H. M., & ROMPELBERG, C. J. M. Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. 2004. RIVM report 320102002/2004.
- VERSANTVOORT, C. H., OOMEN, A. G., VAN DE KAMP, E., ROMPELBERG, C. J., & SIPS, A. J. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the

- bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.
- WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. Atheneu, 2009.
- WANG, H. S., ZHAO, Y. G., MAN, Y. B., WONG, C. K., & WONG, M. H. Oral bioaccessibility and human risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) via fish consumption, using an *in vitro* gastrointestinal model. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1673-1679, 2011.
- WOLLSTONECROFT, M. M., ELLIS, P. R., HILLMAN, G. C., & FULLER, D. Q. Advances in plant food processing in the Near Eastern Epipalaeolithic and implications for improved edibility and nutrient bioaccessibility: an experimental assessment of *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla (sea club-rush). **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 17, n. 1, p. 19-27, 2008.
- World Health Organization (WHO) **Geneva: World Health Organization**, v. 107, p.118.1991.