

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Qualidade e inocuidade do polvo (*Octopus* sp) nos diferentes elos
da sua comercialização na Baixada Santista, SP, Brasil

Marildes Josefina Lemos Neto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Mariza Landgraf

Co-orientadora:
Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo
2009

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015688

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L557q Lemos Neto, Marildes Josefina
Qualidade e inocuidade do polvo (*Octopus sp*) nos diferentes
elos da sua comercialização na Baixada Santista, SP, Brasil /
Marildes Josefina Lemos Neto. - São Paulo, 2009.
77p.
Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental
Orientador: Landgraf, Mariza
Co-orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza
1. Microbiologia de alimentos 2. Alimentos : Controle de
qualidade : Tecnologia 3. Análise toxicológica I. T. II. Landgraf,
Mariza, orientador. III. Nascimento, Elizabeth de Souza, co-
orientador.
664.07 CDD

Marildes Josefina Lemos Neto

Qualidade e inocuidade do polvo (*Octopus sp*) nos diferentes elos
da sua comercialização na Baixa da Santista, SP, Brasil

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. Mariza Landgraf
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo 14 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

A meu filho, José Lourenço, na esperança que meus acertos sirvam de exemplo e desejando que ele compreenda que conhecimento exige dedicação e esforço.

Aprender é de longe a maior recompensa.

William Hazlitt

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre uma força maior.

Às Professoras Mariza Landgraf e Elizabeth de Souza Nascimento pela dedicação, ensinamentos, estímulo, paciência e apoio.

Às Professoras Bernadette Franco e Maria Teresa pelo apoio quando necessário.

À Kátia e Lúcia, funcionárias do Laboratório de Microbiologia, pelo apoio e carinho constantes.

Aos amigos André, Ângela, Ana, Cecília, Daniela, Eb, Hans, Lina, Matheus, Tatiana, Vanessa, Vinícius, que muitas vezes foram a multiplicação de meus braços.

À todos os colegas do Instituto de Pesca, que em algum momento me deram apoio técnico, logístico, ou pessoal.

As “meninas” do Laboratório de Tecnologia do Pescado Agar, Cristiane, Érika, Rúbia e Thais. Como técnicas meu muito obrigado pelo suporte nas análises laboratoriais. Como amigas só posso dizer que a caminhada foi mais fácil com vocês.

Ao Acácio e Luiz Miguel pela realização da análise estatística e palavras de incentivo.

Aos estagiários do Laboratório de Tecnologia do Pescado por sempre estarem dispostos a ficar com “bolhas” nas mãos de tanto “picar” polvo e o que mais fosse preciso.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pelas informações, disponibilidade, realização de análises e suporte durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos novos colegas e amigos do IPEN, em especial ao Edson, Maria José e Vera, pelos ensinamentos e apoio.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e seus funcionários pelo auxílio na realização das análises

E finalmente a minha “base”, meu “esteio”, meu “porto seguro”, que é a minha família. Não se preocupem... um dia eu me aposento, mas nunca de vocês.

A todos vocês meu coração e meu muito obrigado.

O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem a sua própria justificativa racional para existir... Não perca nunca essa sacrossanta curiosidade.

Albert Einstein

O melhor método de se vencer obstáculos é o método de equipe.

Colin Powell

INDICE

	Página
Lista de tabelas	X
Lista de figuras	XI
Resumo	XII
Abstract	XIV
1 Introdução	1
Microbiologia do pescado	6
Qualidade Físico-química do pescado	9
Contaminantes químicos em pescado	11
2 Objetivos	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 Material e métodos	30
3.1 Material	30
3.1.1 Amostragem	30
3.1.1.1 Coleta das amostras	31
3.2 Métodos	32
3.2.1 Ensaio Microbiológicos	32
3.2.1.1 Preparo da amostra	32
3.2.1.2 Contagem total de microrganismos aeróbios psicotróficos	32
3.2.1.3 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	32
3.2.1.4 Número mais provável de coliformes Totais e termotolerantes	33
3.2.1.5 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	33
3.2.1.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp	34
3.2.1.7 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
3.2.2 Ensaio físico-químicos	35
3.2.2.1 Preparo das amostras	35
3.2.2.2 Determinação do valor do pH	36
3.2.2.3 Determinação do valor do nitrogênio nas bases voláteis totais (NBVT)	36
3.2.2.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBArS)	36
3.2.3 Determinação de As, Cd, Hg e Pb nas amostras de polvo	37
3.2.3.1 Análise por Ativação com Nêutrons – Determinação de As	37
3.2.3.1.1 Preparação das amostras para irradiação	38
3.2.3.1.2 Preparação dos padrões dos elementos de interesse	38
3.2.3.1.3 Irradiação das amostras e dos padrões analíticos	38
3.2.3.1.4 Medições das atividades gama induzidas	39
3.2.3.2 Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado	39

	indutivamente – Determinação de Cd e Pb	
3.2.3.2.1	Dissolução das amostras para análise por ICP OES	40
3.2.3.2.2	Padrões utilizados –Curvas de Calibração	40
3.2.3.2.3	Leituras no Espectrômetro de Emissão Atômica	40
3.2.3.3	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio – Determinação de Hg	41
3.2.3.3.1	Dissolução das amostras para análise por CV-AAS	41
3.2.3.3.2	Curva de Calibração	41
3.2.3.4	Validação das Metodologias	41
3.2.3.4.1	Limites de Detecção e Determinação	42
3.2.3.4.1.1	Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) por NAA	42
3.2.3.4.1.2	LD e LQ por ICP OES e CV - AAS	43
3.2.4	Análise estatística	44
4	Resultados e discussão	45
4.1	Caracterização da atividade de pesca e manipulação do polvo na Baixada Santista	45
4.2	Análises microbiologia	46
4.3	Análises físico-química	60
4.4	Análise dos Metais	65
5	Conclusões	72
6	Recomendações	74
7	Referências	75

Lista de tabelas

Tabela 1. Exportação e importação de polvo (<i>Octopus</i> sp) pelo Brasil no período de 1998 a outubro de 2008	3
Tabela 2. Concentrações máximas e mínimas de metais em diferentes locais de amostragem no sistema estuarino de Santos e São Vicente	12
Tabela 3. Concentrações de arsênio no meio ambiente	13
Tabela 4. Concentrações de cádmio no meio ambiente	17
Tabela 5. Amostras de polvo coletadas por local de comercialização e município da Baixada Santista, SP	31
Tabela 6. Período de estocagem e número de amostras de polvo, por ponto de amostragem, submetidas às análises físico-químicas	35
Tabela 7. Distribuição da população de microrganismos aeróbios psicrotóxicos (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (<i>Octopus</i> sp) cru, sob refrigeração ou congelado, conforme elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP	49
Tabela 8. Distribuição da população de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (<i>Octopus</i> sp) cru sob refrigeração ou congelado, conforme elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP	51
Tabela 9. Distribuição da população de coliformes totais (NMP/animal) em 121 amostras de polvo (<i>Octopus</i> sp) cru sob refrigeração ou congelado, conforme elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP.	54
Tabela 10. Distribuição da população de coliformes termo-tolerantes (NMP/animal) em 121 amostras de polvo (<i>Octopus cf vulgaris</i>) cru sob refrigeração ou congelado, conforme elos de comercialização na Baixada Santista, SP.	56
Tabela 11. Distribuição da população de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (<i>Octopus</i> sp) cru, sob refrigeração ou congelado, conforme elos da cadeia de comercialização da Baixada Santista, SP.	58
Tabela 12. Numero de amostras que seriam rejeitadas sensorialmente conforme as níveis de TBARS (mg MAL/kg) de acordo com três estudos diferentes, por elo da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP	64
Tabela 13. Determinação de As, Hg, Cd e Pb em amostras de referência	66
Tabela 14. Limites de determinação e de Quantificação para Hg, Cd, e Pb em amostras de polvo por CV ASS e ICP OES	66
Tabela 15. Média, desvio padrão de concentrações de Pb (mg/kg) em polvo <i>in natura</i> nos diferentes elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista.	69

Lista de figuras

Figura 1: Polvo desembarcado (t) por ano entre 2000 e 2008 pelas diferentes frotas que atuam no litoral Sudeste do Brasil.	4
Figura 2: Polvo desembarcado (t) por ano entre 2000 a 2008, segundo os diferentes pontos de desembarque das frotas que atuam no litoral Sudeste do Brasil.	4
Figura 3 – População de aeróbios psicotrófilos presentes em polvo (<i>Octopus</i> sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista	48
Figura 4 – População de aeróbios mesófilos presentes em polvo (<i>Octopus</i> sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista	50
Figura 5 – População de coliformes totais presentes em polvo (<i>Octopus</i> sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista	53
Figura 6 – População de coliformes termo tolerantes presentes em polvo (<i>Octopus</i> sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista	53
Figura 7 – População de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva presente em polvo (<i>Octopus</i> sp.) coletadas em diferentes locais de amostragem da Baixada Santista	57
Figura 8 Níveis de pH em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo da Baixada Santista, SP	61
Figura 9 Níveis de N-BVT (mg/100g de polvo) em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo na Baixada Santista, SP	62
Figura 10 Níveis de TBARS (mg de malonaldeído/kg) em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo na Baixada Santista, SP	64
Figura 11 Correlação entre os diferentes parâmetros microbiológicos, físico-químicos, período de estocagem e peso de amostras de polvo coletadas na baixada Santista, SP através da análise por Componentes Principais (PCA)	65
Figura 12 Dispersão dos níveis de Pb (mg/kg) em amostras de polvo <i>in natura</i> , comercializado na Baixada Santista, relacionados ao peso (kg)	68
Figura 13 Dispersão dos níveis de As (mg/kg) em amostras de polvo <i>in natura</i> , comercializados na Baixada Santista, relacionados ao peso (kg)	68

RESUMO

Qualidade e inocuidade do polvo (*Octopus* sp) nos diferentes elos da sua comercialização na Baixada Santista, SP, Brasil

O pescado é uma fonte de alimento com componentes altamente desejáveis para uma dieta saudável, apesar de vários fatores poderem torná-lo um risco potencial para a saúde do consumidor. Dentre os diferentes tipos de pescado desembarcados pelas frotas que atuam no litoral paulista e águas adjacentes, os moluscos da Classe Cephalopoda (lulas e polvos) constituem um grupo de interesse econômico tanto para o mercado interno quanto para o externo. Tendo em vista a inexistência de dados sobre a qualidade de polvo e o interesse que vem despertando como produto de exportação, o presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de contaminação microbiana e de metais pesado, bem como seu grau de frescor.

Foram analisadas 121 amostras de polvo cru adquiridas em locais como feiras-livres (14), mercados/peixarias (27), supermercados (25), indústrias (23) e terminais pesqueiros ou entrepostos (32) em quatro municípios da Baixada Santista (Guarujá, Santos, São Vicente e Praia Grande). Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e de metais pesados.

Salmonella spp foi detectada em oito (6,6%) das 121 amostras sendo duas provenientes de amostras coletadas em entreposto, três de amostras de indústria, duas de amostras de polvo coletadas em supermercados e uma amostra coletada em feira-livre; *L. monocytogenes* foi detectada em 15 (12,4%) amostras de polvo sendo seis (5,0%), de amostras coletadas em entreposto, duas (1,6%) proveniente de indústria, uma (0,8%) de amostra coletada em feira livre, cinco (4,1%) de supermercados e uma (0,8%) em peixaria. Observou-se que uma amostra (0,8%), coletada em entreposto, apresentou população de coliformes termotolerantes na faixa de 10^4 a 10^5 NMP/animal e uma (0,8%) proveniente de feira livre apresentou o maior nível de contaminação (10^5 - 10^6 NMP/animal). Apenas uma amostra (0,8%), proveniente de entreposto, apresentou população de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^3 UFC/animal. Quarenta e uma amostras (33,9%) apresentaram populações de

aeróbios mesófilos acima de 10^6 UFC/animal. Em relação aos psicrotóxicos, 94 (77,7%) amostras apresentaram populações acima de 10^6 UFC/animal. Os valores de pH oscilaram entre 6,02 e 7,22. Para N-BVT os valores variaram entre 11,5 e 69,01 mg/100g. Considerando o limite máximo estabelecido de 30 mg de N-BVT/100g de pescado, do total de amostras analisadas, 29,3% foram consideradas impróprias para consumo humano. Os resultados obtidos para TBARS variaram de 0,08 a 2,37mg de aldeído malônico/kg de pescado. Na quantificação de metais os níveis para As variaram de 1,256 a 28,502 mg/kg; Cd de 0,006 a 0,540 mg/kg; Pb de 0,0018 a 0,491 mg/kg; Hg de 0,007 a 0,179 mg/kg; Se de 0,074 a 0,690 mg/kg e Zn de 4,7 a 140,8 mg/kg de polvo *in natura*. No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece o limite máximo de tolerância (LMT) de 1,0 mg/kg para o arsênio em peixe e produtos da pesca, 0,5 mg/kg para o mercúrio para o chumbo 2,0 mg/kg e cádmio 1,0 mg/kg. Em relação ao As, 100% das amostras encontram-se acima do LMT.

O presente estudo sugere a importância dos ensaios físico-químicos, microbiológicos e de metais pesados na avaliação da qualidade do polvo para consumo humano. É imprescindível um esforço em conjunto dos órgãos de pesquisa, de fiscalização e instituições relacionadas à capacitação dos manipuladores do pescado visando garantir o oferecimento de um alimento, não só de alto valor nutricional, como é o polvo, mas com qualidade assegurada.

Palavras chave: Microbiologia, metais pesados, qualidade, polvo.

ABSTRACT

Quality and safety of the octopus (*Octopus* sp) in different segments of its marketing in Baixada Santista, São Paulo, Brazil

Seafood contain highly desirable nutrients for a healthy diet, although several factors may turn it into a potential risk to consumers health. Among the different types of seafood landed by the fleets operating in the Sao Paulo coast and adjacent waters, the mollusc class Cephalopoda (squid and octopus) are a group of economic interest for both domestic and external market. In view of the lack of data on the quality of octopus and it's increasing attracting interest as an export product, this study aimed to verify the occurrence of microbial and heavy metals contamination, and it's degree of freshness.

121 samples of raw octopus purchased at street fairs (14), free markets/fish markets (27), supermarkets (25), industries (23) and fish warehouses (32) in four municipalities of the Baixada Santista (Guarujá , Santos, São Vicente and Praia Grande) were analyzed. Microbiological, physical-chemical analyses were performed as well as heavy metals determinations.

Salmonella was detected in eight (6.6%) of 121 samples - two samples were collected from fish warehouses, three samples from industries, two samples from supermarkets and one sample from street fair; *L. monocytogenes* was detected in 15 (12.4%) samples, six of them (5.0%) collected from fish warehouses, two (1.6%) from industries, one (0.8%) from street fair, five (4.1%) from supermarkets, and one (0.8%) from fish markets. One sample (0.8%), collected from fish warehouse, showed a population of thermotolerant coliforms in the range of 10^4 to 10^5 MPN/animal and one (0.8%) collected from street fair showed the highest level of contamination (10^5 - 10^6 MPN/animal).

Only one sample (0.8%), collected from warehouse, showed a positive population of *Staphylococcus coagulase* above 10^3 CFU/animal. Forty-one samples (33.9%) showed aerobic mesophiles populations higher than 10^6 CFU/animal. In relation to psychrotrophics, 94 (77.7%) samples showed populations higher than 10^6 CFU/animal. The pH values ranged between 6.02 and 7.22. TVBN values ranged between 11.5 and 69.01 mg/100g. Considering

30 mg TVBN/100g of fish the maximum established limit 29.3% of the samples were considered unfit for human consumption. Results for TBARS ranged from 0.08 to 2.37 mg of malonic aldehyde/kg of fish.

In relation to metal quantification the levels of As ranged from 1.256 to 28.502 mg/kg, Cd from 0.006 to 0.540 mg/kg, Pb from 0.0018 to 0.491 mg/kg, Hg 0.007 to 0.179 mg/kg. These levels are related to raw octopus. The Brazilian Ministry of Health sets the maximum residue limit (MRL) of 1.0 mg/kg for arsenic in fish and fish products, 0.5 mg/kg for mercury in predatory fish, 2.0 mg / kg for lead in predatory fish, and 1.0 mg / kg for cadmium. 100% of the samples were above the arsenic MRL.

This study suggests the importance of physical-chemical, microbiological and heavy metals analysis in assessing the quality of octopus for human consumption. It is essential to coordinate a task force among research and surveillance centers as well as institutions related to fish handlers training to ensure the delivery of a food, not only of high nutritional value, as is the octopus, but with assured quality.

Key words: Microbiology, heavy metals, quality, octopus.

1. INTRODUÇÃO

O pescado representa 20% de toda a proteína animal consumida no mundo, contudo este percentual pode se mostrar mais elevado se considerarmos a pesca de subsistência. Dados da Food and Agriculture Organization (FAO) de 2004 (FAO, 2007a) mostram que a pesca e a aqüicultura alcançaram produção mundial de, aproximadamente, 106 milhões de toneladas e um consumo mundial aparente de 16,6 kg *per capita*. Do total do pescado produzido, 43% provieram da aqüicultura.

No Brasil, a produção nacional de pescado totalizou 1.050.808 t em 2006, com 50,2% correspondentes à pesca extrativista marinha, 23,9% à pesca extrativista continental, 7,7% à maricultura e 18,2% à aqüicultura continental, o que representou R\$ 3.294.604.130,00. Quando comparado a 2005, observa-se um aumento de 4,1% (IBAMA, 2008).

O Brasil, em 2003, apresentou um consumo médio de 6,4 kg de pescado *per capita*/ano (FAO, 2007b), consumo este considerado baixo, provavelmente devido ao alto preço do produto e a um sistema de distribuição deficiente em redes atacadistas e varejistas (WIEFELS, 2004). Observa-se, ainda, grandes diferenças no consumo conforme a região, fato evidenciado quando se compara, por exemplo, o consumo *per capita* de pescado no Estado do Amazonas, de 54 kg/ano, com o do Rio de Janeiro, de 16 kg/ano. (WIEFELS, 2006)

Estudos recentes relatam um aumento no consumo mundial *per capita*, sendo a diversificação e disponibilização de produtos de conveniência pelas indústrias pesqueiras os responsáveis por esta tendência. Outro fator a contribuir para este aumento é a busca, pelo consumidor, por produtos de elevado valor nutricional e seguros do ponto de vista microbiológico (EMBRAPA, 2004).

Dentre os diferentes tipos de pescado desembarcados pelas frotas que atuam no litoral paulista e águas adjacentes, os moluscos da Classe Cephalopoda (lulas e polvos) constituem um grupo de interesse econômico devido a possibilidade de exportação.

O polvo é um animal bentônico versátil, com alta taxa de crescimento e ciclo de vida relativamente curto, presente em diferentes ambientes marinhos e

em diferentes profundidades (SEIXAS; PINHEIRO; REIS, 2002). Na natureza, esses moluscos marinhos ocorrem em uma grande variedade de habitats, desde os ambientes costeiros até os oceânicos muito profundos (BOYLE, 1983), sendo muito comuns nas capturas da pesca de arrasto-de-portas nos litorais Sudeste e Sul do país (PEREZ *et al.*, 2003; TOMÁS; CORDEIRO, 2003; TOMÁS; GASALLA; CARNEIRO, 2003). O estabelecimento de uma pesca específica como é a pesca com potes a partir de 2003 aumentou a captura de polvos, não só melhorando o equilíbrio entre oferta e demanda desse produto no mercado interno, mas também viabilizando a sua exportação como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 Exportação e importação de polvo (*Octopus sp*) pelo Brasil no período de 1998 a outubro de 2008

ANO	EXPORTAÇÃO (kg)		IMPORTAÇÃO (kg)	
	Polvo fresco, resfriado	Polvo congelado	Polvo fresco, resfriado	Polvo congelado
1998	0	7.000	188	271.557
1999	149	5.186	0	173.576
2000	239	0	0	133.379
2001	36	265.784	0	57.222
2002	26	116.923	0	15.684
2003	212	295.679	0	800
2004	2.797	1.241.437	0	10.196
2005	206	881.568	0	4.120
2006	3.953	787.378	0	14.346
2007	473	887.004	0	20.163
2008	280	1.257.665	0	10.583

Fonte: ALICE WEB DESENVOLVIMENTO, 2008

De acordo com ÁVILA-DA-SILVA; CARNEIRO; FAGUNDES (1999), através do Sistema Gerenciador de Banco de Dados de Controle Estatístico de Produção Pesqueira Marinha, ProPesq®, a captura de polvo está distribuída em termos de frota pesqueira na Figura 1 e conforme o local de desembarque na Figura 2.

Observa-se na Figura 1 que, até o início de 2003, a maior captura de polvo acontecia com os arrasto duplo médio e outras artes de pesca. A partir deste ano, com a introdução da pesca com potes (covos), observa-se que a captura do polvo tem sua maior concentração nesta arte de pesca juntamente com o arrasto duplo médio.

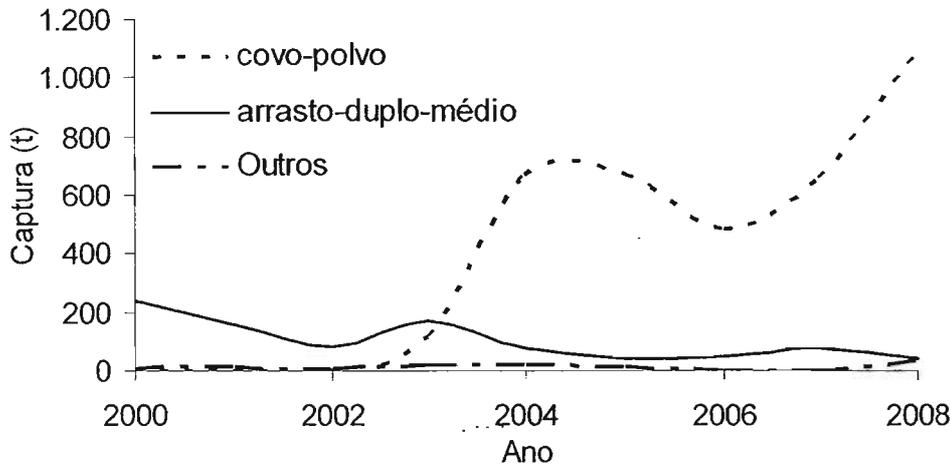


Figura 1: Polvo desembarcado (t) por ano entre 2000 e 2008 pelas diferentes frotas que atuam no litoral Sudeste do Brasil.



Figura 2: Polvo desembarcado (t) por ano entre 2000 a 2008, segundo os diferentes pontos de desembarque das frotas que atuam no litoral Sudeste do Brasil.

Na Figura 2 verifica-se que o município de Santos e Guarujá apresentam, no período de 2000 a 2008, o maior desembarque de polvo (t) quando comparados aos outros municípios amostrados. Isto se deve principalmente pelas características das frotas pesqueiras que realizam os

desembarques em cada município, bem como as espécies de interesse das respectivas frotas.

A exigência de um controle eficaz da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos disponibilizados para consumo se justifica pelo direito que todo cidadão tem de consumir alimentos inócuos, pois as enfermidades transmitidas por alimentos contaminados, quando não põe em risco a vida, impedem a sua atuação profissional, influenciam negativamente o comércio, o turismo, e a confiança do consumidor (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Apesar de todos os benefícios relacionados à composição nutricional do pescado, vários fatores podem torná-lo um risco potencial à saúde do consumidor, tais como: a presença de microrganismos patogênicos, parasitas, elementos tóxicos e compostos resultantes da degradação protéica e oxidação lipídica (SANTOS *et al.*, 2002). CATO (1998) relata 71 casos de alerta de risco potencial à saúde envolvendo o pescado, o que representava 42,5% do total dos alimentos investigados pelo Food and Veterinary Office of the European Union entre 1992 e 1997.

A via de deterioração do pescado é diferente quando se compara espécies diferentes, indivíduos de uma mesma espécie ou até partes de um mesmo indivíduo. A utilização concomitante de diversos métodos é o mais indicado, podendo ser sensoriais, físicos, químicos, histológicos, parasitológicos e microbiológicos (OGAWA; MAIA, 1999).

Segundo RAY (1996), tanto o pescado colhido em água doce como salgada é susceptível à degradação por meio de enzimas autolíticas, oxidação de ácidos graxos insaturados e do crescimento microbiano.

Após a morte do animal, inicialmente ocorrem os eventos bioquímicos, seguidos da proliferação da microbiota, passando os dois, a agir, então, concomitantemente. Pela ação de enzimas e de microrganismos próprios do pescado ocorrem alterações no tecido muscular que se iniciam logo após a captura e que resultam na putrefação (FALCÃO; LESSI; LEITÃO, 1994). Essas alterações são aceleradas quando o pescado é mantido em temperaturas inadequadas de armazenamento e/ou sofre excesso de manipulação. Portanto, cuidados especiais na manipulação, desde a captura até a comercialização, são necessários por se tratar de alimento extremamente perecível (CODEX ALIMENTARIUS, 1989, HOBBS; GILBERT, 1986).

Segundo EHIRA; UCHIYAMA (1987), o frescor é um dos atributos mais importantes da avaliação da qualidade do pescado, pois as mudanças microbiológicas e bioquímicas, associadas à deterioração, ocorridas durante a manipulação e a estocagem, levam a uma visível perda deste atributo. Além disso, ele é utilizado pelo consumidor no momento da compra, principalmente devido à simplicidade, à relativa eficiência e imediatismo dos resultados (BOTTA, 1995).

MICROBIOLOGIA DO PESCADO

Na deterioração por ação de microrganismos, muitos fatores determinam quais espécies poderão se multiplicar mais rapidamente, vindo a se tornar o grupo de microrganismos dominante na deterioração. Segundo GRAM; HUSS (1996) e RAY (1996) dentre estes fatores pode-se citar o tipo de microrganismo, de alimento, características intrínsecas e extrínsecas do alimento, a manipulação e fatores relacionados ao processamento.

A facilidade de contaminação microbiana do pescado, bem maior do que em outros tipos de carne, deve-se, segundo EVANGELISTA (1992), à sua composição química, textura frágil e à menor quantidade de tecido conjuntivo.

Segundo FRAZIER; WESTHOFF (1993), RITTER; SANTOS; BERGMANN (2002) e VIEIRA (2004), a microbiota do peixe vivo depende da carga de microrganismos presentes nas águas onde vive e embora a contaminação primária do pescado possa acontecer no sistema aquático, alguns autores (CARNEIRO; VIANA, 1998; GASPAR; VIEIRA; TAPIA, 1997; LIMA; OLIVEIRA, 1992; NORMANDE; ALENCAR; BEZERRA, 1998, RAY, 1996 e SILVA *et al.*, 2002) relatam que o manuseio, após a captura, incluindo a qualidade da água e do gelo utilizados na conservação e armazenamento, são tidos como fatores determinantes da qualidade microbiológica do produto comercializado, transformando o pescado em veículo potencial de microrganismos patogênicos ao consumidor.

Segundo MONTVILLE; MATTHEWES (2008), além dos fatores descritos acima, o número e a composição da microbiota do pescado são influenciados pela estação do ano e pelas condições da arte de pesca. A temperatura da água tem significativa influência no número inicial e tipos de microrganismos

encontrados no pescado. A população bacteriana é, geralmente, maior em pescado de águas quentes tropicais e subtropicais quando comparado ao de águas frias. Pescados colhidos em águas frias abrigam predominantemente bactérias psicrófilas, enquanto bactérias mesófilas são mais comumente encontradas em pescado de águas tropicais. Desta forma, em pescado de águas temperadas, encontram-se bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio* e no pescado de águas tropicais são encontrados gêneros *Bacillus*, corineformes e *Micrococcus* em pescado de águas tropicais (RAY, 1996).

Outro fator que influencia a microbiota inicial do pescado é a arte de pesca empregada. O pescado colhido com rede apresenta população de microrganismos maior que os pescados com linha, pois no primeiro caso o arrasto do pescado no fundo do oceano pode causar a ruptura da pele e músculos, bem como do aparelho digestivo com extravasamento do conteúdo intestinal, aumentando a contaminação microbiana. A demora no resfriamento desse pescado, por sua vez, também contribui para o aumento da população microbiana (MONTVILLE; MATTHEWES, 2008).

Os microrganismos têm importante papel na produção de compostos que são mensurados nos ensaios físico-químicos e que indicam o grau de frescor deste pescado. Neste sentido, os microrganismos, principalmente os bacilos Gram-negativos iniciam a degradação de compostos nitrogenados não protéicos através da oxidação, contudo, até a putrefação diferentes tipos de compostos voláteis são produzidos como NH_3 , trimetilamina, histidina, putrescina, cadaverina, indol, H_2S , mercaptanas, dimetil sulfetos (especialmente pela *S. putrefaciens*) e ácidos graxos voláteis (acético, isobutírico ou isovalérico). As espécies de bactérias proteolíticas também produzem proteinases extracelulares que hidrolisam as proteínas do pescado e disponibilizam peptídeos e aminoácidos que auxiliam o metabolismo das bactérias deteriorantes. A decomposição de compostos nitrogenados primários por *Pseudomonas* e *Vibrio*, especialmente sob refrigeração, resulta na produção de NH_3 , aminas e ácidos graxos voláteis (RAY, 1996).

Substâncias nitrogenadas não protéicas, com baixo peso molecular como inosina, ribose, uréia e óxidos de trimetilamina, presentes quando o

pescado já entrou em acentuada autólise, constituem substratos preferenciais para a microbiota, responsável por profundas alterações sensoriais no pescado (BEIRÃO *et al.*, 2000; SÃO PAULO, 1985).

No caso específico de moluscos, que contém baixa concentração de compostos nitrogenados não protéicos, porém alto teor de carboidratos (glicogênio, 3,5 a 5,5%), a microbiota é composta predominantemente por *Pseudomonas* sp e vários outros bacilos Gram-negativos que utilizam estes compostos produzindo, mesmo sob refrigeração, ácidos orgânicos que serão utilizados no metabolismo das bactérias ácido lácticas, enterococos e coliformes, resultando no abaixamento do pH (RAY, 1996).

Dos diversos microrganismos que já foram relacionados com o pescado e seus produtos podem ser citados *Listeria monocytogenes*, encontrada em pescado fresco, congelado, defumado e desidratado-salgado (CASERIO; GRONCHI; VILLA, 1989; FARBER; PETERKIN, 1991; FLETCHER; ROGERS; WONG, 1994, FUCHS; SURENDRAN, 1989; MOTES, 1991; WEAGENT *et al.*, 1988,), coliformes termotolerantes, encontrados em ostras, mariscos, peixes e outras espécies aquáticas recém capturadas (CARVALHO; VASCONCELOS; VIEIRA, 2007; POMMEPUY *et al.*, 1996; VARGA; ANDERSON, 1968), *Salmonella* sp, relacionada a moluscos, crustáceos, peixes e frutos do mar crus (DUFFY *et al.*, 1999; FELDHUSEN, 2000; FERREIRA; CAMPOS, 2008; FORSYTHE, 2002; JAKABI *et al.*, 1999; MOHAMED HATHA; LAKSHMANAPERUMALSAMY, 1997) e *Staphylococcus* coagulase positiva, encontrados em peixes e frutos do mar (CATO 1998; WIENEKE; ROBERT; GILBERT, 1993).

O Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) da EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2003, 2004, 2005, 2006, 2007), no período de 2003 a 2007, relata 917 alertas envolvendo pescado e seus produtos. Destes, 415 foram por contaminação de elementos tóxicos, principalmente mercúrio e cádmio e 206 foram por contaminação de microrganismos patogênicos, entre os quais encontram-se *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, e *Vibrio* sp.

A contaminação de polvo por microrganismos pode dificultar e até mesmo impedir o comércio internacional desse alimento como ocorrido nos Estados Unidos que não permitiram o desembarque de 22 carregamentos de

polvo congelado originário das Filipinas, em razão de contaminação por *Salmonella* (MANILA TIMES, 2003).

A ocorrência em polvos de microrganismos nocivos à saúde ou mesmo a presença desse tipo de carne entre os alimentos incriminados em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos tem sido relatada por diversos autores (SOTO *et al.*, 2001; HADJICHRISTODOULOU *et al.*, 1999)

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO PESCADO

Além da manipulação, outros fatores podem influenciar os teores e tipos de compostos indicadores de degradação do pescado e que são identificados por ensaios físico-químicos, tais como temperatura de armazenamento (FRASER; PITTS; DYER, 1968), espécie (CASTELL; NEAL; SMITH, 1971; HILTZ *et al.* 1969; JONES; MURRAY; LIVINGSTONE, 1964; VALENCIA; SANAHUJA, 1968), estações ou época do ano (HUGHES, 1959; ITO *et al.*, 1969; WATANABE, 1971), tempo *post-mortem* (HUGHES, 1959; THOMPSON, 1967) e a maturidade do peixe (HUGHES, 1959).

A decomposição do pescado, assim que se inicia, resulta na produção de substâncias indesejáveis, em sua maioria não encontradas no tecido muscular vivo (MENDES, 1974). A constatação da presença e a quantificação de algumas dessas substâncias podem indicar o frescor do pescado, sendo de eficiência comprovada por diversos autores há várias décadas (BOTTA; LAUDER; JEWER, 1984, HILLING *et al.*, 1960).

Dentre os aspectos bioquímicos que afetam a qualidade do pescado tem-se o baixo conteúdo de glicogênio que, após a morte, origina pequena quantidade de ácido láctico resultando em pH variável de 5,6 a 6,4 (OGAWA; MAIA, 1999). Segundo NUNES; BATISTA; CAMPOS (1992), os valores de pH sofrem um aumento gradual durante a estocagem do pescado e valores mais elevados são comuns em espécies com baixo teor lipídico. Estes níveis de pH não são baixos o suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano.

LOUGOVOIS *et al.* (2008) consideram o pH um indicador da degradação do músculo de polvo, relatando que no início da estocagem este sofre uma queda devido ao gasto energético no *post mortem*, que envolve a hidrólise do ATP e a glicólise. No polvo, estas reações ocorrem mais acentuadamente nos

braços devido ao maior teor de glicogênio depositado nestes músculos propulsores, resultando em menor pH comparativamente ao manto (BALDWIN; ENGLAND, 1980).

A atividade enzimática nos tecidos dos peixes é elevada, resultando num período de *rigor mortis* curto, e rápido processo de autólise, ou seja, decomposição do músculo por via enzimática. A hidrólise de proteínas por enzimas autolíticas (proteínases) será predominante se o peixe não for eviscerado logo após a colheita (RAY, 1996). Tal fato foi comprovado por MENDEZ (1974) que observou uma deterioração mais lenta no peixe eviscerado quando comparado ao não eviscerado, recomendando esta prática antes do armazenamento no gelo.

Em estudo realizado por LOUGOVOIS *et al.* (2008) foi observado que nos primeiros sete dias de estocagem em gelo, a deterioração do polvo aconteceu principalmente devido a reações autolíticas que à ação de microrganismos deteriorantes presentes no manto e braços $<10^5$ Unidades Formadoras de Colônias/g (UFC/g) e que somente a partir deste período a população microbiana aumentou, corroborando com a deterioração mais efetivamente.

A determinação do nitrogênio das bases voláteis totais (N-BVT) é rotineiramente utilizada para estimar o grau de decomposição do pescado resfriado, quantificando as aminas (principalmente trimetilamina) e amônia, resultantes da ação das próprias enzimas tissulares e do desenvolvimento bacteriano.

Quando as boas práticas de manipulação não são respeitadas, além da degradação de nutrientes (proteínas e ácidos graxos polinsaturados), compostos reconhecidamente tóxicos são formados (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996), dentre eles o aldeído malônico ou malonaldeído (MAL), principal produto secundário da oxidação lipídica e que tem sido associado a processos cancerígenos e mutagênicos (PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005).

Na avaliação do MAL pode-se quantificar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para o qual não há padrões estabelecidos na legislação nacional. São utilizados normalmente indicações da literatura científica que correlacionam valores de TBARS acima de 1 - 2mg MAL/kg ao pescado com odor e sabor característicos de ranço e que, portanto, será

rejeitado sensorialmente (BONNELL, 1994; GRAY; PEARSON, 1987). KELLEHER; HULTIN; WILHELM (1994) correlacionaram teores de até 0,43 mg de MAL/kg a odor ainda suave no filé de cavala e de 0,43 a 0,72 mg de MAL/kg ao odor de ranço.

CONTAMINANTES QUÍMICOS EM PESCADO

Um terceiro fator a se considerar na caracterização da qualidade sanitária do pescado é a contaminação por produtos químicos, ainda que este fator, como causa de doenças provocadas pelo consumo de pescado, figure muito pouco nas estatísticas oficiais.

A principal via de intoxicação de seres humanos por poluentes orgânicos e inorgânicos, associados a sistemas aquáticos, é o consumo de pescado contaminado (MACKAY; CLARK, 1991). Os riscos à saúde associados à ingestão de pescado contaminado chegam a ser de 20 a 40 vezes mais elevados do que o resultado de ingestão de água contaminada (FORAN, 1990). Isto se deve ao fato dos organismos aquáticos serem capazes de reter os elementos em até 10 vezes as concentrações observadas no meio ambiente (GUIMARÃES; LACERDA; TEIXEIRA, 1982). Dessa forma, o pescado pode ser considerado como um indicativo da estimativa de poluição por metais e potencial risco para o consumidor (DUGO *et al.*, 2006, YILMAZ *et al.*, 2006)

Um levantamento, realizado pela CETESB em 2001, no sistema estuarino de Santos e São Vicente, SP, em 36 pontos considerados principais fontes de poluição, constataram a presença de vários metais em diferentes amostras de água, sedimento e organismos (Tabela 2).

Segundo MÁRSICO *et al.* (1999) é crescente a quantidade de publicações, relatando a presença elevada de poluentes em espécies predadoras do topo de cadeia trófica, como resultado da biomagnificação, ou seja, da acumulação sucessiva e progressiva dos poluentes nos diferentes níveis da cadeia alimentar, uma vez que não são eliminados do organismo animal. Estes autores ressaltam que tal contaminação resulta também da bioacumulação, quando as concentrações crescentes dos poluentes se acumulam nos tecidos ao longo da vida de um indivíduo. Neste caso, para uma mesma espécie, um organismo de maior porte (ou mais idoso) terá um teor

mais elevado de determinado produto químico do que um de menor porte (ou mais jovem).

Tabela 2 Concentrações máximas e mínimas de metais em diferentes locais de amostragem no sistema estuarino de Santos e São Vicente

Poluente	Águas (mg/L)	Sedimentos ($\mu\text{g/g}$)	Organismos ($\mu\text{g/g}^*$)
Arsênio	não analisado	0,1 a 18	não analisado
Cádmio	<0,001 a 0,007	< 0,05 a 6,0	<0,01 a 0,3
Chumbo	< 0,002 a 0,020	1,6 a 567	< 0,05 a 1,3
Mercúrio	< 0,0001	< 0,05 a 0,97	0,01 a 0,34
Zinco	< 0,01 a 0,08	5,2 a 2600	0,0 a 560
Cromo	< 0,05	1,5 a 106	< 0,05 a 1,4
Níquel	< 0,01 a 0,28	0,97 a 57	<0,01 a 15
Cobre	<0,003 a 0,03	0,41 a 100	< 0,02 a 39,6

* em peso úmido

Adaptado de CETESB 2001

A presença de contaminantes químicos no pescado torna-se, portanto, dependente da localização geográfica, da espécie e do tamanho do indivíduo, do padrão alimentar da espécie, da solubilidade dos diferentes compostos químicos e da sua persistência no ambiente.

No caso da costa brasileira há relatos de contaminação de várias regiões por elementos tóxicos, resultado de elevadas taxas de emissão por atividades industriais e urbanas, concentradas nas bacias de drenagens e na região costeira, desde a década de 1980 (JOYEUX; CAMPANHA-FILHO; JESUS, 2004, KEHRIG *et al.*, 2002, LACERDA *et al.*, 2000, LIMA JUNIOR *et al.*, 2002, MACHADO *et al.*, 2002, MARINS *et al.*, 2004, MONTEIROS-NETO; ITAVO; MORAES, 2003, MORALES-AIZPURUA *et al.*, 1999, SILVA *et al.*, 2001, TARLEY *et al.*, 2001).

Os contaminantes químicos, passíveis de serem encontrados em produtos do mar, e que apresentam risco, são os metais como o arsênio,

chumbo, mercúrio, antimônio, selênio e compostos inorgânicos como sulfitos – usados na conservação do camarão, e compostos orgânicos tais como bifenilas policloradas, dioxinas e inseticidas como os organoclorados (AHMED, 1991).

Segundo BRAGA (2002) os elementos tóxicos mais avaliados são mercúrio, cádmio, chumbo, arsênio e estanho, por apresentarem efeitos danosos mais freqüentes sobre a biota.

Arsênio (As)

Segundo LIU *et al.* (2006) na classificação de abundância dos minerais, o As encontra-se em vigésimo lugar na crosta terrestre, em 14º lugar na água do mar e 12º lugar no corpo humano.

O As está presente em mais de 200 espécies minerais, sendo a mais comum a arsenopirita. Estima-se que um terço do fluxo atmosférico de arsênio seja de origem natural, sendo a atividade vulcânica e intempéries em solo as que mais contribuem para sua disseminação (BRISBIN; BHYMER; CARUSO, 2002, GOYER; CLARKSON, 2001, LIAO; LING, 2003).

A Tabela 3 apresenta as concentrações de arsênio em diversos ambientes (WHO, 2001).

Tabela 3 – Concentrações de arsênio no meio ambiente

Meio ambiente	Concentrações
Zonas rurais	0,02 a 4 ng/m ³
Zonas urbanas	3 a 200 ng/m ³
Proximidades de indústrias	>1000 ng/m ³
Alto mar	1-2 µg/litro
Rios e lagos	10 µg/litro
Água freática	1-2 µg/litro
Água freática de zonas com rochas vulcânicas	3 mg/litro
Sedimentos	5 a 3000 mg/kg

Adaptado de WHO, 2001

Fontes antropogênicas de As incluem atividades de mineração, uso de praguicidas, conservantes de madeira, geração de eletricidade pela queima de carvão e refinaria de petróleo, fundições de cobre, zinco e chumbo, fabricação de vidros e semicondutores, entre outros processos químicos. Estas atividades permitem que o metal seja despejado no ambiente aquático, principalmente por processos agrícolas e industriais, podendo ocorrer em formas químicas diferentes, o que altera sua toxicidade. (HEINRICH-RAMM; MINDT-PRUFERT; SZADKOWSKI, 2002, LEIST; CASEY; CARID, 2000, PIZARRO *et al.*, 2003, SLOTH; JULSHAMN; LUNDEBEY, 2005, TRIPATHI; RAGHUNATH; KISHNAMOORTHY, 1997).

O As não é considerado um elemento essencial, como, por exemplo, o são o zinco, cobre e manganês, constituindo-se em objeto de preocupação dada a sua importância toxicológica (MÖLLERKE *et al.*, 2003).

A absorção pode ocorrer por inalação, que depende da deposição do arsênio nas vias aéreas (intimamente ligado ao tamanho da partícula) e da solubilidade do arsênio. A absorção pode também se dar pela via dérmica em contato com trióxido de arsênio. Ainda pode ser absorvido a partir da água, bebidas ou ainda por inalação com posterior atividade mucociliar. De especial relevância para este trabalho é a ingestão a partir de alimentos. Porém MANDAL; SUZUKI, (2002) salientam que a biodisponibilidade do arsênio inorgânico ingerido depende da solubilidade dos compostos arseniais, da presença de constituintes do alimento e de outros nutrientes presentes no trato gastrointestinal, além do alimento em si.

Braga (2002) considera que a exposição humana não-ocupacional a esse metal ocorre pela ingestão de alimentos e de água contaminados que podem contribuir com até 90% do arsênio total ingerido nas formas inorgânicas trivalentes e pentavalentes. Já o FDA (1993) considera que 90% da exposição humana ao arsênio são acarretadas pela ingestão de peixes e outros frutos do mar.

Em diversas partes do mundo, como em Bangladesh e regiões da Argentina, Chile e México, os lençóis freáticos possuem arsênio inorgânico de origem geológica (WHO, 2001). Em organismos marinhos e algumas espécies terrestres o As é encontrado principalmente na forma dos compostos orgânicos

arsenobetaína, arsenocolina, sais de tetrametilarsênio, os arsenoaçúcares e lipídios arsêniais.

Nos organismos marinhos os resíduos de As oscilam entre teores inferiores a 1mg/kg e superiores a 100 mg/kg, predominantemente na forma orgânica, como arsenoaçúcares em macroalgas e arsenobetaína em peixes e invertebrados. A bioacumulação destes compostos nestes organismos tem sua origem na biogênese a partir do As inorgânico.

Em organismos marinhos foram relatadas mais de 32 espécies diferentes de arsênio orgânico e inorgânico (HIRATA e TOSHIMITSU, 2005).

O efeito tóxico deste elemento está relacionado à forma em que se encontra, sendo seus compostos orgânicos reconhecidamente menos tóxicos que os inorgânicos e destes, os compostos trivalentes são os mais tóxicos (LUNDE, 1970).

Segundo KOH; KNON; PAK (2005) a toxicidade dos compostos arseniais diminui na seguinte sequência: $(As^{-3}) >$ derivados orgânicos da arsina $>$ arsênio inorgânico $(As^{+3}) >$ arsênio orgânico $(As^{+3}) >$ arsênio inorgânico $(As^{+5}) >$ compostos orgânicos de arsênio pentavalentes $(As^{+5}) >$ compostos de arsênio e arsênio elementar. Estes autores ressaltam que de acordo com esta escala o As (III) é cerca de 10 vezes mais tóxico que o As (V).

Muitas espécies de arsênio têm seu metabolismo caracterizado por dois tipos de reações principais, a redução de arsênio pentavalente à trivalente e a reação de metilação oxidativa, processo este que facilita sua excreção principalmente pelos rins.

O arsênio trivalente interage com proteínas e enzimas afetando suas ações, como por exemplo, as das enzimas responsáveis pela glucólise, ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou glicogênese. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que na mitocôndria o As^{5-} seja reduzido a As^{3-} , inibindo a respiração celular e diminuindo a fosforilação oxidativa (GOYER; CLARKSON, 2001, WHO, 1981).

Os sinais e sintomas observados na intoxicação causada pelo As diferem entre indivíduos, grupos populacionais e áreas geográficas, dependendo da via de exposição, da forma química do As ingerido, da dose, freqüência e tempo de absorção, podendo variar desde lesões dérmicas tais como queratoses e hiperqueratoses, problemas respiratórios, doenças cardiovasculares, do sistema gastrointestinal e circulatório periférico, distúrbios

neurológicos até vários tipos de câncer (WHO, 2001). LIU *et al.* (2006) relatam que no sudeste de Taiwan as altas concentrações de arsênio nas águas de poços profundos causam doenças vasculares (Doença do pé preto) nos habitantes da região.

Ainda neste contexto LIN; HUANG; WANG (1998) determinaram a prevalência de doenças vasculares e carcinogênicas no sudoeste da costa de Taiwan ocasionadas por arsênio e seus compostos na seguinte ordem de importância: ácido monometilarsênico (III) > As (III) > As (V) > ácido monometilarsênico (V) = ácido dimetilarsênico (V).

Segundo GOYER; CLARKSON (2001) quando são observados níveis urinários de As na concentração de 0,8 mg/L os sintomas são dermatites, faringite e conjuntivite. Contudo se estas concentrações forem acima de 2mg/L os sintomas são de anemia severa. Os autores relatam que a DL₅₀ para compostos inorgânicos de arsênio varia entre 10 a 300 mg/kg, sendo os compostos hidrossolúveis mais tóxicos que os menos solúveis. Já para o trióxido de arsênio (As₂O₃) a DL₅₀ varia de 26 a 47 mg/kg em camundongos e 15 mg/kg em ratos. A arsina (AsH₃) pode ser letal na concentração de 250 ppm/30 minutos e pode provocar intoxicações numa concentração de 3 a 10 ppm/h.

A maioria dos métodos analíticos quantifica o As total (As-t) que pode ser encontrado em alimentos em várias formas químicas, que diferem em grau de toxicidade e patologias a elas associadas (DENOBILE,2006)

Cádmio (Cd)

O Cd é um metal relativamente raro e não é encontrado em estado puro na natureza. Está associado principalmente a sulfetos em minerais de zinco, chumbo e cobre. É distribuído pela crosta terrestre com concentração média de 0,1mg/kg sendo que em rochas sedimentares e fosfatos marinhos, podem chegar a 15 mg. É encontrado em altas concentrações próximo a áreas de mineração de zinco, cobre e chumbo (WHO, 1992).

Na Tabela 4 encontram-se as concentrações de Cd em diferentes ambientes.

Tabela 4 Concentrações de cádmio no meio ambiente

Meio ambiente	Concentrações de Cd
Atmosfera	0,01 a 90 ng/m ³
Crosta terrestre	0,01 a 1 ppm
Solos vulcânicos	4,5 ppm
Rochas sedimentares	Até 15 ppm
Fosfatos marinhos	Aproximadamente 1 ppm
Sedimentos marinhos	0,1 a 1 ppm
Água do mar	0,02 a 0,1 µ/L na água de profundidade
	<0,5 ng/L na água de superfície
Água doce	0,01 a 100mg/L
Gelo	5pg/g (ártico) e 0,3 pg/g antártico

Adaptado de CARDOSO; CHASIN (2001)

As principais fontes naturais de contaminação ambiental são as rochas sedimentares e fosfáticas marinhas, atividades vulcânicas, erosão e incêndios florestais. Já as antropogênicas são a mineração, os produtos industrializados que utilizam Cd ou que utilizam produtos à base deste elemento tais como fertilizantes fosfatados, cimento, combustíveis fósseis e ligas de Zn, Pb e Co. Considera-se que o cádmio difunde-se amplamente nos ecossistemas costeiros estudados da Baixada Santista, concentrando-se próximo as fontes geradoras do poluente (CETESB (2001).

O Cd e seus compostos apresentam baixa pressão de vapor, porém podem ocorrer na atmosfera como material particulado suspenso passível de deposição por gravimetria ou por precipitação. Este elemento possui significativa mobilidade na água quando ocorre como íon hidratado ou

relativamente imóvel quando complexado com outras substâncias orgânicas e inorgânicas. O mesmo pode acontecer no solo, porém apresentará maior disponibilidade quando o pH local for baixo (ASTDR, 2008). A forma encontrada é fundamental para a sua disponibilidade e remoção, pois os compostos sulfurosos, carbonatos e óxidos deste elemento são praticamente insolúveis em água, porém em meio natural estes compostos podem se converter em sais hidrossolúveis, como os sulfatos, nitratos e haletos.

Os fatores ambientais, tais como altas temperaturas e salinidade aumentam a captação e os efeitos tóxicos do cádmio nos organismos aquáticos. Já um aumento na concentração de matéria orgânica na água diminui a disponibilidade do cádmio para os seres vivos (WHO, 1992).

O Cd é retido no fígado e rins dos animais que se alimentam de plantas aquáticas que concentram este metal. As bactérias têm papel importante na redução deste elemento no meio aquoso. Nos peixes encontram-se principalmente nas guelras, fígado, rins e parede intestinal. A retenção desse metal em tecidos orgânicos está relacionada com a formação da cádmio-metalotioneína, um complexo “cádmio – proteína” de baixo peso molecular. A síntese de metalotioneína é induzida por metais essenciais cobre e zinco no fígado e nos rins, mas também pode ser induzida patogenicamente, pelo cádmio, já que este pode substituir os metais fisiologicamente corretos (cobre e zinco) ou compartilhar as proteínas com eles (MANTOVANI, 2005).

Há evidências que a biota marinha contém quantidade de Cd significativamente superior aos seus correspondentes terrestres ou de água doce, e que a maior concentração por indivíduo da mesma espécie coletados em várias localidades são associados com a proximidade de áreas urbanas ou industriais, ou pontos de descarte de lixo contendo este elemento (ATSDR, 2008).

A exposição humana ao Cd pode resultar do consumo de alimentos, H₂O, ingestão acidental de solo ou poeiras contaminadas, da inalação de partículas, pelo hábito de fumar ou por atividades ocupacionais que envolvem exposição à poeira ou fumos de Cd. A principal fonte de exposição ao Cd para indivíduos não fumantes e não ocupacionalmente expostos são os alimentos, sendo pequena a proporção de cádmio absorvida por outras vias.

As concentrações de cádmio nos alimentos são maiores nos vegetais, decrescendo em carnes e pescados e, finalmente, em ovos e produtos lácteos (SHERLOCK, 1984, *apud* ROMAN *et al*, 2002). Moluscos e crustáceos apresentam níveis considerados elevados de cádmio, superiores a 1,0 mg/kg, mesmo quando procedentes de águas consideradas não poluídas por metais pesados (ROMAN *et al.*, 2002).

Segundo DORNELLES; LAILSON-BRITO; MALM (2007), a bioacumulação de cádmio por cefalópodes se deve às características fisiológicas próprias destes moluscos como o elevado consumo de alimento, a alta eficiência digestiva aliados ao alto grau de retenção de cádmio, pela associação deste metal com proteínas citoplasmáticas.

Os efeitos agudos por inalação desse metal e os efeitos renais crônicos são os mais importantes em humanos. Ele se acumula nos ossos e outros órgãos, porém as concentrações mais altas encontram-se nos rins, onde aumenta com a idade relativamente à carga total de cádmio corpóreo.

A vida média biológica do cádmio é superior a dez anos, com valores acima de 80% de carga corpórea concentrados nos rins, fígado e ossos. Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer mesmo após a redução ou ao final da exposição ao cádmio. Uma exposição crônica a este metal de $50\mu\text{g}/\text{m}^3$, valor 10 vezes superior ao novo limite permitido pela *Occupational Safety Health Administration* – OSHA por dez anos pode causar disfunção renal com lesão tubular proximal em até 4% dos casos. (LEWIS *et al*, 1972, *apud* ROMAN *et al.*, 2002; ATSDR, 2008).

Os efeitos no homem são diversos, tais como edema pulmonar, gastroenterite aguda e disfunção renal como diminuição da filtração ou excreção de proteínas de baixo peso molecular na urina. Nos rins, ele ainda altera o metabolismo do cálcio, originando cálculos renais e da vitamina D, podendo ocasionar osteoporose e/ou osteomalácia (UEMURA, 2000). É ainda um agente carcinogênico (WAALKES, 2000).

Chumbo (Pb)

Este metal ocorre naturalmente em rochas magmáticas e outras, em concentrações que variam de 0,1 µg/g em rochas ultramarinas e calcários a 40 µg/g em rochas magmáticas ácidas e sedimentos argilosos (CETESB, 1997).

As principais fontes naturais deste elemento são o intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (WHO, 1989). No ambiente o chumbo encontra-se na forma de metais de chumbo, íons inorgânicos, sais e compostos órgano-metálicos (CODEX ALIMENTÁRIUS, 2004).

O Pb é um dos metais mais antigos usados pelo homem e muitas das aplicações primitivas têm persistido através dos séculos. Embora a sua presença na crosta terrestre seja de apenas 0,002%, há jazidas em várias partes da terra, que são exploradas com teor de 3%. Raramente é encontrado no seu estado natural, mas sim, em combinações com outros elementos, sendo os mais importantes os minérios galena (PbS), cerusita (PbCO₃), anglesita (PbSO₄) piromorfita, vanadinita, crocoíta e wulfenita (SILVA, 2001). Sua ocorrência é maior quando associado a outros minerais, em especial o zinco, sendo esta combinação responsável por 70% do total de Pb primário.

As fontes antropogênicas de Pb estão associadas à fabricação de acumuladores, catalisadores na fabricação de espumas de poliuretano, pinturas navais, agentes biocidas contra as bactérias Gram positivas, proteção de madeira contra ataque de brocas e fungos marinhos, inibidores da corrosão do aço e blindagem contra radiação. Está presente ainda em indústria de extração, beneficiamento e fundição de metais, ocorrendo como efluente de indústrias de refino de petróleo, como catalisador, anticorrosivo ou dispersante (CETESB, 2001).

Outra importante fonte antropogênica, até a década de 1990, foi a utilização de chumbo (Pb (C₂H₅)₄) como antidetonante na gasolina. A partir daí alguns países limitaram o uso do chumbo diminuindo a quantidade das emissões (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

O aumento e acúmulo dos níveis de Pb em organismos aquáticos, na água e em sedimentos são influenciados por vários fatores ambientais como a temperatura, salinidade e pH, e também pelos conteúdos de ácido húmico e algínico.

Na contaminação de sistemas aquáticos quase todo o Pb encontra-se limitado ao sedimento, e apenas uma pequena fração encontra-se dissolvida na água intersticial entre as partículas do sedimento. Os níveis de Pb em organismos marinhos só alcançam equilíbrio após algumas semanas de exposição, acumulando-se principalmente nas guelras, fígado, rins e ossos, podendo ainda estar presente na superfície das ovas de pescados, porém não se acumulam no embrião. Em contraste com o Pb inorgânico o chumbo tetraetila é rapidamente absorvido pelos peixes, bem como é rapidamente eliminado ao término da exposição (WHO, 1989).

Em animais terrestres existe uma correlação positiva entre os níveis de Pb na dieta e sua concentração nos tecidos e, em geral, a distribuição deste elemento nos diferentes tecidos está relacionada com o metabolismo do cálcio. Contudo, especificamente quando presente na forma orgânica de chumbo tetravalente Pb, que é geralmente mais tóxica que a divalente, sua distribuição nos tecidos pode não estar relacionada ao metabolismo do cálcio.

Em função do uso de chumbo tetraetila como antidetonante na gasolina, até recentemente observava-se uma correlação entre a proximidade de auto-estradas e a concentração de chumbo encontrada em plantas e animais destes locais. Quanto mais distantes de rodovias menor era a concentração de Pb nestes organismos. Atualmente o uso deste antidetonante foi proibido na maioria dos países. Observa-se também que os seres terrestres e aquáticos apresentam maior concentração de Pb quando próximos a atividades industriais que utilizam este metal.

O Pb na forma de sal tem ação tóxica aguda, em invertebrados aquáticos de água doce, em concentrações que variam de 0,1 a 40 mg/L, enquanto que para organismos marinhos as concentrações variam de 2,5 a >500 mg/L, sendo a concentração letal -CL₅₀ em 96 horas de 1 a 27 mg/L em água doce e entre 440 a 540 mg/L em água salgada. Os altos valores da CL₅₀ em água salgada podem ser explicados pela baixa solubilidade dos sais de chumbo neste meio e devido a presença de outros sais que facilitam a precipitação reduzindo a sua disponibilidade (WHO, 1989).

Entretanto, as formas orgânicas do Pb são as que apresentam maior toxicidade para peixes, sendo, mais suscetíveis, os estágios jovens comparativamente aos adultos ou ovas. Os sintomas típicos da toxicidade por

Pb são deformidade espinhal e enegrecimento da região caudal. A faixa de concentração máxima tolerável de Pb inorgânico para diferentes organismos e ambientes é de 0,04 mg/L a 0,198 mg/L (WHO, 1989).

A população em geral expõe-se ao Pb através da ingestão de alimentos, água e inalação. Porém, segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2004), uma alta exposição ao Pb ocorre principalmente em situações ocupacionais, devendo-se analisar estas duas categorias separadamente.

A exposição pelo chumbo pode ocorrer através da placenta e os níveis no sangue da mãe e do neonato são similares, bem como sua distribuição nos tecidos.

O Pb é distribuído de forma pouco homogênea entre tecidos moles, como o fígado e os rins e rígidos, como os ossos e os dentes, sendo que se armazena de forma mais estável nos ossos, com uma meia vida biológica de 27 anos (WHO, 1995; ATSDR, 2008). Segundo SIQUEIRA, 2003, o Pb tende a se armazenar entre 94 a 95% nos ossos. Já nos tecidos moles a concentração de chumbo tende a diminuir com a idade. As concentrações de Pb no sangue são de extrema importância na avaliação de exposições a este metal, tanto para diagnósticos de intoxicação como na avaliação de condições de risco em ambientes laborais ou de exposição ambiental ou alimentar.

O chumbo é biotransformado a partir de reações reversíveis, formando complexos com amino-ácidos e tióis não protéicos e ligações protéicas (ATSDR, 2008). A eliminação do chumbo do organismo é feita pela urina e fezes, neste caso a partir da excreção biliar, sendo que cerca de 60% do chumbo absorvido é armazenado no organismo e o restante é excretado pelas vias mencionadas (WHO, 1995).

O chumbo exerce ação tóxica em diversos órgãos, decorrentes de ligações a componentes celulares que apresentem afinidade por grupamentos SH, H₃PO₃, NH₂, OH, acarretando alterações em funções bioquímicas com comprometimento dos sistemas hematopoiético, renal e sistema nervoso central e periférico, resultando em manifestações clínicas (WHO, 1995).

O sistema nervoso é particularmente sensível à intoxicação por chumbo que pode causar prejuízos no desenvolvimento neurocomportamental de crianças. Tem como sintomas iniciais letargia, vômito, irritabilidade, perda de

apetite e tontura, progredindo para a ataxia e perda de consciência, que pode levar ao coma e à morte. A toxicodinâmica deste metal é justificada por sua interação em processos bioquímicos fundamentais, como a capacidade de inibir ou mimetizar a ação do cálcio ou a de interagir com proteínas (ATSDR, 2008).

O chumbo diminui a produção do grupo heme, ao inibir as enzimas ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), coproporfirinogênio oxidase e ferroquelatase. Esta inibição leva ao aumento urinário de porfirinas, coproporfirinas e ácido δ -aminolevulínico (ALA); aumento do ALA plasmático e sanguíneo; e aumento da protoporfirina eritrocitária livre e ligada ao zinco (zincoprotoporfirina - ZPP). O resultado desta interação é a anemia (ATSDR, 2008).

O chumbo afeta ainda o fígado, rins e trato respiratório (MAVROPOULOS, 1999).

Mercúrio (Hg)

O Hg ocorre normalmente, em pequenas concentrações, na hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. Raramente é encontrado como elemento livre na natureza (AZEVEDO; NASCIMENTO; CHASIN, 2003). Contudo, em locais de fraturas geológicas profundas, os processos de difusão e mobilização acontecem intensamente sendo estes locais chamados de cinturões de mercúrio e neles se localizando os depósitos extraíveis deste metal. O mercúrio é introduzido no meio ambiente através de fontes geoquímicas e antropogênicas, sendo um poluente ambiental bem conhecido (YANG; MESTER; STURGEON, 2003).

As fontes naturais de mercúrio são a desgaseificação natural da crosta terrestre, que lança 25 mil a 150 mil toneladas de Hg/ano na atmosfera, e a erosão do solo (SCHROEDER; MUNTHE, 1998). As fontes antropogênicas são a mineração (HYLANDER; MEILI, 2003, CAMARGO, 2002), utilização de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural bruto) (CAMARGO, 2002, LIN; PEHKONEN, 1999), a fabricação de lâmpadas, artigos médicos, equipamentos elétricos, como termostatos, e baterias, amálgamas dentários, em processos industriais como na produção de cloreto e soda cáustica, na

obtenção de metais preciosos e incineração, entre outros (LEVINE *et al.*, 2005, MOORE, 2002).

O Hg resiste aos processos naturais de degradação podendo permanecer inalterado por muitos anos. Pode sofrer bioacumulação, quando o Hg inorgânico sofre o processo de alquilação e aumento da lipossolubilidade, podendo ser transportado pela membrana celular, ou ainda existe a possibilidade do metilmercúrio e das formas inorgânicas deste metal, menos o elementar, reagir com substâncias intracelulares.

Já a biomagnificação do Hg se dá pela capacidade de se acumular nos organismos ao longo da cadeia alimentar, ou seja, quando um organismo contaminado ocupa um nível inferior na cadeia trófica, seu predador absorverá aquele Hg orgânico, mas terá concentrações relativamente aumentadas (AZEVEDO, 2003). Este processo foi descrito por BOENING, 2000, ao constatar que em locais onde os peixes vegetarianos apresentavam 6,64 ppm de Hg, os peixes que se alimentavam de invertebrados apresentavam 12,4 ppm, os onívoros 26,6, e os piscívoros 40,2 ppm.

O Hg é o único metal que se encontra no estado líquido à temperatura ambiente, e pode se apresentar em três estados de oxidação: zero (Hg^0) quando ele existe na forma metálica ou como vapor e nos estados mercurioso e mercúrico, que são os de maior oxidação, onde o átomo de mercúrio perde um (Hg^+) e dois elétrons (Hg^{2+}), respectivamente. Os vapores de mercúrio são muito mais perigosos que o metal na forma líquida. O Hg pode formar vários compostos orgânicos estáveis pela ligação a um ou dois átomos de carbono. Os diversos estados de oxidação e espécie orgânica apresentam toxicocinética e toxicodinâmica específicos (GOYER; CLARKSON, 2001, YANG; MESTER; STURGEON, 2003).

Segundo GALVÃO; COREY, (1987 *apud*, AZEVEDO, 2003) as populações de alto risco de intoxicação por Hg são trabalhadores expostos ocupacionalmente, populações vizinhas a fontes de poluição, ou de regiões contaminadas por Hg, principalmente a água, que consomem fauna regional, pessoas que se alimentam preferencialmente de pescados e outros produtos aquáticos, pessoas que utilizam por longo tempo medicamento mercuriais, gestantes e crianças pequenas.

A toxicinética do Hg está intimamente relacionada à espécie química do metal sendo que as vias respiratória, oral e dérmica são as principais vias de introdução. Uma vez no sangue distribuem-se no cérebro, rins, fígado, medula óssea, baço, parte superior do trato respiratório, mucosa bucal, parede intestinal, pele, coração, músculos esqueléticos, pulmão, placenta, feto e leite materno (AZEVEDO, 2003).

A eliminação do Hg se dá pelos rins, fígado (via bile), mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, pele e leite (SWIFT, 1997).

O consumo prolongado de peixe é o maior determinante da exposição ao metilmercúrio e, conseqüentemente, dos níveis de mercúrio total no sangue. Em comunidades onde o consumo diário é de aproximadamente 200 µgHg/dia, por longo tempo, os níveis sanguíneos serão de cerca de 200 µg/L, e no cabelo 50 µg/g. Os valores de referência de mercúrio em populações não expostas ocupacionalmente são, respectivamente, 8 µg/L no sangue total, 2 µg/g no cabelo, 4 µg/L na urina e 10 µg/L peso úmido na placenta (SALGADO, 2003 apud DENOBILE, 2006).

O mecanismo de ação tóxica do Hg se dá através da desnaturação de proteínas, inativação de enzimas, alteração da atividade celular (pela indução de genes específicos ou pela transmissão ou influência de sinais de controle da expressão gênica), alteração de membranas celulares com prejuízo de suas funções causando a morte celular e conseqüentemente a do tecido (KOROPATNIK; ZALUPS, 1997).

Os sintomas da intoxicação por Hg em humanos variam de acordo com a dose e a forma do metal. Assim, nos casos de exposição aguda observam-se febre, fadiga, tremores, edema pulmonar, dispnéia, dores torácicas, instabilidade emocional, delírios e alucinações, perda de memória, cefaléia, perda de sensibilidade, ulcerações no aparelho digestivo, inchaço e necrose central do fígado, degeneração do miocárdio, entre outras. Nas intoxicações crônicas ou de longo prazo os sintomas são: mudança comportamental, reflexos alterados, dificuldades auditivas, visuais e da fala, tremores, nefropatias, diarreia muco sanguinolenta, estomatite, hemorragia pulmonar, pneumonia, enfisema, anemia e linfocitose, hepatite, alterações menstruais, dificuldades reprodutivas, mutações gênicas e cromossômicas, entre outras.

É sabido que os organismos aquáticos, principalmente os carnívoros do topo da cadeia trófica, acumulam grande quantidade de poluentes persistentes, o que explica a grande importância destes organismos em testes de toxicidade (CETESB, 2001).

Neste sentido, segundo DURAL; GOKSU; OZAK, 2007 e RIBA *et al.*, 2005 é de extrema importância para a saúde humana a determinação da presença de metais pesados em organismos aquáticos que são utilizados como alimentos.

FERREIRA; MACHADO; ZALMON (2005), em estudo realizado em praias do Estado do Rio de Janeiro, detectaram as seguintes concentrações médias de elementos tóxicos em ostra (*Ostrea equestris*): Cd 0,8; Cr 0,4; Cu 58; Fe 249; Mn 11; Ni 0,55; Pb 0,13 e Zn 1131 µg/g de peso seco.

Estudando outras espécies marinhas, CARVALHO *et al.* (2000) observaram que Cd, Mn, Ni e Pb apresentaram concentrações inferiores ao limite de detecção do método utilizado em suas determinações, enquanto Cu, Zn, Cr, Fe, e Al apresentaram concentrações inferiores ao máximo permitido para consumo humano pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Os polvos alimentam-se de outros cefalópodes, crustáceos, bivalves e peixes, o que lhes confere grande potencial como organismo bioindicador, provendo informações qualitativas sobre a contaminação do ambiente (SEIXAS; PINHEIRO; REIS, 2002).

A Portaria nº 685 do Ministério da Saúde, de 27 de agosto de 1998, aprovou o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Esta portaria determina os seguintes limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em alimentos: 1,0 mg/kg para o arsênio; 2,0 mg/kg para o chumbo; 1,0 mg/kg para o cádmio e 0,5 mg/kg para o mercúrio para a maioria das espécies e de 1,0 mg/kg para espécies predadoras (ANVISA, 1998).

O FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos estabelece o valor máximo permitido de 1 µg/g, peso úmido, para o mercúrio total em peixe. No Japão, peixes contendo concentrações de mercúrio total maiores que 0,4 µg/g, peso úmido, é considerado impróprio para o consumo. Na Europa, o limite máximo permitido para mercúrio em produtos da pesca,

proposto pela Comissão Europeia 93/351 de 19 de maio de 1993 é de 0,5 µg/g, peso úmido, o qual aumenta para 1,0 µg/g, peso úmido, para partes ou órgãos de algumas espécies, que por razões fisiológicas, concentram mais facilmente mercúrio em seus tecidos (STORELLI e MARCOTRIGIANO, 2004, apud DENOBILO, 2006).

A ingestão diária máxima aceitável de As, segundo a FAO/WHO é de 2 µgAs/kg. Este parâmetro é obtido dividindo-se o NOAEL (nível no qual não se observa nenhum efeito) ou o LOAEL (menor nível no qual se observa um efeito adverso) por fatores de incerteza. A dose de referência DRf para o As é de 0,3 µg/kg/dia, preconizada pelo Food and Drug Administration (FDA), que representa a estimativa do nível de exposição diária sem risco apreciável de efeitos deletérios (SALGADO, 2003, apud DENOBILO, 2006).

Devido aos riscos à saúde associados à exposição ao mercúrio a Agência de Proteção Ambiental (EPA), nos Estados Unidos, recomenda um valor máximo permitido de 0,1 µg/kg de peso corpóreo/dia (LEVENSON e AXELRAD, 2006, apud DENOBILO).

O Comitê de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO) recomenda uma Ingestão Semanal Tolerável Provisional de Hg total de 5 µg/kg de peso corpóreo (WHO, 1978) que equivale a 300µg de Hg total por pessoa (peso médio de 60kg), onde não mais de 1,6 µg/kg de peso corpóreo/semana podem ser de metilmercúrio. Levando-se em consideração os resultados de ensaios de exposição pré-natal ao mercúrio causar efeitos significantes no comportamento no desenvolvimento infantil, a OMS reduziu a Ingestão Diária Tolerável Provisional de metilmercúrio de 0,47 para 0,23 µg/kg de peso corpóreo/dia (WHO, 2003).

A Organização Mundial de Saúde estabelece que a dose tolerada de ingestão de cádmio não deva ser superior a 500 mg de cádmio por indivíduo por semana (WHO, 1992).

Estudos mostram que animais marinhos tais como, marisco, caranguejo, lagosta, camarão e peixe, que são diariamente consumidos como produtos da pesca em muitos países contêm altas concentrações de compostos arseniais, variando de 4 a 80 µg/g e estes compostos estão

presentes geralmente na forma de compostos orgânicos solúveis em água (SAKURAI *et al.*, 2002, apud DENOBILE, 2006).

No Brasil, a inexistência de dados sobre a qualidade higiênico-sanitária do polvo e o interesse que vem despertando como produto de exportação, torna imprescindível a realização de estudos nesta área, que permitirão vislumbrar a necessidade de ações que venham a assegurar o oferecimento de um alimento seguro e nutritivo ao consumidor.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a qualidade e inocuidade do polvo (*Octopus* sp) nos diferentes elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP, Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de contaminação microbiana no polvo nos pontos de comercialização da Baixada Santista.
- Avaliar o frescor em diferentes períodos de estocagem sob congelamento, através da determinação do pH, de nitrogênio em bases voláteis totais (NBVT) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Avaliar os níveis de arsênio, cádmio chumbo e mercúrio em polvo e seu potencial risco às populações que os consomem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no Laboratório do Departamento de Oceanografia Física, Química e Geológica do Instituto Oceanográfico do Instituto Oceanográfico da USP de São Paulo, SP, no Laboratório de Tecnologia do Pescado do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho do Instituto de Pesca (Santos, SP) e no Laboratório de Análise por Ativação do Centro do Reator de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, SP.

3.1 MATERIAL

3.1.1 AMOSTRAGEM

A Baixada Santista é composta por nove municípios (Bertioga, Guarujá Santos, São Vicente, Praia Grande, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe e Cubatão). Destes, os mais representativos em volume de comercialização de polvo são os de Guarujá, Santos, São Vicente e Praia Grande, que foram objeto desta pesquisa.

No período de 20 de novembro de 2005 a 15 de dezembro de 2007 foram adquiridas 121 amostras de polvo cru distribuídas conforme as estações pesqueiras: “verão” (setembro a fevereiro) e “inverno” (março a agosto). Trinta dessas amostras foram gentilmente cedidas por supermercados, indústrias e entrepostos localizados nos municípios de Santos e Guarujá. As demais amostras foram adquiridas comercialmente nos seguintes locais: feiras-livres (14), mercados/peixarias (27), supermercados (25), indústrias (23) e terminais pesqueiros ou entrepostos (32), conforme apresentado na Tabela 5. Vale salientar que alguns municípios não possuem todos os locais de amostragem, como entrepostos e indústrias.

Tabela 5. Amostras de polvo coletadas por local de comercialização e município da Baixada Santista, SP.

MUNICÍPIO	LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS					TOTAL
	Feira-livre	Mercado Peixaria	Super-mercado	Indústria	Entreposto ou barco	
Santos	4	6	6	23	16	55
Guarujá	2	7	6	-	16	31
São Vicente	4	7	7	-	-	18
Praia Grande	4	7	6	-	-	17
TOTAL	14	27	25	23	32	121

3.1.1.1 COLETA DAS AMOSTRAS

No momento da coleta, nos diferentes elos de comercialização, eram solicitadas informações sobre a manipulação realizada no polvo para uma posterior caracterização desta atividade.

Nas feiras-livres, mercados e peixarias, as 41 amostras de polvo, quando possível com peso superior a 1,5 kg foram evisceradas e embaladas em saco plástico comum para alimentos.

Nos supermercados, em alguns deles, a coleta foi realizada de maneira análoga ao descrito anteriormente, mas em outros foram adquiridas amostras previamente embaladas originárias de entrepostos ou indústrias.

Nas indústrias, as 23 amostras foram coletadas em suas embalagens originais, aprovadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Nos entrepostos ou barcos, as 32 amostras foram retiradas diretamente do barco, no momento da sua chegada, e colocadas em sacos plásticos. Estas amostras não foram evisceradas para as análises microbiológicas.

Todas as amostras, após colhidas, foram imediatamente colocadas em caixa de material isotérmico e levadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP. O início das análises microbiológicas não ultrapassava

18h da coleta. Após a retirada da amostra para os ensaios microbiológicos os polvos foram acondicionados em sacos plásticos e congelados em freezer a 20 °C negativos para as demais análises.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensaio microbiológicos

Todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid (Basingstoke, UK), exceto quando citado.

3.2.1.1 Preparo da amostra

O polvo inteiro foi colocado em embalagem plástica, própria para alimentos, à qual foram adicionados 300 mL de solução salina 0,85%, sendo a seguir massageada por 10 minutos. Essa água de enxágüe foi centrifugada a 1464g por 30 minutos a 10 °C (Sorvall Instruments - Du Pont, modelo RC5 C, rotor GSA) e o sedimento ressuspenso em 50 mL de solução salina. A partir deste material foram realizadas diluições seriadas decimais até 10⁻⁶.

3.2.1.2 Contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001)

O volume de 0,1 mL de cada diluição foi semeado na superfície de placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA), com o auxílio de uma alça de Drigalski. A seguir, as placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias. Os resultados, expressos em Unidade Formadora de Colônia/animal (UFC/animal) foram obtidos multiplicando-se o número de colônias pelo fator de diluição.

3.2.1.3 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (MORTON *et al.*, 2001)

Foi adicionado 1 mL de cada diluição (item 3.2.1.1) a placas de Petri, às quais foram adicionados aproximadamente de 20 mL de PCA. Após a homogeneização e solidificação do agar, as placas foram incubadas a 37 °C

por 48 h. Os resultados expressos em UFC/animal foram obtidos multiplicando-se o número de colônias pelo fator de diluição.

3.2.1.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes (tubos múltiplos) (KORNACKI; JOHNSON, 2001)

Três alíquotas de 1 mL do material ressuspenso e das diluições descritas anteriormente foram inoculados em uma série de três tubos de caldo lauril sulfato triptose (LST) por diluição. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 horas. A partir de tubos considerados positivos, isto é, turvos e com produção de gás, um inóculo foi transferido, com auxílio de alça de 0,1 mL, para tubos de caldo lactose bile verde brilhante (coliformes totais) que foram incubados a 37 °C por 48 horas e um inóculo para tubos de caldo EC (coliformes termotolerantes). Decorridas as 48 horas de incubação em banho-maria a 44,5 °C, observou-se o crescimento microbiano com produção de gás. A partir dos tubos que apresentaram turvação e produção de gás, calculou-se o NMP/animal de acordo com Tabela de Blodgett (2008).

3.2.1.5 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Das diluições 10^{-1} a 10^{-3} , descritas no item 3.2.1.1, foi semeado 1 mL em placas Petrifilm™ Staph Express Count Plate (3M, Sumaré, Brasil) que posteriormente foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período, foram realizadas as contagens das colônias características para *S. aureus*, isto é, de coloração vermelho-violeta, e os resultados foram expressos em UFC/animal. Contudo, quando se desenvolviam colônias de outra coloração, colocava-se o “Staph Express Disk” sobre a placa de Petrifilm™, incubando-se por mais 3 horas a 37 °C. Das colônias que apresentaram halo rosa, após o período de incubação, cinco foram então, inoculadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 h para verificação da produção de enzima coagulase, de acordo com LANCETTE; BENNETT (2001). Posteriormente, 0,1 mL desta cultura foi transferida para um tubo estéril, e ao qual adicionou-se 0,3mL de plasma de coelho (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda). Após incubação por 6 horas a 37 °C, verificava-se a

formação de coágulo indicativo de reação positiva para o teste de produção da enzima coagulase. Os resultados para estafilococcus coagulase positiva foram expressos em UFC/animal.

3.2.1.6 Pesquisa de *Salmonella* spp (ANDREWS *et al.*, 2001, modificado)

Uma alíquota de 10 mL do material ressuspenso foi homogeneizada com 90 mL de caldo lactosado e incubada à 35 °C por 24 horas. Decorrido esse período, 0,1 mL desse caldo foi transferido para 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis e incubado em banho-maria a 42 °C por 24 horas. Simultaneamente, foi adicionado 1 mL de caldo lactosado a 10 mL de caldo tetratonato e incubado a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, semeou-se, com o auxílio de uma alça, de maneira a obter colônias isoladas, em placas de ágar Hektoen Enteric (HE) e ágar MLCB que foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias suspeitas foram inoculadas em tubos de ágar ferro lisina (TSI) e de ágar triplice açúcar ferro (LIA). Após incubação a 37 °C por 24 horas foram submetidos às provas bioquímicas em meios EPM (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982a) Mili (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982b) e Citrato e à aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil).

3.2.1.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (HITCHINS, 2003)

Uma alíquota de 10 mL do material ressuspenso foi homogeneizada em 90 mL de caldo LEB (*Listeria* Enrichment Broth, formulação UVM) e incubada a 30 °C por 24 horas. Em seguida, alíquotas foram semeadas, de maneira a obter colônias isoladas, em placas de ágar Palcam e Oxford que foram incubadas a 37 °C por 24 h. Três a cinco colônias características de *Listeria* em cada um dos meios foram semeadas em placas de ágar soja tripticase (TSA) adicionada de 0,6% de extrato de levedura para verificação de sua pureza. Colônias verde azuladas sob luz transmitida foram consideradas características de *Listeria* e purificadas. Entre três e cinco colônias dessas placas foram submetidas à identificação bioquímica: testes para produção de catalase e β

hemólise, fermentação de carboidratos (xilose, manitol, ramnose e dextrose) e motilidade.

3.2.2 Ensaio Físico-químicos

Das 121 amostras de polvo, estocadas a -20 °C, empregadas nas análises microbiológicas, 82 foram utilizadas para as determinações de pH e nitrogênio nas bases voláteis totais (N-BVT). Destas, apenas 69 foram analisadas, também, para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) uma vez que em 13 amostras a quantidade de amostra disponível não era suficiente para a realização de todas as análises.

Os períodos de estocagem, até a realização das análises físico-químicas, variaram conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Período de estocagem e número de amostras de polvo, por ponto de amostragem, submetidas às análises físico-químicas

Ponto de amostragem	Período de estocagem (meses)				
	5	8	11	14	18
Entrepósitos	4	9	2	6	1
Indústrias	12	8	3	0	0
Supermercados	4	3	1	2	2
Peixarias	7	4	8	0	0
Feira livre	1	6	0	0	0

3.2.2.1 Preparo das amostras

As amostras foram previamente descongeladas sob refrigeração, evisceradas (quando oriundas dos entrepostos e/ou barcos), pesadas (peso limpo), picadas, trituradas em "cutter" por aproximadamente 1 minuto, homogeneizadas e encaminhadas para as diferentes análises descritas a seguir.

3.2.2.2 Determinação do valor de pH (SÃO PAULO, 1985)

Triplicatas de 10 g da amostra foram pesadas em balança analítica. Adicionaram-se 100 mL de água destilada e homogeneizou-se com bastão de vidro. Após a decantação, foram realizadas três leituras, em cada triplicata, em potenciômetro digital (Tecnal, modelo TEC-3MP, Piracicaba), previamente calibrado.

3.2.2.3 Determinação de nitrogênio em bases voláteis totais (BRASIL modificado, 1981)

Foram pesadas em balança analítica, 10 g de amostra previamente homogeneizada e após adição de 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5%, a amostra foi homogeneizada em microtritador (Turratec, Tecnal) por um minuto. Filtrou-se em papel filtro quantitativo e o extrato foi avolumado para 50 mL com solução de TCA (7,5%). Dez mL do extrato foram transferidos para um tubo de Kjeldahl e destilados, sendo o destilado coletado em Erlenmeyer contendo 4 gotas de indicador misto (verde de bromocresol 0,1% e alaranjado de metila 0,2%) e 5 mL de ácido bórico saturado. Na seqüência, efetuou-se uma titulação com ácido clorídrico (0,02N). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.2.2.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (VINCKE, modificado, 1970)

Amostras, em triplicata, de 10 g, previamente homogeneizadas, foram adicionadas de 50 mL de TCA (7,5%) e novamente homogeneizadas em microtritador (Turratec, Tecnal) por 1 minuto. Após filtragem em papel filtro qualitativo, o extrato foi avolumado para 50 mL com a solução de TCA. Uma alíquota foi transferida para tubo de tampa com rosca e acrescida de 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02M. As amostras permaneceram por 10 minutos em banho-maria fervente e, após resfriamento, foi realizada leitura em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 538 nm. O branco foi constituído de 5 mL de TCA (7,5%) e 5 mL de TBA (0,02M). Os cálculos foram corrigidos conforme a curva de calibração, construída utilizando-se como padrão o tetraetoxipropano – TEP. Os resultados foram expressos em mg de aldeído malônico/kg de amostra.

3.2.3 Determinação de As, Cd, Hg e Pb nas amostras de polvo

As amostras de polvo foram previamente liofilizadas em equipamento FTS-SYSTEMS™ modelo Dura-dry™ Microprocessador control (Mishigan, USA) com vácuo de 30 μ e temperatura de -80 °C por 72 hs. Após a liofilização as amostras foram trituradas e homogeneizadas em liquidificadores.

Foram empregadas as seguintes metodologias na determinação dos elementos: Análise por ativação com nêutrons (NAA) para a determinação de As; Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) para a determinação de Cd e Pb e a Espectrometria de absorção atômica com vapor frio de mercúrio (CV AAS) para a determinação de Hg.

3.2.3.1 Análise por Ativação com Nêutrons – Determinação de As

A análise por ativação com nêutrons (NAA) é uma técnica nuclear de alta sensibilidade, com boa precisão e exatidão, útil para análises multielementares qualitativas e quantitativas dos elementos maiores, menores e traço em amostras dos mais variados campos de aplicação. Consiste na irradiação da amostra com nêutrons num reator nuclear. Neste processo, isótopos estáveis são convertidos em isótopos radiativos. Durante o decaimento desses isótopos (com meias-vidas variando de segundos a anos) há emissão de diferentes tipos de radiação, entre eles a radiação gama. Cada radionuclídeo emite radiação gama de certa energia. As energias medidas são únicas para cada radionuclídeo. Então, com o espectro gama, pode-se determinar quais são os elementos presentes nas amostras, através das energias medidas. A atividade de um radionuclídeo produzido em uma reação

nuclear é uma medida direta da quantidade do elemento alvo presente da amostra irradiada. Dessa forma, o cálculo das concentrações dos elementos é feita através de suas atividades induzidas (PARRY, 2003).

Neste trabalho foi empregado o método de análise por ativação comparativa, onde amostras e padrões dos elementos de interesse com concentrações conhecidas são irradiados simultaneamente no reator nuclear, sob o mesmo fluxo de nêutrons e ambos medidos no detector de raios gama nas mesmas condições de geometria de contagem. Toda a parte experimental da técnica de AAN foi desenvolvida no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do Centro do Reator de Pesquisa – CRPq do IPEN/CNEN-SP.

3.2.3.1.1 - Preparação das amostras para irradiação

Cerca de 150 mg de cada amostra de polvo liofilizado foi pesada em invólucros de plásticos previamente limpos e desmineralizados com água deionizada e ácido nítrico PA diluído.

3.2.3.1.2 Preparação dos padrões dos elementos de interesse

O padrão de As foi preparado a partir da solução padrão certificada da marca SPEX CERTI PREP. Após diluições apropriadas as soluções foram pipetadas em tiras papel de filtro Whatman 40 e secas. Após a secagem, estas tiras de papel de filtro foram acondicionadas em invólucros de plásticos limpos e desmineralizados.

A concentração de As na solução estoque do padrão foi de $1003,5 \pm 3,0$ mg/L e a massa do elemento irradiado foi de 2,48 µg.

3.2.3.1.3- Irradiação das amostras e dos padrões analíticos

As amostras de polvo foram irradiadas juntamente com os padrões pipetados e os materiais de referência (Oyster Tissue NIST 1566b; Mussel Tissue NIST 2976, Dogfish DORM-2) sob fluxo de nêutrons térmicos de 10^{12} cm⁻²s⁻¹ por 8 horas no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN-CNEN/SP.

Após períodos de decaimento de 4 a 15 dias, as atividades gama induzidas das amostras, do padrão e dos materiais de referência foram medidas em espectrômetros gama.

3.2.3.1.4 Medições das atividades gama induzidas

As medidas das atividades emitidas pelos radioisótopos formados na irradiação das amostras, padrões e materiais de referência foram feitas em dois espectrômetros gama: um composto por um detector de Ge hiperpuro (Modelo POP TOP) da EG&G ORTEC e outro por detector da Canberra Modelo GX2020, com resolução de 1,90 keV e 1,76 keV para o fotopico 1332 keV do ^{60}Co , respectivamente. Ambos os detectores são acoplados a analisadores multicanais, a eletrônica associada e a microcomputadores. Os espectros gama obtidos foram analisados utilizando-se os programas VISPECT 2 e VERSÃO 2, desenvolvidos no próprio laboratório, que fornecem as energias da radiação gama dos radioisótopos formados e as respectivas áreas dos picos.

Para o radioisótopo ^{76}As o valor de meia-vida é de 26,32 horas e a energia da radiação gama é de 55,9 keV (IAEA, 1990).

3.2.3.2 Espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente –Determinação de Cd e Pb

A espectrometria de emissão atômica é um processo no qual a luz emitida por átomos excitados ou íons é medida. A emissão ocorre quando energia térmica ou elétrica excita um átomo livre ou íon a ponto de levá-lo a um estado energético mais alto, sendo este estado instável. A luz é emitida à condição mais estável ou ao estado fundamental. Os comprimentos de onda emitidos são específicos para os elementos que estão presentes na amostra. No caso da técnica de ICP OES, o plasma é usado como fonte de excitação (SING, 1999).

3.2.3.2.1 – Dissolução das amostras para análise por ICP OES

Aproximadamente de 0,150 a 0,200 g de amostras de polvo liofilizado foram pesadas diretamente em frascos de teflon fechados (Savillex, USA) com capacidades de 25 mL. Após a pesagem, foram adicionados 4 mL de ácido nítrico concentrado (Merck) e 1 mL de água oxigenada 30% (Merck) e deixados reagir com as amostras durante a noite. No dia seguinte, os frascos foram colocados no bloco digestor (Tecnal, Brasil) e as amostras foram digeridas por 3 horas à 90°C. As soluções das amostras digeridas foram então resfriadas à temperatura ambiente e diluídas a volume de 25 mL.

3.2.3.2.2- Padrões utilizados – Curvas de Calibração

A partir de soluções padrão estoques de 1000 mg/L de Cd e 1000 mg/L de Pb foram preparadas soluções diluídas de 5 µg/mL de Cd e 80 µg/mL de Pb. Destas soluções foram construídas as curvas de calibração de cinco pontos para Cd e Pb, nas seguintes concentrações: 3, 6, 8, 10 e 12 ng mL⁻¹ para Cd e de 32, 48, 96, 128 e 160 ng/mL para Pb.

3.2.3.2.3- Leituras no Espectrômetro de Emissão Atômica

As leituras das amostras para a determinação de cádmio e chumbo foram realizadas no espectrômetro de emissão atômica por plasma de argônio acoplado indutivamente, marca VARIAN, modelo 710ES, instalado no Departamento de Oceanografia Física, Química e Geológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. O espectrômetro é multielementar e possui sistema ótico simultâneo. O instrumento mede o espectro de emissão característico de cada elemento e determina os elementos Cd e Pb numa mesma corrida, nos seguintes comprimentos de onda 226,502 e 220,353 nm.

3.2.3.3 Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio - Determinação de Hg

A técnica de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) é uma técnica bastante apropriada para a determinação de Hg total presente em amostras de alimentos. Para a determinação de Hg, os compostos de mercúrio são convertidos a íons Hg^{2+} com uma mistura oxidante de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$. Posteriormente, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0 , com o uso de cloreto estanoso (SnCl_2). O vapor de Hg^0 é então liberado da amostra e arrastado diretamente para a célula do espectrômetro ou é pré-concentrado numa superfície de ouro, antes de ser dessorvido por meio de calor antes da análise. A grande vantagem desta análise está na sensibilidade, em comparação com outras técnicas, pois todo o mercúrio da solução é quimicamente atomizado e transportado para a cela. Em geral, os níveis de detecção desta técnica, atingem concentrações inferiores a $0,1 \mu\text{g/L}$ (FARIAS, 2006).

3.2.3.3.1 – Dissolução das amostras para análise por CV-AAS

O procedimento de dissolução das amostras foi o mesmo utilizado para as análises de Cd e Pb por ICP OES. As amostras foram dissolvidas em HNO_3 concentrado e H_2O_2 30 vol., em bloco digestor por 3 horas a 90°C . Após a digestão, a determinação de Hg foi realizada no equipamento FIMS-100, da Perkin Elmer do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do Centro do Reator de Pesquisa – CRPq do IPEN/CNEN-SP

3.2.3.3.2 Curva de Calibração

Para a construção da curva de calibração, soluções diluídas de Hg foram preparadas a partir da solução estoque de 1000 mg/mL . As concentrações de Hg, para a curva de calibração, foram de $0,47$; $1,40$; $2,33$; $3,27$; $3,97$ e $9,33 \text{ ng/mL}$. A curva foi linear em toda a faixa de concentração.

3.2.3.4 Validação das Metodologias

A validação das metodologias foi feita através das análises de materiais de referência certificados. Materiais de referência são materiais que possuem valores certificados para alguns elementos e sua utilização é uma maneira simples e eficiente de validar métodos analíticos e monitorá-los de forma a garantir que estejam sob controle. Assim para verificar a precisão e exatidão das metodologias analíticas utilizadas neste trabalho, foram analisados os seguintes materiais de referência certificados: Oyster Tissue (NIST SRM 1566^a), Mussel Tissue (NIST- SRM 2976) e DogFish Mussel (NRCC-DORM2), para a validação da determinação de As, por NAA e Hg por CV AAS, Cd e Pb por ICP OES. O material DogFish Mussel (NRCC-DORM2) foi analisado apenas pela técnica de AAN. Este material foi analisado em seis replicatas.

3.2.3.4.1 Limites de Detecção e Determinação

3.2.3.4.1.1 Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) por NAA

Os limites de detecção e de quantificação pela técnica de NAA foram determinados de acordo com a definição da IUPAC (CURRIE, 1995). Para o cálculo do limite de detecção (LD) e o limite quantificação (LQ) foram utilizadas seguintes expressões:

$$L_D = \frac{3 \cdot \sqrt{BG}}{LT} \quad (\text{A})$$

$$L_Q = \frac{10 \cdot \sqrt{BG}}{LT} \quad (\text{B})$$

Onde,

BG = radiação de fundo

LT = tempo de contagem

O valor da radiação de fundo (BG) foi obtido diretamente de dados emitidos (espectros) no programa VISPECT 2, para as energias dos elementos de interesse.

O valor de LD expresso pela equação **(A)** representa a taxa de contagem correspondente à massa mínima detectável pela técnica de NAA.

Utilizando-se o valor de LD obtido para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem (LT), calculou-se a concentração mínima detectável.

Relacionando-se os valores de LQ para a amostra e padrão e considerando o tempo de contagem, calculou-se o limite de quantificação para cada elemento.

3.2.3.4.1.2 LD e LQ por ICP OES e CV-AAS

Os limites de detecção e determinação pelas técnicas de ICP OES e CV-AAS foram calculados diretamente da curva de calibração, construída usando-se a técnica de regressão e considerando-se um nível de confiança de 95% (HASWELL, 1991).

Os limites de detecção e determinação foram calculados a partir das seguintes equações:

$$A_{Ld} = A_o \cdot 3 \cdot \sigma_o$$

$$A_{LQ} = A_o \cdot 10 \cdot \sigma_o$$

$$C_{Ld} = \frac{A_{Ld} - A_o}{a}$$

$$C_{LQ} = \frac{A_{LQ} - A_o}{a}$$

Onde

- A_{Ld} : absorvância (ou intensidade de emissão) do limite de detecção;
- A_{LQ} : absorvância (ou emissão) do limite de determinação
- A_o : média dos valores obtidos para a absorvância (ou emissão) da solução branco;
- σ_o : desvio padrão dos valores obtidos para a absorvância (ou emissão) da solução branco;

- C_{Ld} : concentração do limite de detecção;
- C_{LQ} : concentração do limite de determinação;
- a : coeficiente angular da curva de calibração.

3.2.4 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados dos ensaios microbiológicos foram utilizados os parâmetros da estatística descritiva como média, desvio padrão, mediana, percentil de 25%, percentil de 75 %, a análise do diagrama de blocos BOXPLOT, e o teste de Kruskal-Wallis (FISHER; VAN BELLE, 1993; BERQUÓ; SOUZA; GLOTIEB, 1981). Para os dados dos ensaios físico-químicos, e de metais pesados a análise estatística aplicada foi a análise de covariância (ANCOVA), tendo como fatores (variáveis categóricas) os elos da cadeia de comercialização, época pesqueira e município e como covariável o peso, para análises dos metais pesados, e período de estocagem para análises físico-químicas (HUITEMA, 1980).

Empregou-se a análise de componentes principais para relacionar os dados microbiológicos, físico-químicos e os parâmetros peso e período de estocagem.

O software Systat 10 foi utilizado na avaliação estatística de todas as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da atividade de pesca e manipulação do polvo na Baixada Santista

A caracterização das diferentes artes de pesca do polvo e sua posterior manipulação foi realizada, no presente trabalho, através de entrevistas com mestres de embarcações e observadores de bordo e são descritas a seguir: na pesca de arrasto, ao final da triagem, o animal era levado ao porão onde era colocado em câmara frigorífica ou gelo.

Na pescaria com covos (potes), após sua retirada do pote, foram observadas três diferentes manipulações – na primeira, colocava-se o polvo em água salgada com gelo para abate por choque térmico. Outro caminho foi mergulha-lo em água salgada sem gelo e com movimentos para, ao fim da pescaria, colocar gelo, realizando o abate, também por choque térmico. Neste caso, o animal sofreu um processo de exaustão que pode influenciar na qualidade. A terceira via consistia em mergulha-lo em água salgada e aos poucos proceder à evisceração, o que era realizado por pouquíssimas embarcações. Após esta primeira etapa, o polvo era embalado em sacos plásticos individuais e, neste ponto, outras duas variações ocorriam – poderia ser colocado no porão do barco com gelo ou ser congelado em blocos de 10 a 13 animais por bloco, em câmara frigorífica.

Na indústria, o polvo era adquirido congelado em blocos ou em tabuleiros (caixas plásticas) onde se encontrava embalado, em geral individualmente, em embalagens plásticas. O animal poderia passar um período na câmara frigorífica até o dia do processamento, quando era descongelado, eviscerado e lavado após a retirada dos olhos e bico. Poderia ou não ser picado. Posteriormente era embalado e congelado. Algumas indústrias ainda realizavam o tampleamento após a evisceração e antes da embalagem.

Nos supermercados, o polvo, adquirido de entrepostos, ficava congelado em câmaras frigoríficas e era retirado em pequenas quantidades, conforme a comercialização. Neste caso era apresentado na forma “fresco” (inteiro, com vísceras, descongelado), ficando exposto sobre ou envolvido em gelo, e eviscerados somente no momento da sua aquisição. Outra forma de

apresentação era o congelado proveniente da indústria já eviscerado, limpo e embalado individualmente, ficando em câmara frigorífica ou freezer de fácil acesso ao consumidor. Este polvo originário da indústria e comercializado nos supermercados pode ser de origem nacional ou não.

Nas peixarias, o polvo era originário de entrepostos ou de pescadores artesanais. Permanecia em câmaras frigoríficas ou freezers e era descongelado em pequeno número, sendo apresentado na forma “fresco”. De todas as peixarias amostradas nos quatro municípios desta pesquisa, somente uma oferecia o produto na forma congelado. Neste caso específico, todo o pescado vendido, era originário de um entreposto, já eviscerado, limpo e embalado individualmente.

Nas feiras-livres, o polvo era adquirido de entrepostos ou pescadores artesanais, mantido em freezers e retirado em quantidades que se estimava comercializar aquele dia. A forma de apresentação era “fresco”, mantido em exposição sobre o gelo, em local aberto. O que não era comercializado voltava para o freezer.

4.2 Análises microbiológicas

Na presente pesquisa não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os municípios e as épocas do ano na contaminação microbiológica das amostras.

Observa-se na Tabela 7 que 94 (77,6%) amostras apresentaram populações de psicrótrófos acima de 10^6 UFC/animal. De um modo geral, populações de psicrótrófos e/ou mesófilos iguais ou acima de 10^6 UFC/mL ou g e, por animal podem indicar o início de processo deteriorante ou esse processo já estar em andamento em outros alimentos. Neste caso, mesmo sendo $\geq 10^6$ UFC/animal, pode-se constatar que o aroma, coloração e textura estavam alterados.

Segundo ÓLASFSDÓTTIR *et al.* (1997), a população de bactérias deteriorantes comumente presente em produtos de pescado encontra-se entre 10^7 a 10^9 UFC/g, contudo VAZ-PIRES; SEIXAS; BARBOSA (2004), ao analisarem psicrótrófos em polvo, verificaram que o ponto de rejeição para os

ensaios físico-químicos e sensoriais foi atingido quando os níveis microbiológicos alcançaram 10^5 a 10^6 UFC/cm².

Apesar de nesta pesquisa não se ter identificado os gêneros de microrganismos psicrotróficos deteriorantes, são reconhecidos como tais e importantes causadores de deterioração de pescados de águas temperadas os gêneros *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*, e *Photobacterium phosphoreum* (GRAM; HUSS, 2000).

LOUGOVOIS *et al.* (2008) observaram que a rejeição, através da análise sensorial do polvo, aconteceu no décimo dia de estocagem em gelo quando os níveis de *Pseudomonas spp* alcançaram 10^6 UFC/g.

Analisando cada elo de comercialização, separadamente, nota-se que 14 (100%) amostras das feiras, 23 (71,9%) dos entrepostos ou barcos, 16 (84,2%) das indústrias, 19 (76%) dos supermercados, 22 (81,5%) das peixarias apresentaram populações de aeróbios psicrotróficos acima de 10^6 UFC/animal.

Este aspecto pode ser melhor observado na Figura 3 onde são apresentados a amplitude dos valores (log UFC/animal) de microrganismos aeróbios psitróficos, suas medianas e dispersões (quartis 1 – 25% e 3 – 75%) em cada elo da cadeia de comercialização amostrada.

Constata-se que a feira livre foi o elo que apresentou menor amplitude e quartis, com mediana de log 8 UFC/animal superiores a todos os demais elos da cadeia de comercialização. Além disso, o menor valor encontrado está próximo a log 7 ou seja, no limite de rejeição, segundo LOUGOVOIS *et al.* (2008). Isto demonstra que, em todas as amostras deste elo, o processo de deterioração estava mais avançado comprometendo a qualidade do polvo.

Já nos supermercados, a amplitude dos valores encontrados para aeróbios psicrotróficos foram os mais altos e a mediana ficou entre log 7 e 8 UFC/animal. Esta maior amplitude se deve às 4 amostras de polvo importadas, e 1 nacional (5 de 25 amostras) que apresentaram log 4,7 a 5,7/animal, aumentando desta foram a dispersão dos resultados.

Os outros três elos têm medianas entre os valores log 6 e 7 UFC/animal, ou seja, no limite de rejeição.

Este panorama demonstra que os processos de deterioração por aeróbios psicritróficos ocorrem em todos os elos de comercialização em grande

porcentagem das amostras, afetando outros parâmetros de qualidade como observado nas análises físico-químicas.

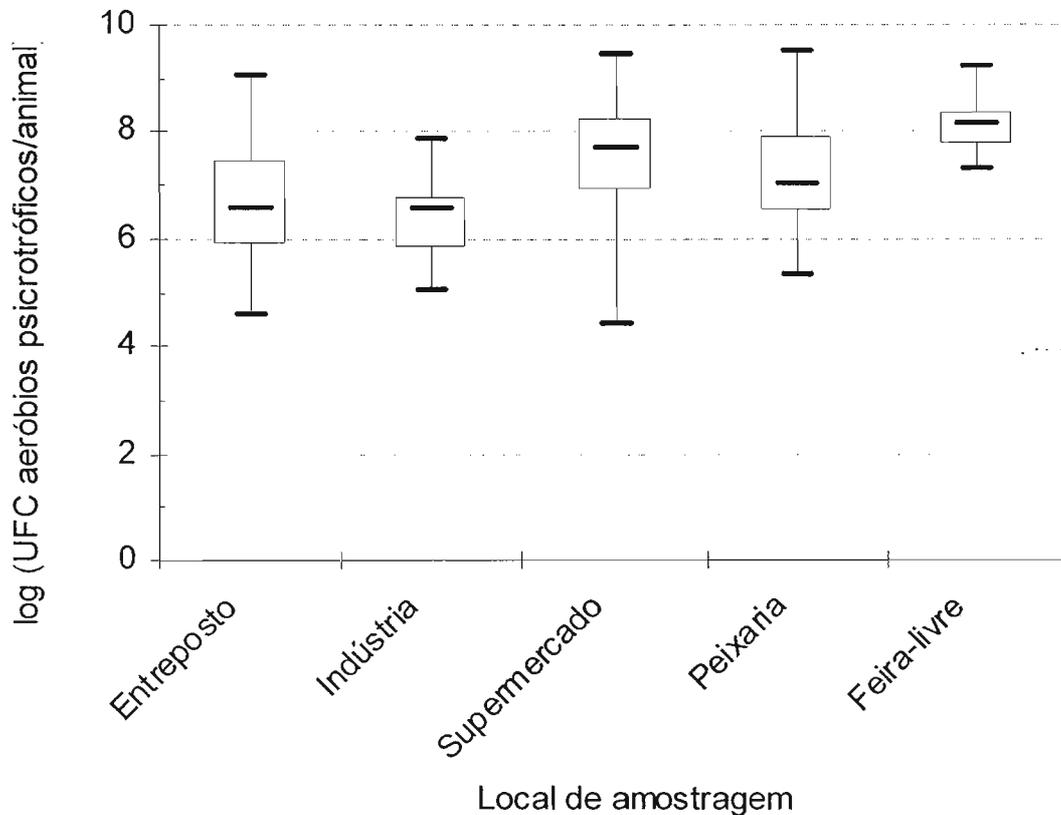


Figura 3. População de aeróbios psicrotróficos presentes em polvo (*Octopus* sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista.

Na Tabela 8 observa-se que a maioria das amostras (50 – 41,3%) apresentaram populações de microrganismos mesófilo na faixa de 10^5 – 10^6 UFC/animal enquanto 41 (33,8%) apresentaram populações acima de 10^6 UFC/animal, que podem ser indicativas de deterioração.

Assim como para os microrganismos psicrotróficos, as medianas das populações de mesófilos também foram maiores nas amostras provenientes de feiras livres (Figuras 3 e 4, respectivamente), contudo a dispersão encontrada no supermercado indica que uma amostra apresentou populações de mesófilos superior a log 8 (Figura 4 e Tabela 8), demonstrando que, em algum momento, estas bactérias tiveram condições de se multiplicarem, ou seja a cadeia de frio foi interrompida ou insuficiente em algum momento da cadeia de comercialização deste produto.

Tabela 7. Distribuição da população de microrganismos aeróbios psicrotróficos (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (*Octopus* sp) cru sob refrigeração ou congelado, conforme os elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

Microorganismos	Elos da cadeia de comercialização do polvo na Baixada Santista (número e percentagem de amostras)						Total
	Entrepasto	Indústria	Supermercado	Peixarias	Feiras-livres		
$0 - 10^5$	32 (26,4)	23 (19,0)	25 (20,7)	27 (22,3)	14 (11,8)	5	(121)
	3	0	2	0	0	5	
	(2,5%)	(0,0%)	(1,7%)	(0,0%)	(0,0%)	(4,1%)	(4,1%)
$10^5 - 10^6$	6	7	4	5	0	22	
	(5,0%)	(5,8%)	(3,3%)	(4,1%)	(0,0%)	(18,2%)	
$10^6 - 10^7$	11	11	3	9	0	34	
	(9,1%)	(9,1%)	(2,5%)	(7,4%)	(0,0%)	(28,1%)	
$10^7 - 10^8$	6	5	9	9	6	35	
	(5,0%)	(4,1%)	(7,4%)	(7,4%)	(5,0%)	(28,9%)	
$10^8 - 10^9$	5	0	5	3	7	20	
	(4,1%)	(0,0%)	(4,1%)	(2,5%)	(5,8%)	(16,5%)	
$10^9 - 10^{10}$	1	0	2	1	1	5	
	(0,8%)	(0,0%)	(1,7%)	(0,8%)	(0,8%)	(4,1%)	

De modo geral os dados de populações de aeróbios mesófilos do presente estudo estão próximos aos encontrados por LOUGOVOIS *et al.* (2008), não excedendo a níveis de log 5 a 5,5. Estes autores ressaltam que os microrganismos aeróbios mesófilos constituem a maior proporção da microbiota presente no músculo de polvos no momento da pesca, contudo a pressão de seleção exercida nos microrganismos pelas baixas temperaturas de estocagem faz com que a população se multiplique muito pouco.

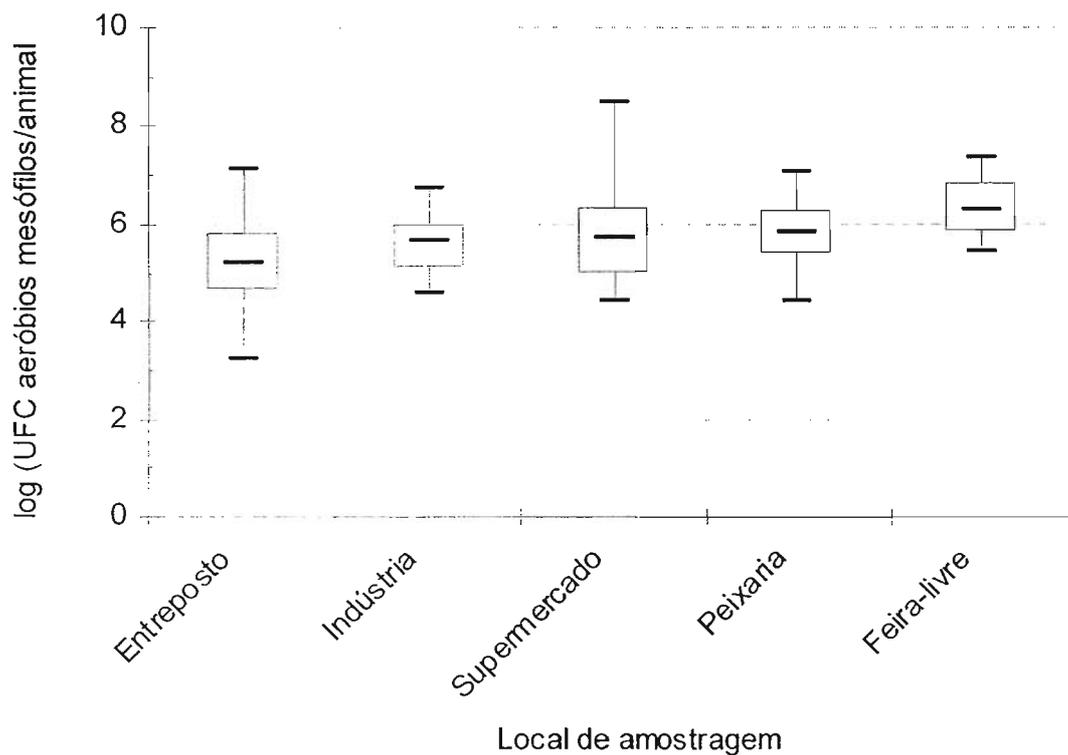


Figura 4. População de aeróbios mesófilos presentes em polvo (*Octopus sp.*) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista

Nas Tabelas 9 e na Figura 5, encontram-se os resultados para coliformes totais. Estes microrganismos apresentaram, no presente estudo, uma variação de 0,3 a $< 10^6$ NMP/animal, sendo que 65 (53,7%) das amostras apresentaram valores superiores a 10^3 . Esta dispersão de resultados foi maior que a encontrada por CARVALHO; VASCONCELOS; VIERA (2007), ao avaliarem a qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), quando obtiveram uma variação de coliformes totais de $< 1,8$ a $3,5 \times 10^3$ NMP/g.

Tabela 8. Distribuição da população de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (*Octopus sp*) cru sob refrigeração ou congelado, conforme os elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

Microorganismos Aeróbios Mesófilo	Elos da cadeia de comercialização do polvo na Baixada Santista (número e percentagem de amostras)						Total (121)
	Entrepasto	Indústria	Supermercado	Peixarias	Feiras-livres		
0 - 10 ⁴	4 (3,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (3,3%)
10 ⁴ - 10 ⁵	8 (6,6%)	5 (4,1%)	7 (5,8%)	6 (5,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	26 (21,5%)
10 ⁵ - 10 ⁶	12 (9,9%)	12 (9,9%)	9 (7,4%)	12 (9,9%)	5 (4,1%)	5 (4,1%)	50 (41,3%)
10 ⁶ - 10 ⁷	7 (5,8%)	6 (5,0%)	7 (5,8%)	8 (6,6%)	7 (5,8%)	7 (5,8%)	35 (28,9%)
10 ⁷ - 10 ⁸	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	2 (1,7%)	2 (1,7%)	5 (4,1%)
10 ⁸ - 10 ⁹	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)

A importância dos coliformes totais reside no fato de fazerem parte da família *Enterobacteriaceae*, bactérias que são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e em fezes dos animais e homem. Estes microrganismos são facilmente inativados pelos sanitizantes, contudo se a sanitização é falha, eles podem contaminar vários nichos da planta de processamento. Devido a estes fatores, as bactérias desta família são comumente utilizadas como indicadores das condições de higiene do processo de fabricação ou manipulação dos alimentos (SILVA *et al.*, 2007).

FONTES *et al.* (2007), ao analisarem 23 amostras de carapau (*Trachurus trachurus*), encontraram níveis de coliformes totais acima do aceitável para 30% das amostras, de acordo com a legislação portuguesa.

Encontram-se na Tabela 10 e Figura 6 os resultados de coliformes termotolerantes. No presente estudo, observa-se que 53 (43,8%) das amostras apresentaram populações desse grupo de microrganismo na faixa de 0,3 a 10^3 NMP/animal, enquanto 4 amostras apresentaram populações superiores a 10^3 NMP/animal. É interessante notar nessa Tabela que uma amostra coletada em entreposto apresentou população na faixa de 10^4 a 10^5 e uma proveniente de feira livre apresentou o maior nível de contaminação – entre 10^5 e 10^6 NMP/animal.

Na Figura 6 pode-se observar que os coliformes termotolerantes, nos elos indústria, supermercado e peixaria, apresentaram o log das medianas mais próximos ao menor valor de dispersão. Em contrapartida, a amplitude desta dispersão sugere que em alguns pontos amostrados dentro de cada elo ocorreram deficiência nos cuidados higiênicos, propiciando a contaminação por estes microrganismos.

CARVALHO; VASCONCELOS ; VIEIRA (2007), ao avaliarem a qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), obtiveram uma variação de coliformes termotolerantes de $< 1,8$ a $2,8 \times 10^3$ NMP/g.

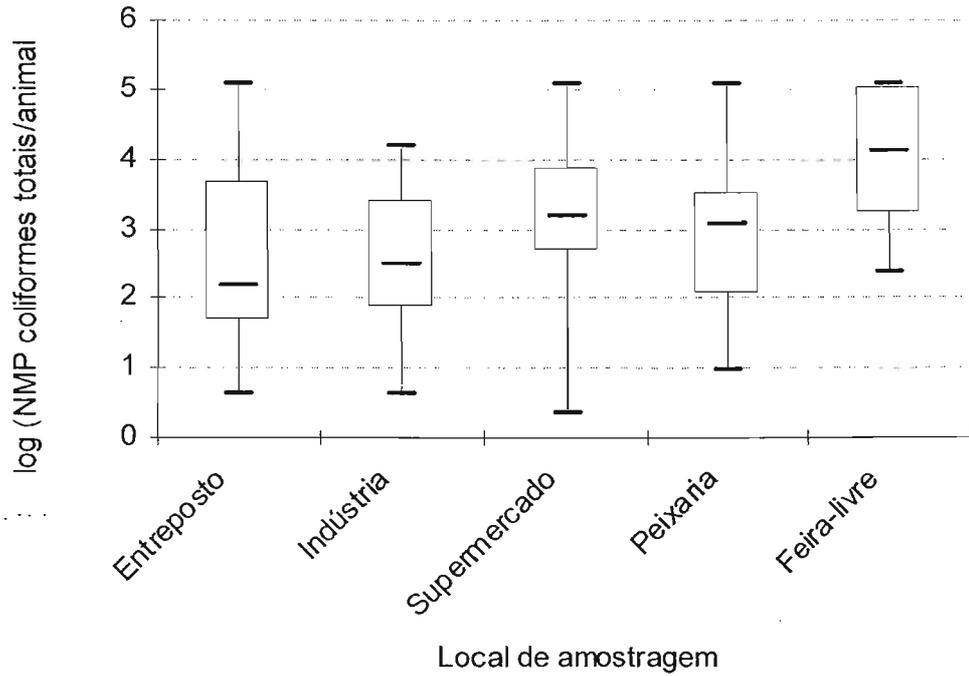


Figura 5 População de coliformes totais presentes em polvo (*Octopus* sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista.

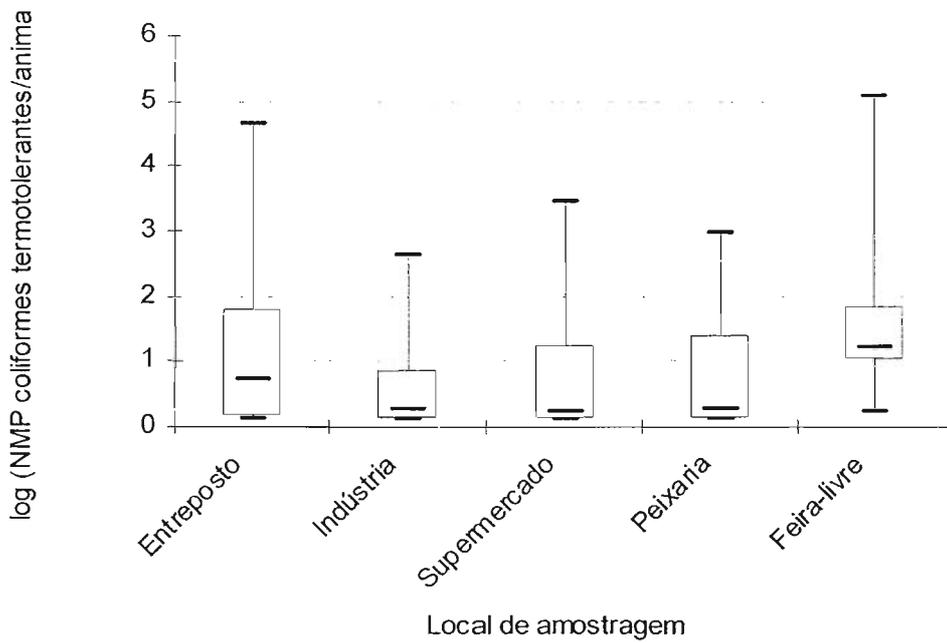


Figura 6 População de coliformes termotolerantes presentes em polvo (*Octopus* sp.) em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista

Tabela 9. Distribuição da população de coliformes totais (NMP/animal) em 121 amostras de polvo (*Octopus sp*) cru sob refrigeração ou congelado, conforme os elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

Coliformes totais (NMP/animal)	Elos da cadeia de comercialização do polvo na Baixada Santista (número e percentagem de amostras)						Total (121)
	Entrepasto	Indústria	Supermercado	Peixarias	Feiras-livres	Total	
< 0,3 – 10	2 (1,7%)	2 (1,7%)	3 (2,5%)	1 (0,8%)	0 (0,0%)	8 (6,6%)	
10 – 10 ²	8 (6,6%)	4 (3,3%)	1 (0,8%)	5 (4,1%)	0 (0,0%)	18 (14,9%)	
10 ² – 10 ³	9 (7,4%)	8 (6,6%)	4 (3,3%)	6 (5,0%)	3 (2,5%)	30 (24,8%)	
10 ³ – 10 ⁴	7 (5,8%)	5 (4,1%)	11 (9,1%)	10 (8,3%)	2 (1,7%)	35 (28,9%)	
10 ⁴ – 10 ⁵	5 (4,1%)	4 (3,3%)	5 (4,1%)	4 (3,3%)	4 (3,3%)	22 (18,2%)	
10 ⁵ – 10 ⁶	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	5 (4,1%)	8 (6,6%)	

Durante as amostragens foi possível observar diferentes condições de higiene nos locais de coleta. Em alguns barcos atracados nos entrepostos foi constatada higiene adequada em todo o barco, contudo em outros tal situação de higiene não foi observada havendo, ainda, animais nas embarcações (cães). Já em feiras livres, a evisceração de todos os pescados comercializados era realizada freqüentemente em apoio de madeira que não sofria boa higienização entre uma evisceração e outra. Além disso, a lavagem do polvo, pós evisceração, constituía em mergulha-lo em água, num balde, onde outros pescados já haviam sido lavados.

Esta deficiência nas Boas Práticas de Manipulação (BPM) pode justificar os resultados encontrados, principalmente os de coliformes termotolerantes.

Além de indicador de falta de higiene, os coliformes totais e termotolerantes tem alta capacidade deteriorante (OGAWA; MAIA, 1999).

Neste estudo, uma (0,8%) amostra, proveniente de entreposto, apresentou população *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^3 UFC/animal (Tabela 11 e Figura 7). Na Figura 7 ainda observamos que a dispersão para entrepostos, peixarias e feiras livres foram maiores que as apresentadas nos supermercados e indústrias. Isto pode ser facilmente explicado pelo fato deste microrganismos ter como reservatório as vias nasais, garganta, pele e cabelo de 50% ou mais indivíduos humanos saudáveis, portanto os manipuladores são a fonte mais freqüente de contaminação. Como nas indústrias e supermercados as luvas, mascara e touca são itens de uso comum, isto diminui grandemente a contaminação dos alimentos.

As bactérias coagulase positiva além de serem consideradas indicadoras das condições de manipulação de um alimento, também podem causar intoxicação alimentar quando sua população atinge níveis superiores a 10^6 UFC/g (ICMSF, 1996).

Tabela 10. Distribuição da população de coliformes termotolerantes (NMP/animal) em 121 amostras de polvo (*Octopus sp*) cru sob refrigeração ou congelado, conforme os elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

Coliformes termotolerantes (NMP/animal)	Elos da cadeia de comercialização do polvo na Baixada Santista (número e percentagem de amostras)						Total (121)
	Entrepasto	Indústria	Supermercado	Peixarias	Feiras-lívrres	Total	
< 0,3 + 0,3	5 (4,1%)	7 (5,8%)	8 (6,6%)	8 (6,6%)	0 (0,0%)	28 (23,1%)	
0,3 + 10	14 (11,6%)	12 (9,9%)	10 (8,3%)	10 (8,3%)	7 (5,8%)	53 (43,8%)	
10 + 10 ²	5 (4,1%)	1 (0,8%)	5 (4,1%)	7 (5,8%)	5 (4,1%)	23 (19,0%)	
10 ² + 10 ³	6 (5,0%)	3 (2,5%)	1 (0,8%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)	13 (10,7%)	
10 ³ + 10 ⁴	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)	
10 ⁴ + 10 ⁵	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	
10 ⁵ + 10 ⁶	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	1 (0,8%)	

PAPADOPOULOU *et al.* (2007), ao investigarem 360 amostras de diferentes espécies de pescado de águas salgadas e doce, encontraram 56,6% delas contaminadas por *S. aureus*, Deste total de amostras, 50 eram de polvo e nenhuma delas estava contaminada. Estes autores alertam que a presença deste microrganismo está relacionada, principalmente, à manipulação.

FONTES *et al.* (2007), avaliando a contaminação microbiológica de pescado em estabelecimentos portugueses, observaram apenas duas amostras do músculo de pescado (8,7%) contaminado pelo microrganismo. Estes autores verificaram, por ocasião da amostragem, que o funcionário do estabelecimento não cumpria algumas das regras desejáveis de manipulação de alimentos, o que se enquadra na idéia de que a presença desse microrganismo nos alimentos está, muitas vezes, relacionada com operações de manipulação deficientes, já que seu habitat são as fossa nasais, mãos e garganta dos manipuladores (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

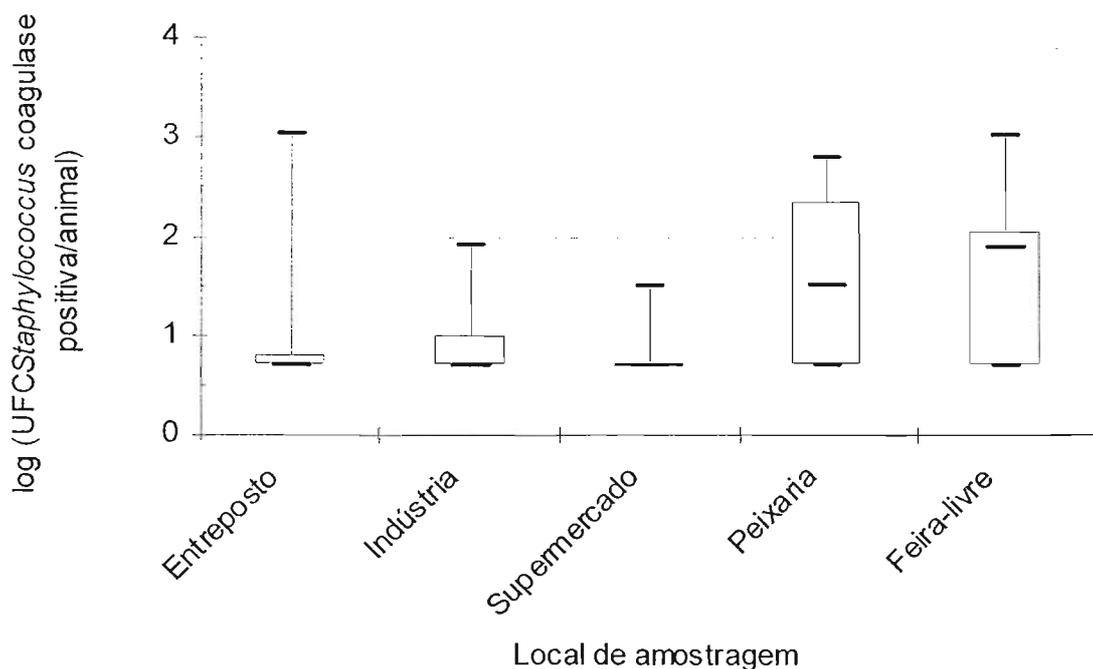


Figura 7. População de *Staphylococcus coagulase* positiva presente em polvo (*Octopus sp.*) coletadas em diferentes locais de amostragem na Baixada Santista

Tabela 11 Distribuição da população de *Staphylococcus* cogulase positiva (UFC/animal) em 121 amostras de polvo (*Octopus* sp) cru sob refrigeração ou congelado conforme os elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

<i>S. aureus</i>	Elos da cadeia de comercialização do polvo na Baixada Santista (número e percentagem de amostras)						Total (121)
	Entrepasto 32 (26,4)	Indústria 23 (19,0)	Supermercado 25 (20,7)	Peixarias 27 (22,3)	Feiras-livres 14 (11,8)		
0 - 10	24 (19,8%)	16 (13,2%)	21 (17,4%)	9 (7,4%)	5 (4,1%)		75 (62%)
10 - 10 ²	4 (3,3%)	7 (5,8%)	4 (3,3%)	9 (7,4%)	5 (4,1%)		29 (24%)
10 ² - 10 ³	3 (2,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	9 (7,4%)	4 (3,3%)		16 (13,2%)
10 ³ - 10 ⁴	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		1 (0,8%)

Entre os patógenos pesquisados, *Salmonella* spp foi detectada em oito (6,6%) das 121 amostras sendo duas provenientes de amostras coletadas em entreposto, três de amostras de indústria, duas de amostras de polvo coletadas em supermercados e uma amostra coletada em feira livre.

A *Salmonella* tem como principal habitat o trato intestinal de humanos e animais, podendo também ocorrer em outros locais contaminados com fezes como água, solo, e nas superfícies de equipamentos e utensílios de fábrica e cozinha. Sua temperatura de crescimento pode variar de 5-7 a 46 °C (FDA/CFSAN, 1999). Esta bactéria faz parte da Família *Enterobacteriaceae*, bem como os coliformes totais e termotolerantes. Assim, buscou-se, neste estudo, uma correlação estatística entre os níveis de coliformes totais e a presença da *Salmonella*. Nestas amostras os coliformes totais variaram de $2,2 \times 10^3$ à $7,5 \times 10^3$ e de coliformes termotolerantes de 0,0 à $2,9 \times 10^3$, não ocorrendo uma correlação estatística entre estes microrganismos.

O RASFF (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2003) relatou uma notificação, na Itália, de polvo congelado contaminado por *Salmonella* spp, originário do Senegal.

Esses resultados são diferentes dos relatados por PAPADOPOULOU *et al.* (2007) que não detectaram *Salmonella* em 360 amostras de diferentes pescados coletados no nordeste da Grécia.

O risco que *Salmonella* representa quando presente nos alimentos é inegável, como demonstrado no caso de polvo especificamente, por HADJICHRISTODOULOU *et al.* (1999) que relataram casos de gastroenterite causados por esse microrganismo. Segundo SOTO *et al.* (2001), na Espanha, o polvo mal cozido, contaminado por *Salmonella*, foi a causa de 25 casos de gastroenterites. É importante salientar que o perigo de consumir alimentos contaminados por este microrganismo pode ser minimizado desde que estes alimentos sofram um tratamento térmico eficiente e que não ocorra contaminação pós processamento.

Outro fato observado na presente pesquisa é que duas amostras (1,6%) apresentaram tanto *Salmonella* como *L. monocytogenes* sendo uma de supermercado e outra de entreposto.

L. monocytogenes, por sua vez foi detectada em 15 (12,4%) amostras de polvo sendo seis (5,0%) delas coletadas em entreposto, duas (1,6%)

proveniente de indústria, uma (0,8%) em amostra coletada em feira livre, uma em peixaria (0,8%) e cinco (4,1%) de supermercados. A *L. monocytogenes* é um microorganismos psicrotrófico. Um fato interessante, na presente pesquisa, é a contagem de microorganismos aeróbios psicrotróficos nas amostras com presença de *L. monocytogenes* observa-se que nas amostras originárias de entrepostos ela variou de $3,9 \times 10^4$ à $9,2 \times 10^8$; nas de supermercado variou entre $2,8 \times 10^7$ à $2,6 \times 10^9$; na indústria de $2,0 \times 10^6$ à $1,6 \times 10^7$; na feira livre foi de $1,6 \times 10^8$ e na peixaria foi de $7,3 \times 10^6$. Apesar desta contagem, de modo geral, alta para microorganismos aeróbios psicrotróficos a análise estatística não apresentou uma correlação entre estes fatores.

A presença desse microorganismo em outros tipos de pescados como camarão, frutos do mar, salmão, já foi relatada por diversos autores entre eles, DESTRO; LEITÃO; FARBER (1996), DILLON; PATEL; RATMAN (1992, 1994), FABER; PETERKIN (1991), RORVIK; CAUGANT; YNDESTAD (1995); VAZ-VELHO; DUART; GIBBS (1998, 2000),.

PAPADOPOULOU *et al.* (2007) encontraram uma amostra positiva para *Listeria monocytogenes* em 30 amostras de mexilhão e uma em 100 amostras de peixe de água doce, porém não a detectaram em 50 amostras de polvo analisadas. FONTES *et al.* (2007), ao analisarem em 23 amostras de pescado proveniente de diferentes estabelecimentos de Vila Real (Portugal), não encontraram contaminação por *Listeria monocytogenes* na superfície ou músculo destas amostras.

4.3 Análises físico-químicas

Os valores de pH oscilaram entre 6,02 e 7,22 sendo o resultado estatisticamente dependente do período que a amostra ficou estocada ($p < 0,1$). Considerando os valores preconizados pela legislação brasileira (BRASIL, 1952), das 82 amostras analisadas 24 (29,3%) foram consideradas impróprias para consumo ($pH > 6,5$).

Na Figura 8 observa-se que a feira livre apresentou a menor amplitude de valores de pH, bem como a maior mediana comparativamente aos outros elos da cadeia de comercialização do polvo. O maior “outlier” (representados por asteriscos) ocorreu no elo mercados/peixarias. As medianas dos

supermercados e feiras livres apresentaram-se superiores ao permitido pela legislação (pH > 6,5).

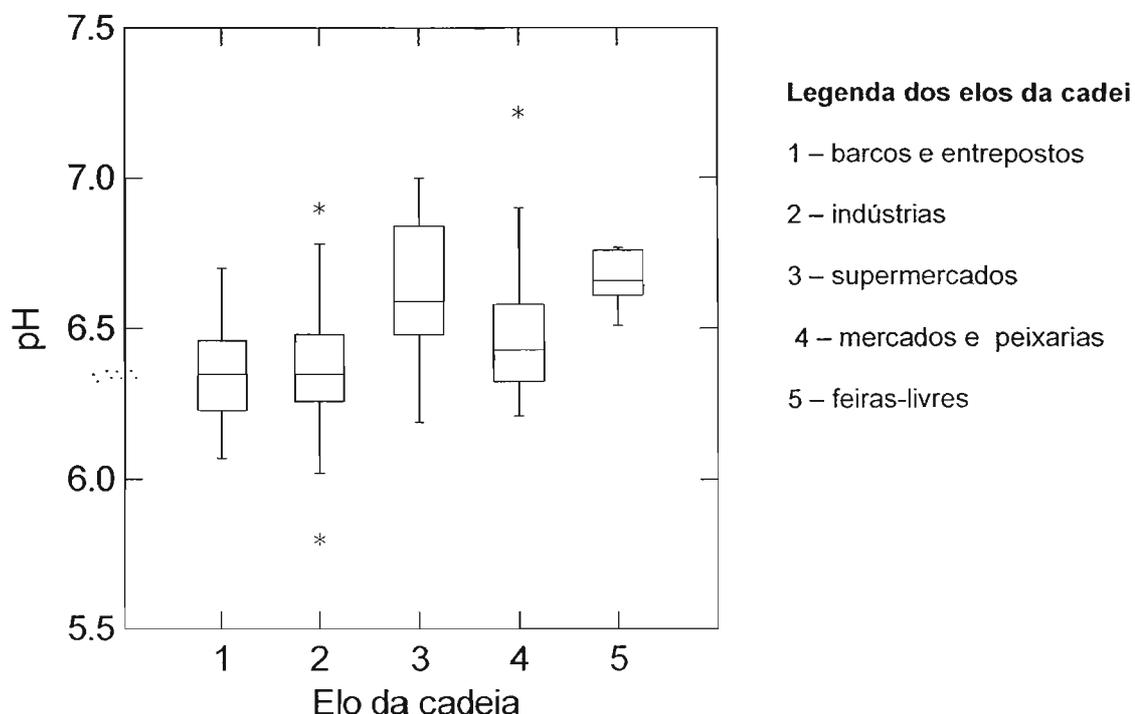


Figura 8. Níveis de pH em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo da Baixada Santista, SP

Segundo LOUGOVOIS *et al.* (2008), o pH do polvo, armazenado em gelo pode variar de aproximadamente 6,2 no segundo dia de armazenagem a, aproximadamente, 7,2 no 18º dia de estocagem. Os autores justificam estes valores pelo acúmulo de ácido láctico e octopina resultantes da degradação de compostos relacionados com a quebra do ATP nos primeiros dias após a captura e em seguida, próximo ao oitavo dia de armazenamento, o pH se eleva graças à produção de álcalis resultantes do rápido processo de autólise e da ação das bactérias deteriorantes.

Para N-BVT não houve diferenças estatísticas para os fatores analisados (época da coleta, elo da cadeia produtiva, município e período de estocagem) ($p > 0,05$). Os valores variam entre 11,5 e 69,01 mg/100g. Considerando o limite máximo estabelecido de 30 mg de N-BVT/100g de pescado (BRASIL, 1952), do total de 82 amostras analisadas, 24 (29,3%) foram consideradas impróprias para consumo humano. Contudo, vale ressaltar que somente oito destas 24 amostras também apresentam pH superiores ao

estabelecido pela legislação. As outras 16 amostras apresentaram um ou outro fator fora dos padrões legais.

Na Figura 9 os asteriscos e círculos indicam valores “outlier”, sendo que os maiores valores foram encontrados nas peixarias. Observa-se que as medianas de todos os pontos de coleta encontram-se abaixo de 30mg de N-BVT/100g, porém os valores nas feiras livres são os que mais se aproximam deste limite máximo permitido pela legislação. Observa-se, ainda, que neste elo ocorreu a menor amplitude entre os dados. Já nos supermercados, o valor da mediana é o menor, comparativamente aos outros elos da cadeia de comercialização.

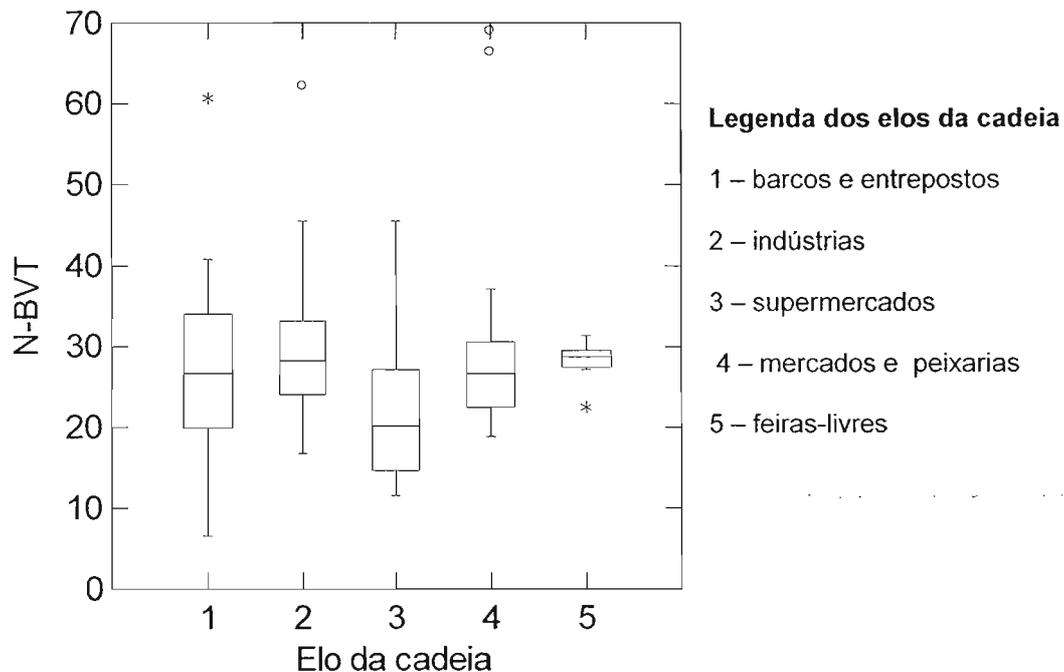


Figura 9. Níveis de N-BVT (mg/100g de polvo) em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo na Baixada Santista, SP

De acordo com LOUGOVOIS *et al.* (2008), que utilizou metodologia de VYNCKE *et al.* (1987), o nível das bases voláteis totais em polvo aumentou somente após o 16º dia de estocagem em gelo, passando de aproximadamente 8,5 mg/100g para 16,5mg/100g no 18º dia, coincidindo com o aumento da população de bactérias. Os autores atribuíram o aumento dos

valores de N-BVT à desaminação de aminoácidos pelas bactérias com a produção de amônia, aminoácidos e outros compostos nitrogenados.

Os resultados obtidos para TBARS variaram de 0,08 a 2,37mg de aldeído malônico/kg de pescado, e não houve diferença estatística para os fatores analisados (época da coleta, elo da cadeia produtiva, município e período de estocagem) ($p > 0,05$). Apesar de não haver limite de TBARS estabelecido na legislação brasileira definindo a ocorrência de oxidação lipídica e/ou indicando o valor a partir do qual o pescado não possa ou não seja recomendado para consumo, o pescado com índice muito alto de oxidação não é indicado para a alimentação humana pois possivelmente haverá prejuízo para a saúde, segundo PEREIRA; TENUTA-FILHO (2005).

KELLEHER; HULTIN; WILHELM (1994) correlacionaram teores de até 0,43 mg de AM/kg com odor suave (frescor) do filé de cavala e de 0,43 a 0,72 mg de AM/kg já associado ao odor de ranço.

Considerando o exposto acima, ou seja, que valores superiores a 0,43mg AM/kg ocasionaria rejeição pela análise sensorial, constata-se que das 69 amostras analisadas 47 (68,1%) seriam rejeitadas (Tabela 12). Destas, 25 só apresentaram valores superiores de TBARS, enquanto três apresentaram ainda os valores de pH e N-BVT superiores ao da legislação. Onze amostras apresentaram tanto valores de TBARS como de pH superiores ao permitido e oito, além do TBARS apresentaram valores de N-BVT superiores ao recomendado.

Na Figura 10 observa-se que as medianas apresentaram valores próximos nos diferentes elos da cadeia. Os "outliers" aconteceram com maior amplitude nas peixarias/mercados.

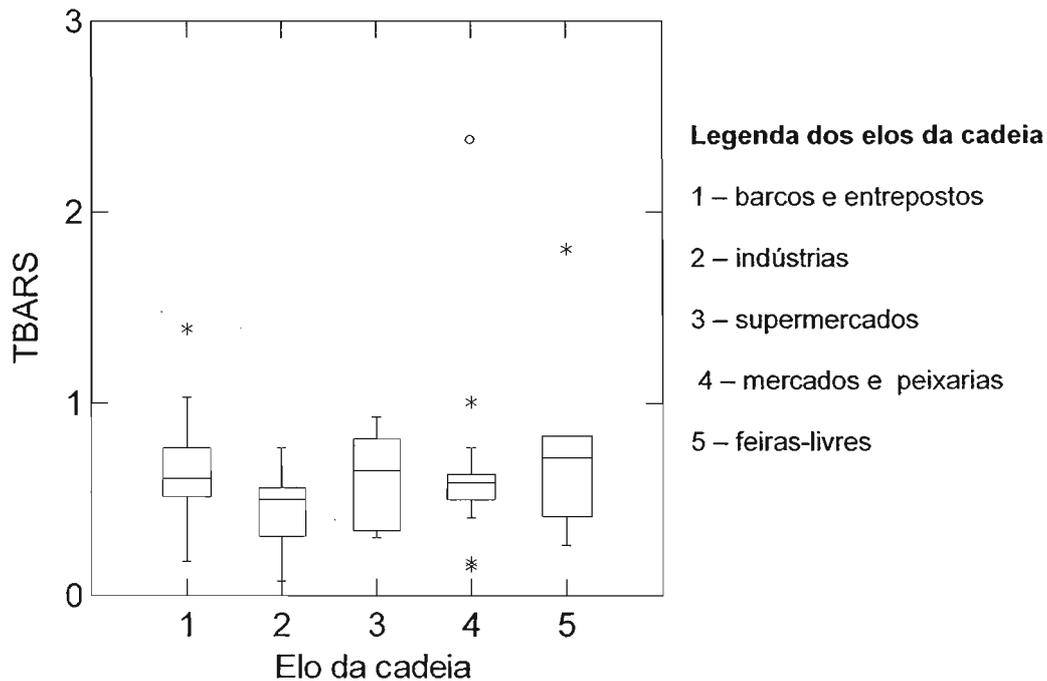


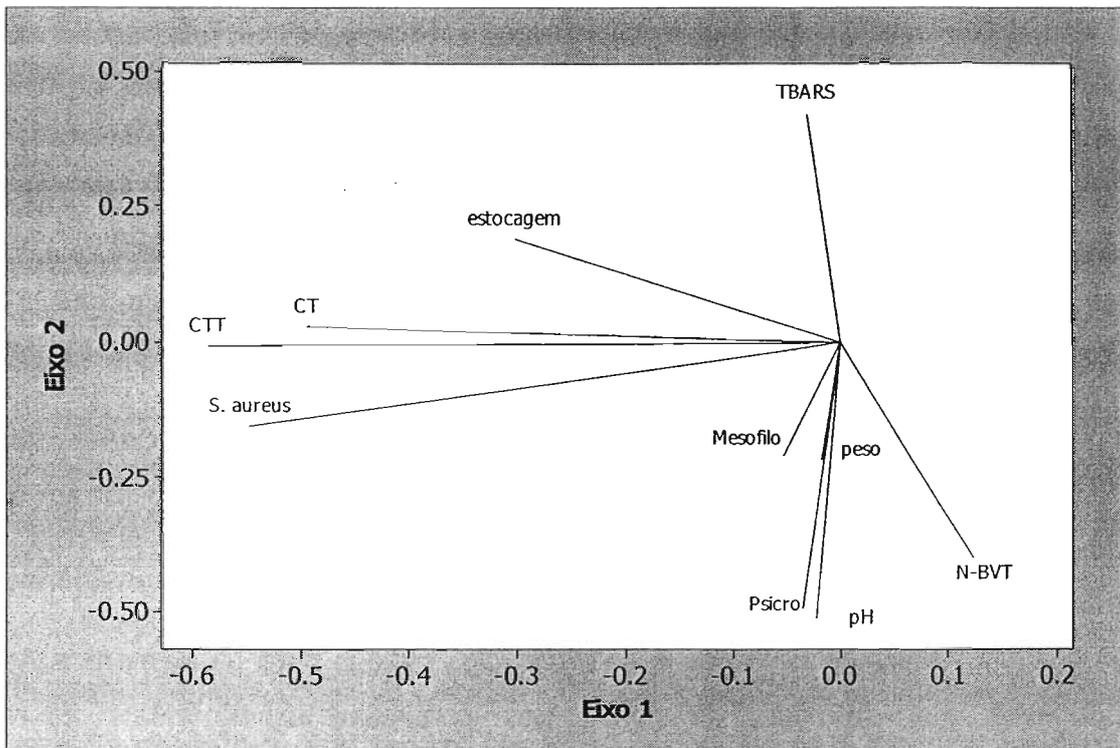
Figura 10. Níveis de TBARS (mg de malonaldeído/kg) em diferentes elos da cadeia de comercialização de polvo na Baixada Santista, SP

Tabela 12. Número de amostras que seriam rejeitadas sensorialmente conforme os níveis de TBARS (mg MAL/kg), de acordo com três estudos diferentes (BONNEL, 1994, GRAY; PERSON, 1987, KELLEHER; HULTIN; WILHELM, 1994) por elo da cadeia de comercialização na Baixada Santista, SP

Elo da cadeia de comercialização	Níveis de TBARS (mg MAL/kg)			TOTAL amostras analisadas
	> 0,43	>0,72	>1,5	
Entrepasto	10	3	0	13
Indústria	12	2	0	22
Supermercado	6	3	0	9
Mercado/peixaria	15	3	1	19
Feira-livre	4	3	1	6
Total amostras/ nível TBARS	47 (68,1%)	14 (20,3%)	2 (2,9%)	

Analisando os dados microbiológicos e físico químicos através da análise estatística por Componentes Principais (PCA) buscou-se correlações

entre estes parâmetros, contudo estas não foram observadas conforme observa-se na Figura 11.



CT – coliformes totais; CTT coliformes termotolerantes; Psicro – microrganismos aeróbios psicrotróficos e Mesofilo - microrganismos aeróbios mesófilos

Figura 11 Correlação entre os diferentes parâmetros microbiológicos, físico-químicos, período de estocagem e peso de amostras de polvo coletadas na Baixada Santista, SP através da análise estatística por Componentes Principais (PCA)

4.4 Análises dos Metais

A validação dos métodos analíticos utilizados nas determinações do metais apresentou os resultados, a seguir:

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para os elementos As determinado por NAA, Cd e Pb por ICP OES e Hg por CV AAS nos materiais de referência certificados.

Tabela 13: Determinação de AS, Hg, Cd e Pb em materiais de referência

Elemento	Oyster Tissue		Mussel Tissue		Dogfish Mussel	
	Este trabalho ^a	Valor certificado	Este trabalho ^a	Valor certificado	Este trabalho ^a	Valor certificado
As (mg/kg)	7,39±0,37	7,65±0,65	12,9±0,9	13,3±1,8	17,5±0,3	18,0±1,1
Hg (mg/kg)	37±5	37,1±1,3	57±1	61,0±3,6	na	4640±260
Cd (mg/kg)	2,30±0,10	2,48±0,08	0,81±0,12	0,82±0,16	na	0,043±0,008
Pb (mg/kg)	0,318±0,030	0,308±0,009	1,30±0,20	1,19±0,18	na	0,0065±0,007

^a: média e desvio padrão de 2 a 6 determinações

na: não analisado

Pode-se observar pelos resultados obtidos nos materiais de referência certificados que as metodologias utilizadas no presente trabalho mostraram-se adequadas para a determinação desses elementos em amostras de origem marinha.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para os elementos As, por NAA nas amostras de polvo, nas condições experimentais foram, respectivamente: 0,225 mg/kg e 0,750 mg/kg.

A Tabela 14 apresenta os limites de detecção e quantificação para os elementos Hg, Cd e Pb.

Tabela 14: Limites de Detecção e de Quantificação para Hg, Cd e Pb em amostras de polvo por CV AAS e ICP OES

Elemento	Polvo	
	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)
Hg	0,001	0,002
Cd	0,004	0,020
Pb	0,010	0,033

Como mencionado anteriormente, a Portaria nº 685 do Ministério da Saúde (ANVISA, 1998) determina como 1,0 mg/kg para o arsênio; 2,0 mg/kg para o chumbo; 1,0 mg/kg para o cádmio e 0,5 mg/kg para o mercúrio os limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em alimentos.

Na presente pesquisa foram constatadas as seguintes faixas de concentração dos metais em polvo *in natura*: para o Hg de 0,007 a 0,179 mg/kg, para o Cd de 0,006 a 0,540 mg/kg, para o Pb de 0,002 a 0,491 mg/kg de Pb e para o As de 1,256 a 28,502 mg/kg. Os teores encontrados para Hg, Cd, e Pb estão de acordo com o permitido pela legislação brasileira, porém todas as analisadas para As apresentam teores superiores a 1mg/kg, recomendado pela legislação.

Estes resultados estão de acordo com os observados por DENOBILE, (2007) que ao analisar 51 amostras cações comercializados na cidade de São Paulo, encontrou teores de As total que variaram de 2,10 mg/kg a 33,53 mg/kg (peso úmido). Neste mesmo trabalho a autora observou que 44,9% das amostras também apresentavam teores acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira de 0,5mg/kg para predadores. O presente trabalho não constatou uma elevada concentração de Hg em polvos.

SEMMLER (2007) ao avaliar a contaminação de mexilhões em cinco diferentes regiões do litoral paulista obteve os seguintes resultados *in natura* para As de 1,28 a 4,60 mg/kg, Cd 0,053 a 0,153 mg/kg, Hg 0,012 a 0,041 mg/kg e Pb abaixo dos limites de detecção até 0,070 mg/kg. Ao se comparar estes resultados com os do presente trabalho observa-se que os valores máximos encontrados para os quatro metais são superiores neste estudo. Isso pode ser explicado pelos hábitos alimentares do polvo que englobam crustáceos, bivalves, outros cefalópodes e peixes (SEIXAS; PINHEIRO; REIS, 2002), ocasionando uma bioacumulação nesta espécie que é topo de cadeia em comparação aos mexilhões que são filtradores.

Outro fator importante a salientar é que mesmo quando os lançamentos de poluentes por diferentes fontes poluidoras se encontrarem dentro dos padrões legais a contaminação dos organismos aquáticos pode ocorrer devido ao fator de acumulação contínuo destes poluentes, nos vários compartimentos dos ecossistemas atingidos, como foi observado por CETESB, 2001 ao estudarem o sistema estuarino de Santos e São Vicente, SP.

De todos os fatores analisados observou-se que a época pesqueira, e o município não apresentaram diferença estatística para os diferentes metais. O elo da cadeia produtiva foi estatisticamente significativo para o Pb e,

finalmente o peso apresentou diferença estatística altamente significativa ($p < 0,000$) para o Pb (Figura 12) e As (Figura 13).

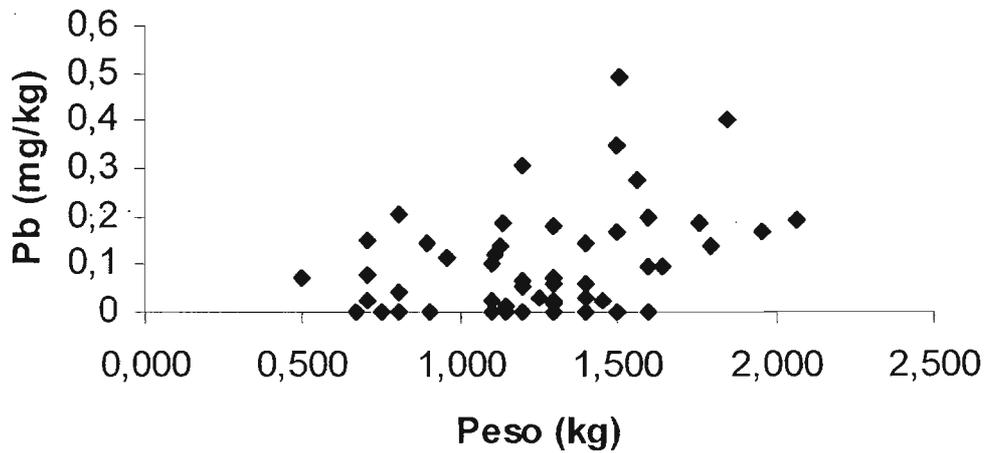


Figura 12. Dispersão dos níveis de Pb (mg/kg) em amostras de polvo *in natura*, comercializados na Baixada Santista, relacionados ao peso (kg).

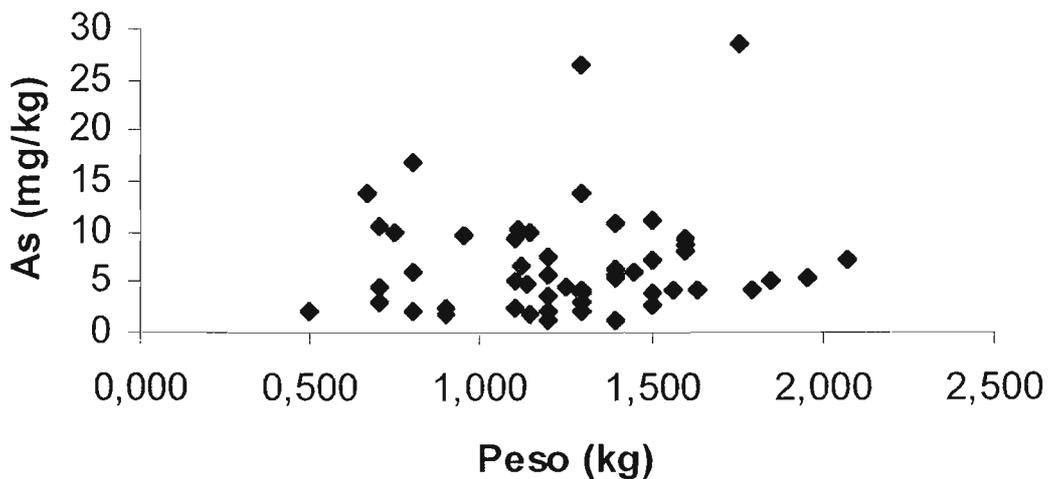


Figura 13 Dispersão dos níveis de As (mg/kg) em amostras de polvo *in natura*, comercializados na Baixada Santista, relacionados ao peso (kg).

Para as concentrações de Pb o fator “elo de comercialização” mostrou-se significativamente distinto ($p < 0,01$). Aplicando-se, *à posteriori*, o teste de Scheffé observou-se diferença estatística significativa entre os elos entreposto/indústria, entreposto/peixarias e entreposto/feira livre. Tal fato pode ser melhor observado na Tabela 15. Contudo, salienta-se que para o elo feira livre os resultados (desvio padrão mais elevado que média) podem estar influenciados pelo baixo número amostral.

Tabela 15. Média, desvio padrão de concentrações de Pb (mg/kg) em polvo *in natura* nos diferentes elos da cadeia de comercialização na Baixada Santista.

Elos de comercialização	Média e desvio padrão de Pb (mg/kg)	Número de amostras analisadas
Entrepasto	211,28 ± 34,27	11
Indústria	52,58 ± 40,30	11
Supermercado	113,44 ± 31,22	12
Peixarias	63,05 ± 32,246	16
Feiras livres	34,19 ± 55,87	4

Conforme mencionado anteriormente, observa-se na presente pesquisa que as concentrações de As variaram de 1,256 a 28,502 mg/kg de polvo *in natura*, sendo estes valores superiores a 1,0 mg/kg, valor permitido pela legislação brasileira (ANVISA, 1998).

Essas concentrações estão de acima das encontradas por LIU et al., (2006) que ao estudarem a contaminação de ostras em quatro pontos de amostragem em Taiwan obtiveram, no decorrer de um ano, médias de As totais de 4,22 a 22,90 mg/kg de ostra. Estes autores realizaram a especificação do arsênio determinando as seguintes concentrações máximas e mínimas para As(V) de 0,032 a 0,062 mg/kg, As (III) de 0,071 a 0,145 mg/kg, monometilarsênio (MMA) de 0,050 a 0,106 mg/kg e dimetilarsênio (DMA) de 0,272 a 0,480 mg/kg. ARGESE *et al.* (2005) ao analisarem compostos de As em *Mytilus galloprovincialis* em diferentes pontos do lago Venice na Itália determinaram as seguintes concentrações em matéria seca para As(III) 1,5 mg/kg, As (V) 1,5 mg/kg, DMA 0,25 a 1,6 mg/kg, arsenobetaina (AB) 4,5 a 14,6

mg/kg, arsenocolina (AC) 0,14 a 0,50 mg/kg e MMA menores que o limite de detecção.

Tanto LIU et al., (2006) como ARGESE *et al.* (2005) ressaltam a importância da especiação do As para a determinação do risco potencial a saúde do consumidor, pois como já dito anteriormente a toxicidade do As depende a sua forma.

Já no estudo realizado por MÖLLERKE et al, 2003 no lago Guaíba em Porto Alegre a média encontrada em Piavas e Pintados foi de 0,14 mg de As/kg.

FERREIRA; MACHADO; ZALMON (2005), em estudo realizado em praias do Estado do Rio de Janeiro, que detectaram as seguintes concentrações médias ($\mu\text{g/g}$ em peso seco) de elementos tóxicos em ostra (*Ostrea equestris*): Cd 0,8; Cr 0,4; Cu 58; Fe 249; Mn 11; Ni 0,55; Pb 0,13 e Zn 1131.

CURTIUS; SEIBERT; FIIELDLER (2003) estudando ostras e mexilhões obtiveram valores máximos na matéria seca de As 15,2 $\mu\text{g/g}$, Cd 0,9 $\mu\text{g/g}$, Hg 0,17 $\mu\text{g/g}$, e Pb 0,6 $\mu\text{g/g}$.

Estudando outras espécies marinhas, CARVALHO *et al.* (2000) observaram que Cd, Mn, Ni e Pb apresentaram concentração abaixo do limite de detecção, enquanto Cu, Zn, Cr, Fe, e Al apresentaram concentrações abaixo do máximo permitido para consumo humano pelo Ministério da Saúde do Brasil. Já o Fe e Al apresentaram distribuição muito semelhante entre as famílias estudadas, tendo porém apresentado concentrações elevadas na raia-viola (*Zapteryx brevirostris*), provavelmente relacionado a diferenças no metabolismo desta espécie.

No presente trabalho as análises de As total em polvos indicam uma contaminação excessiva destes metais, ou seja, acima do valor estabelecido pela legislação vigente e, em tese, seriam inapropriadas para consumo. No entanto, ao se avaliar o risco associado à ingestão de um determinado componente da dieta, há que se considerar a frequência com que este componente é ingerido. De acordo com o IBGE - Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística – edição 2003 a ingestão de peixes predadores pela população brasileira e levando em consideração os dados do sobre a “aquisição alimentar domiciliar per capita anual” o consumo de polvo no Brasil

não é sequer considerado, o que dificulta o processo de avaliação do risco.

6. Conclusões

A presente pesquisa, através de seus resultados e discussão permite concluir que:

- A diversidade de formas de manipulação do polvo, muitas vezes inadequada, desde o momento de sua captura, passando pelos diferentes elos de comercialização, propicia a instalação dos processos de deterioração microbiológicos e físico-químicos.
- 77,6% e 33,8% das amostras que apresentaram populações de aeróbios psicrotróficos e mesófilos, respectivamente, acima de 10^6 UFC/animal, indicadores dos processos de deterioração do polvo nos diferentes elos de comercialização.
- A dispersão dos resultados de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e coliformes totais indica que em alguns pontos amostrados, dentro de cada elo, ocorreram deficiência nos cuidados higiênicos, propiciando a contaminação e/ou multiplicação destes microrganismos.
- Foram constatados microrganismos patogênicos como *Salmonella* e *L.monocytogenes* em 6,6% e 12,4%, das amostras, respectivamente.
- Das 82 amostras analisadas físico-quimicamente, apenas 12 (14,6%) estariam aptas para o consumo de acordo com o RIISPOA (BRASIL, 1952) evidenciando que mesmo sob congelamento a -20°C , os processos de deterioração tem prosseguimento, ainda que lento, limitando a vida de prateleira deste produto.
- As metodologias empregadas para as análises de As, Cd, Hg e Pb se mostraram eficientes como indica a validação metodológica realizada.
- Os níveis de As totais foram superiores ao que permite a legislação brasileira em 100% das amostras estudadas.
- Apesar de apresentar concentrações inferiores as permitidas pela legislação brasileira o Pb mostrou diferença estatística significativa entre os elos da cadeia produtiva.

- O presente estudo evidencia a importância dos ensaios físico-químicos, microbiológicos e de metais pesados na avaliação da qualidade do polvo para consumo humano.

- **7. Recomendação**

Uma vez que os teores de arsênio em polvo se mostraram acima do recomendado pela legislação brasileira, recomenda-se a especificação deste metal visando estabelecer a porcentagem das espécies arseniais nocivas neste tipo de alimento.

8. Referências bibliográficas

1. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for lead**. Atlanta. ATSDR, 1999 Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov>. Acesso em 15 abr. 2003.
2. AHMED, F.E., ed. **Seafood safety**. Washington: National Academy Press, 1991. 432p. [Committee on Evaluation on the Safety of Fishery Products, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine].
3. ALICE WEB DESENVOLVIMENTO. In: BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior. 2008. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> Acesso em: 22 nov. 2008.
4. ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. Salmonella. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.37, p.357-380.
5. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.685, de 27 de agosto de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=90&word=>. Acesso em: 22 nov. 2008.
6. ARGESE, E., BETTIOL, C., RIGO, C., BERTINI, S. COLOMBAN, S. GHETTI, P.F. Distribution of arsenic compounds in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice Lagoon (Italy). **Science of the Total Environment** v.358, p. 267-277, 2005
7. ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Review Food Science Nutrition**, v.36, n.1/2, p.87-121, 1996.
8. ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease. **Draft toxicological profile for cadmium**. p.512, 2008. in: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf> Acesso em 02 jun 2009

9. ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.H.; FAGUNDES, L. Sistema gerenciador de banco de dados de controle estatístico de produção pesqueira marinha – ProPesq. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 11, CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA, 1, Recife, 1999. **Anais**. Recife, 1999. v.2, p.824-832.
10. AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos: Rima, 2003. 272p.
11. AZEVEDO, F.A.; NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A.A.M. Mercúrio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais**: gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.11, p.299–352.
12. BALDWIN, J.; ENGLAND, W.R. A comparison of anaerobic energy metabolism in mantle and tentacle muscle of the blue-ringed octopus *Hapalochlaema maculosa*, during swimming. **Australian Journal of Zoology**, v.28, p.407-412, 1980.
13. BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P. Processamento e industrialização de moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO, Campinas, 2000. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p.38-84.
14. BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GLOTIEB, S.L.D. **Bioestatística**. 2.ed. São Paulo: EPU, 1981. 350p.
15. BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review, **Chemosphere**, v.40, n.12, p.1335-1351, 2000.
16. BONNELL, A.D. Raw material quality. In: _____. **Quality assurance in seafood processing**: a practical guide. New York: Chapman & Hall, 1994. p.55-76.
17. BOTTA, J.R.; LAUDER, J.T.; JEWER, M.A. Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVB-N) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal Food Science**, v.49, p.734-736, 1984.

18. BOTTA, J.R. **Evaluation of seafood freshness quality**. New York: VCH Publishers, 1995. 180p. (Food science and technology).
19. BRAGA, E.S. **Bioquímica marinha e efeitos da poluição nos processos bioquímicos**. 2.ed. São Paulo: FUNDESPA, 2002. 108p.
20. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. SisLegis. **Decreto n.30.691, de 29 de março de 1952**. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=14974>. Acesso em: 24 jan. 2008.
21. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: Métodos físicos e químicos**. Brasília, 1981. Cap 1, P2; carne Bovina "in natura"
22. BRASIL. IBGE – Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Tabela 2393 - Aquisição alimentar domiciliar "per capita" anual por grupos, subgrupos e produtos. Ano 2003. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=13&i=P>. Acesso em 8 julho 2009.
23. BRISBIN, J.A.; BHYMER, C.; CARUSO, J.A A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts. **Talanta**, v. 58, p. 133–145, 2002.
24. BOYLE, P.R., ed. **Cephalopod life cycles**. London, New York: Academic Press, 1983. 474p. v.1 - Species account].
25. CAMARGO, J.A. Contribution of Spanish-American silver mines. **Chemosphere**, v.48, p.51-57, 2002.
26. CARDOSO, L.M.N.; CHASIN, A.A.M. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. Série cadernos de referência ambiental, v.6, Salvador, Centro de recursos Ambientais, CRA, 2001. Disponível em <http://www.seia.ba.gov.br/v3/busca/index.cfmcritério=cadmio> Acesso em 12/10/2006. Salvador, CRA, v.6, 122p, 2001.

27. CARNEIRO, M.R.P.; VIANA, C.M. Avaliação da qualidade bacteriológica em moluscos bivalves marinhos de grande consumo em Aracajú. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, Águas de Lindóia, 1998. **Resumos**. Águas de Lindóia, 1998. p.84.
28. CARVALHO, E.M.R.; VASCONCELOS, R.F.; VIEIRA, R.H.S.F. Vibrios, coliformes totais e termotolerantes na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* e na água do estuário do rio Jaguaribe, Fortim, CE, Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 20, Rio de Janeiro, 2007. **Anais**. Rio de Janeiro, 2007. p.334.
29. CARVALHO, C.E.V.; FARIA, V.V.; CAVALCANTE, M.P.O.; GOMES, M.P.; REZENDE, C.E. Distribuição de elementos tóxicos em peixes costeiros bentônicos da região de Macaé, R.J., Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v.3, n.2, p.64-68, 2000.
30. CASERIO, G.; GRONCHI, C.; VILLA, C. Listeria in meat, fish, poultry, stuffed pastries and vegetables. **Industrie-Alimentari**, v.28, p.250-253, 1989.
31. CASTELL, C.H.; NEAL, W.; SMITH, B. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.28, n.1, p.1-5, 1971.
32. CATO, J.C. **Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood: Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programmes**. Rome: FAO, 1998. 70p. (FAO Fisheries Technical Paper, n.381). Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/003/x0465e/X0465E01.htm>. Acesso em: 01 ago. 2004.
33. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Estabelecimento de padrões de referência de qualidade e valores de intervenção para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Relatório parcial. Relatório Técnico CETESB 110p. 1997.
34. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. Relatório Técnico CETESB 178p. 2001.
35. CODEX ALIMENTARIUS, Código de Prácticas para la Prevención y Reducción de la Presencia de Plomo em los Alimentos, CAC/RCP 56-2004. in:

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10099/CXC_056_2004s.pdf Acesso em: 22 abr 2005

36. CODEX ALIMENTÁRIUS. **Código Internacional de practicas recomendado: principios generales de higiene de los alimentos.** (CAC/RCP 1-1969) Revisado em abr. 2003. Disponível em: <http://www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/artigocomp3e428-04-05.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2005.
37. CODEX ALIMENTÁRIUS. Código Internacional Recomendado para los Cephalopods (CAC/RCP) 37, 1989. in: Acesso em: 22 abr 2005
38. COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.13, p.159-166.
39. CURRIE, L.A Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Analytical Chemistry. Acta**, v.391, p.127-134, 1998.
40. CURTIUS, A. J., SEIBERT, E.L., FIELDLER, H.D. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura. Resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Química Nova**, v.26, n.1, p.44-52, 2003
41. DENOBILE, M. **Estudo da ocorrência de compostos arseniais, mercuriais e selênio em cações comercializados na cidade de São Paulo.** São Paulo, 2007. 150 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
42. DILLON, R.; PATEL, T.; RATMAN, S. Prevalence of Listeria in smoked fish. **Journal of Food Protection.** n.55, p.866–870, 1992.
43. DILLON, R.; PATEL, T.; RATMAN, S. Occurrence of Listeria in hot and cold smoked seafood products. **International Journal of Food Microbiology.**, n.22, p.73–77, 1994.
44. DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in shrimp processing plant. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.705-711, 1996.

45. DORNELLES, P.R.; LAILSON-BRITO Jr., J.; MALM, O. A transferência de cádmio de cefalópodes para cetáceos: uma revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.7, n.1, p.3-9, 2007.
46. DUGO, G.; LA PERA, L.; BRUZZESE, A.; PELLICANO, T.M.; LO TURCO, V. Concentration of Cd (II), Cu (II), Pb (II), Se (IV) and Zn (II) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissues from yrrhenian sea and Sicilian sea by derivative stripping potentiometry. **Food Control**, v.17, p.146-152, 2006.
47. DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; O'SULLIVAN, M.G.; GUILLET, A.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. **Food Microbiology**, v.16, p.623-631, 1999.
48. DURAL, M.; GÖKSU, M.Z.L.; ÖZAK, A.A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food Chemistry**, v.102, p.415-421, 2007.
49. EHIRA, S.; UCHIYAMA, H. Determination of fish freshness using the K -value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In: KRAMER, D.E.; LISTON, J., eds. **Seafood quality determination**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.185-207. [International Symposium on Seafood Quality Determination, Anchorage, Alaska, 1986).
50. EMBRAPA. EMBRAPA Meio Ambiente. **A aquicultura e atividade pesqueira**. 2004. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic:::27>. Acesso em: 12 out. 2007.
51. EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 652p.
52. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF)**. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/food/food/rapidalert/reports/week45-2003_en.pdf. Acesso em: 01 ago. 2004.

53. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF):** Annual Report, 2003. 32p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2003_en.pdf. Acesso em: 30 nov. 2008.
54. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF):** Annual Report, 2004. 38p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2004_en.pdf. Acesso em: 30 nov. 2008.
55. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF):** Annual Report, 2005. 40p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf. Acesso em: 30 nov. 2008.
56. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF):** Annual Report, 2006. 72p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf. Acesso em: 30 nov. 2008.
57. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The rapid alert system for food and feed (RASFF):** Annual Report, 2007. 70p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2007_en.pdf. Acesso em: 30 nov. 2008.
58. FALCÃO, P.T.; LESSI, E.; LEITÃO, F.F. Deterioração do Jaraqui (*Semaprochilodus insignis*, Schomburgk, 1841), capturado no Estado do Amazonas e conservado em gelo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.14, n.2, p.168-177, 1994.
59. FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.53, n.3, p.476-511, 1991.
60. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and Aquaculture 2006.** Rome: FAO Fisheries and Agriculture Department, 2007a. 180p. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=topic&fid=16000>. Acesso em: 16 out. 2007.

21. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fish and fishery products: world apparent consumption statistics based on food balance sheets**. Rome, 2007b, 429p. (FAO Fisheries Circular, n.821, rev.8). Disponível em: <http://www.fao.org/fi/website/FIR>. Acesso em: 16 out. 2007.
22. FARIAS, L.A. **Avaliação do conteúdo de mercúrio, metilmercúrio e outros elementos de interesse em peixes e em amostras de cabelos e dietas de pré-escolares da região Amazônica**. Tese (Doutorado) São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2006.
23. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne Pathogenic Microorganism and Natural Toxins Handbook "Bad Bug Book"**. Center for Food Safety & Applied Nutrition, March, 1999. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/factors.html>. Acessado em 17 mai 2001
4. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.. Guidance document for arsenic in shellfish. Washington, D.C.7 U.S. Food and Drug Administration; 1993. p. 25–7.
25. FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v.2, p.1651-1660, 2000.
26. FERREIRA, A.G.; MACHADO, A.L.S.; ZALMON, I.R. Variação temporal e espacial da concentração de elementos tóxicos na ostra *Ostrea equestris* na costa norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v.65, n.1, p.67-76, 2005.
27. FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; RÁCZ, M.L.B.O.; MARTINEZ, M.B.; CAMPOS, L.C.; GOMPERTZ, O.F., eds. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.329-338.
28. FISHER, L.D.; VAN BELLE, G. **Biostatistics: a methodology for the health sciences**. New York: Wiley, 1993. 991p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics).
29. FLETCHER, G.C.; ROGERS, M.L.; WONG, R.J. Survey of *Listeria monocytogenes* in New Zealand seafood. **Journal of Aquatic Food Product** v.3, p.13-24, 1994
30. FONTES, M.C.; ESTEVES, A.; CALDEIRA, F.; SARAIVA, C.; VIEIRA-PINTO, M.; MARTINS, C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1308-1315, 2007.

71. FORAN, J.A. Toxic substances in surface waters. **Environm.Sci. Technol.**, v.24, p.604-608, 1990.
72. FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424p.
73. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
74. FRASER, D.J.; PITTS, D.P.; DYER, W.J. Nucleotide degradation and organoleptic quality in fresh and thawed mackerel muscle held at and above ice temperature. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v.25, n.2, p.239-253, 1968.
75. FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.
76. FUCHS, R.S.; SURENDRAN, P.K. Incidence of listeria in tropical fish and fishery products. **Lett. Appl. Microbiology** v.9, p.49-51, 1989.
77. GALVÃO, L.A., COREY, G. Mercúrio. Metepec, México: ECO – Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/OPS/OMS, 82p **Série Vigilância**, n.7, 1987.
78. GASPAR Jr., J.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; TAPIA, M.S.R. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira da Gentilândia, Fortaleza – CE. **Higiene Alimentar**, v.11, n.51, p.20-23, 1997.
78. GOYER, R.A.; CLARKSON, T.W. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D., ed. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6.ed. New York: MacGraw-Hill, 2001. cap.23, p.811-867.
79. GRAM, L.; HUSS, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.121-137, 1996.

80. GRAM, L.; HUSS, H.H, Fresh and processed fish and shellfish. In: LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, A.C.; GOULD, G.W., eds. **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p.472–506.
81. GRAY, J.I.; PEARSON, A.M. Rancidity and warmed-over flavour. **Advances in Meat Research**, v.3, p.221-269, 1987.
82. GUIMARÃES, J.R.D.; LACERDA, L.D.; TEIXEIRA, V.L. Concentração de elementos tóxicos em algas bentônicas da Baía da Ribeira, Angra dos Reis: com sugestão de espécies monitoras. **Revista Brasileira de Biologia.**, v.42, p.553-557, 1982.
83. HADJICHRISTODOULOU, C.; NIKOLAKOPOULOU, E.; KARABINIS, K.; KARAKOU, E.; MARKOGIANNAKIS, A.; PANOULIS, C.; LAMPIRI, M.; TASSIOS, P. Outbreak of salmonella gastroenteritis among attendees of a restaurant opening in grece, june 1998. **Eurosurveillance Monthly Release**, v.4, n.6, art.4, 1999. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/em/v04n06/0406-224.asp>. Acesso em: 09 ago. 2004.
84. HEINRICH-RAMM, R.; MINDT-PRÜFERT, S.; SZADKOWSKI, D. Arsenic species excretion after controlled seafood consumption. **Journal of Chromatography B**. v.778, p.263–273, 2002.
85. HILLING, F.; SHELTON, Jr., L.R.; LOUCHERY, J.N.; FITZGERALD, B.F. Chemical indices of decomposition in flounder. **Journal Association Official Agriculture Chemistry**, v.43, p.755-759, 1960.
86. HILTZ, D.F.; DYER, W.J.; NOWLAN, S.; DINGLE, J.R. Processing, handling and environmental factors, species differences and freezing effects with regard to applicability of various nucleotide degradation quality indices. In: FAO CONFERENCE ON FISH INSPECTION AND QUALITY CONTROL, 1, Halifax, 1969. **Working Papers**. Halifax, 1969. 9p.
87. HIRATA, S.; TOSHIMITSU, H. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC–ICP–MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.383, p.454–460, 2005.
88. HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Department of Health & Human Services. Food and Drug Administration. Food. Science

89. Research. More Science Research. Laboratory Methods. **Bacteriological analytical manual**. cap.10. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>. Acesso em: 23 out 2007.
90. HOBBS, B.C.; GILBERT, R.J. **Higiene y toxicologia de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1986. p.80.
91. HUGHES, R.B. Herring (*Clupea harengus*). I. Trimethylamine oxide and volatile amines in fresh, spoiling and cooked herring flesh. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.431-436, 1959.
92. HUITEMA, B.E. **The analysis of Covariance and Alternatives**. J. Wiley & Sons, New York, 445p. 1980.
93. HYLANDER, L. D., MEILI, M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. **Science of the Total Environment**, v.304, p.13-27, 2003.
94. IBAMA. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2008. 174p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/>. Acesso em: 04 nov. 2008.
95. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food), 1996. **Microorganisms in Food 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, London.
96. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. (IAEA) **Practical aspects of operating a neutron activation analysis laboratory**. Vienna: 1990, (IAEA – TECDOC-564)
97. ITO, Y.; SANCHES, L.; CARNEIRO, D.S. Seasonal variation of the chemical composition of sardine. **Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico. Tecnologia**, v.6, p.1-8,1969.
98. JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

99. JONES, N.R.; MURRAY, J.; LIVINGSTONE, E.E. Rapid estimation of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.15, p.763, 1964.
100. JOYEUX, J.C.; CAMPANHA-FILHO, E.A.; JESUS, H.C. Trace Metal Contamination in Estuarine Fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n. 5, p. 765-774, 2004.
101. KEHRIG, H.A.; COSTA, M.; MOREIRA, I. MALM, O. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Marine Pollution Bulletin**, v.44, p.1018-1023, 2002.
102. KELLEHER, S.D.; HULTIN, H.O.; WILHELM, K.A. Stability of mackerel surimi prepared under lipid-stabilizing processing condition. **Journal of Food Science**, v.59, n.2, p.269-271, 1994.
103. KOH, J.; KWON, Y.; PAK, Y.N. Separation and sensitive determination of arsenic species (As³⁺/As⁵⁺) using the yeast-immobilized column and hydride generation in ICP–AES. **Microchemical Journal**, v.80, p.195-199, 2005.
104. KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.8, p.69-82.
105. KOROPATNICK, J., ZALUPS, R.K. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n.5, p.797-806, 1997.
106. LACERDA, L. D., PARAQUETTI, H. H. M., MARINS, R. V., REZENDE, C. E., ZALMON, I. R., GOMES, M. P., FARIAS, V. Mercury content in shark species from the South-Eastern Brazilian coast. **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n.4, p.571-576, 2000.
107. LANCETTE, G.A.; BENETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.387-400.

108. LEIST, M., CASEY, R.J., CARIDI, D. The management of arsenic wastes: problems and prospects. **Journal of Hazardous Materials**, v.76, p.125-138, 2000.
109. LEVINE, K.E.; LEVINE, M.A.; WEBER, F.X.; HENDERSON, J.P.; GROHSE, P.M. Mercury in an assortment of processed and unprocessed seafood samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.74, p.973-979, 2005.
110. LEWIS, G.P., COUGHLIN, L., JUSKO, W., HARTZ, S. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. **Lancet**. v.1, p.291-92, 1972.
111. LIAO, C.M.; LING, M.P. Assessment of Human Health Risks for Arsenic Bioaccumulation in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Large-Scale Mullet (*Liza macrolepis*) from Blackfoot Disease Area in Taiwan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.45, p.264-272, 2003.
112. LIMA JUNIOR, R.G.S.; ARAÚJO, F.G.; MAIA, M.F.; PINTO, A.S.S.B. Evaluation of Heavy Metals in Fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**. v. 89, p.171-179, 2002.
113. LIMA, F.C.; OLIVEIRA, L.T. Enumeração e identificação de coliformes fecais e *Escherichia coli* em lulas frescas comercializadas no município de Niterói – RJ. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.23-27, 1992.
114. LIN, C.J.; PEHKONEN, S.O. The chemistry of atmospheric mercury: a review. **Atmospheric Environment**, v.33, p.2067-2079, 1999.
115. LIN, T.H.; HUANG, Y.L.; WANG, M.Y. Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot disease. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.53, n.2, p.85-93, 1998.
116. LIU, C.W.; LIANG, C.P.; HUANG, F.M.; HSUEH, Y.M. Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. **Science of the Total Environment**, v.361, n.1/3, p.57-66, 2006.
117. LOUGOVOIS, V.P. KOLOVOU, M.K. SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Spoilage potential of ice-stored whole musky octopus (*Eledone moschata*) **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1286-1294, 2008.

118. LUNDE, G. Analysis of arsenic and selenium in marine raw material. **Journal of the Science of Food and Agriculture.**, v.21, n.5, p.242-247, 1970.
119. MACHADO, I.; MAIO, F.D.; KIRA, C.S.; CARVALHO, M.F.H. E. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cananéia- SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n.1, p. 13-18, 2002.
120. MACKAY, D.; CLARCK, K.E. Predicting the environmental partitioning of organic contaminants and their transfer to biota. In: JONES, K.C., ed. **Organic contaminants in the environment: environmental pathways & effects**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1991. 254p. (Environmental Management Series).
121. MANDAL, B.K.; SUZUKI, K.T. Arsenic around the world: a review. **Talanta**. v.58, p.201-235, 2002.
122. MANILA TIMES. US ban on RP octopus rattles local exporters. Disponível em: <http://www.manilatimes.net/national/2004/jul/03>. Acesso em: 14 ago. 2004
23. MANTOVANI, D.M.B. Contaminantes inorgânicos na cadeia produtiva do Pescado. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO: QUALIDADE E SUSTENTABILIDADE, 1, São Vicente, 2005. **Anais**. São Vicente: Instituto de Pesca, 2005. 1 CD-ROM.
24. MARINS, R.V.; PAULA FILHO, F.J.; MAIA, S.R.R.; LACERDA, L.D.; MARQUES, W.S. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira **Química Nova**, v.27, n.5, p.763-770, 2004.
125. MÁRSICO, E.T.; SANTOS, N.N.; SÃO CLEMENTE, S.C.; ZAMBORLINI, L.C. Determinação do teor de mercúrio em camarões (*Penaeus notialis* e *Penaeus schmitti*) coletados nas baías de Guanabara e de Sepetiba, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, n.6, p.240-245, 1999.
126. MAVROPOLUS, E. **A hidroxipatita como removedora de chumbo**. Rio de Janeiro, 1999. 126p. Tese de Mestrado – Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ
128. MENDEZ, M.H.M. **Evolução das bases voláteis totais e da trimetilamina em pescados e o seu uso como indicador de qualidade**. São Paulo, 1974. 63p. Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

129. MOHAMED HATHA, A.A.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of Salmonella in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, v.14, n.2, p.111-116, 1997.
130. MOLLERKE, R.O.; NOLL, I.B.; SANTO, M.A.B.E.; NORTE, D.M. Níveis de arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do Lago Guaíba em Porto Alegre RS – Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.117-121, 2003.
131. MONTEIRO-NETO, C.; ITAVO, R.V.; MORAES, L.E.S. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceará, northeast Brazil. **Environmental Pollution**, v. 123, p.319–324, 2003.
132. MONTVILLE, T., MATTHEWS, K.R. **Food Microbiology an introduction**. Spoilage Organisms, 2. ed. Cap. 20, p.271-299, 2008.
133. MORALES-AIZPURUA, I. C.; TENUTA-FILHO, A.; SAKUMA, A. M. ; ZENEBON, O. Total mercury contents in shark species commercialized in São Paulo-SP, Brazil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.3, p.429-432, 1999.
134. MOORE, C.J. **A review of mercury in the environment** (its occurrence in marine fish). S.I.: South Carolina Department of Natural Resources, Marine Resources Division, Office of Environmental Management, Office of environmental management 2002. 22p. Disponível em: http://www.dnr.sc.gov/marine/img/mm_paper.pdf. Acesso em: 15 jan. 2007.
135. MORTON, D.R. Aerobic plate count. In: DOWLES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.63-67.
136. MOTES, Jr., M.L. Incidence of *Listeria* spp. in shrimp, oysters and estuarine waters. **Journal of Food Protection**, v.54, n.3, p.170-173, 1991.
137. NORMANDE, A.C.L.; ALENCAR, A.N.; BEZERRA, A.R. Caracterização higiênico-sanitária de sururu (*Mytella charruana*) in natura e beneficiado proveniente da Lagoa Mundaú, Maceió – AL. **Boletim de Estudos de Ciências do Mar**, v.6, p.105-106. 1998.

138. NUNES, L.M.; BATISTA, I.; CAMPOS, R.M. Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. **Journal Science Food Agricultural**, v.59, p.37-43, 1992.
139. OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de pesca**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430p. [v.1 - Ciência e tecnologia do pescado].
140. ÒLASFSDÓTTIR, G., MARTINSDÓTTIR, E., OEHLENSCHLAGER, J., DALGAARD, P., JENSEN, B., NIELSEN, J., NILSEN, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**. v.8, p.258-264, 1997.
141. PAOLIELLO, M.M.B., CHASIN, A.A.M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos** – Série cadernos de referência ambiental, v.3, Salvador, Centro de recursos Ambientais, CRA, 2001. Disponível em <http://www.seia.ba.gov.br/v3/busca/index.cfmcritério=chumbo> Acesso em 12/10/2006.
142. PAPADOPOULOU, C.; ECONOMOU, E.; ZAKAS, G.; SALAMOURA, C.; DONTOROU, C.; APOSTOULOU, J. Microbiological and pathogenic contaminants of seafood in Greece. **Journal of Food Quality**, v.30, n.1, p.28–42, 2007.
143. PARRY, S. **Handbook of Neutron Activation Analysis**. UK – Viridian Publishing, 2003.
144. PEREIRA, A.A.F.; TENUTA-FILHO, A. Avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.720-725, 2005.
145. PEREZ, J.A.A.; PEZZUTO, P.R.; LUCATO, S.H.B.; VALE, W.G. Frota de arrasto de Santa Catarina. In: CERGOLE, M.C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.B., coords. **Dinâmica das frotas pesqueiras: análise das principais pescarias comerciais do sudeste-sul do Brasil**. São Paulo: Evoluir, 2003. p.117-186.
146. PIZARRO, I.; GÓMEZ, M.; CÁMARA, C.; PALACIOS, M. A. Arsenic speciation in environmental and biological samples. Extraction and stability studies. **Analytica Chimica Acta.**, v.495, p.89-96, 2003.
147. POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, M.; COLWELL, R.R.; CORMIER, M. Retencion of enteropathogenicity by viable but

nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4621-4626, 1996.

148. RAY, B. **Fundamental food microbiology**: spoilage of specific food groups. Boca Raton: CRC PRESS, 1996. cap.18, p.213-231.
149. RIBA, I.; BLASCO, J.; JIMENEZ-TENORI, N.; DESVALLS, T.A. Heavy metal bioavailability and effects. I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). **Chemosphere**, v.58, p.659-669, 2005.
150. RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Presença de microorganismos contaminantes e patogênicos em pintado (*Pimelobus claria*), comercializados no Mercado Público de Porto Alegre – RS. **A Hora Veterinária**, v.15, n.126, p.53-57, 2002.
151. ROMAN, T.R.N., LIMA, E.G.; AZOUBEL, R.; BATIGÁLIA, F. Toxicidade do cádmio no homem. **HB Científica**. v.9, n.1, p.43-48, 2002.
152. RORVIK, L.M.; CAUGANT, D.A.; YNDESTAD, M. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. **International Journal of Food Microbiology**. n.25, p.19-27, 1995.
153. SAKUMA, A.M.; CAPITANI, E.M.; TIGLEA, P. Arsênio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais**: gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.8, p.203-238.
154. SANTOS, P.C.R.F.; OLIVEIRA, L.A.T.; MESQUITA, E.F.M.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Número mais provável (NMP) de coliformes fecais (*E. coli*) na avaliação do tempo de espera entre descarregamento e o tratamento térmico de mexilhões comercializados no município de Niterói – Estado do Rio de Janeiro – Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, n.2, p.89-92, 2002.
155. SÃO PAULO. Secretaria da Saúde. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.

56. SCHROEDER, W.H.; MUNTHE, J. Atmospheric mercury: an overview. **Atmospheric Environment**, v.32, p.809-822, 1998.
57. SEIXAS, B.A.; PINHEIRO, T.; REIS, C.S. Lead in Octopus (*Octopus vulgaris*) in Portugal: a preliminary study. **Bulletin of Marine Science**, v.71, n.2, p.1091–1093, 2002.
58. SEMMLER, M., G., M., C. **Biomonitoração de Hg, Cd, Pb, e outros elementos em áreas costeiras do estado de São Paulo por meio do mexilhão transplantado *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)**. São Paulo, 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo São Paulo.
59. SHERLOCK, J.C. Cadmium in foods and the diet. **Experientia** v.40, p.152-156, 1984.
60. SILVA, M.C.D.; NORMANDE, A.C.L.; FERREIRA, M.V.; RAMALHO, L.S. Avaliação da qualidade microbiológica de pescado comercializado em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.60-64, 2002.
61. SILVA, B.C. Chumbo. **Balanço Mineral Brasileiro**, 19 p., 2001.
62. SILVA, C.A.R.; RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D.; SANTOS, Z.L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**. v.35, n. 17, p. 4072–4078, 2001.
63. SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS, R. F. S., GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. Livraria Varela , 3^a ed . 536p 2007.
64. SING, R. Direct sample insertion for inductively coupled plasma spectrometry. **Spectrochim. Acta, Part B**, v.54, p.411-441, 1999.
65. SIQUEIRA, G.W. **Estudo dos teores de metais pesados e outros elementos em sedimentos superficiais do sistema estuarino de Santos (Baixada Santista, SP) e da plataforma continental do Amazonas (margem Continental Norte)**. São Paulo, 2003. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico – Universidade de São paulo, São Paulo.

166. SLOTH, J.J.; JULSHAMN, K.; LUNDEBYE, A.K. Total arsenic and inorganic arsenic content in Norwegian fish feed products. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.61-66, 2005.
167. SOTO, S.M.; GUERRA, B.; DEL CERRO, A.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **Internastional Journal of Microbiology**, n.71, p.35-43, 2001.
168. SWIFT, J.A. Morphology and histochemistry of human hair **EXS.**, v.78, p.149-175, 1997.
169. TARLEY, C.R.T.; COLTRO, W.K.T.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Characteristic Levels of Some Heavy Metals from Brazilian Canned Sardines (*Sardinella brasiliensis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.611-617, 2001.
170. THOMPSON, R.R. Disk electrophoresis method for the identification of fish species. **J. Ass. Offic. Agr. Chem.**, 50, n.2, p.282-285, 1967.
171. TOLEDO, M.R.F, FONTES,C.F.,TRABULSI, L. R. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, uréase e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v.13, n.4, p.309-315, 1982a.
172. TOLEDO, M.R.F, FONTES,C.F.,TRABULSI, L. R. MILI– um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.13, n.4, p.309-315, 1982b.
173. TOMÁS, A.R.G.; CORDEIRO, R.A. Dinâmica da frota de arrasto de portas do Estado do Rio de Janeiro. In: CERGOLÉ, M.C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.B., coords. **Dinâmica das frotas pesqueiras: análise das principais pescarias comerciais do sudeste-sul do Brasil**. São Paulo: Evoluir, 2003. p.15-38.
174. TOMÁS, A.R.G.; GASALLA, M.L.A.; CARNEIRO, M.H. Dinâmica da frota de arrasto de portas do Estado de São Paulo. In: CERGOLÉ, M.C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C.L.B., coords. **Dinâmica das frotas pesqueiras: análise das principais pescarias comerciais do sudeste-sul do Brasil**. São Paulo: Evoluir, 2003. p.39-64.
175. TRIPATHI, R.M; RAGHUNATH, R.; KRISHNAMOORTHY, T.M. Arsenic intake by the adult population in Bombay City. **Science of the Total Environment**, v.208, p.89-95, 1997.

76. UEMURA T. Experimental reproduction of "Itai-itai" disease: a chronic cadmium poisoning of humans in rats and monkeys. **American Journal Veterinary Research**. v.48, n.1, p.15-28, 2000.
77. VALENCIA, M.E.; SANAHUJA, J.C. Indices de calidad en *pescados* y productos de la pesca. I. **Pescados enfriados**. **Anales de Bromatologia**, v.21, n.1, p.45-58, 1969.
78. VARGA, S.; ANDERSON, G.W. Significance of coliforms and enterococci in fish products. **Applied Microbiology**, v.16, n.2, p.193-196, 1968.
179. VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; BARBOSA, A. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. **Aquaculture**, v.238, n.1/4, p.221-238, 2004.
180. VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Occurrence of *Listeria* spp. in salmon trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmon (*Salmo salar*). **Food Science and Technology International**, n.4, p.121-125, 1998.
181. VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **Journal of Microbiological Methods**, n.40, p.147-151, 2000.
182. VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380p.
183. VINCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.
184. VYNCKE, W.; LUTEN, J.; BRUNNER, K.; MOERMANS, R. Determination of total volatile bases in fish: a collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v.184, p.110-114, 1987.
185. WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. **Journal Inorganic Biochemistry** v.79, n.1-4 p. 241-244, 2000.
186. WATANABE, K. Physical characteristics and chemical composition of lake kariba. **Fisheries Research. Bulletin**, v.5, p.163-173, 1971.

187. WEAGENT, S.D.; SADO, P.N.; COLLURN, K.C.; TORKELSON, J.D.; STANLEY, F.A.; KRANE, M.H.; SHIELDA, S.C.; THAYER, C.F. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. **Journal of Food Protection**, v.51, p.655-657, 1988.
188. WIEFELS, R. **Consumer requirements for supply from sustainable resources**: report of the Expert Consultation on International Fish Trade, Roma: FAO, 2004. (FAO Fisheries Report, n.744). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5767e/y5767e00.HTM>. Acesso em 15/10/2007. Acesso em: 15 out. 2007.
189. WIEFELS, R. El desarrollo de los mercados domésticos para productos pesqueros. In: REUNION REGIONAL DE LA RED PANAMERICANA DE INSPECCION, CONTROL DE CALIDAD Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS PESQUEROS Y DE LA ACUICULTURA, Punta del Este, 2006. **Anais**. Punta del Este: INFOPECA, 2006. CD-ROOM.
190. WIENEKE, A.A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1960-1990. **Epidemiology and Infection**, v.110, p.519-531, 1993.
191. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary and conclusions of the sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee for Food Additives and Contaminants (JECFA). Rome, 10-19 June, 2003. (JECFA/61/SC). In: Programmes and Projects. Media Centre. News Archive. Notes for the media. 2003. /UN Committee recommends new dietary intake limits for mercury/. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2003/np20/en/>. Acesso em 15 setembro 2006.
192. WORLD HEALTH ORGANIZATION FOR THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY; INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Arsenic and arsenic compounds**. 2.ed. Geneva: World Health Organization, 2001. 521p. (Environmental Health Criteria, 224).
193. WORLD HEALTH ORGANIZATION. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Inorganic lead**. Geneva: WHO, 1995. (Environmental Health Criteria, 165).
194. WORLD HEALTH ORGANIZATION FOR THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY; INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS; UNITED

NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Cadmium**. Geneva: World Health Organization, 1992. (Environmental Health Criteria, 134).

195. WORLD HEALTH ORGANIZATION FOR THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY; INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Lead**. Geneva: World Health Organization, 1989. (Environmental Health Criteria, 85).
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Arsenic**. Geneva: WHO, 1981. 174p. (Environmental Health Criteria, 18).
97. WORLD HEALTH ORGANIZATION. /Evaluation of certain food additives and contaminants/: 22rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO, 1978. (WHO Technical Report Series, 631).
98. YANG, L.; MESTER, Z.; STURGEON, R.E. Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.18, p.431–436, 2003.
99. YILMAZ, F.; ÖZDEMİR, N.; DEMIRAK, A.; TUNA, A.L. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. **Food Chemistry**, v.100, p.830-835, 2006.