UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Estudo da ocorrência de compostos arseniais, mercuriais e selênio
em cações comercializados na cidade de São Paulo

Michela Denobile

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora
Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo
2007

18.915

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013015

Ficha Catalográfica

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

D413e	<p>Denobile, Michela</p> <p>Estudo da ocorrência de compostos arseniais, mercuriais, e selênio em cações comercializados na cidade de São Paulo / Michela Denobile. -- São Paulo, 2007. 150p.</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza</p> <p>1. Contaminação de alimentos : Toxicologia 2. Metal : Toxicologia 3. Análise toxicológica I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.</p> <p>615.954 CDD</p>
-------	--

Michela Denobile

Estudo da ocorrência de compostos arseniais, mercuriais e selênio em cações comercializados na cidade de São Paulo

Comissão Julgadora
para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
Orientadora e Presidente

Prof Dr Alfredo Senato Filho
1º. Examinador

Prof Dr João Palermo Neto
2º. Examinador

Prof^a Dr Izabela Martins
3º. Examinador

Prof Dr Felix Guilherme Reis Reyes
4º. Examinador

São Paulo, 3 de agosto de 2007.

*Para meus pais, **José Luiz** e **Ivanice**, pela
intensa dedicação, pelo amor, incentivo e
ensinamentos.*

*À minha irmã **Tatiana**, pelo amor e carinho.*

*Ao **Márcio**, pelo amor, apoio e valiosa
ajuda.*

Prof^a. Dr^a. Elizabeth de Souza Nascimento

*Minha admiração e agradecimento pela
sua dedicada e valiosa orientação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Agroquímica e Tecnologia do Alimentos - IATA/CSIC, de Valência, Espanha que propiciou os recursos e materiais para a realização da etapa analítica. Às pesquisadoras Dra. Rosa Montoro e Dra. Dinoraz Vélez pelos ensinamentos e importante participação na construção deste trabalho.

À 3M do Brasil que me liberou da carga horária de trabalho a apoiou-me neste projeto, na pessoa do Gerente Geral Antônio Espeleta e da gerente Roberta Franchim. Aos colegas de trabalho Berenice, Patrícia e Marx pela amizade, incentivo e apoio.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelos ensinamentos.

Aos professores Dr. Félix Reyes e Dr. Alfredo Tenuta, pelas importantes sugestões e correções no exame de qualificação.

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Às pessoas que se tornaram amigas no curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas: Vanessa, Simone, Patrícia, Isarita, Eliana, Nádia, Cláudia e todos os alunos que compartilham dos mesmos objetivos neste curso.

Ao amigo e professor Dr. Eduardo Purgatto pela ajuda e sugestões.

À Maria Marcellari pela ajuda em muitos momentos.

À Maria Luiza e Leila Bona, da Biblioteca do Conjunto das Químicas, que auxiliaram na confecção da ficha catalográfica e revisão das referências.

A Jorge de Lima e Elaine Ychico pelos esclarecimentos em relação aos prazos e formalidades.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Arsênio	10
2.1.1 Toxicocinética.....	12
2.1.2 Mecanismo de ação tóxica	15
2.1.3 Toxicodinâmica.....	16
2.1.4 Relação dose – efeito	19
2.1.5 Parâmetros dos órgãos regulamentadores	20
2.1.5.1 Limites máximo de tolerância estabelecidos em peixe e pescado	20
2.1.5.2 Valores máximos de ingestão permitidos	20
2.1.6 Risco de exposição através dos alimentos	21
2.1.7 Técnicas analíticas utilizadas para determinação de espécies arseniais	26
2.2. Mercúrio	31
2.2.1 Toxicocinética.....	32
2.2.2 Toxicodinâmica.....	35
2.2.3 Parâmetros dos órgãos regulamentadores	40
2.2.3.1 Limites máximo de tolerância estabelecidos em peixe e pescado	40
2.2.3.2 Valores máximos de ingestão permitidos	41
2.2.4 Risco de exposição através dos alimentos.....	42
2.3. Selênio	46
2.3.1 Toxicocinética.....	47
2.3.2 Essencialidade do selênio	48
2.3.3 Deficiência de selênio.....	50
2.3.4 Toxicodinâmica.....	51
2.3.5 Interações biológicas.....	53
2.3.6 Recomendações de ingestão diária para humanos	55
2.3.7 A exposição ao selênio através dos alimentos.....	56

3. OBJETIVOS	59
3.1. Objetivo Geral.....	59
3.2. Objetivos específicos.....	59
4. MATERIAL E MÉTODO	60
4.1. Arsênio total e Arsênio Inorgânico	60
4.1.1. Equipamentos	60
4.1.2. Reagentes.....	60
4.1.3. Material de referência	61
4.1.4. Amostras.....	61
4.1.5. Métodos	62
4.1.5.1. Determinação de arsênio total.....	62
4.1.5.2. Determinação de arsênio inorgânico.....	64
4.1.6. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de arsênio inorgânico	67
4.1.6.1. Limite de detecção	67
4.1.6.2. Linearidade.....	68
4.1.6.3. Precisão	68
4.1.6.4. Recuperação	68
4.1.7. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de arsênio total	69
4.1.7.1. Exatidão	69
4.2. Mercúrio Total.....	71
4.2.1. Equipamentos	71
4.2.2. Reagentes.....	71
4.2.3. Material de referência	72
4.2.4. Amostras.....	72
4.2.5. Método	72
4.2.5.1. Digestão assistida por forno de microondas em meio ácido para determinação de mercúrio total.....	72
4.2.5.2. Determinação de mercúrio total através de CV-AFS....	75
4.3. Metilmercúrio	79
4.3.1. Equipamentos	79

4.3.2. Reagentes.....	80
4.3.3. Material de referência	81
4.3.4. Amostras.....	81
4.3.5. Método.....	81
4.3.5.1. Extração de metilmercúrio.....	81
4.3.5.2. Determinação de metilmercúrio através HPLC-termo-oxidação-CV-AFS	81
4.3.6. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de mercúrio total e metil mercúrio	84
4.4. Selênio.....	85
4.4.1. Equipamentos	85
4.4.2. Reagentes.....	85
4.4.3. Amostras.....	86
4.4.4. Método	86
4.4.4.1. Determinação de selênio.....	86
4.4.5. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de selênio	88
4.5. Análises estatísticas	89
5. RESULTADOS.....	90
5.1. Teores de As total e As inorgânico em amostras de cação analisadas mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do arsênio por FI-HG-EAA.....	90
5.2. Teores de mercúrio total em amostras de cação analisadas por digestão em forno de microondas e CV-AFS, e teores de metilmercúrio em amostras de cação analisadas por HPLC-termo-oxidação-CV-AFS	92
5.3. Teores de selênio em amostras de cação analisadas mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do selênio por FI-HG-EAA.....	94
5.4. Teores de selênio e mercúrio ($\mu\text{M/Kg}$, peso seco) e a razão molar entre Hg e Se.....	96
5.5. Análises estatísticas	98

5.5.1. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total analisados por mineralização por via seca e posterior quantificação do As total por FI-HG-EAA	98
5.5.2. Representação gráfica em diagrama de blocos – BOXPLOT dos teores de As inorgânico analisados por mineralização por via seca e posterior quantificação do As inorgânico por FI-HG-EAA.....	99
5.5.3. Representação gráfica em diagrama de blocos – BOXPLOT dos teores de mercúrio total analisados por digestão em forno de microondas e CV-AFS	100
5.5.4. Representação gráfica em diagrama de blocos – BOXPLOT dos teores de metilmercúrio em amostras de cação analisadas mediante HPLC-termo-oxidação-CV-AFS.....	101
5.5.5. Representação gráfica em diagrama de blocos – BOXPLOT dos teores de selênio analisadas por mineralização por via seca e posterior quantificação do selênio por FI-HG-EAA.....	102
5.5.6. Representação gráfica da dispersão dos teores de As total em comparação com o limite máximo de tolerância	103
5.5.7. Representação gráfica da dispersão dos teores de Hg total em comparação com o limite máximo de tolerância	104
5.5.8. Representação gráfica da porcentagem de valores obtidos de Hg total acima do limite máximo de tolerância.....	105
5.6. Estimativa da Ingestão média diária de As total, As inorgânico, Hg total e metilmercúrio considerando apenas o consumo de pescado	106
6. DISCUSSÃO	107
7. CONCLUSÕES	120
8. RECOMENDAÇÕES.....	121
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de arsênio total64
Figura 2	Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de arsênio inorgânico.....67
Figura 3	Ciclo de temperatura e potência no forno de microondas aplicado para a digestão das amostras.....73
Figura 4	Reator de PTFE utilizado na digestão ácida em forno de microondas74
Figura 5	Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de mercúrio total.....75
Figura 6	Esquema do gerador de vapor à frio utilizado para a determinação de mercúrio total através de espectrometria de fluorescência atômica.....77
Figura 7	Funcionamento da válvula de troca do gerador de vapor à frio utilizado para a determinação de mercúrio total, através da espectrometria de fluorescência atômica. (a) tempo de espera e de retorno da linha de base. (b) tempo de análise.....78
Figura 8	Esquema da metodologia HPLC-termo-oxidação-CV-AFS.....82
Figura 9	Diagrama em blocos dos resultados das análises de arsênio total nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo98
Figura 10	Diagrama em blocos dos resultados das análises de arsênio inorgânico nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo99
Figura 11	Diagrama em blocos dos resultados das análises de mercúrio total nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo100

Figura 12	Diagrama em blocos dos resultados das análises de metilmercúrio nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo	101
Figura 13	Diagrama em blocos dos resultados da análise de selênio nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo	102
Figura 14	Representação gráfica da dispersão dos teores de As total em comparação com o limite máximo de tolerância (mg/kg, peso úmido).....	103
Figura 15	Representação gráfica da dispersão dos teores de Hg total em comparação com o limite máximo de tolerância (mg/kg, peso úmido).....	104
Figura 16	Porcentagem de valores obtidos de Hg total acima do limite máximo de tolerância.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais locais de procedências do cação no ano de 2005	9
Quadro 2	Sazonalidade do pescado cação comercializado no Estado de São Paulo	9
Quadro 3	Intervalos de concentração de arsênio total em mg/kg, em diferentes espécies de pescados, em diferentes regiões do mundo	29
Quadro 4	Intervalos de concentração de mercúrio total em mg/kg, em diferentes espécies de peixe e diferentes regiões do mundo.....	45
Quadro 5	Ciclo de temperatura e potência utilizado no forno de microondas	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de compostos arseniais encontrados no ambiente marinho	11
Tabela 2	Condições analíticas para determinação de arsênio total por FI-HG-EAA.....	63
Tabela 3	Parâmetros analíticos de validação das metodologias FI-HG-EAA utilizadas para a determinação de arsênio total e arsênio inorgânico em pescado (MUÑOZ et al, 1999)	70
Tabela 4	Condições analíticas utilizadas na determinação de mercúrio por CV-AFS: Parâmetros instrumentais e experimentais utilizados	76
Tabela 5	Parâmetros instrumentais utilizados no sistema HPLC-termooxidação-CV-AFS	83
Tabela 6	Parâmetros analíticos de validação da técnica de digestão em forno de microondas CV-AFS utilizada para a determinação de mercúrio total em pescado e do método de quantificação por HPLC-termo-oxidação-CV-AFS para a determinação de metilmercúrio em pescado (NAVARRO, 2005).....	84
Tabela 7	Condições analíticas para determinação de selênio por FI-HG-EAA.....	87
Tabela 8	Parâmetros analíticos de validação da metodologia FI-HG-EAA utilizada para a determinação de selênio em pescado	88
Tabela 9	Teores de arsênio total e arsênio inorgânico, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo	90
Tabela 10	Teores de mercúrio total e metilmercúrio, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo	92
Tabela 11	Teores de selênio, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo.....	94

Tabela 12	Teores de selênio e mercúrio ($\mu\text{M/Kg}$, peso seco) e a razão molar (Hg:Se).....	96
Tabela 13	Estimativa da Ingestão média diária de As total, As inorgânico, Hg total e metilmercúrio considerando apenas o consumo de pescado	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/g}$	microgramas por grama
ADN	Ácido desoxirribonucléico
As	Arsênio
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Adenosina trifosfato)
ATSDR	<i>Agency For Toxic Substances And Disease Registry</i> (Agência sobre Substâncias Tóxicas e Registro de Enfermidades)
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo
CEN	Comitê Europeu para Padronização
CV-AFS	Vapor frio acoplado a Espectrômetria de Fluorescência Atômica
DORM	<i>Dogfish muscle</i> (músculo de tubarão)
EAA	Espectrômetro de Absorção Atômica
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
<i>et al.</i>	<i>et alli</i> (e outros)
DL ₅₀	Dose Letal 50
DMA	Ácido dimetilarsínico
DOU	Diário Oficial da União
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
FI	<i>Flow injection</i> (Injeção em fluxo)
Hg	Mercúrio
HG	<i>Hydride generation</i> (Geração de Hidretos)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatógrafo líquido de alta eficiência)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer)

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA/FAO/WHO	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives and Contaminants</i> (Comitê de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde)
LD	Limite de Detecção
LOAEL	<i>Lowest-observed-adverse-effect-level</i> (Menor nível de Efeito Adverso Observável)
mg/g	miligramas por grama
MMA	Ácido monometilarsênio
NOAEL	<i>No-observed-adverse-effect-level</i> (Nível de efeito não Observado)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTFE	Politetrafluoretileno
PTWI	<i>Provisional Tolerable Weekly Intake</i> (Ingestão Semanal Tolerável Provisional)
NAS	<i>National Academy of Sciences</i> (Academia Nacional de Ciências)
NRC	<i>National Research Council Canada</i> (Conselho Nacional de Pesquisa, Canadá)
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i> (Ingestão Dietética Recomendada)
Se	Selênio
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde
TDI	Ingestão Diária Total
TORT	<i>Lobster Hepatopancreas</i> (Hepatopâncreas de lagosta)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

DENOBILE, Michela. Estudo da ocorrência de compostos arseniais, mercuriais e selênio em cações comercializados na cidade de São Paulo. Orientador: Elizabeth de Souza Nascimento. São Paulo, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]

Os metais de relevância toxicológica provenientes de fontes naturais e antropogênicas continuamente entram no ecossistema aquático causando sérios problemas à saúde humana e ambientais devido a sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. A contaminação de peixe e produtos da pesca por metais é de interesse da saúde pública. 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 e 0,5 mg/kg para o mercúrio, e 1,0 mg/kg em peixe predadores. O LMT não foi estabelecido para arsênio inorgânico, metilmercúrio e selênio. Este trabalho tem por objetivo avaliar a presença de arsênio total, arsênio inorgânico, mercúrio total, metilmercúrio e selênio em amostras de peixe cação comercializadas na cidade de São Paulo e analisar os resultados em relação à avaliação do risco. O arsênio total e o selênio foram determinados através de mineralização por via seca das amostras e quantificação utilizando absorção atômica com gerador de hidretos (FI-HG-AAS). O arsênio inorgânico foi determinado através de digestão ácida das amostras e posterior mineralização por via seca e quantificação utilizando FI-HG-AAS. O mercúrio total foi determinado através de digestão assistida por microondas em meio ácido e posterior quantificação do mercúrio total por espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio em fluxo contínuo (CV-AFS). O metilmercúrio foi determinado através de extração ácida das amostras e quantificação utilizando HPLC-termo-oxidação-CV-AFS. Os valores de As total nas amostras de cação analisadas variaram de 8,4 a 134,1 mg/kg (peso seco) e 2,1 a 33,5 mg/kg (peso úmido) e os valores de As inorgânico variaram de 0,013 a 0,738 mg/kg (peso seco) e 0,0033 a 0,1845 mg/kg (peso úmido). Os valores de Hg total variaram de 0,7 a 14,6 mg/kg (peso seco) e 0,18 a 3,65 mg/kg (peso úmido). Os valores de metilmercúrio variaram de 0,46 a 8,67 mg/kg (peso seco) e 0,12 a 2,17 mg/kg (peso úmido). Os valores de selênio variaram de 0,5 a 2,6 mg/kg (peso seco) e 0,13 a 0,65 mg/kg (peso úmido). Os valores de razão molar entre Hg e Se variaram de 0,28 a 5,39 (Hg:Se), e a média foi igual a 1,69. O PTWI para o arsênio inorgânico é 15 µg/kg de peso corpóreo (WHO, 1989), e assumindo uma média de peso corpóreo de 65kg, a ingestão de arsênio inorgânico proveniente do consumo de cação representa apenas 0,0007% do valor de referência TDI (Ingestão diária tolerável) para média brasileira. O PTWI para o Hg total é 5 µg/kg de peso

corpóreo (WHO, 2003) e, a ingestão de Hg total por pessoa por dia proveniente apenas do consumo de cação para a média brasileira representa 0,17% do valor de referência TDI.

ABSTRACT

DENOBILO, Michela. Occurrence study for arsenic, mercuric and selenium compounds in shark sample commercialized on São Paulo city. Advisor: Elizabeth de Souza Nascimento. São Paulo, 2007. [Ph. D. Dissertation – Pharmacology School of the University of São Paulo]

Metals of toxicological relevance from natural and anthropogenic sources continuously enter the aquatic ecosystem and cause serious environmental problems to human health and environment due to their toxicity, persistence, bioaccumulation and biomagnification in the food chain. Seafood metal contamination is a public health interest. In Brazil, the Minister of Health establishes the maximum residue level (MRL) 1.0 mg/kg for arsenic in seafood and 0.5 for mercury and 1.0 for mercury in predator fish. The MRL was not established for inorganic arsenic, methylmercury and selenium. The purpose of this study is to evaluate the presence of total arsenic, inorganic arsenic, total mercury, methylmercury and selenium in shark samples commercialized in São Paulo city, and to evaluate their risk. The total arsenic and selenium were determined through sample dry ash and quantification by flow Injection -hydride generation-atomic absorption spectrometer (FI-HG-AAS). The inorganic arsenic was determined through sample acid digestion, ulterior dry ash and quantification by FI-HG-AAS. The total mercury was determined through sample acid digestion in microwave and quantification by atomic fluorescence spectrophotometer with a cold vapor generator (CV-AFS). Methylmercury was determined by sample acid extraction and quantification by HPLC-thermo-oxidation-CV-AFS. The levels of total arsenic vary between 8.4 and 134.1 mg/kg (dry weight) and 2.1 and 33.5 mg/kg (fresh weight) and levels of total inorganic arsenic vary between 0.013 and 0.738 mg/kg (dry weight) and 0.0033 and 0.1845 mg/kg (fresh weight). The levels of total mercury vary between 0.7 and 14.6 mg/kg (dry weight) and 0.18 and 3.65 mg/kg (fresh weight). The levels of methylmercury vary between 0.46 and 8.67 mg/kg (dry weight) and 0.12 and 2.17 mg/kg (fresh weight). The levels of selenium vary between 0.5 and 2.6 mg/kg (dry weight) and 0.13 and 0.65 mg/kg (fresh weight). The values of molar ratio between Hg and Se vary 0.28 and 5.39 (Hg:Se), and the media was 1.69. The PTWI for inorganic arsenic is 15 µg/kg body weight (WHO, 1989), and assuming an average body weight of 65 Kg, the ingestion of inorganic arsenic from shark ingestion represents only 0.0007% of the reference value TDI (Tolerable daily ingestion) for Brazilian media. The PTWI for total mercury is 5 µg/kg body weight (WHO, 2003) and the ingestion of total mercury per person per day from shark ingestion for Brazilian media represents 0.17% of the reference value TDI.

1. INTRODUÇÃO

A poluição por metais de relevância toxicológica é reconhecida como um sério problema ambiental. A presença de alguns desses metais no ambiente aquático e a sua bioacumulação em peixes e em outros organismos ao longo da cadeia alimentar vem sendo estudada em vários países nos últimos anos. Este acúmulo pode ser nocivo para os peixes e, conseqüentemente, para a população que ingere estes peixes contaminados.

Os metais pesados provenientes de fontes naturais e antropogênicas continuamente entram no ecossistema aquático causando sérios problemas devido a sua toxicidade, longa persistência, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. A industrialização e as atividades agrícolas contribuem para seus níveis elevados em águas naturais.

Diversas espécies de peixes, consumidas por humanos, estão freqüentemente no topo da cadeia alimentar e podem acumular grandes quantidades de metais presentes na água. Este acúmulo depende da espécie, do hábito alimentar, da ingestão, dos meios de eliminação, do tamanho e do comprimento do peixe e principalmente de seu habitat.

O arsênio (As) e mercúrio (Hg) são agentes reconhecidamente tóxicos para humanos e sendo o alimento, principalmente o pescado, a maior fonte de metais pesados para a população não exposta ocupacionalmente, vários trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo para determinar a contaminação de pescado por estes metais e estes dados são utilizados para a elaboração de estudos sobre a Dieta Total, onde se avalia a contribuição de diferentes grupos de alimentos na ingestão de arsênio e mercúrio.

O selênio (Se) é classificado como um elemento essencial para humanos, porém ele é tóxico em concentrações elevadas, e é considerado como um potencial poluente marinho. Devido a sua importância fisiológica e toxicológica, tem havido um aumento no interesse sobre a quantidade de selênio em água marinha e em organismos aquáticos. Além disso, o selênio pode também atuar como um possível modificador de toxicidade de contaminantes ambientais, como por exemplo, o mercúrio, cobre e cádmio.

A avaliação da contaminação do pescado por metais pesados é, portanto, de interesse da saúde pública. Em função disso, são adotados limites máximos desses metais, acima dos quais o consumo de pescado torna-se inadequado, por oferecer os riscos à saúde humana. Estes valores são estabelecidos por diferentes Agências Internacionais, e no Brasil, o Ministério da Saúde determina o limite máximo de tolerância de 1,0 mg/kg para o arsênio e 0,5 mg/kg para o mercúrio para a maioria das espécies e de 1,0 mg/kg para espécies predadoras.

A avaliação do risco do consumo de peixe pode ser realizada considerando-se os valores de Ingestão Semanal Tolerável Provisional (PTWI) estabelecidos pelo Comitê de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO) que são: 15 µg de arsênio inorgânico/Kg de peso corpóreo, 5 µg de mercúrio total /kg de peso corpóreo e 1,6 de metilmercúrio/kg de peso corpóreo.

No Brasil, são comercializadas e consumidas várias espécies de cação. No entanto, não existem informações suficientes de que o pescado, tanto marinho quanto de água-doce, seja sistematicamente monitorado em relação à contaminação por metais pesados e faltam dados sobre os níveis de metais de relevância toxicológica em pescado.

O objetivo do presente trabalho é avaliar o teor de arsênio total, arsênio inorgânico, mercúrio total, metilmercúrio, e selênio em amostras de

peixe cação comercializadas na cidade de São Paulo e os resultados serão comparados com os níveis máximos de tolerância estabelecidos pela legislação brasileira e analisados em relação à avaliação do risco a partir da comparação do consumo alimentar.

Nota: Esta pesquisa faz parte do projeto internacional de "Estimación de riesgos derivados de la presencia de metales pesados y arsénico en los alimentos" coordenado pela Dra Rosa Montoro, do laboratório de Contaminación Metálica del Departamento de Conservación y Calidad de los Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA/CSIC), de Valência, Espanha, aprovado pela Rede Iberoamericana de Alimentos - CYTED- (RIANTAP) ligada ao programa CYTED XI.23 - Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - Rede Íbero Americana de Evaluación Nutricional Y Toxicológica de Alimentos Processados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os metais pesados são considerados a forma mais importante de poluição do meio ambiente aquático devido a sua toxicidade e acúmulo em organismos marinhos (SALIM *et al.*, 2003, KHANSARI *et al.*, 2005). Um exemplo do impacto ambiental causado por metais pesados ocorreu no início de 1952 em Minamata, Japão onde a população foi intoxicada por metilmercúrio pela ingestão de peixe e crustáceos contaminados (TAKEUCHI *et al.*, 1962, *apud* AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN, 2003). Este incidente, amplamente documentado, foi causado por uma fábrica que usava cloreto de mercúrio como catalisador na produção de cloreto de vinila e descarregava o efluente diretamente no mar contaminando o ecossistema aquático (SPURGEON, 2006). Neste contexto, é de extrema importância para a saúde humana a determinação da presença de metais pesados em organismos aquáticos que são utilizados como alimentos (RIBA *et al.*, 2005, DURAL *et al.*, 2007).

O acúmulo de metais pesados em peixes, e em outros organismos aquáticos é de grande importância ao homem, por serem consumidos por uma considerável parcela da população (SANKAR, 2006). Entre as diferentes espécies aquáticas, os mariscos e mexilhões são os que mais acumulam metais pesados devido a seu habitat natural e hábito alimentar (FARKAS *et al.*, 2003, CANLI e ATLI, 2003, SANKAR, 2006). Além disso, a idade, o desenvolvimento, e outros fatores fisiológicos também influenciam a distribuição de metais pesados entre as várias espécies de peixes (KAGI e SCHAFFER, 1998 *apud* KHANSARI *et al.*, 2005).

O consumo de peixe tornou-se mais importante entre as pessoas com hábitos alimentares mais saudáveis, pois além de ser uma fonte de proteínas, vitaminas e outros nutrientes, e apresentar baixos níveis de colesterol, muitas espécies ainda fornecem ômega 3 que reduz os níveis de colesterol e a incidência de doenças cardiovasculares (BURGER e

GOCHFELD, 2005, BAYEN *et al.*, 2005, LEVENSON e AXELRAD, 2006). Um estudo que inclui dados coletados de 36 países mostrou que o consumo de peixe está associado com a redução de risco para doença isquêmica do coração e a mortalidade por ataques cardíacos (ZHANG *et al.*, 1999).

Vários episódios de intoxicação têm sido relatados após consumo de pescado contaminado com poluentes, tais como, o mercúrio (BAYEN *et al.*, 2005). O pescado é parte importante da dieta humana e por isso, muitos estudos têm sido realizados para determinar o acúmulo de metais em diferentes espécies (USERO *et al.*, 2003, TÜRKMEN *et al.*, 2005). Além disso, são considerados como fatores indicativos no sistema aquático da estimativa de poluição por traços de metais e o potencial de risco para consumo humano (BOISSON *et al.*, 1998, DUGO *et al.*, 2006, YILMAZ *et al.*, 2006).

A bioacumulação de metais pesados em peixes é significativa, mesmo quando estes contaminantes se encontram na água em baixas concentrações. No caso de moluscos bivalves, sendo estes organismos filtradores (que se alimentam através de um processo de filtração da água e retenção das partículas em suspensão, principalmente plâncton e microrganismos presentes na água), sofrem de maneira intensa a bioacumulação dos contaminantes, tornando-se muitas vezes impróprios para o consumo humano (MACHADO *et al.*, 2002).

No Brasil existem vários relatos de contaminação da água e de organismos aquáticos por metais pesados, tais como os que estão descritos abaixo (MORALES-AIZPURUA *et al.*, 1999, LACERDA *et al.*, 2000, TARLEY *et al.*, 2001, SILVA *et al.*, 2001, MACHADO *et al.*, 2002, KEHRIG *et al.*, 2002, LIMA JUNIOR *et al.*, 2002, MONTEIROS-NETO *et al.*, 2003, JOYEUX *et al.*, 2004).

MORALES-AIZPURUA *et al.* (1999) determinaram os teores de mercúrio total em espécies de cação-anjo, cação-azul, cambeva, caçoa, machote e anequim - comercializadas na cidade de São Paulo. Os níveis encontrados variaram de 0,04 a 4,71 mgHg/kg, sendo que 54% estavam acima de 1mg Hg/kg, que é o limite aceito pela legislação brasileira especificamente para peixes predadores, para o propósito de consumo humano.

LACERDA *et al.* (2000) determinaram a concentração de mercúrio total em três espécies de pequenos tubarões (*Rhizoprionodon lalandei*, *R. porosus* e *Mustelus higmani*) da costa Sudeste do Brasil. As concentrações de Hg em *R. lalandei* variaram de 21,5 a 289,0 ng/g, em peso seco (média de 74,6 ng/g, peso seco, e 17,9 ng/g peso úmido. Em *R. porosus*, variaram de 7,6 a 90,5 ng/g, em peso seco (média de 42,2 ng/g, peso seco, e 9,4 ng/g peso úmido, enquanto em *M. higmani* variaram de 13,0 a 162,8 ng/g, em peso seco (média de 54,9 ng/g, peso seco, e 13,4 ng/g peso úmido.

MACHADO *et al.* (2002) avaliaram os níveis de contaminação de metais pesados em ostras *Crassostrea brasiliiana* do estuário de Cananéia, em São Paulo. Esta é uma espécie estuarina de ocorrência em quase toda a costa brasileira, desde o Estado de Santa Catarina até o Maranhão. As concentrações encontradas para o mercúrio, chumbo, cádmio, cobre e zinco, em peso úmido foram 0,02; 0,08; 0,11; 2,6 e 393 mg/kg, respectivamente. Estes valores encontram-se abaixo dos limites máximos preconizados pela legislação brasileira, exceto para o zinco, que é de 50,0 mg/kg (Decreto 55871/65), para qualquer tipo de alimento, exceto bebidas alcoólicas e sucos.

Em um estudo realizado no estuário da Baía de Guanarabara, Rio de Janeiro, por KEHRIG *et al.* (2002) a quantidade de mercúrio total e metilmercúrio em mexilhão variou de 11,6 a 53,5 µg/kg de mercúrio total, em peso úmido, e 4,5 a 21,0 µg/kg de metilmercúrio em peso úmido

dependendo do ponto de coleta e da qualidade da água, enquanto que peixes carnívoros apresentaram concentrações maiores de mercúrio total e metilmercúrio ($199,5 \pm 119,3$ e $194,7 \pm 112,7$ $\mu\text{g/kg}$ em peso úmido, respectivamente) dependendo do hábito alimentar e nível trófico. Nos peixes que se alimentam de plantas as concentrações de metilmercúrio foram semelhantes às concentrações encontradas em mexilhões, e as quantidades de mercúrio total em peixes que se alimentam de plantas foram menores que em mexilhões.

MONTEIRO-NETO *et al.* (2003) avaliou a presença de chumbo, cádmio e mercúrio em fígado e rins de *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphidae) capturados na costa do Ceará, Brasil sendo que os valores de chumbo encontrados eram inferiores ao limite de detecção do método (0,1 $\mu\text{g/g}$), e as concentrações de cádmio foram significativamente maiores em rins que em fígado. Porém as maiores concentrações de mercúrio foram observadas em fígado. Os níveis de contaminação encontrados não foram considerados críticos, mas podem estar relacionados com o desenvolvimento industrial da região.

No Brasil, também foram realizados trabalhos que avaliaram a contaminação de pescado por outros metais de relevância toxicológica como cromo, zinco, cobre, etc. TARLEY *et al.* (2001) analisaram diferentes marcas de sardinhas enlatadas (*Sardinella brasiliensis*) visando determinar Cu, Fe, Mn, Zn, Sn, Cd e Pb. Os metais que apresentaram maiores concentrações foram Fe e Zn, e os valores de Cd (0,19 a 0,38 $\mu\text{g/g}$) e Pb (0,77 a 2,15 $\mu\text{g/g}$) encontrados eram inferiores aos limites máximos permitidos pela legislação brasileira (1,0 e 2,0 $\mu\text{g/g}$, respectivamente).

SILVA *et al.* (2001) analisou ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas no estuário Potengi, em Natal, e observou que as concentrações de zinco, cobre e chumbo em algumas amostras estavam acima do limite estabelecido pela legislação brasileira.

LIMA JUNIOR *et al.* (2002) analisaram amostras de músculos, gônadas e fígado de peixes capturados em Sepetiba e Baía de Ilha Grande para determinar as concentrações de cádmio, ferro, zinco, chumbo, níquel, cobre e cromo e os resultados mostraram um evidente aumento da contaminação com um risco a população humana, à partir do consumo destes peixes. A baía de Ilha Grande também parece sofrer os mesmo problemas ambientais.

Em um estudo realizado por JOYEUX *et al.* (2004) foram analisados tecidos musculares de tainhas (*Mugil* sp.) e robalos (*Centropomus* sp.) para determinar as concentrações de cádmio, cromo, cobre, chumbo e zinco. Neste estudo, as concentrações de cádmio, cromo, cobre e zinco, aumentaram significativamente com o tamanho e o peso dos robalos. Os teores de cádmio e chumbo apresentaram-se significativamente mais altos em fevereiro que em julho, e também concluíram que o maior risco à saúde está provavelmente relacionado à concentração de chumbo, especialmente pelo consumo de pescado por crianças.

O consumo de pescado no Brasil é bastante variado. Especificamente no Estado do Amazonas, o consumo per capita é de 54 kg/ano, já no Rio de Janeiro é de 16 kg/ per capita/ano. Contudo, há uma tendência de aumento do consumo, principalmente, através de produtos beneficiados/ industrializados, tais como filés e empanados (BRASIL, 2006).

Em 2003, foram pescadas 712 mil toneladas, e em 2005 esse número subiu para 751 mil toneladas. A média do consumo de peixe per capita por ano, em torno de 7 quilos por habitante, está bem abaixo dos 12 quilos por ano recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e também muito inferior à média mundial, em torno de 16 quilos por pessoa, por ano. O baixo consumo deste alimento tende a ser explicado pelo preço e hábitos alimentares. Várias regiões do país não têm o hábito de consumo de

pescado, a não ser na Semana Santa. Como exemplos, o Rio Grande do Sul, cujo consumo é de quatro quilos por habitante, por ano (SEAP, 2007).

No Brasil, não existem dados estatísticos do consumo para cada tipo de pescado. Várias espécies de cação são comercializadas e normalmente consumidas. De acordo com dados obtidos em dezembro de 2006, na CEAGESP - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo, em São Paulo - SP, Brasil, foram comercializadas na cidade de São Paulo aproximadamente 145,5 toneladas mensais de cação nos últimos cinco anos, sendo as espécies procedentes de diferentes regiões (Quadro 1) e com uma sazonalidade variada, ilustrada na Figura 9.

Quadro 1. Principais locais de procedências do cação no ano de 2005

Municípios	Toneladas
Itajaí – RJ	416
Santos – SP	200
Ubatuba – SP	130
Rio Grande – RS	100
Porto Belo – SC	93
Outros/Transf.	876
Total	1.815

Fonte: CEAGESP, 2006

Quadro 2. Sazonalidade do pescado cação comercializado no Estado de São Paulo

Produto	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Cação	FRACO	MÉDIO	FORTE	FORTE	MÉDIO	MÉDIO	MÉDIO	FORTE	MÉDIO	FORTE	FORTE	FRACO

FRACO

MÉDIO

FORTE

Fonte: CEAGESP, 2006

2.1. Arsênio

O arsênio é particularmente difícil de ser considerado como um elemento único devido a sua característica química complexa e a existência de diferentes compostos arseniais. Ele pode ser encontrado na forma trivalente ou pentavalente e é amplamente distribuído na natureza. As formas mais comuns dos compostos de arsênio inorgânico trivalente são o trióxido de arsênio, arsenito de sódio e tricloreto de arsênio. Os compostos inorgânicos pentavalentes são o pentóxido de arsênio, o ácido arsênico e os arsenatos, entre eles arsenatos de chumbo e cálcio. Os compostos orgânicos podem também ser trivalente (GOYER e CLARKSON, 2001).

O arsênio inorgânico é liberado no meio ambiente, a partir de várias fontes antropogênicas, como fundições de cobre, zinco e chumbo, queima de carvão, uso de praguicidas e fertilizantes, fabricação de vidros, semicondutores e outros processos químicos (TRIPATHI *et al.*, 1997, LEIST *et al.*, 2000, HEINRICH-RAMM *et al.*, 2002, PIZARRO *et al.*, 2003, SLOTH *et al.*, 2005), e também de fontes naturais como atividades vulcânicas e intempéries em solo (GOYER e CLARKSON, 2001, BRISBIN *et al.*, 2002, LIAO e LING, 2003). Como resultado dos processos metabólicos naturais na biosfera, o arsênio apresenta um grande número de diferentes espécies orgânicas e inorgânicas, existindo mais de 25 espécies diferentes já identificadas no meio ambiente. A Tabela 1 apresenta algumas destas espécies (SLOTH *et al.*, 2005).

Entre os vários metais e metalóides presentes no meio ambiente, o arsênio se sobressai devido ao seu potencial tóxico. Normalmente é quantificado como arsênio total (As-t) que pode ser encontrado em alimentos em várias formas químicas que diferem em grau de toxicidade e patologias associadas a eles. As formas tóxicas mais comuns são as inorgânicas, As(III) e As(V), e a soma de ambos representa o arsênio inorgânico (As-I) que é considerado um carcinógeno humano (TSUDA *et al.*, 1992).

Tabela 1. Exemplos de compostos arseniais encontrados no ambiente marinho

Abreviação	Espécies Arseniais	Fórmula*
As(III)	Arsenito	$\text{As}(\text{O}^-)_3$
As(V)	Arsenato	$\text{AsO}(\text{O}^-)_3$
MA	Methylarsonato	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{O}^-)_2$
DMA	Dimetilarsinato	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{O}^-)$
AB	Arsenobetaina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+ \text{CH}_2\text{COO}^-$
TMAO	Óxido Trimethylarsina	$(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$
AC	Arsenocolina	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
TETRA	ion Tetrametilarsonio	$(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$
TMAP	Trimetilarsoniopropionato	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^+$
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$

Arsenoaçúcar 1 (glicerol açúcar)	R = OH
Arsenoaçúcar 2 (fosfato açúcar)	R = $\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{OCH}_2$ $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
Arsenoaçúcar 3 (sulfonato açúcar)	R = SO_3^-
Arsenoaçúcar 4 (sufato açúcar)	R = OSO_3^-

*Para simplificar, os componentes são mostrados na sua forma desprotonada (SLOTH *et al.*, 2005).

O arsênio é considerado um agente tóxico para humanos, e dependendo da dose sua ingestão pode ser fatal. A maioria dos casos de intoxicação humana por arsênio ocorre devido à exposição ao arsênio inorgânico, podendo haver muitas diferenças no potencial tóxico das diferentes formas químicas (CHOU e DE ROSA, 2003). Por exemplo, o arsenito é 60 vezes mais tóxico que o arsenato (HOSSAIN, 2006). Biologicamente, as formas orgânicas são normalmente menos tóxicas que as formas inorgânicas, com exceção do MMA III (ácido monometilarsonoso) (CHOU e DE ROSA, 2003, SHIH, 2005).

A toxicidade dos compostos arseniais diminui da seguinte forma: arsina (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. De acordo com essa escala, o As(III) é cerca de 10 vezes mais tóxico que o As(V) (PONTIUS *et al.*, 1994 *apud* SAKUMA *et al.*, 2003, KOH *et al.*, 2005).

As espécies arseniais inorgânicas (arsenato e arsenito) são classificadas como carcinógenos, já as formas metiladas (ácido monometilarsênio (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA)) recentemente foram identificadas como epigênicos. A arsenobetaina e arsenocolina que são altamente metilados são consideradas pouco tóxicas. Em organismos marinhos foram relatadas mais de 32 espécies diferentes de arsênio orgânico e inorgânico (HIRATA e TOSHIMITSU, 2005).

2.1.1. Toxicocinética

A exposição humana às espécies orgânicas e inorgânicas do arsênio ocorre através dos alimentos, água e meio ambiente. Cada uma das espécies de arsênio apresenta diferentes propriedades físico-químicas e biodisponibilidade e, portanto, é muito complexo o estudo da cinética e metabolismo em animais e humanos.

As vias de exposição mais comuns são a respiratória, através de poeira e fumos, e a oral, através do consumo de bebidas, alimentos e água (MANDAL e SUZUKI, 2002). A pele também pode ser uma via de exposição ao arsênio, porém os compostos inorgânicos são pouco absorvidos por esta via, exceto os corrosivos como o tricloreto de arsênio (WHO, 1992).

Aproximadamente 80 a 90% de uma dose única de arsenito, As(III), ou arsenato, As(V), são absorvidos no trato gastrointestinal de humanos e animais. A biodisponibilidade do arsênio inorgânico ingerido depende da

matriz em que se encontra (por exemplo, alimento, água, bebidas), da própria solubilidade dos compostos arseniais e da presença de outros constituintes do alimento e nutrientes presentes no trato gastrointestinal (MANDAL e SUZUKI, 2002).

O trióxido de arsênio pode ser encontrado na forma de aerodispersóide, a deposição nas vias aéreas e a absorção pulmonar dependem da forma química, e tamanho da partícula (GOYER e CLARKSON, 2001). As partículas de diâmetro aerodinâmico inferior a 1 μm são absorvidas pela via pulmonar, enquanto que as maiores, pelo movimento mucociliar, podem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal (WHO, 1981).

Após a absorção, o arsênio distribui-se na fração eritrocitária, cerca de três vezes mais do que na plasmática, não se ligando firmemente às proteínas séricas (WHO, 1981). O tempo de meia vida do arsênio inorgânico no sangue humano é de duas horas, assim, a sua presença neste fluido biológico indica uma exposição recente (WHO, 2001).

O arsênio deixa rapidamente a corrente sangüínea para se depositar nos tecidos, e é armazenado no fígado, nos rins, nos pulmões e ossos (SALGADO, LARINI, LEPERA, 1993; WHO, 2001). Os tecidos que apresentam alta concentração de grupos sulfidrilas, como os ricos em queratina (pele, cabelo e unhas) são os que apresentam as maiores concentrações de arsênio, e são utilizados como indicadores da exposição não recente ao arsênio. As concentrações na urina, por outro lado, são bons indicadores de uma exposição recente (MANDAL e SUZUKI, 2002).

A urina é a via mais significativa de excreção do arsênio absorvido, e aproximadamente 60% da quantidade ingerida diariamente é assim eliminada (BUCHET e LAUWERYS, 1994) na forma inalterada, ou após biotransformação. A eliminação através das fezes é pouco relevante

(MANDAL e SUZUKI, 2002). Nas primeiras horas após o início da exposição, a excreção na urina é representada principalmente pela forma inorgânica, e após cerca de 8 horas as espécies metiladas são as preponderantes (GOYER e CLARKSON, 2001, WHO, 2001).

O metabolismo e potencial tóxico são complexos devido à biotransformação do arsênio inorgânico por metilação às formas orgânicas MMA (ácido monometilarsênio) e DMA (ácido dimetilarsínico) que é o principal metabólito urinário. O arsênio inorgânico é transformado a DMA através de reações consecutivas de redução e metilação. Uma fração substancial do As(V) absorvida é rapidamente reduzida a As(III) através da oxidação de glutathione (GSH) em dissulfeto de glutathione (GSSG). Em seguida, o arsenito formado é metilado originando MMA e DMA. O fígado é o principal local de metilação, onde o As(III) reage com a S-adenosilmetionina (SAM) por oxidação resultando na transferência do grupo metila do enxofre para o arsênio (KARIM, 2000, GOYER e CLARKSON, 2001, MANDAL e SUZUKI, 2002, SAKUMA *et al.*, 2003, NARANMANDURA *et al.*, 2006).

Em alguns estudos em humanos, nos quais os metabólitos urinários de arsênio inorgânico foram avaliados por especiação, observaram-se valores médios de 10 a 30% de arsênio inorgânico, 10 a 20% de MMA e 55 a 76% de DMA. Estes resultados foram obtidos em pessoas expostas ambiental e ocupacionalmente ao arsênio. As variações na metilação do arsênio podem estar associadas a fatores, tais como, polimorfismos genéticos, idade, sexo e hábito de fumar (GOYER e CLARKSON, 2001, WHO, 2001).

2.1.2. Mecanismo de ação tóxica

Os mecanismos de ação tóxica são determinados pela valência e espécie arsenical. Os compostos trivalentes são as principais formas tóxicas e os compostos pentavalentes apresentam baixo efeito na atividade enzimática (WHO, 2001, SAKUMA *et al.*, 2003).

O arsênio trivalente interage com proteínas que contém grupos tióis em sua estrutura química e interfere com as enzimas pela ligação aos grupos –SH e –OH, especialmente quando existem dois grupos –SH adjacentes (MANDAL e SUZUKI, 2002). Assim, diversas proteínas e sistemas enzimáticos são alterados pela exposição ao arsênio. O arsenito pode afetar a atividade das enzimas na glucólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou glicogênese. Os compostos arseniais podem afetar as enzimas alfa-cetoglutarato desidrogenase, β –hidroxibutirato desidrogenase, malato desidrogenase, o complexo enzimático da piruvato desidrogenase, citocromo oxidase e urease (WHO, 2001). O arsênio pentavalente e o fosfato têm estrutura e propriedades semelhantes, portanto, o arsenato pode substituir a função e a posição do fosfato no organismo humano. Por exemplo, o arsenato pode romper o processo de formação das ligações altamente energéticas do fosfato (ATP, adenosina trifosfato), que é a fonte primária de armazenamento de energia na célula. Este rompimento pode levar a perda de energia (SAKUMA *et al.*, 2003, SHIH, 2005).

Várias enzimas que contém grupos sulfidrilas são afetadas pelo arsênio, provocando a supressão de substratos dependentes de NAD, como o piruvato, glutamato de α -cetoglutarato, interferindo, portanto, na respiração celular, na mitocôndria. A ação ocorre por inibição do ácido lipóico, na sua forma reduzida, responsável pela oxidação dos substratos. O arsênio trivalente diminui a fosforilação oxidativa mitocondrial e esse fenômeno está associado à estimulação da atividade da ATPase. É possível que o As^{5+} seja reduzido ao As^{3+} na mitocôndria, e daí teria condições de exercer ação tóxica, como inibir a respiração celular e diminuir a fosforilação oxidativa,

conforme indicam estudos *in vitro* e *in vivo* (WHO,1981; GOYER e CLARKSON, 2001).

2.1.3. Toxicodinâmica

A ingestão de altas doses de arsênio (70 a 180 mg) pode ser fatal. Os sintomas da intoxicação aguda consistem em febre, anorexia, hepatomegalia, melanose e arritmia cardíaca. Ocorrem também efeitos no trato respiratório superior, neuropatia periférica, alterações hematopoiética, cardiovascular e gastrointestinal. A ingestão aguda pode causar danos a membranas mucosas, tais como, irritação e escaras. A perda sensorial do sistema nervoso periférico aparece em 1 ou 2 semanas após a exposição e pode desaparecer se a exposição for interrompida. As alterações hematológicas observadas na intoxicação aguda são as mesmas observadas na exposição crônica (GOYER e CLARKSON, 2001).

As patologias cardiovasculares associadas ao arsênio são infarto do miocárdio, arritmia cardíaca e acidente vascular cerebral (MANDAL e SUZUKI, 2002). No sistema vascular periférico são descritos casos de perda progressiva da circulação nas mãos e pés, e com posterior gangrena e perda dos membros (CHEN *et al.*, 1994). Em relação às espécies organoarseniais, não existem evidências sobre a sua capacidade de causar efeitos ao sistema cardiovascular e respiratório (SAHA *et al.*, 1999).

As alterações hematológicas mais comuns são a anemia e leucopenia, e ocorrem tanto na exposição crônica como na aguda, além de causar distúrbios na síntese do heme, com um aumento na excreção da porfirina urinária (SAHA *et al.*, 1999, GOYER e CLARKSON, 2001, MANDAL e SUZUKI, 2002).

Vários estudos indicam que a ingestão de arsênio inorgânico pode causar um dano neural. A exposição aguda (1 mg As por Kg por dia ou mais) causa encefalopatia com sintomas, tais como, dor de cabeça, letargia, confusão mental, alucinação, tontura e coma (MANDAL e SUZUKI, 2002).

A exposição crônica ao arsênio inorgânico é mais comum que a exposição aguda, e afeta principalmente a pele, o fígado e os sistemas gastrintestinais, respiratórios, cardiovasculares, hematopoiético e nervoso (SAHA *et al.*, 1999, MANDAL e SUZUKI, 2002). Os efeitos mais evidentes da exposição crônica ao arsênio inorgânico por ingestão são as alterações cutâneas, entre elas a eritematose leve que progride para uma melanose, hiperqueratose, preferencialmente nas extremidades e descamação difusa das palmas das mãos e plantas dos pés (SAHA *et al.*, 1999, CHOU e DE ROSA, 2003).

O arsênio afeta o sistema gastrintestinal produzindo irritação das mucosas, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia moderada, gastrite, colite, anorexia, má-absorção e perda de peso (MANDAL e SUZUKI, 2002).

A exposição crônica aos compostos de arsênio inorgânico pode causar alteração dos sistemas nervosos centrais e periféricos. A neurotoxicidade inicia-se, normalmente, com alterações sensoriais, parestesias e fraqueza, progredindo dos grupos musculares proximais aos distais. A neuropatia periférica pode ser progressiva, envolvendo os neurônios sensoriais e motores levando a desmielinização de fibras nervosas dos axônios (GOYER e CLARKSON, 2001). A exposição crônica (0,05-0,5 mg As/Kg/dia) causa neuropatia periférica simétrica, e neuropatia periférica de ambos neurônios sensoriais e motores, causando perda de reflexos e fraqueza muscular (MANDAL e SUZUKI, 2002).

Os danos hepáticos, característicos da exposição crônica, manifestam-se inicialmente com icterícia e podem progredir a cirrose e ascite (GOYER e CLARKSON, 2001). O arsênio tende a acumular-se no

fígado em casos de exposição crônica, produz danos mitocondriais e afeta o metabolismo da porfirina (SAHA *et al.*, 1999), podendo desenvolver cirrose, hipertensão portal e neoplasia primária (MANDAL e SUZUKI, 2002).

A IARC – *International Agency for Research on Cancer* (1987) e EPA – *Environmental Protection Agency* (1988) classificam o arsênio como carcinógeno humano Classe I, para o qual há evidência suficiente, a partir de estudos epidemiológicos, de uma associação causal entre a exposição ao arsênio e o câncer de pele e pulmão (no caso de exposição por via inalatória). Existe também evidência de que o arsênio cause câncer em órgãos internos devido à ingestão oral (SHIN, 2005). Existem evidências epidemiológicas que indicam uma associação entre a exposição crônica ao arsênio inorgânico e o aumento do risco de câncer de pele, pulmão, fígado, rins e bexiga (IARC, 1987, ROJAS *et al.*, 1999 *apud* BOUTAKHRIT *et al.*, 2005). Alguns estudos indicam elevados riscos de câncer em múltiplos órgãos (pulmão, pele, vesícula, rins e fígado) em diversas áreas do mundo, incluindo Japão, Bangladesh, Índia, Chile, e Argentina onde as populações estão expostas à água potável contaminada com arsênio (MANDAL e SUZUKI, 2002, ANAWAR *et al.*, 2002).

O mecanismo de carcinogênese ainda não está bem estabelecido. O arsênio inorgânico e seus metabólitos induzem a mutação por deleção, aberrações cromossômicas, alterações nas cromátides irmãs, mas não mutações pontuais (GOYER e CLARKSON, 2001, ANAWAR *et al.*, 2002, SHIH, 2005). Os compostos de arsênio também podem alterar o sistema de reparo do ácido desoxiribonucleico (ADN), e este dano de reparação pode resultar em um efeito co-mutagênico com luz ultra-violeta, raio-X, e várias substâncias químicas (SHIH, 2005). Outros modos de ação sugerem a metilação no ADN, estresse oxidativo, e proliferação celular, mas não existem dados suficientes que os confirmem (NRC, 1999 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

Atualmente, a exposição crônica ao arsênio inorgânico é freqüente em todos os continentes, atingindo proporções alarmantes em regiões, já mencionadas, da Argentina, Chile, China, Bangladesh, Taiwan e Índia. A população de Bangladesh não mais utiliza águas subterrâneas (aproximadamente em cinquenta distritos), que contêm altos níveis de arsênio, desde que muitos estudos epidemiológicos evidenciaram que a exposição ao arsênio está fortemente associada a doenças e câncer, embora esta água ainda seja utilizada em aquicultura e irrigação do solo (ANAWAR *et al.*, 2002, ALAM *et al.*, 2003, HUNG *et al.*, 2004, LIU *et al.*, 2005). Nestas regiões, os altos níveis de arsênio na água causam problemas de saúde, tais como, doenças cardiovasculares, hepatomegalia, neuropatia, câncer, problemas dermatológicos (hiperpigmentação, hipopigmentação, hiperqueratose) e problemas no sistema vascular periférico (enfermidade da pele negra) que progride à gangrena seca e amputação espontânea das extremidades afetadas (LIAO e LING, 2003, CHOU e DE ROSA, 2003, HOSSAIN, 2006). Os sintomas relacionados à toxicidade do arsênio podem levar de meses a anos para se desenvolverem. Este período varia de pessoa para pessoa, dependendo da quantidade de arsênio ingerido, estado nutricional, nível de imunidade, e o período total de exposição ao arsênio (HOSSAIN, 2006). Nestas regiões se observa um aumento dos cânceres de pulmão, rim, bexiga, pele, fígado e próstata (HOPENHAYN-RICH *et al.*, 1998, SMITH *et al.*, 1998, SAHA *et al.*, 1999, KARIM, 2000, YOSHIDA *et al.*, 2004). O tempo de latência estimado para a aparição destes tipos de câncer é superior a vinte anos (HOPENHAYN-RICH *et al.*, 1998).

2.1.4. Relação dose - efeito

A DL_{50} para compostos inorgânicos de arsênio varia entre 10 a 300 mg/Kg. Os compostos hidrossolúveis são mais tóxicos que os menos solúveis. A DL_{50} para o trióxido de arsênio (As_2O_3) varia de 26 a 47 mg/Kg em camundongos, e 15 mg/Kg em ratos. A arsina (AsH_3) é extremamente tóxica na concentração de 250 mg/Kg durante uma exposição de 30

minutos, pode ser letal, e pode provocar intoxicações numa concentração de 3-10 mg/Kg por hora. Níveis urinários na concentração de 0,8 mg/L podem levar a intoxicações que poderiam ocasionar dermatites, perfurações do septo nasal (no caso de inalação de compostos arseniais), faringite e conjuntivite, e níveis acima de 2 mg/L podem ocasionar anemia severa (GOYER e CLARKSON, 2001).

2.1.5. Parâmetros estabelecidos por órgãos regulamentadores

2.1.5.1. Limites máximo de tolerância estabelecidos em peixe e pescado

A legislação Brasileira regulamenta os níveis de arsênio em alguns alimentos e gêneros alimentícios, conforme a Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, a qual 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", segundo a publicação no D.O.U. - Diário Oficial da União do Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998, o órgão emissor desta é o Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS), a área de atuação é Alimentos e determina o limite máximo de tolerância de 1,0 mg/kg para o arsênio em peixes e produtos de peixe (BRASIL, 2006).

O limite máximo de tolerância para arsênio inorgânico em peixe e pescado não foi estabelecido pela legislação brasileira.

2.1.5.2. Valores máximos de ingestão permitidos

O Comitê de Especialistas sobre Aditivos em Alimentos da Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO) recomenda uma Ingestão Semanal Tolerável Provisional de arsênio inorgânico de 15 µg /Kg de peso corpóreo, que corresponde a uma ingestão de cerca de 130 µg/dia

para uma pessoa de 60kg. Este valor não se aplica aos casos de incidentes onde ocorre a exposição aguda (WHO, 1989, SAKUMA *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos a média estimada para a ingestão diária de arsênio através dos alimentos é de 12 a 40 µg. Para a FAO/WHO a dose diária máxima aceitável é de 2 µgAs/kg. Os alimentos marinhos, grãos e cereais contribuem com a maior parte do arsênio na dieta (UTHUS, 1994; ABERNATHY, 1994).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabeleceu, em 1975, o limite de 50µg/L para arsênio em água, e este limite foi utilizado por 25 anos. Em 2001, a EPA abaixou este limite para 10µg/L. No Brasil, a legislação em vigor para água de consumo humano é a Portaria N° 1.469, de 29 de dezembro de 2000 que estabelece o limite de 0,01 mg/L (SAKUMA *et al.*, 2003).

Admite-se que para um adulto de 70 kg a ingestão diária média de As deva ser de 12-40 µg. O limite superior de segurança, provavelmente, poderá ser de 140 µg, em razão do arsênio, aparentemente, não ser tóxico em casos de ingestão entre 140-250 µg/dia. Estes valores estão de acordo com a FAO/WHO para indivíduos com 70 kg. O NOAEL (nível no qual não se observa nenhum efeito) calculado para o arsênio é de 0,8 µg/kg/dia; e o LOAEL (menor nível no qual se observa um efeito adverso) é de 14 µg/kg/dia. O NOAEL dividido pelo fator de incerteza de 3 deriva a RfD de 0,3 µg/kg/dia, dose oral de referência, que representa a estimativa do nível de exposição diária sem risco apreciável de efeitos deletérios (SALGADO, 2003).

2.1.6. Risco de exposição através dos alimentos

Com exceção da exposição ocupacional, os alimentos e a água são normalmente as principais fontes de arsênio para o homem. Durante muitos

anos os estudos se concentraram na determinação de arsênio total, mas nas últimas décadas as pesquisas estão sendo direcionadas para a caracterização das espécies arseniais próprias para cada tipo de alimento (SAKUMA *et al.*, 2003).

O arsênio é encontrado em baixas concentrações na água potável. A concentração máxima permitida desse metalóide em água potável é 50 µg/L e o valor estabelecido é 10 µg/L pela EPA e OMS (WHO, 2001, HOSSAIN, 2006). O arsênio presente na água encontra-se predominantemente nas formas inorgânicas As (V) e As (III) (SHIH, 2005), e a água é considerada uma via de exposição importante de arsênio inorgânico para o homem. Atualmente existem muitas regiões onde se consomem água com altos níveis deste cancerígeno (YOSHIDA *et al.*, 2004, HUNG *et al.*, 2004). As piores situações são encontradas na Ásia, em Bangladesh, Índia, China e Taiwan. Nestas regiões o solo naturalmente contém altos níveis de arsênio que é lixiviado na água subterrânea e consumida como água potável (CHOU e DE ROSA, 2003). Foram implementados diversos avanços tecnológicos para diminuir o conteúdo de arsênio em água potável, utilizando-se técnicas de troca iônica, adsorção, ultrafiltração, osmose inversa e adsorção-coprecipitação com FeCl₃ seguido de coagulação (XU *et al.*, 2002, NING, 2002, ZAW e EMETT, 2002, CHAKRAVARTY, 2002, MENG *et al.*, 2001).

No pescado, que inclui peixes, moluscos, crustáceos e algas comestíveis, encontram-se as maiores quantidades de arsênio. O conteúdo de arsênio inorgânico em peixes geralmente não excede 0,1 mg/kg, peso seco (MUÑOZ *et al.*, 2000), desta forma, até o momento admite-se que o consumo de peixe não represente risco à saúde associado a metais tóxicos (LAPARRA *et al.*, 2004). O arsênio é encontrado em pescado em diferentes formas químicas, diferindo no grau de toxicidade e na patologia. O arsênio inorgânico [As(III) + As(V)] é a forma mais tóxica, sendo a LD₅₀ do As(III) é 34,5 mg/kg e do As(V) é 41 mg/kg (valores obtidos à partir da administração por via oral em ratos (SHIOMI, 1994).

Os compostos arseniais podem bioacumular-se na biota aquática, principalmente em algas marinhas, peixes e bivalvos, e no final da cadeia alimentar estes contaminantes alcançam animais terrestres e humanos (SCHAEFFER *et al.*, 2005). Para a população em geral o consumo de produtos da pesca é a principal fonte de exposição ao arsênio (HEINRICH-RAMM, *et al.*, 2002). O FDA considera que peixes e outros produtos da pesca representam 90% do total da exposição humana a arsênio por ingestão de alimentos, sendo que os outros tipos de alimentos representam os 10% restantes (FDA, 1993 *apud* LIAO e LING, 2003). Os peixes são valiosos indicadores da bioacumulação de substâncias tóxicas em organismos aquáticos (LIU *et al.*, 2005)

Vários estudos sobre a Dieta Total, onde se avalia a contribuição de diferentes grupos de alimentos na ingestão de arsênio total, mostram que os produtos da pesca contribuem entre 64 a 96% do arsênio ingerido (DABEKA *et al.*, 1993, GUNDERSON, 1995, URIETA *et al.*, 1996, YSART *et al.*, 1999).

Em um estudo realizado por DEVESA *et al.* (2001), como resultado do alto consumo de pescado, a média estimada de ingestão de arsênio total pela população espanhola foi de 245 µg/dia, porém para o arsênio inorgânico, a média estimada de ingestão foi 2,3 µg por pessoa por dia, que representa menos de 1% de arsênio total ingerido, e menos de 1,7% da Ingestão Semanal Tolerável Provisional (PTWI) de arsênio inorgânico. Conseqüentemente, há uma ampla margem de segurança para a ingestão de arsênio inorgânico, mesmo nas populações onde o consumo de pescado é alto (a média de ingestão para a população espanhola é de 77 g/dia).

Na água e sedimentos marinhos, o arsênio ocorre primariamente como arsenato com traços de arsenito, ácido monometilarsônico e ácido dimetilarsínico, com concentrações de arsênio total no intervalo de 1 - 2 µg/L e 3 - 15 mg/kg respectivamente. Os organismos marinhos são capazes de

bioacumular arsênio e as concentrações de arsênio total variam de 1 - 100 mg/kg em animais marinhos e plantas. O padrão de espécies arseniais difere entre os diferentes organismos aquáticos. Em peixes e crustáceos, a arsenobetaina é a espécie dominante (BRISBIN *et al.*, 2002, KOJIMA *et al.*, 2002, HIRATA *et al.*, 2006, HSIUNG e HUANG, 2006), usualmente contribuindo com mais de 80% de arsênio total (SLOTH *et al.*, 2003, SLOTH *et al.*, 2005). O restante das espécies arseniais apresentam um comportamento diferente, não são detectadas em todas as amostras e suas concentrações são bastante inferiores. Para o ácido dimetilarsínico e ácido monometilarsínico são descritas concentrações inferiores a 0,5 µg/g (peso seco) para o ácido dimetilarsínico, e 0,021 µg/g (peso seco) para o ácido monometilarsínico, com porcentagens de arsênio total inferiores a 15 e 0,6% respectivamente (HOWARD e ARBAB ZAVAR, 1981, KAISE *et al.*, 1988, BRANCH *et al.*, 1994 ALBERTÍ *et al.*, 1995 VÉLEZ *et al.*, 1996). Existem pouco dados na literatura para o óxido de trimetilarsina (EDMONDS e FRANCESCONI, 1987, PHILLIPS, 1990, LARSEN, 1995), arsenocolina (LARSEN, 1995) e íon tetrametilarsônio (FRANCESCONI *et al.*, 1988, SHIBATA e MORITA, 1992, GAILAER *et al.*, 1995, LARSEN, 1995). Os arsenoaçúcares são as espécies organoarseniais que estão sendo mais pesquisadas nos últimos anos, mas somente alcançam concentrações relevantes em moluscos (SHIBATA e MORITA, 1992, FRANCESCONI *et al.*, 1988).

Em algas marinhas, os compostos de arsenoaçúcares, (derivados do dimetilarsinoilribosídeos e trimetilarsônioilribosídeos), são as espécies dominantes, embora a arsenobetaina também seja encontrada. Em bivalves, os arsenoaçúcares e a arsenobetaina são os mais encontrados (SLOTH *et al.*, 2003, SLOTH *et al.*, 2005).

Muitos estudos realizados a partir de 1973 mostram que a forma química predominante em produtos da pesca é a arsenobetaina, uma espécie considerada praticamente não tóxica. Entretanto há algumas

espécies, tais como, bivalves e outros moluscos, nos quais a arsenobetaina representa menos de 50% do arsênio total. Isto indica que a presença de outras espécies arseniais em concentrações consideráveis. As diferenças entre os vários tipos de produtos da pesca em termos de conteúdo de espécies organoarseniais podem ser o resultado de fatores que afetam o processo de síntese e degradação, no ambiente aquático (SÚÑER *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado por KOJIMA *et al.* (2002), foi demonstrado que a arsenobetaina não é citotóxica para as várias células animais estudadas, como macrófagos de camundongo RAW264.7, células de fígado de rato TRL1215 e células da pele humana TIG-112.

A presença de arsênio em organismos marinhos foi detectada por Bertrand no início dos anos de 1900, e em 1973, Lunde mostrou que o este elemento era distribuído tanto nas espécies orgânicas quanto inorgânicas. A partir dessa data, muitos estudos têm sido realizados para a elucidação do ciclo do arsênio em ecossistemas marinhos, para o desenvolvimento de metodologia para a especiação do arsênio e para a descoberta da presença de novas espécies (DEVESA *et al.*, 2005). As principais espécies de arsênio detectadas em produtos da pesca são: arsenato, arsenito, ácido monometilarsônico, ácido dimetilarsínico, óxido de trimetilarsina, íon tetrametilarsônio, arsenocolina, arsenobetaina, e também os arsenoaçúcares e arsenolipídeos (MUÑOZ *et al.*, 1999, HIRATA *et al.*, 2006).

As espécies arseniais metiladas, tais como, ácido monometilarsônico e ácido dimetilarsínico, óxido de trimetilarsina e tetrametilarsônio são considerados moderadamente tóxicas. Estes compostos são precursores de formas orgânicas mais complexas e praticamente não tóxicas como a arsenocolina e arsenobetaina (GEBEL, 2001 *apud* FATTORINI *et al.*, 2004). Por último, os arsenoaçúcares, encontrados somente em moluscos, tais

como, bivalvos e gastrópodes, e são espécies cuja toxicidade necessita de estudos adicionais (LI *et al.*, 2003). As concentrações de arsênio total não fornecem informações para a realização de uma análise de risco. Conseqüentemente, há a necessidade de métodos analíticos capazes de diferenciar entre as diferentes espécies de arsênio, denominadas análises de especiação (ACKLEY *et al.*, 1999, SLOTH *et al.*, 2005).

Estudos mostram que animais marinhos tais como, marisco, caranguejo, lagosta, camarão e peixe, que são diariamente consumidos como produtos da pesca em muitos países contém altas concentrações de compostos arseniais, variando de 4 a 80 µg/g e estes compostos são geralmente na forma de compostos orgânicos solúveis em água (KAISE *et al.*, 1988 *apud* SAKURAI *et al.*, 2002).

2.1.7. Técnicas analíticas utilizadas para determinação de espécies arseniais

A identificação e quantificação das diferentes espécies arseniais em alimentos são importantes para se conhecer o risco de exposição deste elemento para a saúde humana, uma vez que a toxicidade do arsênio é altamente dependente da forma química presente (SCHAEFFE *et al.*, 2005). Assim, diversos estudos de especiação foram realizados nos últimos anos. A realização da especiação apresenta alguns problemas como a instabilidade das espécies durante as etapas do método analítico, a eficiência da extração, baixas recuperações, sensibilidade dos métodos analíticos e falta de materiais de referência.

Atualmente, somente são comercializados dois materiais de referência com conteúdo certificado das espécies arseniais: arsenobetaína e ácido dimetilarsínico em músculo de atum (CRM-627, Institute for Reference Materials and Measurements, Bruxelas, Bélgica); arsenobetaína e íon

tetrametilarsênio em músculo de dogfish (DORM-2, Institute for Environmental Chemistry, National Research Council, Ottawa, Canadá).

Para a especiação de compostos arseniais em pescado são utilizadas as técnicas de cromatografia líquida (HPLC) e espectrometria de massas com plasma de acoplamento indutivo (HPLC-ICP-MS) que apresentam uma sensibilidade bastante adequada (ACKLEY *et al.*, 1999, CHATTERJEE, 2000, ZBINDEN *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida e espectrometria de emissão atômica com plasma de acoplamento indutivo (HPLC-ICP-AES) e com uma etapa de geração de hidretos entre o cromatógrafo e o espectrofotômetro é uma técnica que também apresenta boa sensibilidade para a especiação de compostos arseniais (GETTAR *et al.*, 2000, CHASSEAU *et al.*, 2000).

A espectrometria de absorção atômica com chama não é atualmente utilizada para a especiação devido a sua baixa sensibilidade. A espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite também é pouco aplicada, devido ao difícil acoplamento com as técnicas de separação (GONG *et al.*, 2002).

A espectrometria de absorção atômica combinada com a geração de hidretos (HG-EAA) é a técnica de absorção atômica mais utilizada para a especiação de arsênio em alimentos (GONG *et al.*, 2002). HPLC-HG-EAA comparada com HPLC-ICP-MS apresenta a vantagem de menor custo, e apesar dos limites de detecção serem ligeiramente superiores aos obtidos no ICP-MS, são adequados para a quantificação de As e de suas espécies na maioria das matrizes alimentares (SLEJKOVEC *et al.*, 1996, VÉLEZ *et al.*, 1996, VÉLEZ *et al.*, 1997).

A espectrometria de fluorescência atômica (AFS) é uma excelente alternativa para a determinação de traços de arsênio e de suas espécies

(VILANÓ *et al*, 2000), e têm sido utilizada para detecção de espécies arseniais orgânicas em pescado (SÁNCHEZ RODAS *et al*, 2002). O acoplamento do HPLC e HG-AFS não apresenta dificuldade, e em comparação com o HG-ASS, oferece vantagens em termos de sensibilidade e baixo custo do equipamento.

Em relação ao efeito do cozimento nos teores de arsênio em pescado, DEVESA *et al*. (2001) comparou o conteúdo de arsênio total e de arsênio inorgânico em pescado antes e após diferentes tipos de cozimento concluiu que o efeito geral do cozimento não foi significativo para o conteúdo de arsênio nas diferentes espécies analisadas, porém para alguns tipos de pescado observou-se um significativo aumento na concentração de arsênio total após o cozimento de bivalvos e bacalhau salgado, e aumento na concentração de arsênio inorgânico em bivalvos e lula. Assim o efeito do cozimento depende do tipo de pescado considerado. Neste trabalho, os autores concluíram que a variação na concentração de arsênio total em pescado após o cozimento pode ser resultado da soma de dois efeitos contrários: (a) concentração do metal devido à diminuição no peso resultante da perda de água, voláteis e em menor grau a outros constituintes como lipídeos, carboidratos e proteínas, e (b) perda de arsênio total como resultado da volatilização e solubilização.

O protocolo da EPA, 1989 considera que o nível de arsênio não varia durante o processo de cozimento (EPA, 1989 *apud* DEVESA *et al*, 2001). Em um trabalho realizado por ALMEIDA (2005) avaliou-se a interferência do cozimento em microondas nos teores de As total em cação e foi observado que este cozimento não interferiu estatisticamente na concentração de arsênio e as perdas durante o procedimento não foram significativas.

O Quadro 3 apresenta um levantamento bibliográfico de trabalhos científicos relacionado aos teores de arsênio obtidos em diferentes espécies de pescados, em algumas regiões do mundo.

Quadro 3. Intervalos de concentração de arsênio total em mg/kg, em diferentes espécies de pescados, em diferentes regiões do mundo

Espécie	Região	Concentração de arsênio	Referência
Amostras de pescados enlatados	Chile - 5 amostras Espanha - 3 amostras Tailândia - 2 amostras Holanda - 1 amostra	0,23 – 2,15 mg/kg, peso úmido 1,92 – 2,65 mg/kg, peso úmido 0,55 – 0,87 mg/kg, peso úmido 2,06 mg/kg, peso úmido	VÉLEZ <i>et al</i> , 1997
Moluscos: <i>C. angulata</i> e <i>S. plana</i> Crustáceos: <i>P. longirostris</i> e <i>U. tangeri</i> <i>M. kerathurus</i> Peixe: <i>L. ramada</i>	Espanha	2,44 – 2,50 mg/kg, peso úmido 1,33 – 3,60 mg/kg, peso úmido 0,65 mg/kg, peso úmido	SUNER <i>et al</i> , 1999
8 diferentes espécies de peixe	Espanha	3,08-53,57 mg/kg, peso seco, "Meagrim" 3,72-32,04 mg/kg, peso seco, Pescada 4,05-24,29 mg/kg, peso seco, "Small hake" 9,49-62,97 mg/kg, peso seco, "white fish" 2,73-36,87 mg/kg, peso seco, Anchova 2,20-14,57 mg/kg, peso seco, Chicharro 3,89-27,62 mg/kg, peso seco, Sardinha 1,02-74,96 mg/kg, peso seco, "Blue fish"	MUNOZ <i>et al</i> , 2000
5 diferentes espécies de peixe	Espanha	4,1 – 32,0 mg/kg, peso seco, Pescada 4,5 – 33,0 mg/kg, peso seco, "Meagrim" 5,7 – 24,3 mg/kg, peso seco, "Small hake" 2,7 – 30,7 mg/kg, peso seco, Anchova 2,4 – 5,4 mg/kg, peso seco, Chicharro	SUNER <i>et al</i> , 2002
1 espécie de marisco (<i>Pitaria chione</i>), 1 espécie de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Mar Adriático	2,56-8,40 mg/kg peso úmido	JUREŠA e BLANUŠA, 2003
9 diferentes espécies de peixe	Mar Adriático	0,56-23,30 mg/kg peso úmido	JUREŠA e BLANUŠA, 2003

Quadro 3. Continuação

Espécie	Região	Concentração de arsênio	Referência
3 espécies de peixe (Liza Aurata, Anguilla anguilla, Solea vulgaris)	Atlântico sul – Costa Espanha	0,30-1,85 mg/kg peso úmido –fígado 0,52-3,96 mg/kg peso úmido –músculo	USERO <i>et al.</i> , 2003
Amostras de peixes	Sul este da Espanha	0,396 – 12,584 mg/kg peso úmido	DELGADO-ANDRADE <i>et al.</i> , 2003
8 amostras de peixes	China	0,26-2,38 mg/kg peso úmido	LI <i>et al.</i> , 2003
3 espécies de camarão	Coletados na Baía Cienfuegos em 2001, após episódio de contaminação aguda	13,25 – 24,99 mg/kg peso seco	FATTORINI <i>et al.</i> , 2004
17 diferentes espécies de peixe	Mar Adriático e Mar Jônio	0,62–61,50 mg/kg, peso úmido, média= 8,58 mg/kg, músculo de peixe 1,06–35,28 mg/kg, peso úmido, média = 10,56 mg/kg, fígado de peixe	MARCOTRIGIANO e STORELLI, 2003
3 espécies peixe	Coletados na Baía Cienfuegos em 2001, após episódio de contaminação aguda	2,17 – 488,99 mg/kg peso seco	FATTORINI <i>et al.</i> , 2004
4 espécies de peixes: Anchova (<i>Engraulis encrasicolus</i>), Dourada (<i>Sparus aurata</i>), Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>) e Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	Mar Egeu - Grécia	12,9-25,81 mg/kg peso seco – anchova 9,5-13,5 mg/kg peso seco- sardinha 2,75-6,55 mg/kg peso seco – Robalo 5,26 mg/kg peso seco- Dorada	SCHAEFFER <i>et al.</i> , 2005
Amostras de ostra, peixe, camarão	Obtidos no Mercado local, Japão	8,3-44,7 mg/kg peso seco	HIRATA e TOSHIMITSU, 2005
11 diferentes tipos de peixe e marisco	Mercado New Jersey	0,23 a 3,3 mg/kg peso úmido	BURGER e GOCHFELD, 2005
4 espécies de peixe: Pargo (<i>P. auratus</i>), Flathead (<i>P. bassensis</i> e <i>N. richardsoni</i>), lagosta (<i>J. edwardsii</i>), e abalone, molusco (<i>H. rubra</i>).	Costa de Victoria, Austrália	1,4-50,7 mg/kg	FABRIS <i>et al.</i> , 2006
Amostras de ostra, peixe, camarão	Obtidos no Mercado local, Japão	6,6-35,1 mg/kg, peso seco	HIRATA <i>et al.</i> , 2006
Ostra (<i>Crassostrea gigas</i>)	Sul este, Taiwan	9,78-10,68 mg/kg	LIU <i>et al.</i> , 2006

2.2. Mercúrio

O mercúrio é o único metal que se encontra no estado líquido a temperatura ambiente, e pode se apresentar em três estados de oxidação: no estado de oxidação zero (Hg^0), ele existe na forma metálica ou como vapor; os estados mercurioso e mercúrico 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 mercúrio pode formar vários compostos orgânicos estáveis pela ligação a um ou dois átomos de carbono. Cada estado de oxidação e cada espécie orgânica apresentam toxicocinética e específicos efeitos à saúde (GOYER e CLARKSON, 2001, YANG *et al.*, 2003).

O mercúrio raramente é encontrado como elemento livre na natureza. Encontra-se amplamente distribuído, porém em baixas concentrações, por toda a crosta terrestre (AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN., 2003). O mercúrio é introduzido no meio ambiente através de fontes geoquímicas e antropogênicas, sendo um poluente ambiental bem conhecido (YANG *et al.*, 2003). As erupções vulcânicas, a solubilização das rochas, solos e sedimentos, a desgaseificação da crosta terrestre e a evaporação de corpos aquáticos constituem as principais fontes naturais de mercúrio (SCHROEDER e MUNTHER, 1998). As principais fontes antropogênicas são as atividades de mineração (HYLANDER e MEILI, 2003, CAMARGO, 2002), a fabricação de lâmpadas, artigos médicos, equipamentos elétricos (termostatos, baterias, etc), amálgamas dentários, em processos industriais como na produção de cloreto e soda cáustica, na obtenção de metais preciosos, incineração, entre outros (MOORE, 2000, LEVINE *et al.*, 2005). As atividades antropogênicas são responsáveis por 70% das 5.500 toneladas de mercúrio liberado na atmosfera terrestre a cada ano (UNEP, 2002 *apud* TRASANDE *et al.*, 2005). O mercúrio está também presente em combustíveis naturais como o carbono e o petróleo, cujo consumo produz a emissão direta na atmosfera (CAMARGO, 2002, LIN e PEHKONEN, 1999).

A crosta terrestre é fonte importante para a contaminação de corpos aquáticos naturais. Uma parcela do mercúrio encontrado na água é de origem natural, embora possa parcialmente ser de origem atmosférica e ter sido gerado, também, por atividade antropogênica. Portanto, é difícil avaliar, quantitativamente, as contribuições relativas à atividade antropogênicas e à natural em relação aos mercuriais que sofrem lixiviação do solo para a água (AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN, 2003).

O mercúrio elementar transforma-se rapidamente em aerossol devido a seu baixo ponto de ebulição, e desta forma pode percorrer longas distâncias até eventualmente depositar-se no solo e na água (TRASANDE *et al.*, 2005). Aproximadamente 95% do mercúrio elementar encontra-se na atmosfera na forma de vapor (HYLANDER e GOODSITE, 2006). Os vapores na atmosfera são as principais vias de transporte global do mercúrio. Eventualmente ele é convertido à forma hidrossolúvel, e retorna a superfície terrestre através da água de chuva. Neste estágio, duas importantes mudanças químicas podem ocorrer. O metal pode ser reduzido a vapor de mercúrio e retornar a atmosfera, ou pode ser metilado por microorganismos presentes em sedimentos, água doce e água do mar, principalmente por formas enxofre-redutoras de bactérias anaeróbicas (SEIXAS *et al.*, 2005). O principal produto desta reação de biometilação natural é o monometilmercúrio ou metilmercúrio (GOYER e CLARKSON, 2001). O metilmercúrio biomagnifica na cadeia alimentar marinha atingindo altas concentrações em peixes predadores, tais, como, peixe-espada, atum, cavala e tubarão (TRASANDE *et al.*, 2005). O metilmercúrio (CH_3Hg^+) é a forma orgânica mais importante do ponto de vista de exposição humana.

2.2.1. Toxicocinética

O vapor de mercúrio é rapidamente absorvido nos pulmões, e através da corrente sanguínea é distribuído em todos os tecidos do organismo. A alta mobilidade se deve ao fato de ser um gás monoatômico, altamente

difuso e lipossolúvel. É rapidamente oxidado a mercúrio mercúrico (GOYER e CLARKSON, 2001). Aproximadamente 80% do vapor mercúrio (Hg^0) inalado é absorvido. Após a absorção, cerca de 10% se distribui no cérebro e 10% permanece no sangue, sendo que o maior acúmulo ocorre nos rins (BALDWIN e MARSHALL, 1999).

Os rins contêm as maiores concentrações de mercúrio após a exposição a sais inorgânicos e vapores de mercúrio, porém o mercúrio orgânico tem uma alta afinidade pelo cérebro, especialmente pelo córtex posterior. O vapor de mercúrio também tem uma maior predileção pelo sistema nervoso central que os sais de mercúrio inorgânico (GOYER e CLARKSON, 2001).

A absorção gastrintestinal de compostos mercúricos presentes em alimentos observada em um estudo realizado com voluntários humanos foi de aproximadamente 15% (GOYER e CLARKSON, 2001). A via oral é a principal via de entrada de compostos organomercuriais no organismo, com uma absorção de metilmercúrio de 90 a 95% (GOYER e CLARKSON, 2001, BALDWIN e MARSHALL, 1999). Para os compostos inorgânicos, a absorção gastrintestinal é baixa, em torno de 7%, podendo variar de 5 a 10%. (MUÑOZ-OLIVAS e CÁMARA, 2001, SALGADO, 2003).

Admite-se que em 4 dias o mercúrio seja distribuído em todos os tecidos do organismo; no cérebro, o nível máximo é alcançado após 5-6 dias da exposição. Neste período, o cérebro contém aproximadamente 6% da dose, e este valor corresponde a 10% da carga corpórea desse metal. A concentração no tecido cerebral corresponde à cerca de 6 vezes a concentração sangüínea. Quanto à distribuição do metilmercúrio na corrente sangüínea, as relações entre as concentrações nos eritrócitos e no plasma variam em cerca de 20:1 no homem e quanto à distribuição de sais de mercúrio inorgânico, a relação entre as concentrações nos eritrócitos e no

plasma é cerca de 0,4, porém, pode apresentar uma ampla variação (SALGADO, 2003).

A excreção do mercúrio ocorre pela via urinária e fezes, diferindo entre as espécies de mercúrio, dose e tempo de exposição (GOYER e CLARKSON, 2001). Aproximadamente 90% do metilmercúrio é excretado nas fezes na forma de Hg^{2+} (mercúrio inorgânico) após exposição crônica e aguda, devido à ação da microflora intestinal (WHO, 1990). Praticamente todo o mercúrio presente nas fezes encontra-se na forma inorgânica. O processo de eliminação por esta via inicia-se com a secreção biliar de ambas as formas, metilmercúrio e Hg^{2+} , complexadas principalmente com a glutathione (SH) e a outros peptídeos sulfidrílicos. O mercúrio inorgânico é pouco absorvido pelas paredes intestinais; e a maior parte (90% do mercúrio inorgânico), é secretada pela bile, passando diretamente às fezes. O metilmercúrio secretado pela bile é em grande parte reabsorvido para a corrente sangüínea (SALGADO, 2003). Deve-se considerar que todas as formas de mercúrio são capazes de atravessar a placenta (GOYER e CLARKSON, 2001).

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 fica em torno de 200 $\mu\text{gHg}/\text{dia}$, por longo tempo, os níveis sangüíneos serão de aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{L}$, e no cabelo cerca de 50 $\mu\text{g}/\text{g}$. Os valores de referência de mercúrio em populações não expostas ocupacionalmente são, respectivamente, 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ no sangue total, 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ no cabelo, 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ na urina e 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ peso úmido na placenta (SALGADO, 2003).

O mercúrio metálico ou elementar é oxidado a mercúrio divalente após absorção. O vapor de mercúrio inalado e absorvido pelos eritrócitos é biotransformado a mercúrio divalente, porém uma parte é também transportada como mercúrio metálico a tecidos mais distais, particularmente

o cérebro, onde pode ocorrer a biotransformação. O metilmercúrio é biotransformado nos tecidos, pela clivagem da ligação mercúrio-carbono, a compostos de mercúrio divalente. Não existe evidência da síntese de compostos orgânicos de mercúrio em células de mamíferos (WHO, 1990, GOYER e CLARKSON, 2001).

A meia vida de eliminação do metilmercúrio pelo organismo é de 44 dias. A cinética é mais complexa para a eliminação de mercúrio após exposição a sais inorgânicos ou vapores de mercúrio e, geralmente, varia de 20 a 90 dias (BALDWIN e MARSHALL, 1999, GOYER e CLARKSON, 2001), sendo que a eliminação ocorre principalmente pela urina (HORVAT, 2001).

O mercúrio liga-se covalentemente ao enxofre, sendo esta propriedade responsável pela maior parte das ações biológicas deste metal. O enxofre, na forma de sulfidrilas, permite que o mercúrio divalente substitua o átomo de hidrogênio, formando mercaptídeos. Assim, é capaz, mesmo em baixas concentrações, de inativar enzimas sulfidrílicas interferindo no metabolismo e na função celular (AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN, 2003).

2.2.2. Toxicodinâmica

A toxicidade do mercúrio depende da via de exposição (inalação, ingestão ou absorção dérmica) e da forma química do mercúrio. As propriedades que fazem deste elemento um potente tóxico são a grande afinidade do Hg^{2+} e dos compostos orgânicos de mercúrio pelos grupos tiol, a tendência em formar ligações covalentes com as moléculas orgânicas, e a grande estabilidade da ligação Hg-C (HORVAT, 2001).

Os sistemas mais afetados pela intoxicação por mercúrio são o nervoso, pulmonar, trato gastrointestinal, genitourinário e o hematopoiético (GRAEME e POLLACK, 1998).

A inalação de altas concentrações de vapor de mercúrio pode causar bronquite corrosiva que pode levar a insuficiência respiratória, e pneumonite intersticial. Os primeiros sintomas de alteração do sistema nervoso central são tremores e manifestações neuropsíquicas (perda de memória, insônia, irritabilidade, aumento de excitabilidade e susceptibilidade emocional) (BALDWIN e MARSHALL, 1999). Na exposição crônica aos vapores de mercúrio, os efeitos mais relevantes são, também, os associados ao sistema nervoso central. Os achados clínicos são tremores, aumento da tireóide, queda de pressão arterial, taquicardia, gengivite, severa salivação, alterações hematológicas, e aumento da excreção de mercúrio na urina. Com o aumento da exposição podem ocorrer tremores em todo o corpo e espasmos violentos das extremidades, com alterações da personalidade e comportamento, perda de memória, aumento da excitabilidade, depressão severa, delírio e alucinação (BALDWIN e MARSHALL, 1999, GOYER e CLARKSON, 2001).

A tríade de aumento da excitabilidade, tremores e gengivite são reconhecidas, historicamente, como as principais manifestações da intoxicação por mercúrio, por inalação de vapores de mercúrio e exposição a nitrato de mercúrio (GOYER e CLARKSON, 2001).

Altas doses de cloreto mercúrico são tóxicas às células renais tubulares, e a exposição crônica a baixas doses de sais mercúricos ou vapores de mercúrio podem induzir a uma doença glomerular de fundo imunológico. Pessoas expostas podem desenvolver proteinúria, que é reversível ao cessar da exposição. Aumento urinário das porfirinas também pode estar presente (AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN, 2003).

Os compostos mercuriosos são menos corrosivos e menos tóxicos que os sais mercúricos, provavelmente por serem menos solúveis (GOYER e CLARKSON, 2001).

Os efeitos do metilmercúrio se manifestam principalmente no sistema nervoso central e podem transcorrer várias semanas ou meses desde a exposição (GRAEME e POLLACK, 1998).

Nas exposições ambientais, o metilmercúrio é a forma mais importante em termos de toxicidade e efeitos à saúde. Como já mencionado anteriormente, os principais efeitos à saúde humana são os neurotóxicos, principalmente durante o desenvolvimento do cérebro. A principal fonte de exposição para a população em geral é o consumo de peixe. Dependendo do nível de exposição, o metilmercúrio pode causar sintomas neurológicos que variam de leves a severos (CARRINGTON *et al.*, 2004). As manifestações clínicas dos efeitos neurotóxicos são (1) parestesia, um adormecimento e formigamento ao redor da boca, nos lábios, e extremidades, particularmente, nos dedos e ponta dos pés; (2) ataxia, dificuldade em engolir, articular palavras; (3) neurastenia, sensação generalizada de fraqueza, fadiga e incapacidade de concentração; (4) perda de visão e audição; (5) espasmos e tremores; e finalmente (6) coma e morte (BALDWIN e MARSHALL, 1999, GOYER e CLARKSON, 2001).

O mercúrio armazena-se no coração, rins, cérebro e fígado. Enquanto os riscos relacionados ao mercúrio incluem desrupção da neurotransmissão mediada por glutamato, homeostase do cálcio e microtúbulos ligados, a maior preocupação relacionada à exposição ao mercúrio em adultos se deve à ação do mercúrio nas ligações dos grupos tióis e a precipitação de complexos insolúveis de selênio-mercúrio. Isto leva a destruição de um grande número de componentes celulares contendo tiol, tais como, glutathione, coenzima A e cisteína. Além disso, por causa da glutathione e selênio, via enzima glutathione peroxidase dependente de selênio, que participa de processos antioxidantes celulares, a exposição ao mercúrio aumenta os processos oxidativos e danos oxidativos a constituintes celulares, como o DNA (LEVENSON e AXELRAD, 2006).

Muitas das informações sobre os efeitos do metilmercúrio a saúde foram obtidas nos episódios de intoxicação ocorridos em Minamata e Nigata, no Japão, e no Iraque (CARRINGTON e BOLGER, 2002). A toxicidade do metilmercúrio ao desenvolvimento cerebral foi primeiramente reconhecida nos anos de 1950 em Minamata, Japão, onde o consumo de peixe com altas concentrações de metilmercúrio por mulheres grávidas resultou em, no mínimo, 30 casos de paralisia em crianças. Em outro episódio de intoxicação ocorrido em 1972 no Iraque onde um grande número de pessoas consumiu pão feito com grão tratado com fungicida à base de mercúrio, observou-se que recém nascidos e crianças foram os mais profundamente afetados (TRASANDE *et al.*, 2005). Subseqüentes exames neurológicos de crianças nascidas de mães que consumiram o pão contaminado por mais de 2 a 3 meses sugeriram um aumento de anormalidades neurológicas (AMIN-ZAKI *et al.*, 1974 *apud* SPURGEON, 2006). A vulnerabilidade do desenvolvimento cerebral ao metilmercúrio reflete a habilidade deste toxicante atravessar a barreira placentária e concentrar-se no sistema nervoso central causando dano (GRAEME e POLLACK, 1998). Recentemente foram realizados estudos epidemiológicos relacionados com a neurotoxicidade na infância e a exposição fetal a metilmercúrio, por mães que ingeriram peixes contendo Hg durante a gravidez, evidenciando anormalidades na memória, atenção e fala (UNITED STATES, 2006, DEBES *et al.*, 2006).

De acordo com OKEN *et al.*, (2005) alguns estudos que avaliaram se a exposição crônica a baixas concentrações de mercúrio orgânico proveniente do consumo de peixe e pescado pela mãe durante a gestação estaria associada com os efeitos adversos no desenvolvimento cerebral do feto, apresentaram resultados conflitantes. Nas ilhas Faroe, localizadas no Atlântico Norte entre Noruega, Shetland e Islândia, foram avaliadas 900 crianças até os 7 anos de idade e que apresentavam altas concentrações de metilmercúrio no cordão umbilical que foram associadas a baixas pontuações em testes de desenvolvimento e testes cognitivos (GRANDJEAN *et al.*, 1997). Por outro lado, em outro estudo que avaliou o desenvolvimento

de crianças das ilhas Seychelles, no Oceano Índico, não houve associação entre o mercúrio total em cabelo materno e os resultados dos testes de desenvolvimento neuronal realizados em mais de 700 crianças até os 9 anos de idade (DAVIDSON *et al.*, 1998 *apud* OKEN *et al.*, 2005), apesar do fato dos níveis de mercúrio serem semelhantes a aqueles encontrados nas ilhas de Faroe (OKEN *et al.*, 2005).

Uma revisão destes dois estudos realizados pela *National Academy of Sciences* (NAS) em 1998, conclui que as inconsistências nos resultados podem ser explicadas pelas diferenças de modelo de estudo e fontes de exposição. Além disso, recomendou que o estudo realizado nas ilhas de Faroe serve melhor como um modelo crítico para a avaliação de risco, pois atende a maioria dos critérios utilizados para avaliar a credibilidade e utilidade de um estudo epidemiológico (JACOBSON, 2001)

Uma investigação sistemática do potencial de efeitos no desenvolvimento das crianças após exposição pré-natal ao metilmercúrio teve início nos anos de 1980s, onde foram avaliados os níveis de exposição pré-natal ao metilmercúrio em populações expostas, através do consumo de peixe e pescado e o subsequente desenvolvimento das crianças em diferentes idades. Apesar do considerável esforço despendido nesta pesquisa ao longo de 20 anos, ainda não há um consenso sobre a questão da exposição ao metilmercúrio pela dieta em mulheres grávidas apresentar risco ao feto (SPURGEON, 2006).

Como parte dos esforços para minimizar os riscos associados a exposição a mercúrio através do consumo de peixe e pescado, o FDA publicou um informativo em 2004 (FDA, 2004 *apud* CARRINGTON *et al.*, 2004) relativo ao consumo de certas espécies de peixes por mulheres grávidas. O FDA recomenda que este grupo de mulheres deve evitar o consumo de quatro espécies de peixe, denominados, cavala, tubarão, peixe espada e tile fish (CARRINGTON *et al.*, 2004).

CHOY *et al.*, 2002, em um estudo realizado em Hong Kong, mostrou que altos níveis de mercúrio no sangue estavam associados à infertilidade humana masculina e feminina, e que o alto consumo de produtos da pesca estava associado às elevadas concentrações de mercúrio no sangue da população infértil estudada.

Os dados relacionados a carcinogênese humana são inadequados, em relação à exposição aos compostos mercuriais. A International Agency for Research on Cancer (IARC) classifica o mercúrio metálico e seus compostos inorgânicos como não sendo um carcinógeno humano (classificação Grupo 3), baseando-se em dados de experimentação animal e eventuais dados para humanos. Os estudos epidemiológicos não demonstram uma correlação entre a exposição aos vapores de Hg e a carcinogênese. O metilmercúrio parece ser clastogênico, porém não é um potente agente mutagênico; alguns estudos apresentam algumas evidências de que induza aberrações cromossômicas (AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN, 2003).

2.2.3. Parâmetros dos órgãos regulamentadores

2.2.3.1. Limites máximo de tolerância estabelecidos em peixe e pescado

A Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998, a qual 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", segundo a publicação no D.O.U. - Diário Oficial da União do Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998, o órgão emissor desta, do Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS), da área de atuação de Alimentos e determina o limite máximo de tolerância (LMT) de 0,5 mg/kg de mercúrio para a maioria das espécies e de 1,0 mg/kg para espécies

predadoras (BRASIL, 2006). O limite máximo de tolerância para metilmercúrio em peixe e pescado não foi estabelecido pela legislação brasileira.

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).

2.2.3.2. Valores máximos de ingestão permitidos

Devido aos riscos à saúde associados a 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).

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).

2.2.4. Risco de exposição através dos alimentos

As fontes de exposição humana ao mercúrio incluem alimentos contaminados, a inalação dos vapores de mercúrio no ambiente e a exposição através de tratamentos médicos e odontológicos. A dieta é a fonte dominante de exposição ao mercúrio para a população em geral, onde os peixes e os produtos da pesca são as principais fontes do metilmercúrio. Diversos estudos mostram que as concentrações de metilmercúrio em peixes e mariscos são aproximadamente 1000 a 10000 vezes maior que em outros alimentos, como cereais, batatas, vegetais, frutas, carnes, aves, ovos e leite (UNITED STATES, 2006).

A água potável, assim como as águas naturais, apresentam um conteúdo de mercúrio na ordem de ng/l (EMTEBORG *et al.*, 1996), que proporciona geralmente a ingestão de menos de 1% do mercúrio inorgânico (HORVAT *et al.*, 2003). De acordo com a EPA, o nível máximo de mercúrio inorgânico em água potável é 0,002 mg/l (UNITED STATES, 2006).

O monometilmercúrio é a forma mais tóxica presente no ambiente e a bioacumulação nos peixes, que constituem o topo da cadeia alimentar aquática, representa a principal fonte de exposição para humanos. Como resultado, muitos países estabelecem normas para garantir a saúde humana em relação ao consumo de peixe, e muitos trabalhos foram realizados para desenvolver métodos analíticos sensíveis, precisos e rápidos para monitorar monometilmercúrio em amostras biológicas e ambientais nas últimas duas décadas (YANG *et al.*, 2003, TRASANDE *et al.*, 2005).

A presença e o comportamento do mercúrio no sistema aquático é de grande interesse e importância porque é o único metal pesado que bioacumula e sofre biomagnificação através de todos os níveis da cadeia alimentar aquática (LINDQVIST *et al.*, 1991 *apud* KEHRIG, 2002). As maiores concentrações são encontradas em peixes de água doce ou

salgada, que estão no topo da cadeia alimentar, por exemplo, o tubarão e o peixe-espada que apresentam valores médios de mercúrio total em partes comestíveis superiores a 1200 µg/kg, enquanto as anchovas e salmão apresentam valores inferiores a 85 µg/kg (WHO, 1990)

A relação entre os riscos à saúde e a ingestão de metilmercúrio foi inicialmente avaliada a partir de dados toxicológicos obtidos em estudos epidemiológicos de casos de intoxicação em Minamata e Niigata, no Japão, nas décadas de 1950 e 1960 (BERLIN, 1986 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

Atualmente, a maioria dos estudos está direcionada para avaliar a forma na qual o Hg encontra-se presente nos produtos de pesca, tanto em água doce como em água salgada. Em geral, 75% do mercúrio encontra-se na forma de metilmercúrio, embora tenham sido descritas porcentagens inferiores a 50% em bivalves (LIANG *et al.*, 2003, BERZAS NEVADO *et al.*, 2003) e gasterópodos (LIANG *et al.*, 2003). A concentração de mercúrio encontrada em pescado procedente de áreas não contaminadas é geralmente inferior a 0,1 µg/g peso úmido, e em pescado provenientes de áreas contaminadas não é incomum encontrar valores superiores a 1 µg/g peso úmido (BERZAS NEVADO *et al.*, 2003). Assim, RENZONI *et al.*, 1998, quantificou mercúrio na concentração de 4,1 µg/g peso úmido em um exemplar de atum capturado no mar mediterrâneo, e CHICOUREL *et al.*, 2001, obteve o valor de 4,7 µg/g peso úmido em um exemplar de cação comercializado em São Paulo. Concentrações superiores a 1,2 mg/kg são encontradas nas partes comestíveis de cação, peixe-espada e atum capturados no mar Mediterrâneo.

Um estudo realizado por BUSTAMANTE *et al.*, 2006 mostrou que o mercúrio encontra-se, principalmente, na forma orgânica em cefalópodes, no qual o metal está ligado a proteínas musculares. O mercúrio orgânico é altamente disponível, e por isso os cefalópodes devem ser considerados

como uma fonte significativa de mercúrio para os predadores na cadeia alimentar e também para humanos que os consomem.

A ingestão de Hg total pela dieta foi determinada durante os anos 1973 a 1982 em diversos grupos populacionais em diferentes faixas etárias. A Ingestão Diária Total média encontrada foi de 2.000 a 7.000 ng Hg em adultos e até 1.000ng Hg em crianças. Entre 1981-82, a ingestão foi de 3.000 ng Hg em adultos e até 1.000 ng Hg em crianças (SHERLOCK *et al.*, 1982 *apud* AZEVEDO, NASCIMENTO e CHASIN *et al.*, 2003).

O processo de evisceração e descamação não reduz significativamente o nível de mercúrio do pescado (UNITED STATES, 2006). Em relação ao cozimento, os resultados são contraditórios. Por exemplo, de acordo com CHICOUREL *et al.*, 2001, fritar e assar os peixes e pescado afetam os níveis de mercúrio presentes no cação azul, mas no Bonito frito, e em sardinhas cozidas observou-se uma diminuição de 24 a 66% de mercúrio. A EPA considera que o nível de mercúrio não varia durante o processo de cozimento, e as pequenas alterações de concentração que podem ocorrer são consequência da perda de umidade durante o cozimento (UNITED STATES, 2006).

O Quadro 4 apresenta o levantamento bibliográfico de trabalhos científicos sobre os teores de mercúrio obtidos em diferentes espécies de peixe e pescado, em algumas regiões do mundo.

Quadro 4. Intervalos de concentração de mercúrio total em mg/kg, em diferentes espécies de peixe e diferentes regiões do mundo

Espécie	Região	Concentração de Mercúrio	Referência
3 espécies de tubarão	Argentina	0,03 – 3,26 mg/kg, peso úmido, média= 0,77 mg/kg em 570 amostras de músculo de <i>M. schmitti</i> 0,89 – 3,04 mg/kg, peso úmido, média= 2,20 mg/kg em 73 amostras de músculo de <i>H. bivius</i> 0,95 - 3,43 mg/kg, peso úmido, média= 2,99 mg/kg em 14 amostras de músculo de <i>Notorhynchus sp</i>	MARCOVECCHIO <i>et al</i> , 1991
Cação Azul (<i>Prionace glauca</i>)	Tasmânia	0,27 – 1,20 mg/kg, peso úmido	DAVENPORT, 1995
Tubarão-toninha (<i>C. signatus</i>)	Flórida	0,24 – 1,70 mg/kg, peso úmido	ADAMS e MCMICHAEL, 1999
Cação martelo (<i>Sphyma tiburo</i>)	Flórida	0,13 – 1,50 mg/kg, peso úmido	ADAMS e MCMICHAEL, 1999
Peixe Tamboril (<i>Lophius piscatorius</i>)	Sul Mar Adriático (Sul da Itália)	0,61 - 2,22 mg/kg, peso úmido, média = 1,26±0,58	STORELLI e MARCOTRIGIANO, 2000
26 espécies diferentes de peixes	Mercado Catar-Arábia	0,05 - 24 mg/kg, peso úmido	AL-JEDAH e ROBINSON, 2001
5 espécies de tubarão	Sul da costa do Brasil	0,36±0,28 µg/g, peso úmido – <i>M. norrisi</i> 0,41±0,35 µg/g, peso úmido – <i>M. canis</i> 1,77±0,56 µg/g, peso úmido – <i>C. signatus</i> 1,90±0,58 µg/g, peso úmido – <i>S. megalops</i> 2,22±0,72 µg/g, peso úmido – <i>S. mitsukurii</i>	PINHO <i>et al</i> , 2002
Peixe Espada Espécies de tubarão	Estados Unidos	1,07 mg/kg 0,96 mg/kg	CARRINGTON e BOLGER, 2002
9 diferentes espécies de peixe	Mar Adriático	0,142-0,373 mg/kg peso úmido	JUREŠA e BLANUŠA, 2003
17 diferentes espécies de peixe	Mar Adriático e Mar Jônio	0,03–5,03 mg/kg, peso úmido, média= 0,85 mg/kg, músculo ND–6,26 mg/kg, peso úmido, média = 0,57 mg/kg, fígado	MARCOTRIGIANO e STORELLI, 2003
Cação Azul (<i>Prionace glauca</i>)	Açores-Portugal	0,16 – 1,20 mg/kg, peso úmido	BRANCO <i>et al.</i> , 2004
Cação Azul (<i>Prionace glauca</i>)	Ilhas Canárias	0,16 - 1,84 mg/kg, peso úmido	BRANCO <i>et al.</i> , 2004

Quadro 4. Continuação

Espécie	Região	Concentração de Mercúrio	Referência
3 amostras de tubarão	Holanda	0,95, 1,52 e 3,53 mg/kg , peso úmido	KRYSTEK e RITSEMA, 2004
Albacora (<i>Thunnus alalunga</i>)	Sul este Mar Mediterrâneo	2,41 mg/kg peso úmido fígado 1,56 mg/kg peso úmido músculo	STORELLI e MARCOTRIGIANO, 2004

2.3. Selênio

O selênio é classificado como um elemento essencial para humanos e para várias espécies animais, porém é tóxico em concentrações elevadas, e é considerado como um potencial poluente marinho (HIGHAM e TOMKINS, 1993, BHATTACHARYA *et al.*, 2003). Devido a sua importância fisiológica e toxicológica, tem havido um aumento no interesse sobre a quantidade de selênio em água marinha e em organismos aquáticos (LIU *et al.*, 1987).

O selênio é introduzido no meio ambiente através da queima do carvão, fundição, mineração e da combustão de combustíveis fósseis. Existe um interesse em relação ao selênio devido à proteção que ele exerce contra os efeitos nocivos de alguns metais pesados. Diversos estudos sobre o selênio em produtores primários e seu acúmulo em consumidores fornecem algumas informações básicas da importância e papel deste elemento em organismos marinhos. Entretanto, para a maioria, a bioacumulação e transformação do selênio é ainda pouco conhecida nos ecossistemas marinhos (BHATTACHARYA *et al.*, 2003). Esta informação é necessária para determinar o papel da biota no ciclo natural do selênio nos oceanos, e para prever concentrações elevadas de selênio, por fontes naturais, industriais e agrícolas (LIU *et al.*, 1987).

A disponibilidade, assim como, o potencial tóxico do selênio e seus compostos estão relacionados à sua forma química e, principalmente à sua solubilidade. O selênio ocorre na natureza e nos sistemas biológicos como selenato (Se^{6+}), selenito (Se^{4+}), selênio elementar (Se^0), e seleneto (Se^{2-}). O selenito é considerado mais tóxico que o selenato (HIGHAM e TOMKINS, 1993).

Alimentos com alto teor protéico, representam uma fonte rica de selênio. Os ovos e carnes (fígado, rim) apresentam alta capacidade de acumular esse elemento, e o pescado, especialmente o camarão, carne, produtos lácteos, e grãos fornecem as maiores quantidades na dieta (SMORKOLJ *et al.*, 2005).

2.3.1. Toxicocinética

Compostos orgânicos de selênio, como a seleniomietionina são bem absorvidos pelo homem. Os selenitos e selenatos inorgânicos são menos absorvidos pelo trato gastrointestinal. Os selenitos e selênio elementar praticamente não são passíveis de absorção pelo trato gastrointestinal (TIGLEA e CAPITANI, 2003). Alta absorção de selênio foi reportada em mulheres que receberam doses de 1mg de selênio como seleniomietionina ou selenito dissolvido em água (WHO, 1987).

De acordo com YOUNG *et al.* (1982) o selênio de fontes animais é menos absorvido que o derivado de fontes vegetais.

A distribuição do selênio ocorre de forma semelhante tanto para compostos orgânicos, quanto para inorgânicos. Após a absorção é amplamente distribuído, inicialmente no fígado e rins, porém níveis consideráveis permanecem no sangue, cérebro, miocárdio, músculo esquelético e testículos. O selênio é transferido ao feto através da placenta, e também pode ser encontrado no leite humano. Nas células vermelhas está

associado com a glutathione peroxidase, onde encontra-se aproximadamente três vezes mais concentrado que no plasma (UNITED STATES, 1996, WHO 1997 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

A biotransformação mais importante do selênio, do ponto de vista toxicológico é a redução do Se^{+6} (selenato) e do Se^{+3} (selenito) a Se^{-2} (seleneto). Num processo dependente de glutathione, o selênio é incorporado em diversos análogos da glutathione até transformar-se em Se^{-2} . O seleneto formado é transformado em trimetilselenônio, que é excretado na urina (RANSOME *et al.*, 1961, THOMAS, 1992 *apud* TIGLEA e CAPITANI, 2003).

O padrão de excreção de uma simples dose de selênio parece ter duas fases, a primeira é rápida, com mais de 15 a 40% da dose absorvida sendo excretada na urina. Durante a segunda fase, ocorre uma excreção exponencial da dose restante, com uma meia-vida de 103 dias. A meia vida do seleniomethionina é de 234 dias. Quando a cinética atinge o estado de equilíbrio, a concentração urinária é aproximadamente duas vezes maior que nas fezes e o aumento dos níveis urinários fornecem uma medida da exposição. A concentração de selênio urinário é normalmente menor que 100 $\mu\text{g/l}$. A excreção pode ocorrer pelo suor e ar exalado (UNITED STATES, 1996, WHO 1997 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

2.3.2. Essencialidade do selênio

Os selenatos são compostos relativamente solúveis, similares aos sulfatos, e são rapidamente absorvidos pelos sistemas biológicos (GOYER e CLARKSON, 2001)

Na China, a suplementação sistemática da dieta com selenito de sódio eliminou a cardiomiopatia congestiva, conhecida como doença de Keshan. Embora a etiologia da doença seja multifatorial, parece ocorrer principalmente devido a deficiência de selênio resultante dos baixos níveis

deste elemento no solo e alimentos. A constatação da importância do selênio na dieta também foi relatada na Nova Zelândia, onde a suplementação com selenometionina permitiu observar melhora da distrofia muscular em pacientes submetidos à nutrição parenteral (SIMONOFF, *et al.*, 1988).

As funções bioquímicas do selênio no homem estão relacionadas à sua presença no sítio ativo das selenoproteínas, tais como, a enzima glutathione peroxidase. Esta enzima toma parte do processo celular que protege o organismo de dano oxidativo por radicais livres como ânions superóxidos, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio (SIMONOFF, *et al.*, 1988, PLESSI *et al.*, 2001). A enzima glutathione peroxidase, em conjunto com a vitamina E, cataliza a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, e protege membranas biológicas de danos oxidativos (RAYMAN, 2000).

Outra função enzimática bem conhecida do selênio é o de catalisador na produção do hormônio tireóide. O selênio parece ter papel importante no metabolismo do hormônio tireoideano como constituinte da iodotironina 5'-deiodinase, podendo produzir efeitos adversos no crescimento, por exemplo, no caso de deficiências combinadas de Se e Iodo (WHO, 1998, SMRKOLJ *et al.*, 2005). Além disso, outros efeitos do selênio não dependente de selenoenzimas são aqueles sobre o sistema imune, funções reprodutivas e proteção contra a toxicidade de alguns metais pesados como o arsênio, mercúrio e cobre. As concentrações de selênio no organismo também estão relacionadas com doenças do tipo viral, alterações de humor, doenças cardiovasculares e câncer (VENTURA *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos têm mostrado desde a década de 1970, uma correlação inversa entre concentrações de selênio e mortalidade por câncer. Estudos mais recentes evidenciam efeitos benéficos da suplementação com selênio, na incidência de determinados cânceres como de bexiga, mama,

colo, reto fígado, esôfago, estômago, pâncreas e tireóide (RAYMAN, 2000). Um possível mecanismo dos efeitos protetores do selênio é o seu envolvimento na inibição da formação de malonaldeído, um produto do dano peroxidativo tecidual, que é carcinogênico (GOYER e CLARKSON, 2001), ou este mecanismo do efeito anticarcinogênico estaria relacionado com o efeito antioxidante do Se através das glutathione-peroxidases, protegendo o DNA contra danos oxidativos (TIGLEA e CAPITANI, 2003).

O selênio parece ser essencial para a fertilidade masculina em humanos (RAYMAN, 2000), pois participaria da biossíntese da testosterona e estaria relacionada ao desenvolvimento normal dos espermatozóides, observação feita em estudos experimentais (BEHNE *et al.*, 1996).

2.3.3. Deficiência de selênio

A deficiência de selênio em humanos mais extensivamente documentada acarreta a doença de Keshan, descrita pela primeira vez em 1935 na província chinesa do mesmo nome (TIGLEA e CAPITANI, 2003). Esta doença caracteriza-se clinicamente por vários graus de cardiomegalia e descompensação cardíaca, e a histopatologia do miocárdio consiste de degeneração e necrose das fibras musculares com substituição por fibrose formando cicatrizes (WHO, 1998).

A ocorrência da doença foi associada ao baixo conteúdo de selênio na dieta e também foi observada baixa atividade da glutathione peroxidase sanguínea na população afetada. Os baixos níveis de selênio no sangue e a baixa atividade da glutathione peroxidase podem estar relacionados com as lesões no miocárdio (GOYER e CLARKSON, 2001).

Diversos trabalhos têm abordado a relação da deficiência leve e moderada de selênio e alterações em vários sistemas orgânicos, como os

sistemas imune, endócrino, reprodutivo, cardiovascular, neurológico, além dessa relação com a incidência de câncer (WHO, 1998, RAYMAN, 2000).

Além disso, observou-se nos estudos realizados por HAWKES e HORNBOSTEL, 1996, FINLEY e PENLAND, 1998, BENTON e COOK, 1991 que o baixo nível de selênio estava associado a um significativo aumento da incidência de depressão e outros estados negativos de humor, como a ansiedade, confusão e hostilidade.

Os efeitos do selênio no sistema nervoso central são ainda pouco conhecidos. Alguns trabalhos têm mostrado que a cinética de neurotransmissores está alterada na deficiência de Se, além de estar relacionada clinicamente com senilidade e rápido declínio das funções cognitivas. A suplementação com selênio parece ter efeito benéfico no humor depressivo em pacientes com concentrações médias no limite inferior dos valores de referência para selênio. A contraprova disso seria trabalhos mostrando ocorrência de comportamento hostil e depressivo em pessoas com deficiência de selênio (TIGLEA e CAPITANI, 2003).

2.3.4. Toxicodinâmica

A toxicidade do selênio começou a se evidenciar durante a década de 1930, na agropecuária, quando se descobriu que algumas enfermidades de animais, que se restringiam a determinadas áreas, eram resultado de contaminação crônica resultante da ingestão de vegetais em áreas com quantidades elevadas deste elemento no solo (WHO, 1987).

A toxicidade do selênio varia de acordo com a forma química e a espécie envolvida. O selenito Se(IV) é considerado mais tóxico que o selenato Se(VI) (HIGHAM e TOMKINS, 1993, LE *et al.*, 1998).

Enquanto considera-se que traços de selênio sejam essenciais à saúde, o excesso deste elemento é tóxico. Os valores de LD₅₀ em ratos para alguns compostos de selênio são: selenito de sódio, 7 mg/kg; dimetilseleneto, 1600 mg/kg; cloreto de metilselênio, 49 mg/kg; e selênio elementar, 6700 mg/kg (SHIBATA *et al.*, 1992). As intoxicações agudas por selênio em gado são observadas freqüentemente, porém para a população humana em geral a preocupação principal é a exposição crônica. O limite máximo aceitável de selênio na água de consumo no Canadá é 10 µg/L (LE *et al.*, 1998).

A toxicidade do selênio ocorre quando a ingestão excede a capacidade de excreção. Em algumas áreas na China, na Venezuela, e em algumas partes dos estados de Dakota do Sul e Nebraska, nos Estados Unidos, onde o solo apresenta altas quantidades de selênio, foram observadas intoxicações por selênio em humanos e animais, denominada selenose. A intoxicação em humanos é caracterizada por danos aos dentes, descoloração amarelada da pele, erupções na pele, e doenças nas unhas e nos dedos dos pés (GOYER e CLARKSON, 2001).

Em 1961, uma síndrome tóxica por selênio ocorrida em 5 vilarejos em Hubei, província da China, afetou 50% de 248 habitantes. Existem várias semelhanças entre esta síndrome e os efeitos crônicos observados em eqüinos e gado. Os principais sintomas foram perda de cabelos, unhas quebradiças com manchas, e lesões de pele nas costas das mãos e pés, e nos antebraços e pernas, e na parte posterior do pescoço. Estas áreas tornaram-se vermelhas, intumescidas e com bolhas. Além disso, 13 de 22 pessoas de um vilarejo tiveram sintomas neurológicos, incluindo anestesia periférica, dor e hiperreflexia. Em alguns indivíduos, estes sintomas progrediram para torpor, convulsões, paralisias e função motora alterada. O selênio provoca perda de fertilidade e defeitos congênitos e também é embriotóxico e teratogênico baseado em experimentação animal (YANG *et al.*, 1983, WHO, 1987).

A intoxicação por selênio pode causar congestão do fígado e rins, perda de cabelo, danos nos ossos, enfraquecimento e efeitos no sistema nervoso central (DIETZ *et al.*, 2000). Assim como o mercúrio, o selênio também causa efeitos adversos na reprodução (HANSEN e DEGUCHI, 1996).

2.3.5. Interações biológicas

O selênio tem várias interações biológicas, as quais podem afetar a toxicidade ou a deficiência de selênio, assim como a toxicidade de outro metal. Ficou evidenciado em estudos de experimentação animal que se a ingestão de vitamina E é baixa, a susceptibilidade à intoxicação por selênio aumenta. O oposto também é verdadeiro: a resistência aumenta se a ingestão de vitamina E aumenta. O selênio também forma complexos insolúveis com prata, cobre, cádmio e mercúrio. Este elemento forma complexo com cobre, mercúrio, e a toxicidade destes metais é influenciada pela ingestão de ambos (SCHUTZ *et al.*, 1994, YONEDA e SUZUKI, 1997, WHO, 1987, WHO 1996 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

O selênio é um antídoto aos efeitos tóxicos de outros metais, particularmente, o arsênio, mercúrio, cobre e tálio. Este mecanismo ainda é desconhecido. O selênio pode prevenir os efeitos tóxicos do cádmio em tecidos de testículos de ratos e a dieta de selênio pode reduzir os efeitos tóxicos do metilmercúrio (SCHUTZ *et al.*, 1994, YONEDA e SUZUKI, 1997, WHO, 1987, WHO 1996 *apud* GOYER e CLARKSON, 2001).

Desde que Moxon, em 1938, descobriu que o arsênio protege contra a toxicidade do selênio, diversas formas arseniais foram testadas em relação a sua habilidade de neutralizar a toxicidade do selênio. Enquanto o arsenito de sódio e o arsenato de sódio são muito efetivos na redução da toxicidade do selênio, o metilarsonato de sódio é pouco efetivo. Além disso, os compostos arseniais não protegem contra todas as formas de selênio.

Embora o arsenito de sódio diminua a toxicidade do selênio, e do selenito de sódio e selenocisteína, ele aumenta a toxicidade do trimetilselênio e dimetilseleneto (LE *et al.*, 1998). Uma explicação parcial sobre a capacidade de o arsênio diminuir a toxicidade do selênio é o aumento da excreção de selênio causada pelo arsênio. Este mecanismo se baseia nas observações de que o arsenito aumenta a excreção do selênio e, similarmente, o selenito estimula a excreção do arsênio na bile em ratos (LEVANDER e BAUMANN, 1966, HILL, 1975 *apud* LE *et al.*, 1998).

O acúmulo de mercúrio e selênio em quantidades equimolares tem sido observado em rins, glândulas pituitárias, cérebro e tireóide de mineradores expostos ocupacionalmente ao mercúrio (KOSTA *et al.*, 1975 *apud* SVENSSON *et al.*, 1992).

A ação mais importante e mais conhecida dos compostos de selênio, tais como, selenoproteína, está relacionada à redução dos efeitos tóxicos do mercúrio (OSMAN *et al.*, 1998). O mercúrio reage primeiramente, em uma razão equimolar, com o selenito em sua forma reduzida, formando o complexo (Hg-Se), seguido pela ligação a proteína plasmática específica (selenoproteína P). A selenoproteína P pode ser efetiva primariamente na detoxificação de metais pesados tais como o mercúrio por seqüestrar estes metais como complexos estáveis (YONEDA e SUZUKI, 1997).

O selênio tem mostrado ser um elemento de proteção na intoxicação por mercúrio. O mecanismo ainda é desconhecido, mas tem-se observado que outros antioxidantes, como a vitamina E, também protegem da toxicidade do Hg, levando à hipótese de que esse efeito estaria ligado ao combate aos radicais livres e radicais superóxidos gerados pela presença do Hg no organismo (GOYER, 1995).

Em relação ao peixe, o exato mecanismo de interação entre mercúrio e selênio não é completamente conhecido (WATANABE *et al.*, 1997,

NAVARRO-ALARCÓN e LÓPEZ-MATINÉZ, 2000). Entretanto, dados obtidos de estudos em peixes em diferentes ecossistemas e em mamíferos marinhos indicam que o selênio, assim como o mercúrio em organismos aquáticos é mais encontrado em concentrações que aumentam proporcionalmente com o nível trófico das espécies (LIMA *et al.*, 2005).

Quando administrado concomitantemente ao metilmercúrio, o selênio confere alguma proteção contra certos efeitos neurológicos da exposição crônica e, também, em altos níveis ao metilmercúrio (MOLLER-MADSEN e DANSCHER, 1991). É pouco conhecido o papel protetor do selênio contra os efeitos crônicos no desenvolvimento embrionário e fetal, na exposição concomitante ao metilmercúrio. Na deficiência de selênio observa-se uma exacerbação dos efeitos do metilmercúrio no desenvolvimento neurológico que se expressa no início do desenvolvimento (FREDRIKSSON *et al.*, 1993, WATANABE, 1999, WATANABE *et al.*, 2001).

2.3.6. Recomendação de ingestão diária para humanos

Devido ao potencial de efeitos adversos à saúde tanto no excesso quanto na deficiência de selênio, a avaliação de risco deve incluir ambos os possíveis efeitos. A National Research Council's Food and Nutrition Board (NAS, 1980) recomenda 200µg por dia como o nível máximo seguro para ingestão de humanos adultos. Os estudos de balanço metabólico em americanos adultos mostraram que 70 µg/dia para humano (70 kg peso corpóreo) parece ser o necessário para manter o balanço de selênio presumivelmente adequado para satisfazer as necessidades orgânicas desse elemento. Estudos realizados em populações chinesas indicam que uma ingestão menor de 20µg pode causar deficiência de selênio. Alguns países como a Nova Zelândia, apresentam locais, onde a ingestão diária é de aproximadamente 30µg, mas não há evidência de efeito significativo à saúde das pessoas que vivem nestas áreas. O nível crítico para a prevenção de deficiência, portanto, é de 20µg/dia (GOYER e CLARKSON, 2001).

A influência do selênio proveniente da dieta na atividade da glutathione peroxidase é evidente, e a quantidade mínima de selênio necessária estabelecida para adultos é, respectivamente, 70 e 55 µg/dia para homens e mulheres (RDA, 1989 *apud* PLESSI *et al.*, 2001).

2.3.7. A exposição ao selênio através dos alimentos

Os alimentos constituem a principal via de exposição ao selênio para a população. Devido às diferenças geoquímicas, a ingestão humana estimada de selênio através da alimentação varia de 11 a 5000 µg/dia, em diferentes partes do mundo, entretanto, a ingestão é mais comum na faixa de 20 a 300 µg/dia (WHO, 1987).

Os alimentos fornecem o selênio necessário ao organismo humano e animal. A carne e o peixe fornecem uma parte significativa desse elemento na dieta humana, aproximadamente 40 a 50% do total de selênio ingerido. Em geral, os vegetais, frutas e produtos lácteos são pobres em selênio, com exceção de alguns cogumelos, brócolis e amêndoas brasileiras que tem a habilidade de acumular selênio do solo e armazená-lo em altas concentrações (REILLY, 1998, MURPHY *et al.*, 2002).

A presença de selênio em alimentos pode apresentar ampla variação, dependendo da disponibilidade natural do selênio no meio ambiente e de certas atividades humanas, tais como, a adição direta de selênio na cadeia alimentar. Os níveis de selênio comumente encontrados em alimentos (peso úmido) variam de 0,4 - 1,5 mg/kg em fígado, rins e pescado; 0,1 - 0,4 mg/kg em carne (músculo); < 0,1 - 0,8 mg/kg ou mais em cereais; < 0,1- 0,3 mg/kg em produtos lácteos; e < 0,1 mg/kg na maioria das frutas e vegetais (WHO, 1987).

A ingestão diária de selênio varia consideravelmente nas diferentes populações no mundo devido a grande variabilidade do conteúdo de selênio nos alimentos (LEVANDER, 1987). A ingestão diária de selênio depende de

sua concentração no alimento e da quantidade de alimento consumida. O seu conteúdo nas plantas é afetado pelo seu conteúdo no solo no qual as plantas se desenvolvem, e o conteúdo em produtos de origem animal reflete o conteúdo consumido por esses animais (BARCLAY *et al.*, 1995).

Considera-se relevante a avaliação do nível de consumo de selênio na população em função dos conhecimentos atuais sobre sua atuação como elemento essencial e como toxicante, e também como um possível modificador de toxicidade de contaminantes ambientais, (HANSEN *et al.*, 2004).

Os níveis de selênio em alimentos encontrados em um estudo realizado em Portugal por VENTURA *et al* (2007) variaram de 0,088 a 0,737 mg/kg em alimentos ricos em proteínas, tais como carne, peixe e ovos, enquanto em alimentos com baixo conteúdo protéico, como frutas e vegetais, os valores de selênio encontrados foram de 1,7 a 24,9 µg/kg. Estes valores estão em acordo com muitos estudos sobre os níveis de selênio em alimentos que mostram que as maiores fontes desse elemento na dieta são peixe, carne e ovos (SMRKOLJ *et al.*, 2005, McNAUGHTON e MARKS, 2002). No estudo realizado por VENTURA *et al* (2007) as quantidades encontradas de selênio em peixes foram 0,429 e 0,461 mg/kg em sardinha, 0,537 mg/kg em peixe espada, 0,6188 mg/kg em cavala branca, e níveis mais baixos como 0,2564 µg/kg em lula e 0,229 e 0,237 mg/kg em polvo.

Em um estudo realizado por PLESSI *et al.*, 2001, os valores de selênio encontrados em 24 diferentes espécies de peixes marinhos variaram de 0,134 a 0,734 mg/kg, sendo o valor médio igual a 0,307 mg/kg peso úmido, e os valores obtidos em 14 espécies diferentes de mariscos variaram de 0,067 a 0,605 mg/kg, sendo o valor médio igual a 0,328 mg/kg peso úmido.

No Brasil, FÁVARO *et al.* (1994) determinaram entre outros elementos, selênio em diferentes dietas regionais do país, compreendendo

as regiões Norte (Manaus), Sul (Santa Catarina, dois tipos diferentes de dietas) e de amostras de um restaurante da Universidade de São Paulo. Os valores variaram entre 0,07 e 0,25 mg/kg, correspondendo a ingestões diárias estimadas entre 30 e 146µg/dia. A legislação no Brasil prevê limites para selênio: 0,05 mg/kg em alimentos líquidos e 0,30 mg/kg em alimentos sólidos (DOU, 1965 *apud* TIGLEA e CAPITANI, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar a presença de arsênio total, arsênio inorgânico, mercúrio total, metilmercúrio e selênio em amostras de peixe cação comercializadas na cidade de São Paulo e avaliar o risco associada à ingestão desse peixe pela população.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliação de arsênio total, arsênio inorgânico, mercúrio total, metilmercúrio, e selênio em amostras de peixe cação.
- Estimativa do risco em função do consumo alimentar de cação pela população brasileira.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1. Arsênio total e Arsênio Inorgânico

4.1.1. Equipamentos

- Espectrômetro de Absorção Atômica (EAA) modelo 3300 Perkin-Elmer, equipado com um amostrador automático Perkin-Elmer, modelo AS-90 e um sistema de injeção em fluxo (FI) Perkin-Elmer, modelo FIAS-400 para fornecer geração de hidreto no modo de fluxo contínuo SOBRA ESTO. Como sistema de atomização se utilizou um tubo de quartzo aquecido eletricamente.

Outros equipamentos utilizados:

- Liofilizador FTS System
- Moulinex Optiquick de uso doméstico, com uma potência máxima de 900W
- Banho de areia Raypa, modelo PL 5125
- Mufla Heraeus modelo K 1253 equipada com programa controle modelo Eurotherm Controls 902
- Agitador mecânico IKA Labortechnik, modelo KS 125.
- Centrífugas para tubos de 50ml Merck, modelo Eppendorf 5810 e para tubos Eppendorf, Merck , modelo Heraeus Biofuge Pico

4.1.2. Reagentes

- Na preparação dos reagentes e padrões utilizou-se água ultrapura (Milli-Q water system, Millipore Inc.) com uma resistividade 18.2 M Ω cm.
- Todos os reagentes químicos são grau PA ou de pureza superior.

- As diluições de padrão de As (V) foram preparadas a partir da diluição da solução padrão comercial (1000 mg/l) de As (V) da Merck. As diluições padrões de padrão de As (III) foram preparadas por redução de uma solução padrão de As (V).
- A solução redutora para a conversão de As (V) à As (III) é uma mistura de iodeto de potássio (KI) 5% (m/v) e ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) a 5% (m/v)
- A solução redutora de As para a geração de hidreto, é borohidreto sódico ($NaBH_4$) 0,2% (m/v) em solução de NaOH 0,05% (m/v). Esta solução foi preparada diariamente, e filtrada em papel Whatman Nº42 antes de sua utilização.
- A vidraria e o material em polietileno utilizados foram previamente tratada com 10% de HNO_3 10% v/v por 24 horas e em seguida lavada três vezes com água deionizada.

4.1.3. Material de referência

DORM-2 (*Dogfish muscle*). Amostra de referência certificada para arsênio total, fornecida pelo Institute for Environmental Chemistry, National Research Council Canadá (NRC, Ottawa, Canadá).

4.1.4. Amostras

As amostras de postas de peixe cação adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais na cidade de São Paulo (ANEXO 3), foram analisadas no período de março de 2006 a abril de 2006. O peixe cação, disponível no comércio, encontrava-se em postas e desta forma, não foi possível identificar a espécie, comprimento e peso.

As amostras foram preparadas pela separação das partes comestíveis das partes não comestíveis (intestino, cabeça e cartilagem). As partes comestíveis foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas em alto vácuo

com pressão reduzida. A sublimação foi obtida por pressão e congelamento. As amostras liofilizadas foram trituradas e homogeneizadas até se obter um pó fino e posteriormente armazenadas a 4°C até o momento de análise.

4.1.5. Métodos

4.1.5.1. Determinação de arsênio total

A determinação de arsênio total foi realizada mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do arsênio por FI-HG-EAA.

A mineralização foi realizada de acordo com o protocolo CEN 14546 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARIZATION, 2004). Pesou-se 0,25g de amostra liofilizada e adicionou-se 2,5 ml de agente coadjuvante da mineralização ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (20%) m/v + MgO (2%) m/v) e 5 ml de ácido nítrico (50%) v/v. A mistura foi evaporada até secar no banho de areia, e posteriormente, foi mineralizada aplicando-se um ciclo de temperatura – tempo, com um aumento gradual de temperatura as amostras permaneceram 12 horas a 450°C. Quando a aplicação de um ciclo de mufla não foi suficiente para a destruição total da matéria orgânica, as cinzas foram umedecidas com HNO_3 a 10% (v/v), evaporada até secar no banho de areia e novamente submetidas a um programa de temperatura-tempo como indicado anteriormente.

As cinzas obtidas depois da mineralização foram dissolvidas de acordo com o protocolo CEN 14546 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARIZATION, 2004). Adicionou-se às cinzas, 5ml de ácido clorídrico (6 mol/l) e em seguida, adicionou-se 5ml do agente pré-redutor (ácido ascórbico (5%) m/v + iodeto de potássio (5%) m/v). Após 30 minutos, a solução foi filtrada através de papel Whatman No.1 e o volume completado com ácido clorídrico (6 mol/l) a 25 ml em balão volumétrico (Figura 1).

As condições analíticas utilizadas para a determinação de arsênio total por espectrometria de absorção atômica (EAA) com um sistema de injeção em fluxo (FI) que permite simultaneamente a geração de hidretos (HG) contínuo, estão descritas na Tabela 2.

Os sinais foram integrados em altura de pico e a quantificação realizada com curva de calibração de As (III) em intervalo de 0-10 ng/ml. As concentrações das soluções padrões foram 0, 1, 2, 5, 7,5 e 10 ng/ml. As amostras foram preparadas em três replicatas e foram realizadas duas leituras para cada replicata.

Tabela 2. Condições analíticas para determinação de arsênio total por FI-HG-EAA

Geração de hidretos (FI-HG)	
Amostra	0,5 ml
Agente redutor	NaBH ₄ 0,2% m/v em NaOH 0,05% m/v, fluxo 5ml/min
Ácido	HCl 10% v/v, fluxo 10ml/min
Gás de arraste	Argônio, fluxo 100ml/minuto
Espectrometria de Absorção Atômica (EAA)	
Célula de Quartzo	900°C
Comprimento de onda	193.7nm
Passagem da fenda spectral	0.7nm
Lâmpada de Arsênio	400mA, EDL (electrodeless discharge lamp) System 2
Temperatura de atomização	900 °C

Figura 1. Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de arsênio total

4.1.5.2. Determinação de arsênio inorgânico

A determinação de arsênio inorgânico foi realizada de acordo com a metodologia padronizada e validado por MUÑOZ *et al.*, 1999. A amostra é submetida a uma digestão ácida com posterior extração do arsênio inorgânico com solventes e quantificação do arsênio por FI-HG-EAA.

Para a digestão da amostra, pesou-se 0,50 g de amostra liofilizada em tubo de polietileno de 50ml com tampa de rosca. Adicionou-se 4,1 ml de água deionizada e 18,4 ml de HCl concentrado. Agitou-se vigorosamente durante 15 minutos e deixou-se em repouso por 12 horas.

Para a extração do arsênio inorgânico, adicionou-se à amostra digerida 1 ml de sulfato de hidrazina 1,5% (m/v), 2 ml de HBr concentrado e agitou-se por 30 segundos. Adicionou-se 10 ml de clorofórmio (CHCl_3), agitou-se por 3 minutos e centrifugou-se a 2000rpm durante 5 minutos. Separou-se a fase clorofórmica utilizando uma pipeta automática e colocou-se em outro tubo de polietileno de 50 ml. A extração com clorofórmio foi repetida mais duas vezes, e as fases orgânicas foram combinadas e filtradas com filtros de seringa de PTFE (25mm, Whatman GD/X) a fim de eliminar matéria orgânica restante.

Adicionou-se 10 ml de HCl 1mol/l a fase clorofórmica filtrada e agitou-se durante 10 minutos. As fases foram separadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Aspirou-se a fase aquosa ácida e colocou-se em béquer de 250ml. Adicionou-se novamente 10 ml de HCl 1mol/l à fase clorofórmica e repetiu-se a extração. As fases aquosas de retroextração foram combinadas.

Para a quantificação do arsênio inorgânico, adicionou-se à fase aquosa ácida retroextraída 2,5ml do agente coadjuvante da mineralização ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (20%) m/v + MgO (2%) m/v) e 10 ml de ácido nítrico concentrado. A mistura foi evaporada até seca no banho de areia, e posteriormente, mineralizou-se em forno de mufla e quantificou-se o arsênio por FI-HG-EAA, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente para a determinação de arsênio total.

A Figura 2 ilustra a marcha analítica da determinação de arsênio inorgânico em pescado.

Figura 2. Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de arsênio inorgânico.

4.1.6. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de arsênio inorgânico

A confiabilidade do método analítico empregado para determinação de As inorgânico foi previamente comprovada pela avaliação dos parâmetros de validação (limite de detecção, precisão e recuperação) no trabalho realizado por MUÑOZ et al., 1999 no Instituto de Agroquímica e Tecnologia dos Alimentos, IATA/CSIC, em Valência, Espanha, onde foi realizada a análise dos metais do presente trabalho. Na tabela 3 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros de validação. As características analíticas foram avaliadas em três amostras de pescado (sardinha, cockles, lula pequena). Os parâmetros de validação estão abaixo descritos (CITAC/Eurachem Guide, 2002)

4.1.6.1. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi estabelecido como a concentração de arsênio inorgânico em pescado que fornece uma leitura de absorbância estatisticamente diferente da leitura de absorbância do branco de reagentes.

O LD instrumental foi calculado dividindo por três o desvio padrão das leituras de absorbância de nove reagentes branco pela inclinação da curva de calibração de As(III). A partir do LD instrumental e levando-se em consideração a massa da amostra e a diluição utilizada foi calculado o LD da amostra expresso em $\mu\text{g/g}$

4.1.6.2. Linearidade

A linearidade foi calculada com um ajuste por mínimos quadrados admitindo um coeficiente de regressão mínimo de 0.999.

4.1.6.3. Precisão

A precisão do método foi expressa como a média da precisão do método para três amostras analisadas. Para cada amostra, a precisão foi calculada a partir do desvio padrão relativo obtido para 6 tomadas de amostra. Foi expressa como o coeficiente de variação em porcentagem, CV (%).

4.1.6.4. Recuperação

A recuperação foi calculada por adição em 3 replicatas de cada amostra com As(III) e As(V). A adição pode ser considerada como um método válido neste caso, desde que a adição de padrão de As(III) e As(V) em amostra de peixe liofilizado e umedecido com água, possa reproduzir os mesmos compostos que existentes nas amostras (compostos organometálicos As-tiol). Desta forma, experimentos realizados *in vitro* por Styblo *et al.*, 1996 *apud* MUÑOZ *et al.*, 2000 mostraram que quando as espécies arseniais foram adicionadas a matrizes protéicas, 60% das ligações arseniais às proteínas citosólicas eram ligações não-covalentes, formando compostos organometálicos As-tiol. Desta forma, quando o As(III) e As(V) foram adicionados às amostras de peixe, estas espécies arseniais

ligadas às proteínas estão, pelo menos parcialmente, com o mesmo tipo de ligação daquelas formadas *in vivo*. Quando 9 mol/l de HCl é adicionado, as ligações são quebradas e o arsênio inorgânico é liberado. A recuperação de As(III) e As(V) foi realizada separadamente para evitar a possibilidade de mutuamente compensarem recuperações não quantitativas.

A recuperação do método foi expressa como a média de três análises independentes em sardinha, *cockles*, e lulas. As adições foram feitas nas amostras liofilizadas, antes de submetê-las ao processo de extração.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(Y - X) 100}{Z}$$

onde:

Y: concentração média de arsênio inorgânico na amostra adicionada.

X: concentração média de arsênio inorgânico na amostra não adicionada.

Z: concentração de arsênio inorgânico adicionada.

4.1.7. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de arsênio total

A confiabilidade do método analítico empregado para determinação de As total foi previamente comprovada pela avaliação dos parâmetros de validação (limite de detecção, precisão, linearidade, recuperação e exatidão) no trabalho realizado por SUÑER *et al.*, 1999, seguindo as definições descritas no item 4.1.6. Na tabela 3 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros de validação.

4.1.7.1. Exatidão

Para determinação da exatidão do método foram utilizados os materiais certificados: DORM-2 (valor certificado $18,0 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$, peso seco), e TORT-2 (valor certificado $21,6 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$, peso seco).

Na Tabela 3 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros de validação das metodologias utilizadas para determinação de As total e As inorgânico.

Tabela 3. Parâmetros analíticos de validação das metodologias FI-HG-EAA utilizadas para a determinação de arsênio total e arsênio inorgânico em pescado (MUÑOZ et al, 1999).

	As total	As inorgânico
Limite de detecção (mg/Kg, peso seco)^a	0,026	0,013
Faixa Linear (ng/ml)	0 – 10	0 – 10
Precisão (RSD %)^b	2%	Cockles 3,3% Lulas 4,8% Sardinha 4,0% Média 4,0%
Recuperação^c	98%	As(III) Cockles 91% Lulas 111% Sardinha 95% Média 99% As(V) Cockles 90% Lulas 99% Sardinha 98% Média 96%
Exatidão	DORM-2 (18,0 ± 1,1) ^d , (17,9 ± 0,5) ^e µg/g, peso seco TORT-2 (21,6 ± 1,8) ^d , (22,3 ± 0,2) ^e µg/g, peso seco	

^a nove brancos de reagentes

^b cada pescado foi analisado em sextuplicata

^c porcentagem de recuperação expressa como média de três análises independentes

^d valor certificado

^e valor obtido

4.2. Mercúrio total

4.2.1. Equipamentos

- A determinação de mercúrio foi realizada em um Espectrômetro de Fluorescência Atômica com geração de vapor frio em fluxo contínuo (CV-AFS; Millenium Merlin PSA 10.025, PS Analytical). O sistema possui duas bombas peristálticas, multicanal de velocidade variável, uma válvula de troca controlada eletronicamente e um separador gás-líquido. O vapor mercúrio gerado é levado ao detector de AFS através de uma membrana higroscópica (Perma Pure) que possibilitou a eliminação da umidade mediante a circulação de ar contra corrente.

Outros equipamentos utilizados

- Forno de microondas CEN, modelo MARS
- Liofilizador FTS System
- Moulinex Optiquick de uso doméstico, com uma potência máxima de 900W

4.2.2. Reagentes

- Na preparação dos reagentes e padrões utilizou-se água ultrapura (Milli-Q water system, Millipore Inc.) com uma resistividade 18.2 M Ω cm.
- Todos os reagentes químicos são grau PA ou de pureza superior.
- As soluções padrão de mercúrio foram preparadas diariamente a partir de diluição apropriada de uma solução padrão comercial (1000 mg/l) de Hg da Merck. Como branco de reativos foi utilizado uma solução de HCl 5% (v/v), e para a preparação dos padrões e a diluição das amostras foi utilizado como diluente o HCl a 5% (v/v).

- A solução redutora para converter o Hg(II) à Hg(0) foi preparada diariamente dissolvendo o SnCl₂ em pó em HCl 15% v/v. A concentração da solução de SnCl₂ é 2% (m/v).
- A vidraria e o material em polietileno utilizados foram previamente tratada com 10% de HNO₃ 10% v/v por 24 horas e em seguida lavada três vezes com água deionizada.

4.2.3. Material de referência

DORM-2 (*Dogfish muscle*). Amostra de referência certificada para mercúrio total, fornecida pelo Institute for Environmental Chemistry, National Research Council Canadá (NRC, Ottawa, Canadá).

4.2.4. Amostras

Descrição das amostras idem ao item 4.1.4.

4.2.5. Método

4.2.5.1. Digestão assistida por forno de microondas em meio ácido para determinação de mercúrio total.

Pesou-se 0,2g de amostra liofilizada em um tubo de PTFE, e em seguida introduziu-o no reator de microondas do mesmo material. A Figura 4 mostra o reator de PTFE utilizado. Adicionou-se 4 ml de HNO₃ concentrado e deixou em repouso por 10 minutos, e em seguida, adicionou-se 1ml de H₂O₂ 35% (v/v) e deixou em repouso por 5 minutos. O reator foi fechado e levado ao forno de microondas onde se aplicou o ciclo de temperatura e potência apresentados no Quadro 5 e na Figura 3.

Quadro 5. Ciclo de temperatura e potência utilizado no forno de microondas

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Potência (W)
85	5	1000
145	10	1000
180	5	1000
180	15	1000
0	45	0

Figura 3. Ciclo de temperatura e potência no forno de microondas aplicado para a digestão das amostras

A Figura 4 ilustra o reator de PTFE utilizado na digestão ácida em forno de microondas

Figura 4. Reator de PTFE utilizado na digestão ácida em forno de microondas

Após digestão, a amostra foi transferida para um béquer, e lavou-se o tubo do reator várias vezes com água deionizada. A amostra digerida, permaneceu em repouso por 24 horas para a liberação de vapores nitrosos. Em seguida, as amostras foram filtradas através de papel Whatman No. 1 e transferidas para balão volumétrico 50 ml, completando com água deionizada. Os brancos de reagentes e amostras de referência foram preparados seguindo-se o mesmo procedimento descrito para a amostra.

A Figura 5 ilustra o fluxograma das etapas que envolvem a determinação de mercúrio total.

Figura 5. Fluxograma das etapas que envolvem a determinação de mercúrio total

4.2.5.2. Determinação de mercúrio total através de CV-AFS

A quantificação de mercúrio total foi realizada por geração de vapor frio em fluxo contínuo acoplado a espectrômetria de fluorescência atômica (CV-AFS). A Figura 6 mostra o esquema do sistema de geração de vapor frio, e a Figura 7 detalha o funcionamento da válvula de intercâmbio do sistema. Os parâmetros analíticos utilizados estão detalhados na Tabela 4.

O ciclo analítico incluiu um tempo de espera, tempo de leitura e tempo de retorno da linha de base. A linha de base do detector de fluorescência estabilizou durante o tempo de espera (15 segundos) com um branco de

reagentes (HCl a 5% v/v) e com a solução redutora (SnCl_2 2% m/v). Durante o tempo de espera a amostra atingiu a válvula de troca. Posteriormente, no tempo de leitura (40 segundos) a amostra misturou-se com a solução de SnCl_2 ; e o Hg(II) se reduziu a Hg(0) que atingiu o detector de AFS. Finalmente, durante 60 segundos (tempo de retorno da linha de base) novamente o branco de reagentes chegou até o detector para retornar a linha de base. Para a leitura de Hg, os sinais foram integrados em altura de pico e a quantificação foi realizada com curva de calibração de Hg em intervalo de 0 - 2,5 ng/ml. As concentrações das soluções padrões foram 0, 0,1, 0,25, 1,0 e 2,5 ng/ml. As amostras foram preparadas em três replicatas e foram realizadas duas leituras para cada replicata.

A Tabela 4 apresenta as condições analíticas utilizadas na determinação de mercúrio por CV-AFS.

Tabela 4. Condições analíticas utilizadas na determinação de mercúrio por CV-AFS: Parâmetros instrumentais e experimentais utilizados

Solução redutora	SnCl_2 2% (m/v) em HCl 15% v/v, fluxo 4,5ml/min
Branco de Reagentes	HCl 5% v/v, fluxo 9ml/min
Gás de arraste	Argônio, fluxo 0,3 l/min
Gás de secagem	Ar, fluxo 2,5 l/min
Tempo de espera	15s
Tempo de leitura	40s
Tempo de retorno da linha de base	60s
Intervalo de amplificação	100
Filtro	32
Comprimento de onda	254nm

A Figura 6 ilustra o esquema do gerador de vapor a frio utilizado para a determinação de mercúrio total por de espectrometria de fluorescência atômica.

Figura 6. Esquema do gerador de vapor à frio utilizado para a determinação de mercúrio total através de espectrometria de fluorescência atômica

A Figura 7 ilustra o funcionamento da válvula de troca do gerador de vapor a frio utilizado para a determinação de mercúrio total, através da espectrometria de fluorescência atômica.

Figura 7. Funcionamento da válvula de troca do gerador de vapor à frio utilizado para a determinação de mercúrio total, através da espectrometria de fluorescência atômica. (a) tempo de espera e de retorno da linha de base. (b) tempo de análise

4.3. Metilmercúrio

4.3.1. Equipamentos

- O equipamento utilizado para a separação das espécies de mercúrio foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), Hewlett-Packard (HP) modelo 1100, equipado com uma bomba quaternária, um sistema de desgaseificação em linha, um injetor automático e um compartimento de termostato para colunas. A coluna cromatográfica utilizada foi de troca aniônica PRP-X100 10 μ m, 250mm x 4,1mm id (Hamilton, Teknokroma,). A pré-coluna utilizada apresentava a mesma fase estacionária da coluna.
- A determinação de mercúrio foi realizada em um Espectrômetro de Fluorescência Atômica com geração de vapor frio em fluxo contínuo (CV-AFS; Millenium Merlin PSA 10.025, PS Analytical). O sistema possui duas bombas peristálticas, multicanal de velocidade variável, uma válvula de troca controlada eletronicamente e um separador gás-líquido. O vapor mercúrio gerado é levado ao detector de AFS através de uma membrana higroscópica (Perma Pure) que possibilitou a eliminação da umidade mediante a circulação de ar contra corrente.
- Um conversor analógico digital com dois canais (Hewlett-Packard, modelo 35900 C) que permitiu obter o sinal analógico proveniente do AFS e converter em um sinal digital que posteriormente foi processado através do programa cromatográfico.

Outros equipamentos utilizados

- Liofilizador FTS System
- Banho de ultrassom (J. P. Selecta, S. A) com tempo programável de 0-15 minutos

- Banho de aquecimento (Julabo modelo HC, Merck).
- Centrífuga para tubos de 50 ml (Merck modelo Eppendorf 5810) e centrífuga para tubos eppendorf (Merck modelo Heraeus Biofuge Pico).

4.3.2. Reagentes

- Na preparação dos reagentes e padrões utilizou-se água ultrapura (Milli-Q, Millipore Inc.) com uma resistividade 18.2 M Ω cm.
- Todos os reagentes químicos são grau PA ou de pureza superior.
- As soluções padrão de mercúrio Hg (II) foram preparadas diariamente a partir de diluição apropriada de uma solução padrão comercial (1000 mg/l) de Hg da Merck. A solução padrão de metilmercúrio (MeHg) foi preparada dissolvendo em metanol-água (50% v/v) em quantidade apropriada do sal disponível comercialmente (CH₃HgCl) (Sigma-Aldrich Laborchenikalien, Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha).
- A fase móvel utilizada na separação cromatográfica foi preparada dissolvendo L-cisteína (C₃H₇NO₂S, 0,04 mol/l) em ácido acético (CH₃COOH, 0,1 mol/l). O processo de termo-oxidação utilizou uma solução de peróxido-dissulfato potássico (K₂S₂O₈) 1% (m/v) em ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,5 mol/l). Como agente redutor foi preparada diariamente uma solução de cloreto de estanho (SnCl₂) a 2% (m/v) em ácido clorídrico (HCl) a 15% (v/v).
- A vidraria e o material de polietileno utilizados foram previamente tratados com 10% de HNO₃ 10% v/v por 24 horas e em seguida lavadas três vezes com água deionizada.

4.3.3. Material de referência

DORM-2 (*Dogfish muscle*). Amostra de referência certificada para metilmercúrio, fornecida pelo Institute for Environmental Chemistry, National Research Council Canadá (NRC, Ottawa, Canadá).

4.3.4. Amostras

Descrição das amostras idem ao item 4.1.4.

4.3.5. Método

4.3.5.1. Extração de metilmercúrio

Foi utilizada extração ácida com auxílio de ultrassom. As amostras liofilizadas (2.0 g) foram pesadas em tubo de centrífuga de 50 ml. Foram adicionados 8 ml de HCl a 20% (v/v) e mantidos no ultrassom por durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 15 minutos, os sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados em tubos eppendorf a 12.000 rpm durante 10 minutos. O extrato resultante foi filtrado em membrana de Nylon de 0,45 µm (Whatman).

4.3.5.2. Determinação de metilmercúrio através HPLC-termo-oxidação-CV-AFS

A Figura 8 mostra o esquema da metodologia de HPLC-termo-oxidação -CV-AFS utilizada. Os parâmetros instrumentais estão detalhados na Tabela 5.

Um volume igual a 100 µl da amostra extraída foi injetado na coluna cromatográfica Hamilton PRP-X100. A eluição foi realizada no modo isocrático. Utilizando condutores de teflon e uma peça de teflon em "T", o

eluato procedente da coluna foi misturado com a solução oxidante de $K_2S_2O_8$, por meio de um banho de aquecimento a 135°C . O efluente termo-oxidado foi resfriado em um banho de gelo e posteriormente misturado ao fluxo contínuo de $SnCl_2$. Assim gerou-se o $Hg(0)$ que através de um separador gas-líquido e um fluxo contínuo de argônio foi conduzido ao detector de AFS (Tabela 5 e Figura 8).

A identificação dos sinais foi realizada através das coincidências dos tempos de retenção entre o sinal da amostra e do padrão. Para a leitura do Hg, os sinais foram integrados em altura de pico e a quantificação foi realizada com curva de calibração de Hg em intervalo de 0 – 100 ng/ml. As concentrações das soluções padrões foram 0, 10, 25, 50 e 100 ng/ml. As amostras foram preparadas em três replicatas e foram realizadas duas leituras para cada replicata.

Figura 8. Esquema da metodologia HPLC-termo-oxidação-CV-AFS

Tabela 5. Parâmetros instrumentais utilizados no sistema HPLC-termooxidação-CV-AFS

HPLC	
Coluna	troca aniônica Hamilton PRP-X100; base polimérica; 10 μm ; 250 mm $\times$ 4.1 mm d.i.
Pré-coluna	Hamilton PRP X-100; 12-20 μm ; 25 mm $\times$ 2.3 mm d.i.
Fase móvel	Cisteína 0,04 mol/l em ácido acético 0,1 mol/l
Volume de injeção	100 μL
Fluxo	1 ml min ⁻¹
Termooxidação	
Oxidante	1% (m/v) K ₂ S ₂ O ₈ em 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ . Fluxo 2 ml min ⁻¹
Local de reação	3 m $\times$ 0.5 mm d.i.
Temperatura do banho	100 °C
CV-AFS	
Agente redutor	2% (m/v) SnCl ₂ em 15% (v/v) HCl. Fluxo 2 ml min ⁻¹
Local de reação	2 m $\times$ 0.5 mm d.i.
Gás de arraste	Argón. Fluxo 300 ml min ⁻¹
Gás de secagem	Air. Fluxo 2.5 l min ⁻¹
Intervalo de amplificação	100
Filtro	32

4.3.6. Parâmetros de validação do método utilizado para determinação de mercúrio total e metil mercúrio

Os parâmetros de validação (limite de detecção, linearidade, precisão e recuperação e exatidão) dos métodos para determinação de mercúrio total e metil mercúrio foram realizados por NAVARRO (2005) no Instituto de Agroquímica e Tecnologia dos Alimentos, IATA/CSIC, em Valência, Espanha, seguindo as definições descritas no item 4.1.6.

Na Tabela 6 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros de validação dos métodos utilizados na determinação de Hg total e metilmercúrio.

Tabela 6. Parâmetros analíticos de validação da técnica de digestão assistida por microondas em meio ácido e CV-AFS utilizada para a determinação de mercúrio total em pescado e do método de quantificação por HPLC-termo-oxidação-CV-AFS para a determinação de metilmercúrio em pescado (NAVARRO, 2005)

	Hg total	Metil Hg
Limite de detecção (mg/Kg, peso seco)^a	0,003	0,001
Faixa Linear (ng/ml)	0,1 – 2,5	0 - 100
Precisão (%)^b	8	6
Recuperação (%)^c	<i>Procambarus clarkii</i> 102	Pescada 98 Merluza 100
Exatidão	DORM-2 (4,64 ± 0,26) ^d , (4,5545 ± 0,3365) ^e µg/g, peso seco. TORT-2 (0,27 ± 0,06) ^d , (0,284 ± 0,021) ^e µg/g, peso seco.	DORM-2 (4,47 ± 0,32) ^d , (4,351 ± 0,099) ^e µg/g, peso seco. TORT-2 (0,152 ± 0,013) ^d , (0,144 ± 0,001) ^e µg/g, peso seco.

^a nove brancos de reagentes

^b desvio padrão relativo obtido de três análises independentes

^c porcentagem de recuperação expressa como média de três análises independentes

^d valor certificado

^e valor obtido

4.4. Selênio

4.4.1. Equipamentos

- A determinação de selênio foi realizada em um Espectrômetro de Absorção Atômica (EAA) modelo 3300 Perkin-Elmer, equipado com um amostrador automático Perkin-Elmer, modelo AS-90, um sistema de injeção em fluxo (FI) Perkin-Elmer, modelo FIAS-400 para fornecer geração de hidreto (HG). Como sistema de atomização se utilizou um tubo de quartzo aquecido eletricamente.

Outros equipamentos utilizados

- Liofilizador
- Banho de areia Raypa, modelo PL 5125
- Mufla Heraeus modelo K 1253 equipada com programa controle modelo Eurotherm Controls 902

4.4.2. Reagentes

- Na preparação dos reagentes e padrões utilizou-se água ultrapura (Milli-Q water system, Millipore Inc.) com uma resistividade 18.2 M Ω cm.
- Todos os reagentes químicos são grau PA ou de pureza superior.
- As diluições de padrão de Se(IV) foram preparadas a partir da diluição da solução padrão comercial (1000 mg/l) de Se(IV) da Merck.
- A solução redutora de Se para a geração de hidreto, é borohidreto sódico (NaBH₄) 0,2% (m/v) em solução de NaOH 0,05% (m/v). Esta solução foi preparada diariamente, e filtrada em papel Whatman N°42 antes de sua utilização.
- A vidraria e o material em polietileno utilizados foram previamente tratada com HNO₃ 10% v/v por 24 horas e em seguida lavada três vezes com água deionizada.

4.4.3. Amostras

Descrição das amostras idem ao item 4.1.4.

4.4.4. Método

4.4.4.1. Determinação de selênio.

A determinação de selênio total foi realizada mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do selênio por FI-HG-EAA.

A mineralização foi realizada de acordo com o protocolo CEN 14546 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2004). Pesou-se 0,25g de amostra liofilizada e adicionou-se 2,5 ml de agente coadjuvante da mineralização [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (20%) m/v + MgO (2%) m/v] e 5 ml de ácido nítrico (50%) v/v. A mistura foi evaporada até seca no banho de areia, e posteriormente, foi mineralizada aplicando-se um ciclo de temperatura – tempo, com um aumento gradual de temperatura as amostras permaneceram 12 horas a 450°C. Quando a aplicação de um ciclo de mufla não foi suficiente para a destruição total da matéria orgânica, as cinzas foram umedecidas com HNO_3 a 10% (v/v), evaporada até seca no banho de areia e novamente submetidas a um programa de temperatura-tempo como indicado anteriormente.

As cinzas obtidas depois da mineralização foram dissolvidas em ácido clorídrico (6 mol/l), filtrada através de papel Whatman No.1 e o volume completado com ácido clorídrico (6 mol/l) a 25 ml em balão volumétrico. A solução foi transferida para tubos de plástico de 50 ml com tampa de rosca e aquecida a 90°C durante 20 min. Após o resfriamento realizou-se a determinação de Se total por espectrometria de absorção atômica (EAA) com um sistema de injeção em fluxo (FI) que permite simultaneamente a

geração de hidretos (HG) contínuo. As condições analíticas estão descritas na Tabela 7.

Os sinais foram integrados em altura de pico e a quantificação realizada com curva de calibração de Se(IV) em intervalo de 0-10 ppb. As concentrações das soluções padrões foram 0, 1, 2, 5, 7,5 e 10 ppb. As amostras foram preparadas em três replicatas e foram realizadas duas leituras para cada replicata.

Tabela 7. Condições analíticas para determinação de selênio por FI-HG-EAA

Geração de hidretos (FI-HG)	
Amostra	0,5 ml
Agente redutor	NaBH ₄ 0,2% m/v em NaOH 0,05% m/v, fluxo 5ml/min
Ácido	HCl 10% v/v, fluxo 10 ml/min
Gás de arraste	Argônio, fluxo 130 ml/minuto
Espectrometria de Absorção Atômica (EAA)	
Célula de Quartzo	900°C
Comprimento de onda	196 nm
Passagem da fenda spectral	0.7nm
Lâmpada de selênio	400mA, EDL System 2
Temperatura de atomização	900 °C

4.4.5. Os parâmetros de validação do método utilizado para determinação de selênio

A confiabilidade do método analítico empregado para determinação de selênio foi previamente comprovada no Instituto de Agroquímica e Tecnologia dos Alimentos, IATA/CSIC, em Valência, Espanha pela avaliação dos parâmetros de validação (limite de detecção, linearidade, precisão e recuperação e exatidão), seguindo as definições descritas no item 4.1.6.

Na Tabela 8 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros analíticos de validação das metodologias utilizadas para determinação de selênio.

Tabela 8. Parâmetros analíticos de validação da metodologia FI-HG-EAA utilizada para a determinação de selênio em pescado

	Selênio
Limite de detecção (mg/Kg, peso seco) ^a	0,015
Faixa Linear (ng/ml)	0 – 10
Precisão (%) ^b	5%
Recuperação (%) ^c	94%

^a nove brancos de reagentes

^b desvio padrão relativo obtido de três análises independentes

^c porcentagem de recuperação expressa como média de três análises independentes

4.5. Análises estatísticas

Para análise estatística dos resultados 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, através do software Statistica 7.0.

Os gráficos tipo dispersão (XY) foram realizados através do software Microsoft Excel.

5. RESULTADOS

5.1. Teores de As total e As inorgânico em amostras de cação analisadas mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do arsênio por FI-HG-EAA.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos de arsênio total e arsênio inorgânico nas amostras analisadas de cação, comercializadas na cidade de São Paulo.

Tabela 9. Teores de arsênio total e arsênio inorgânico, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

Amostra	As Total peso seco (mg/kg)	As Total peso úmido (mg/kg)*	As Inorgânico (mg/kg peso seco)	As Inorgânico (mg/kg peso úmido)*	% As Inorg./ As Total
T1	21,8 ± 2,8	5,45	0,023 ± 0,001	0,0058	0,11
T2	48,9 ± 0,1	12,23	0,021 ± 0,001	0,0053	0,04
T3	8,4 ± 0,7	2,10	0,028 ± 0,001	0,0070	0,33
T4	9,3 ± 0,1	2,33	0,004 ± 0,001	0,0010	0,04
T5	28,2 ± 0,4	7,05	0,014 ± 0,001	0,0035	0,05
T6	27,3 ± 0,3	6,83	0,014 ± 0,001	0,0035	0,05
T7	77,8 ± 0,4	19,45	0,165 ± 0,005	0,0413	0,21
T8	24,4 ± 2,0	6,10	0,009 ± 0,001	0,0023	0,04
T9	37,6 ± 1,2	9,40	0,017 ± 0,001	0,0043	0,05
T10	31,3 ± 0,6	7,83	<LD		
T11	116,8 ± 5,7	29,20	0,039 ± 0,005	0,0098	0,03
T12	12,3 ± 0,3	3,08	0,015 ± 0,001	0,0038	0,12
T13	19,1 ± 0,8	4,78	0,015 ± 0,001	0,0038	0,08
T14	97,3 ± 0,9	24,33	0,041 ± 0,001	0,0103	0,04
T15	30,3 ± 1,2	7,58	<LD		
T16	34,6 ± 0,6	8,65	0,043 ± 0,001	0,0108	0,12
T17	134,1 ± 3,0	33,53	0,031 ± 0,001	0,0078	0,02
T18	59,6 ± 2,5	14,90	0,018 ± 0,001	0,0045	0,03
T19	40,7 ± 4,0	10,18	<LD		
T20	57,5 ± 0,4	14,38	<LD		
T21	33,3 ± 0,5	8,33	0,048 ± 0,001	0,0120	0,14
T22	105,8 ± 1,8	26,45	0,041 ± 0,001	0,0103	0,04
T23	46,9 ± 0,6	11,73	0,022 ± 0,001	0,0055	0,05

Tabela 9. Continuação

Amostra	As Total peso seco (mg/kg)	As Total peso úmido (mg/kg)*	As inorgânico (mg/kg peso seco)	As inorgânico (mg/kg peso úmido)*	% As Inorg./ As Total
T24	30,3 ± 2,1	7,58	0,021 ± 0,001	0,0053	0,07
T25	26,1 ± 2,2	6,53	0,021 ± 0,001	0,0053	0,08
T26	35,1 ± 3,6	8,78	0,015 ± 0,001	0,0038	0,04
T27	69,3 ± 0,1	17,33	0,016 ± 0,001	0,0040	0,02
T28	30,4 ± 0,1	7,60	0,017 ± 0,001	0,0043	0,06
T29	29,9 ± 0,9	7,48	<LD		
T30	77,8 ± 1,6	19,45	0,443 ± 0,013	0,1108	0,57
T31	27,7 ± 1,3	6,93	<LD		
T32	67,8 ± 0,7	16,95	0,070 ± 0,001	0,0175	0,10
T33	32,7 ± 1,9	8,18	0,110 ± 0,001	0,0275	0,34
T34	35,0 ± 0,4	8,75	0,153 ± 0,001	0,0383	0,44
T35	11,1 ± 0,8	2,78	0,016 ± 0,001	0,0040	0,14
T36	9,5 ± 0,1	2,38	0,013 ± 0,001	0,0033	0,14
T37	34,8 ± 0,9	8,70	<LD		
T38	64,5 ± 0,8	16,13	0,131 ± 0,009	0,0328	0,20
T39	88,7 ± 5,7	22,18	<LD		
T40	67,8 ± 1,5	16,95	0,019 ± 0,001	0,0048	0,03
T41	11,7 ± 1,5	2,93	0,089 ± 0,001	0,0223	0,76
T42	37,0 ± 2,4	9,25	0,051 ± 0,001	0,0128	0,14
T43	35,3 ± 0,8	8,83	0,209 ± 0,011	0,0523	0,59
T44	39,5 ± 5,3	9,88	0,738 ± 0,012	0,1845	1,87
T45	18,2 ± 0,2	4,55	<LD		
T46	8,5 ± 0,1	2,13			
T47	34,5 ± 2,8	8,63	0,049 ± 0,001	0,0123	0,14
T48	33,0 ± 4,0	8,25	0,043 ± 0,001	0,0108	0,13
T49	29,9 ± 0,3	7,48	0,024 ± 0,001	0,0060	0,08
T50	20,7 ± 0,4	5,18	0,020 ± 0,001	0,0050	0,10
T51	23,4 ± 1,6	5,85	0,065 ± 0,001	0,0163	0,28

*Teor de umidade estimado igual a 75

LD – Limite de Detecção

5.2. Teores de mercúrio total em amostras de cação analisadas por digestão em forno de microondas e CV-AFS, e teores de metilmercúrio em amostras de cação analisadas por HPLC-termo-oxidação-CV-AFS.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos de mercúrio total e metilmercúrio nas amostras analisadas de cação, comercializadas na cidade de São Paulo.

Tabela 10. Teores de mercúrio total e metilmercúrio, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

Amostra	Hg Total peso seco (mg/kg)	Hg Total peso úmido (mg/kg)*	MetilHg peso seco (mg/kg)	MetilHg peso úmido (mg/kg)*	% MetilHg/ Hg Total
T1	3,3 ± 0,4	0,83			
T2	2,1 ± 0,2	0,53			
T3	2,5 ± 0,1	0,63	1,57 ± 0,07	0,39	62,80
T4	3,1 ± 0,1	0,78			
T5	1,7 ± 0,1	0,43	1,24 ± 0,01	0,31	72,94
T6	1,8 ± 0,1	0,45			
T7	5,8 ± 0,4	1,45			
T8	2,0 ± 0,1	0,50			
T9	2,1 ± 0,1	0,53			
T10	5,2 ± 0,4	1,30	3,25 ± 0,38	0,81	62,50
T11	4,8 ± 0,5	1,20			
T12	13,7 ± 0,1	3,43	8,67 ± 0,53	2,17	63,28
T13	10,0 ± 0,6	2,50			
T14	7,6 ± 0,3	1,90			
T15	0,7 ± 0,1	0,18	0,46 ± 0,04	0,12	65,71

Tabela 10. Continuação

Amostra	Hg Total peso seco (mg/kg)	Hg Total peso úmido (mg/kg)*	MetilHg peso seco (mg/kg)	MetilHg peso úmido (mg/kg)*	% MetilHg/ Hg Total
T16	9,5 ± 0,4	2,38			
T17	3,3 ± 0,1	0,83			
T18	2,2 ± 0,2	0,55	1,41 ± 0,06	0,35	64,09
T19	3,8 ± 0,3	0,95			
T20	5,7 ± 0,2	1,43			
T21	4,7 ± 0,1	1,18	2,53 ± 0,01	0,63	53,83
T22	8,8 ± 0,2	2,20			
T23	3,8 ± 0,4	0,95			
T24	3,7 ± 0,1	0,93			
T25	3,4 ± 0,2	0,85			
T26	4,1 ± 0,1	1,03			
T27	2,8 ± 0,1	0,70			
T28	3,1 ± 0,6	0,78			
T29	2,0 ± 0,1	0,50			
T30	4,6 ± 1,3	1,15			
T31	1,8 ± 0,1	0,45			
T32	1,6 ± 0,2	0,40			
T33	2,2 ± 0,5	0,55			
T34	2,9 ± 0,3	0,73			
T35	14,6 ± 0,5	3,65	7,98 ± 0,18	2,00	54,66
T36	9,9 ± 2,3	2,48			
T37	5,0 ± 0,2	1,25			
T39	5,3 ± 0,1	1,33			
T41	7,2 ± 0,2	1,80			
T42	3,6 ± 0,2	0,90			
T43	0,9 ± 0,1	0,23			
T44	6,3 ± 0,2	1,58			
T45	6,6 ± 1,0	1,65			
T46	5,1 ± 0,3	1,28			
T47	4,5 ± 0,2	1,13			
T48	3,8 ± 0,1	0,95			
T49	1,7 ± 0,2	0,43			
T50	7,0 ± 0,1	1,75			
T51	3,5 ± 0,2	0,88			

*Teor de umidade estimado igual a 75

5.3. Teores de selênio em amostras de cação analisadas mediante uma mineralização por via seca e posterior quantificação do selênio por FI-HG-EAA.

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos selênio nas amostras analisadas de cação, comercializadas na cidade de São Paulo.

Tabela 11. Teores de selênio, em peso seco e úmido em amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

Amostra	Se peso seco (mg/kg)	Se peso úmido (mg/kg)*
T1	1,2 ± 0,1	0,30
T2	0,9 ± 0,1	0,23
T3	1,2 ± 0,1	0,30
T4	1,1 ± 0,1	0,28
T5	0,9 ± 0,1	0,23
T6	1,1 ± 0,1	0,28
T7	0,9 ± 0,1	0,23
T8	0,8 ± 0,1	0,20
T9	1,1 ± 0,1	0,28
T10	1,0 ± 0,1	0,25
T11	0,8 ± 0,1	0,20
T12	1,0 ± 0,1	0,25
T13	1,7 ± 0,1	0,43
T14	1,2 ± 0,1	0,30
T15	1,0 ± 0,1	0,25
T16	1,4 ± 0,1	0,35
T17	0,7 ± 0,1	0,18
T18	0,5 ± 0,1	0,13
T19	1,1 ± 0,1	0,28
T20	0,8 ± 0,1	0,20
T21	1,3 ± 0,1	0,33
T22	0,9 ± 0,1	0,23
T23	1,2 ± 0,1	0,30
T24	1,1 ± 0,1	0,28
T25	0,7 ± 0,1	0,18
T26	1,1 ± 0,3	0,28
T27	1,3 ± 0,1	0,33

Tabela 11. Continuação

Amostra	Se peso seco (mg/kg)	Se peso úmido (mg/kg)*
T28	1,4 ± 0,2	0,35
T29	0,9 ± 0,1	0,23
T30	1,4 ± 0,2	0,35
T31	1,2 ± 0,1	0,30
T32	1,9 ± 0,2	0,48
T33	0,8 ± 0,1	0,20
T34	1,2 ± 0,1	0,30
T35	1,5 ± 0,1	0,38
T36	1,5 ± 0,1	0,38
T38	1,2 ± 0,1	0,30
T39	1,2 ± 0,1	0,30
T40	0,9 ± 0,1	0,23
T41	1,2 ± 0,1	0,30
T42	0,9 ± 0,1	0,23
T43	0,9 ± 0,1	0,23
T44	0,7 ± 0,1	0,18
T45	0,9 ± 0,1	0,23
T46	0,8 ± 0,1	0,20
T47	0,7 ± 0,1	0,18
T48	1,3 ± 0,1	0,33
T49	0,7 ± 0,1	0,18
T50	2,6 ± 0,1	0,65
T51	1,1 ± 0,1	0,28

*Teor de umidade estimado igual a 75

5.4. Teores de selênio e mercúrio ($\mu\text{M/Kg}$, peso seco) e a razão molar entre Hg e Se

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos de selênio e mercúrio em $\mu\text{M/Kg}$, peso seco, e a razão molar entre Hg e Se nas amostras analisadas de cação, comercializadas na cidade de São Paulo.

Tabela 12. Teores de selênio e mercúrio ($\mu\text{M/Kg}$, peso seco) e a razão molar (Hg:Se)

Amostra	Hg ($\mu\text{M/kg}$)	Se ($\mu\text{M/kg}$)	Hg:Se (razão molar)
T1	16,45	15,20	1,08
T2	10,47	11,40	0,92
T3	12,46	15,20	0,82
T4	15,45	13,93	1,11
T5	8,47	11,40	0,74
T6	8,97	13,93	0,64
T7	28,91	11,40	2,54
T8	9,97	10,13	0,98
T9	10,47	13,93	0,75
T10	25,92	12,66	2,05
T11	23,93	10,13	2,36
T12	68,30	12,66	5,39
T13	49,85	21,53	2,32
T14	37,89	15,20	2,49
T15	3,49	12,66	0,28
T16	47,36	17,73	2,67
T17	16,45	8,87	1,85
T18	10,97	6,33	1,73
T19	18,94	13,93	1,36
T20	28,42	10,13	2,81
T21	23,43	16,46	1,42
T22	43,87	11,40	3,85
T23	18,94	15,20	1,25
T24	18,45	13,93	1,32
T25	16,95	8,87	1,91
T26	20,44	13,93	1,47
T27	13,96	16,46	0,85
T28	15,45	17,73	0,87
T29	9,97	11,40	0,87
T30	22,93	17,73	1,29

Tabela 12. Continuação

Amostra	Hg ($\mu\text{M/kg}$)	Se ($\mu\text{M/kg}$)	Hg:Se (razão molar)
T31	8,97	15,20	0,59
T32	7,98	24,06	0,33
T33	10,97	10,13	1,08
T34	14,46	15,20	0,95
T35	72,79	19,00	3,83
T36	49,35	19,00	2,60
T39	26,42	15,20	1,74
T41	35,89	15,20	2,36
T42	17,95	11,40	1,57
T43	4,49	11,40	0,39
T44	31,41	8,87	3,54
T45	32,90	11,40	2,89
T46	25,42	10,13	2,51
T47	22,43	8,87	2,53
T48	18,94	16,46	1,15
T49	8,47	8,87	0,95
T50	34,90	32,93	1,06
T51	17,45	13,93	1,25
Média =			1,69

5.5. Análises estatísticas

5.5.1. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As total analisados por mineralização por via seca e posterior quantificação do As total por FI-HG-EAA.

No diagrama em blocos (Figura 9) estão representados os valores apresentados na Tabela 9, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 9. Diagrama em blocos dos resultados das análises de arsênio total nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

5.5.2. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de As inorgânico analisados por mineralização por via seca e posterior quantificação do As inorgânico por FI-HG-EAA.

No diagrama em blocos (Figura 10) estão representados os valores apresentados na Tabela 9, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 10. Diagrama em blocos dos resultados das análises de arsênio inorgânico nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

5.5.3. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de mercúrio total analisados por digestão em forno de microondas e CV-AFS

No diagrama em blocos (Figura 11) estão representados os valores apresentados na Tabela 10, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 11. Diagrama em blocos dos resultados das análises de mercúrio total nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

5.5.4. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de metilmercúrio em amostras de cação analisadas mediante HPLC-termo-oxidação-CV-AFS

No diagrama em blocos (Figura 12) estão representados os valores apresentados na Tabela 10, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 12. Diagrama em blocos dos resultados das análises de metilmercúrio nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

5.5.5. Representação gráfica em diagrama de blocos - BOXPLOT dos teores de selênio analisadas por mineralização por via seca e posterior quantificação do selênio por FI-HG-EAA.

No diagrama em blocos (Figura 13) estão representados os valores apresentados na Tabela 11, a fim de serem encontrados a média, mínimo, máximo, mediana e percentis dos resultados.

Figura 13. Diagrama em blocos dos resultados da análise de selênio nas amostras de cação comercializadas na cidade de São Paulo

5.5.6. Representação gráfica da dispersão dos teores de As total em comparação com o limite máximo de tolerância.

Na Figura 14 estão representados os valores obtidos nas amostras analisadas de cação e o limite máximo de tolerância estabelecido pela legislação brasileira para o As em peixe que é de 1,0 mg/kg.

Figura 14. Representação gráfica da dispersão dos teores de As total em comparação com o limite máximo de tolerância (mg/kg, peso úmido)

5.5.7. Representação gráfica da dispersão dos teores de Hg total em comparação com o limite máximo de tolerância.

Na Figura 15 estão representados os valores obtidos nas amostras analisadas de peixe cação e o limite máximo de tolerância estabelecido pela legislação brasileira para o Hg em peixe predador que é de 1,0 mg/kg.

Figura 15. Representação gráfica da dispersão dos teores de Hg total em comparação com o limite máximo de tolerância (mg/kg, peso úmido)

5.5.8. Representação gráfica da porcentagem de valores obtidos de Hg total acima do limite máximo de tolerância.

Na Figura 16 está representada a porcentagem de valores obtidos de Hg total acima do limite máximo de tolerância estabelecido pela legislação brasileira para o Hg em peixe predador que é de 1,0 mg/kg.

Figura 16. Porcentagem de valores obtidos de Hg total acima do limite máximo de tolerância

5.6. Estimativa da Ingestão média diária de As total, As inorgânico, Hg total e metilmercúrio considerando apenas o consumo de pescado.

A tabela 13 apresenta as estimativas de Ingestão média diária de As total, As inorgânico, Hg total e metilmercúrio considerando apenas o consumo de pescado.

Tabela 13. Estimativa da Ingestão média diária de As total, As inorgânico, Hg total e metilmercúrio considerando apenas o consumo de pescado.

Tipo de Alimento ¹	Consumo (g/dia) per capita ¹	Região ¹	Estimativa da Ingestão de As total µg/dia ³	Estimativa da Ingestão de As inorgânico µg/dia ⁴	Estimativa da Ingestão de Hg total µg/dia ⁵	Estimativa da Ingestão de metilmercúrio µg/dia ⁶
Pescados de água salgada	5,00	Brasil	41,63	0,0300	4,75	2,564
Pescados de água salgada	15,11	Norte	125,86	0,0907	14,35	7,751
Pescados de água salgada	6,12	Nordeste	50,98	0,0367	5,81	3,140
Pescados de água salgada	4,00	Sudeste	33,30	0,0240	3,80	2,051
Pescados de água salgada	2,26	Sul	18,81	0,0135	2,14	1,158
Pescados de água salgada	26,14	Pará ²	217,77	0,1569	24,84	13,411
Cação	0,08	Brasil	0,68	0,0005	0,08	0,042
Cação	0,18	Norte	1,48	0,0011	0,17	0,091
Cação	0,05	Nordeste	0,43	0,0003	0,05	0,027
Cação	0,11	Sudeste	0,94	0,0007	0,11	0,058
Cação	0,05	Sul	0,39	0,0003	0,04	0,024
Cação	0,37	Pará ²	3,10	0,0022	0,35	0,191

¹ Fonte: BRASIL, 2007

² Estado que apresenta maior consumo "per capita"

³ Considerando a mediana de As total = 8,33 µg/g, obtido no presente estudo

⁴ Considerando a mediana de As inorgânico = 0,006 µg/g, obtido no presente estudo

⁵ Considerando a mediana de Hg total = 0,95 µg/g, obtido no presente estudo

⁶ Considerando a mediana de Metilmercúrio = 0,513 µg/g, obtido no presente estudo

6. DISCUSSÃO

As amostras utilizadas nas análises de cação foram adquiridas em postas com cerca de 200 g, em feiras livres, mercados e supermercados da cidade de São Paulo e sua procedência é indicada no Anexo 1. Assim, não houve a possibilidade de um levantamento das espécies de cação da qual se originavam, nem quanto ao seu comprimento e peso. Entretanto MORALES-AIZPURÚA *et al.*, 1999, ao pesquisarem mercúrio em cação, indicaram algumas espécies comestíveis que habitam a costa brasileira, inclusive na região sudeste, tais como: Cação azul (*Prionace glauca*), Caçoa (*Odontaspis*), Anequim (*Isurus*). CHICOUREL *et al.*, 1995, pesquisaram mercúrio em cação-azul (*Prionace glauca*) e afirmaram que, os cações apresentam concentrações desse metal em função de parâmetros como idade, alimentação e área geográfica. Sendo espécies de vida longa, acumulam metais cujos níveis aumentam progressivamente, podendo haver correlação entre o metal e o peso ou tamanho da espécie. Assim, em cações, os fatores, tais como, idade, crescimento, alimentação, área geográfica, voracidade, migração, peso e tamanho da espécie também podem ter relação com a concentração de metais, visto que os resultados encontrados nesta pesquisa variaram de amostra para amostra, conforme os dados apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11.

Consumidores estão expostos a metais de relevância toxicológica diariamente, podendo resultar em danos à saúde desde que os níveis estejam acima dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação (GUNDACKER *et al.*, 2006). O pescado é reconhecido como a principal fonte de metais para a população não exposta ocupacionalmente. Assim, são de considerável interesse os níveis de contaminantes em peixes devido ao risco para os indivíduos que os consomem. Portanto, a avaliação dos níveis de exposição é uma preocupação de saúde pública (TÜZEN, 2003, BURGER e GOCHFELD, 2005).

A IARC (1987) e EPA (1988) classificam o arsênio como carcinógeno humano Classe I, para o qual há evidência suficiente, a partir de estudos epidemiológicos, de uma associação causal entre a exposição ao arsênio e o câncer (SHIN, 2005).

O pescado é bem conhecido como a fonte mais significativa de arsênio na dieta, e conseqüentemente a ingestão de As total por humanos depende da quantidade de pescado consumida. É difícil estimar a quantidade de arsênio ingerida proveniente do consumo de pescado, devido à multiplicidade de fatores relacionada ao pescado como espécie, sexo, local de origem, entre outros que afetam o nível de arsênio. Desta forma, o controle dos níveis de arsênio nestes produtos é necessário, e entre alguns estudos realizados é possível observar uma grande variabilidade dos níveis de arsênio obtidos em diferentes espécies (Quadro 3).

Os resultados obtidos para arsênio total em 51 amostras de cação variaram de $8,4 \pm 0,7$ a $134,1 \pm 3,0$ mg/kg, peso seco, ou 2,10 a 33,53 mg/kg, peso úmido (Tabela 9), sendo que 100% das amostras apresentaram valores de As total acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira de 1,0 mg/kg, conforme ilustra a Figura 14.

A maioria dos resultados obtidos no presente estudo apresentam valores de arsênio total que estão dentro do intervalo de dados obtidos em alguns estudos apresentados no Quadro 3. No trabalho realizado por MARCOTRIGIANO e STORELLI (2003) as concentrações de arsênio total em 17 diferentes espécies de peixe variaram de 0,62 - 61,50 mg/kg, peso úmido, DELGADO-ANDRADE *et al.* (2003) obtiveram 0,396 - 12,584 mg/kg peso úmido de As em peixes e JUREŠA e BLANUŠA (2003) analisaram 9 diferentes espécies de peixe (48 amostras) e os valores de As obtidos foram 0,56 - 23,30 mg/kg peso úmido.

A maioria dos resultados em termos de As em mg/kg, peso seco, obtidos no presente trabalho também apresentam valores que estão dentro dos intervalos de valores obtidos em alguns trabalhos, como o realizado por MUÑOZ *et al.* (2000) que analisaram 8 diferentes espécies de peixe em um total de 95 amostras, onde os valores obtidos foram de 1,02 - 74,96 mg/kg, peso seco, SUNER *et al.* (2002) que analisaram 5 diferentes espécies de peixe (35 amostras), e os valores obtidos foram de 2,4 - 33,0 mg/kg, peso seco. SCHAEFFER *et al.* (2005) que analisaram 4 espécies de peixe (11 amostras) e os valores encontrados foram 2,75 - 25,81 mg/kg, peso seco, e HIRATA e TOSHIMITSU (2005) que analisaram amostras de ostra, peixe, camarão, e os valores variaram de 8,3 - 44,7 mg/kg, peso seco.

As formas mais tóxicas de arsênio são as inorgânicas As(III) e As(V). O As(III) é encontrado em organismos vivos ligados a grupos -SH de proteínas citosólicas e constituintes macromoleculares, causando a inibição de enzimas metabólicas e a toxicidade aguda atribuída a arsênio inorgânico (LIEBL *et al.*, 1995 *apud* MUÑOZ *et al.*, 2000). Os sintomas da intoxicação aguda por arsênio segue um padrão geral independente das formas de arsênio inorgânico, provavelmente como resultado da interconversão destas formas pelas reações de oxidação/redução *in vivo* (Tsuda *et al.*, 1992 *apud* MUÑOZ *et al.*, 2000). Assim, não é necessário distinguir entre as duas espécies arseniais inorgânicas. Conseqüentemente, a estimativa dos riscos a saúde devido à ingestão de pescado pode ser dependente da ingestão de arsênio inorgânico nestes produtos. Esta ingestão pode ser comparada com valores de referência estabelecidos pela OMS em 1989, que recomenda uma Ingestão Semanal Tolerável Provisional (PTWI) de arsênio inorgânico de 15 µg /Kg de peso corpóreo (MUÑOZ *et al.*, 2000).

A avaliação dos níveis de arsênio inorgânico normalmente encontrados em pescado é dificultada pela ausência de métodos simples, confiáveis e econômicos para a quantificação desta espécie de arsênio em alimentos. Além disso, os poucos dados de arsênio inorgânico relatados na

literatura são de dados isolados, e não necessariamente representativos dos níveis de arsênio existentes em vários tipos de peixe (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Os resultados de As inorgânico obtidos no presente estudo variaram de 0,013 - 0,738 mg/kg, peso seco, ou 0,0033 - 0,1845 mg/kg, peso úmido, e foram consistentes com alguns trabalhos publicados. Em um estudo realizado SUNER *et al.* (1999) que analisaram 6 diferentes espécies de pescado (total de 164 amostras), os valores obtidos foram 0,03 – 0,22 mg/kg, peso úmido. MUÑOZ *et al.* (2000) analisaram 8 diferentes espécies de peixe em um total de 95 amostras, onde os valores da As inorgânico foram 0,008 - 0,408 mg/kg, peso seco. Li *et al.* (2003) analisaram 8 amostras de peixe e os valores obtidos foram 0,003 - 0,014 mg/kg, peso úmido.

A porcentagem de arsênio inorgânico em relação a arsênio total variou de 0,02 - 1,87%. De acordo com os dados da literatura esta porcentagem apresenta grande variação entre os diferentes tipos de pescado e também dentro do mesmo tipo de pescado. SUNER *et al.* (1999) encontraram resultados de As inorgânico em moluscos de 3,53% (*C. angulata*) e 16,39% (*S. plana*), em crustáceos (*P. longirostris*) 2,99%, 13,94% (*U. tangeri*) e 1,12% (*M. kerathurus*) e em peixe (*L. ramada*) 4,40%.

Considerando que o mercúrio é capaz de biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, os peixes carnívoros tendem a acumular altas concentrações deste elemento. Por esta razão, os peixes predadores podem tornar-se a principal via de contaminação humana por mercúrio através do consumo de espécimes contaminadas.

Os resultados obtidos para mercúrio total em 49 amostras de cação variaram de $0,7 \pm 0,1$ a $14,6 \pm 0,5$ mg/kg, peso seco, ou 0,18 a 3,65 mg/kg, peso úmido (Tabela 10), sendo que 44,9% das amostras apresentaram valores de Hg acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira de 1,0 mg/kg (para predadores, como o cação) conforme ilustram a Figura 15 e

Figura 16. Os resultados obtidos para mercúrio, neste trabalho, apresentam valores próximos aos encontrados no estudo realizado por MORALES-AIZPURUA *et al.* (1999) sobre os teores de mercúrio total em 20 amostras das espécies de cação – anjo (6), cação-azul (5), cambeva (6), caçoa (5), machote (3) e anequim (1) - comercializadas na cidade de São Paulo. Os níveis encontrados foram de 0,04 a 4,71mg Hg/kg, sendo que 54% estavam acima de 1 mgHg/kg, que é o limite aceito pela legislação brasileira especificamente para peixes predadores, para o propósito de consumo.

Alguns estudos realizados com peixes marinhos capturados na costa brasileira têm revelado concentrações de mercúrio total acima do limite estabelecido pelo Ministério da Saúde. PINHO *et al.*, 1998 *apud* FERREIRA *et al.*, 2004 encontrou uma concentração média de mercúrio de 1,777 mg/kg em tubarão-toninha (*Carcharhinus signatus*), e FERREIRA *et al.*, 2004 encontrou nesta mesma espécie, em 38 amostras (19 machos e 19 fêmeas), uma concentração média de 1,787 mg/kg (machos) e 1,697 mg/kg (fêmeas). PINHO *et al.* (2002) analisou um total de 152 amostras de 5 diferentes espécies de tubarão e os valores de mercúrio encontrados variaram de 0,36 a 2,22 mg/kg, peso úmido. As concentrações de mercúrio foram determinadas em fígado e rins de 11 espécimes de *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphidae) obtidos na costa do Ceará, Brasil por MONTEIRO-NETO *et al.* (2003), e os valores variaram de 0,10 a 29,51 mg/kg em fígado e 0,06 a 5,63 mg/kg em rim.

No Quadro 4, pode-se observar que os estudos realizados em outros países também apresentam concentrações de mercúrio total acima do limite recomendado pelo Codex Alimentarius, de 0,5 mg/kg de mercúrio para a maioria das espécies e de 1,0 mg/kg para espécies predadoras (WHO, 2002) Por exemplo, DAVENPORT (1995) obteve valor de Hg total de 1,20 mg/kg, peso úmido, em cação, ADAMS e MCMICHAEL (1999) obteve 1,70 mg/kg, peso úmido, em Tubarão-toninha.

As espécies orgânicas de mercúrio são mais tóxicas que o correspondente espécies inorgânicas de Hg(II) livre. A metilação natural no meio ambiente não é bem estabelecida para muitos elementos. O mercúrio foi um dos primeiros elementos que se observou seu potencial de metilação e a alta toxicidade associada com o produto final, metilmercúrio. Em análises ambientais observou-se que a água do mar contém aproximadamente 5% do total de mercúrio na forma de metilmercúrio, já no fitoplâncton é aproximadamente 15% e no zooplâncton, aproximadamente 20%. Esta porcentagem aumenta em 70% em peixe herbívoros, e em peixes predadores pode chegar a 100% de metilmercúrio (KRYSTEK e RITSEMA, 2004).

O metilmercúrio é a forma mais tóxica para humanos e essencialmente todo o mercúrio encontrado em tecido muscular de peixe (>95%) encontra-se na forma de monometilmercúrio (CH₃Hg) (GRIEB *et al.*, 1990, BLOMM, 1992 *apud* ADAMS e MCMICHAEL, 1999). Como já mencionado anteriormente, os principais efeitos à saúde humana são os neurotóxicos, principalmente durante o desenvolvimento cerebral. Para a população em geral, a principal fonte de exposição é o consumo de peixe. Dependendo do nível de exposição, o metilmercúrio pode causar sintomas neurológicos que variam de leves a severos (CARRINGTON *et al.*, 2004).

No estudo realizado por KRYSTEK e RITSEMA (2004) as concentrações de metilmercúrio otidas variaram de 0,95 a 3,53 mg/kg, que representaram uma porcentagem em relação ao mercúrio total de 94 a 98,9%. PINHO *et al.* (2002) analisou amostras de 2 espécies de tubarão e os valores de metilmercúrio foram de $0,2 \pm 0,04$ e $1,71 \pm 0,97$ µg/g, peso úmido, que representaram uma porcentagem em relação ao mercúrio total de 63% e 95%, respectivamente.

No presente estudo, os níveis de metilmercúrio variaram de $0,46 \pm 0,04$ a $8,67 \pm 0,53$ mg/kg, peso seco. A porcentagem média obtida de

metilmercúrio em relação ao mercúrio total foi de 62,5%. Estes valores não foram representativos de todo o universo amostral devido ao número reduzido de amostras analisadas para metilmercúrio. Desta forma, o restante das amostras serão analisadas posteriormente de acordo com disponibilidade do laboratório.

O peixe e a carne são as principais fontes de selênio na dieta. O selênio é um elemento essencial para humanos, e suas principais funções bioquímicas estão relacionadas à sua presença no sítio de ação da enzima glutathiona-peroxidase. Esta enzima participa de processos celulares que protegem o organismo contra os danos oxidativos causados por radicais livres. Por exemplo, sabe-se que a suplementação com Se atua como antioxidante celular em animais pela estimulação e síntese de várias enzimas Se-dependentes (PAUL *et al.*, 2003). O selênio também está relacionado à diminuição de doenças cardiovasculares e câncer. Além disso, o selênio protege contra a toxicidade de certos metais pesados, como o mercúrio (SIMONOFF, 1988, KLAPEC *et al.*, 1998). Entretanto é importante ressaltar o papel ambivalente do selênio em relação a sua concentração, assim, níveis elevados podem causar efeitos tóxicos (PLESSI *et al.*, 2001).

O Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos, através do “Office of Dietary Supplements” estabeleceu uma Ingestão Dietética Recomendada (RDA) para selênio de 55 µg/dia para homens e mulheres adultos (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2007).

A determinação de mercúrio e selênio em matrizes biológicas é desejável uma vez que existe uma interação metabólica entre o selênio e mercúrio que protege o organismo contra a ação tóxica do mercúrio (PLESSI *et al.*, 2001, PAUL *et al.*, 2003). O mercúrio reage com a forma reduzida de selenito, em uma razão equimolar, formando um complexo Hg-Se, seguido por uma ligação à proteína plasmática específica selenoproteína P. Assim, esta proteína age primariamente como detoxicante de Hg através da

formação de um complexo estável (LIMA *et al.*, 2005). Recentes pesquisas em tecidos de ratos tratados com metilmercúrio e selenito de sódio demonstram a formação de bis metilmercúrico seleneto e do complexo seleneto mercúrico (Hg-Se). O Hg-Se é um produto estável formado no processo de demetilação do metilmercúrio. Embora ele não seja prontamente eliminado de tecidos biológicos, ele é inerte e aparentemente não tóxico. Em recentes estudos observa-se uma razão equimolar (1:1) entre o Hg e Se em vários órgãos biológicos (PAUL *et al.*, 2003).

Os valores típicos de selênio normalmente encontrados em peixes e pescados variam de 0,4 a 1,5 mg/kg (VLIEG, 1990). PLESSI *et al.*, 2001 analisaram 24 espécies de peixe marinho e encontraram níveis de selênio variando de 0,073 mg/kg (perca) a 0,743 mg/kg (atum). Os valores obtidos em um estudo realizado por VLIEG (1990) foram de 0,11 a 0,97 mg/kg, peso úmido, em músculo de 55 espécies de peixes marinhos. No estudo realizado por SIRICHAKWAL *et al.* (2005), onde foram analisadas 10 diferentes espécies de pescado os valores de Se foram 0,335 a 0,881 mg/kg. No presente estudo, os valores de selênio variaram de 0,13 a 0,65 mg/kg, peso úmido, conforme descritos na Tabela 11, e são consistentes com valores observados em alguns estudos da literatura (VENTURA *et al.*, 2007, SIRICHAKWAL *et al.*, 2005, MCNAUGHTON e MARKS, 2002).

No presente trabalho, ao comparar os valores obtidos de Hg e Se nas amostras, pode-se afirmar que não existe uma razão equimolar entre os dois elementos. Os valores de razão molar nas amostras analisadas variaram de 0,28 a 5,39 de Hg:Se, e a média foi igual a 1,69. A razão equimolar também não foi observada por PAUL *et al.* (2003) que determinaram os níveis de Hg e Se em amostras de músculo, fígado e rim de um espécime de tubarão (*Sphyrna zygaena*), sendo que a razão molar encontrada em fígado e em rim mostrou um nível de selênio de 17 e 15 vezes maior que o de mercúrio, respectivamente. Ao contrário, em músculo, o Se e Hg estavam presentes numa razão molar de 0,5:1, respectivamente. PLESSI *et al.* (2001)

analisaram 24 diferentes espécies de peixe marinho e 14 espécies de mariscos, e foi observado um grande excesso de Se em relação ao Hg. Os valores de razão molar nas amostras de peixe variaram de 0,07 a 0,81 de Hg:Se e a média foi 0,23 e para mariscos a razão molar variou de 0,03 a 0,24 de Hg:Se e a média foi 0,09. A média da razão molar igual a 0,23 em peixe é bem inferior a média obtida no presente trabalho, pois os valores de mercúrio presentes nas amostras analisadas são superiores aos obtidos por PLESSI *et al* (2001). Os valores superiores de Hg em comparação com Se podem ser explicados pela capacidade de bioacumulação do Hg.

Os resultados obtidos para arsênio e mercúrio indicam uma contaminação excessiva destes metais, ou seja, acima do valor estabelecido pela legislação vigente e, portanto pode-se considerar que estas amostras não são apropriadas para o consumo. Porém, há que se ressaltar a frequência de ingestão de peixes predadores pela população brasileira e levando em consideração os dados do IBGE - Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística - 2003 sobre a “aquisição alimentar domiciliar per capita anual” o consumo de cação no Brasil varia de 0,05 a 0,18 g/dia por pessoa dependendo da região do país, sendo a média brasileira 0,08 g/dia, e o maior consumo observado é no estado do Pará, igual a 0,37 conforme mostrado na Tabela 13.

A partir da mediana obtida de As inorgânico nas amostras de cação no presente estudo de 0,006 µg/g e dos dados de consumo de cação citados acima, estima-se um valor de ingestão de 0,0005µg de As inorgânico por pessoa por dia para a média brasileira, e nas diferentes regiões do país esta estimativa varia de 0,0003 a 0,0011µg de As por pessoa por dia, e no Pará alcança o valor máximo de 0,0022µg de As por pessoa por dia (Tabela 13). O PTWI para o arsênio inorgânico é 15 µg/kg de peso corpóreo (WHO, 1989), e assumindo uma média de peso corpóreo de 65kg, a ingestão de arsênio inorgânico proveniente do consumo de cação representa apenas 0,0004% do valor de referência TDI (Ingestão diária tolerável) para média

brasileira, e no estado do Pará que apresentou o maior consumo de cação, esta porcentagem é ainda de apenas 0,002% do TDI. Consequentemente, pode-se considerar a existência de uma ampla margem de segurança para a ingestão do arsênio inorgânico proveniente do consumo de cação. Mesmo considerando o consumo de pescado de água salgada no Pará que é de 26,14 g/dia por pessoa e extrapolando a mediana de As inorgânico obtido para o cação, o valor estimado de ingestão de As inorgânico por pessoa por dia é de 0,1569µg que representa 0,11% do TDI.

A partir dos dados de consumo per capita de cação no Brasil de acordo com o IBGE (BRASIL, 2007) e da mediana obtida de Hg total nas amostras de cação no presente estudo igual a 0,95 µg/g obtêm-se um valor estimado de ingestão de 0,08 µg de Hg total por pessoa por dia para a média brasileira, e nas diferentes regiões do país esta estimativa varia de 0,04 a 0,17µg de Hg total por pessoa por dia e no Pará alcança o valor máximo de 0,35 µg de ingestão de Hg total por pessoa por dia, conforme mostrado na Tabela 13.

O PTWI para o Hg total é 5 µg/kg de peso corpóreo (WHO, 2003) e assumindo uma média de peso corpóreo de 65kg, a ingestão de Hg total por pessoa por dia proveniente apenas do consumo de cação para a média brasileira representa 0,17% do valor de referência TDI, e esta porcentagem variou de 0,09 - 0,37% considerando as diferentes regiões. No Pará que apresentou o maior consumo, o valor estimado de ingestão de Hg total proveniente do consumo de cação por pessoa por dia representa 0,75% da TDI.

Apesar da existência de valor estabelecido de PTWI para o metilmercúrio de 1,6 µg/kg de peso corpóreo pela WHO, 2003, a estimativa da ingestão de metilmercúrio proveniente do consumo de cação não é representativa devido ao número reduzido de resultados obtidos para metilmercúrio no presente estudo.

A orientação ao consumidor pode ser feita baseando-se nos níveis de metais pesados encontrados e na Ingestão Semanal Tolerável Provisional recomendada pela JECFA/FAO/WHO, por exemplo, para mercúrio total o PTWI é igual a 5 µg/kg de peso corpóreo que equivale a 0,325mg de Hg total por pessoa (peso médio de 65kg). Assim, uma espécie de peixe predador com 1,0 mgHg/kg, que é o limite tolerado pela legislação brasileira, pode ser consumido em até 325 g/semana/pessoa. Utilizando como exemplo o máximo valor encontrado neste estudo de 3,65mg de Hg/kg, neste caso, só poderia ser consumida uma quantidade de até 89,0g de peixe/semana/pessoa, para não ultrapassar a ingestão semanal tolerável definida para o mercúrio.

O peixe apresenta um alto valor nutricional, devido a presença de minerais (P, I, K), de lipídeos insaturados (ácido oléico, ácido linoléico e a série de Omega 3), de fosfolipídeos, de vitaminas (A,D) e proteínas de alto valor biológico (CABAÑERO *et al.*, 2004). Além disso, vários estudos também demonstram o benefício à saúde associado ao consumo de peixe, como a diminuição de doenças cardiovasculares e coronarianas (KROMHOUT *et al.*, 1985, DAVIGLUS, *et al.*, 1997, ALBERT *et al.*, 1998) e a diminuição do risco de alguns tipos de câncer, como por exemplo, o câncer de próstata (Terry *et al.*, 2001) e em função do baixo nível de exposição a metais através da ingestão de cação observado no presente trabalho, pode-se considerar que o consumo deste pescado é seguro, em termos de exposição a metais de relevância toxicológica, e apropriado como um componente ideal da dieta balanceada e saudável.

Uma vez que se tem observado um aumento do consumo de peixes nos hábitos alimentares do brasileiro, seria adequado que houvessem maiores e mais amplas informações sobre a qualidade do pescado disponíveis comercialmente para consumo no Brasil e uma maior fiscalização em relação aos contaminantes presentes, uma vez que a maior

porcentagem das amostras analisadas apresentaram teores superiores aos estabelecidos pela legislação.

Esta monitoração é de extrema importância para uma melhor orientação à população em geral, mas principalmente aos grupos de risco como criança, gestantes e o pescador, incluindo seus familiares em relação à ingestão de metais pesados através do pescado. Particularmente grave é a questão da ingestão do mercúrio envolvendo gestantes, em razão da vulnerabilidade do feto em relação ao metilmercúrio, que é capaz de atravessar a barreira placentária.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Portaria Nº50, de 20 de fevereiro de 2006, aprovou os Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2006 que integram o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR 2006), e através da Instrução Normativa Nº 8, de 30 de março de 2007, publicou os resultados do acompanhamento dos referidos programas. No Programa de Controle de Resíduos em Pescado – PCRP/2006, os resultados obtidos nas análises de metais pesados, e neste Programa, o analito em questão é o mercúrio em peixes de cultivo, foram detectadas 3 violações em um total de 58 amostras analisadas, ou seja, 5,17% de amostras não conforme com a legislação vigente. Os resultados obtidos nas análises de mercúrio, em pescado de captura mostraram 8 violações detectadas em um total de 230 amostras analisadas, ou seja, 3,48% de amostras não conforme com a legislação vigente. A porcentagem de 44,9% das amostras que apresentam nível superior ao LMR de mercúrio estabelecido pela legislação vigente obtida no presente é muito superior à encontrada no PCRP/2006 (BRASIL, 2007).

Assim, estes resultados são indicativos da necessidade de fiscalização periódica, aplicação da legislação e monitoramento das espécies de cação e outras espécies consumidas no Brasil. Porém, o baixo

consumo de pescado no país implica em uma baixa exposição à metais , conforme estimado neste trabalho e assim, o consumo de peixe cação pode ser considerado seguro.

7. CONCLUSÕES

- Das amostras analisadas, 100% apresentaram valores de arsênio total acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira de 1,0 mg/kg.
- Das amostras analisadas, 44,9% apresentaram valores de mercúrio total acima do valor máximo permitido pela legislação brasileira de 1,0 mg/kg (para predadores, como o cação).
- Os resultados obtidos para arsênio total e mercúrio total indicam uma contaminação excessiva por estes metais, ou seja, acima do valor estabelecido pela legislação brasileira vigente, e, portanto pode-se considerar que estas amostras não são apropriadas para o consumo.
- Os compostos orgânicos de arsênio representaram praticamente a totalidade do arsênio total presente em cação.
- Os resultados obtidos para selênio estão dentro dos valores típicos de selênio normalmente encontrados em peixes e pescado.
- A estimativa da ingestão de arsênio inorgânico, baseada no consumo de cação pela população brasileira indica uma ampla margem de segurança quando comparada com os valores de ingestão diária tolerável de As inorgânico estabelecido pela OMS.
- Em seu conjunto os resultados obtidos para arsênio total e mercúrio total sugerem a necessidade de monitoração e controle periódicos da contaminação de metais pesados em cação, e em outras espécies de organismos marinhos, principalmente espécies predadoras que estão no topo da cadeia alimentar.

8. RECOMENDAÇÕES

A grande dificuldade ao se tentar estabelecer o risco de ingestão de metais presentes em cação, recai especificamente numa das fases da avaliação do risco, que consiste no estabelecimento da exposição, uma vez que faltam dados precisos do consumo anual de peixes pela população brasileira, por espécies de pescado, por regiões, por faixas etárias dos consumidores.

Assim, recomenda-se que rotineiramente o pescado seja avaliado e dados reais de consumo sejam obtidos pelos órgãos governamentais pertinentes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNATHY, C.O. The arsenic reference dose. In: MERTZ, W.; ABERNATHY, C.O.; OLIN, S.S., eds. *Risk assessment of essential elements*. Washington: ILSI Press, 1994, p.283-290.

ACKLEY, K. L., B'HYMER, C., SUTTON, K. L., CARUSO, J. A. Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.14, p.845-850, 1999.

ADAMS, D.H.; MCMICHAEL, R.H. Mercury levels in four species of sharks from the Atlantic coast of Florida. *Fishery Bulletin*, v. 97, n.2, p. 372-379, 1999.

ALAM, M.G.M., SNOW, E.T., TANAKA, A. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Science of the Total Environment*, v.308, p.83-96, 2003.

ALBERT, C.M. HENNEKENS, C.H., DONNELL, C.J.O., AJANI, U.A.; CAREY, V.J., WILLETT, W.C, RUSKIN, J.N., MANSON, J.E. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Journal American Medical Association*. v.279, p.23-28, 1998.

ALBERTÍ, J., RUBIO, R., RAURET, G. Extraction method for arsenic speciation in marine organisms. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.351, n. 4/5, p.420-425, 1995.

AL-JEDAH, J.H.; ROBINSON, R.K. Aspects of the safety of fish caught off the coast of Qatar. *Food Control*, v.12, p. 549-552, 2001.

ALMEIDA, M.C.S. *Avaliação dos teores de arsênio total em cação, por meio de técnicas espectrométricas*. São Paulo, 2005. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ANAWAR , H.M.; AKAI, J.; MOSTOFA , K.M.G.; SAFIULLAH, S.; TAREQ, S.M. Arsenic poisoning in groundwater Health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environment International*, v.27, p.597-604, 2002.

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.

BALDWIN, D. R., MARSHALL, W. J. Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.36, p.267-300, 1999.

BARCLAY, M.N.I., MACPHERSON, A., DIXON, J. Selenium content of a range of UK foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, n.8, p.307-318, 1995.

BAYEN, S.; KOROLEVA, E.; LEE, H.K.; OBBARD, J.P. Persistent organic pollutants and heavy metals in typical seafoods consumed in Singapore. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.68, p.151-166, 2005.

BEHNE D, WEILER H, KYRIAKOPOULOS A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106(2), p. 291-297, 1996.

BENTON, D., COOK, R. The Impact of Selenium Supplementation on Mood. *Biological Psychiatry*, n.29, p.1092-1098, 1991.

BERZAS NEVADO, J. J., GARCÍA BERMEJO, L. F., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C. Distribution of mercury in the aquatic environment at Almaden, Spain. *Environmental Pollution*, v.122, p.261-271, 2003.

BHATTACHARYA, B., SARKAR, S.K., DAR, R. Seasonal variations and inherent variability of selenium in marine biota of a tropical wetland ecosystem: implications for bioindicator species. *Ecological Indicators*, n.2, p. 367-375, 2003.

BOISSON, F.; COTRET, O.; FOWLER, S.W. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. *Science of the Total Environment*, v.222, p.237-248, 1998.

BOUTAKHRIT, K.; CLAUS, R.; BOLLE, F.; DEGROODT, J.M.; GOEYENS, L. Open digestion under reflux for the determination of total arsenic in seafood by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with hydride generation. *Talanta*, v. 66, p. 1042-1047, 2005.

BRANCO, V.; CANÁRIO, J.; VALE, C.; RAIMUNDO, J.; REIS, C. Total and organic mercury concentrations in muscle tissue of the blue shark (*Prionace glauca* L.1758) from the Northeast Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, p. 854-874, 2004.

BRANCH, S., EBDON, L., O'NEILL, P. Determination of arsenic species in fish by directly coupled high-performance liquid chromatography-inductively

coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.9, p.33-37, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis: Sistema de Consulta à Legislação. *Portaria n.50, de 20 de fevereiro de 2006*. A Secretaria de Defesa Agropecuária aprova os programas de controle de resíduos em carne (bovina, aves, suína e eqüina), leite, mel, ovos e pescado do exercício de 2006. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16693>. Acesso em: 14 maio 2007.

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 2 janeiro 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria 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: 10 jan. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Mapa do site. Unidades de pesquisa. EMBRAPA Meio-Ambiente. Linhas de Pesquisas. Recursos Hídricos. Aquicultura. *A aquicultura e a atividade pesqueira*. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic>. Acesso em: 5 jun. 2006.

BRISBIN, J.A.; B'HYMER, 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.

BUCHET, J. P.; LAUWERYS, R. Interpretation of inorganic arsenic metabolism in humans in the light of observations made in-vitro and in-vivo in the rat. *Applied Organometallic Chemistry*, v.8, p.191, 1994.

BUSTAMANTE, P.; LAHAYE, V.; DURNEZ, C.; CHURLAUD, C. CAURANT, F. Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: Influence of geographical origin and feeding ecology. *Science of the Total Environment*, v. 368, p.585–596, 2006.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environmental Research*, v.99, p.403–412, 2005.

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

CAMARGO, J. A. Contribution of Spanish-American silver mines. *Chemosphere*, v.48, p.51-57, 2002.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, v.121, p.129–136, 2003.

CARRINGTON, C.D.; BOLGER, M.P. An exposure assessment for methylmercury from seafood for consumers in United States. *Risk Analysis*, v. 22, n.4, p. 689-699, 2002.

CARRINGTON, C.D.; MONTWILL, B.; BOLGER, M.P. An intervention analysis for the reduction of exposure to methylmercury from the consumption of seafood by women of child-bearing age. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 40, p. 272–280, 2004.

CHAKRAVARTY, S.; DUREJA, V.; BHATTACHARYYA, G.; MAITY, S.; BHATTACHARJEE, S. Removal of arsenic from groundwater using low cost ferruginous manganese ore. *Water Research*, v. 36, p.625–632, 2002.

CHATTERJEE, A. Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, v.51, 303-314, 2000.

CHAUSSEAU, M., ROUSSEL, C., GILON, N., MERMET, J. M. Optimization of HPLC-ICP-AES for the determination of arsenic species. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.366, n.5, 476-480, 2000.

CHEN, S. L.; DZENG, S. R.; YANG, M. H.; CHIU, K. H.; SHIEH, G. M.; WAI, C. M. Arsenic species in groundwaters of the blackfoot disease area, Taiwan. *Environmental Science and Technology*, v.28, p.877-881, 1994.

CHICOUREL, E. L., SAKUMA, A. M., ZENEBON, O., TENUTA-FILHO, A. Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.51, n.3, p.288-292, 2001.

CHOU, C.H.S.J.; DE ROSA, C.T. Case Studies – Arsenic. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v.206, p.381-386, 2003.

DENOBILO, M.

CHOY, C.M.Y.; LAM, C.W.K.; CHEUNG, L.T.F.; BRITON-JONES, C.M.; CHEUNG, L.P.; HAINES, C.J. Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: a case-control study: *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 109, p. 1121-1125, 2002.

CITAC/EURACHEM (CITAC - The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry / EURACHEM - A Focus for Analytical Chemistry in Europe). *Guide to Quality in Analytical Chemistry*, Published 2002, p. 1-57.

DABEKA, R. W.; MCKENZIE, A. D.; LACROIX, G. M. A.; CLEROUX, C.; BOWE, S., GRAHAM, R. A.; CONACHER, H. B. S.; VERDIER, P. Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary-intake of arsenic by canadian adults and children. *Journal of AOAC International*, v.76, n.1, p.14-25, 1993.

DAVENPORT, S. Mercury in blue sharks and deepwater dogfish from around Tasmania. *Australian Fisheries*, v. 54, n.3, p. 20-22, 1995.

DAVIGLUS, M.L., STAMLER, J., ORENCIA, J.A., DYER, A.R., LIU, K., GREENLAND, P., WALSH, M.K. MORRIS, D., SHEKELLE, R.B. Fish Consumption and the 30-Year Risk of Fatal Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine*. v. 336, n.15, p. 1046-1053, 1997.

DEBES, F.; JORGENSEN, E.B.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 28, p. 363-375, 2006.

DELGADO-ANDRADE, C.; NAVARRO, M.; LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M.C. Determination of total arsenic levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in foods from south-east Spain: estimation of daily dietary intake. *Food Additives & Contaminants*, v. 20, n. 10, p. 923-932, 2003.

DEVESA, V., MACHO, M.L., JALÓN, M. URIETA, I., MUÑOZ, O, SÚÑER, M.A, LÓPEZ, F., VÉLEZ, D., MONTORO, R. Arsenic in Cooked Seafood Products: Study on the Effect of Cooking on Total and Inorganic Arsenic Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4132-4140, 2001.

DEVESA, V.; SÚÑER, M.A.; ALGORA, S. VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; JALÓN, M. URIETA, I.; MACHO, M.L. Organoarsenical Species Contents in Cooked Seafood, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.8813-8819, 2005.

DHAR, R. K.; BISWAS, B. K.; SAMANTA, G.; MANDAL, B. K.; CHAKRABORTI, D.; ROY, S.; JAFAR, A.; ISLAM, A.; ARA, G.; KABIR, S.;

KHAN, A. W.; AHMED, S. A.; HADI, S. A. Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Current Science*, v. 73, n.1, p.48-59, 1997.

DIETZ, R., RIGET, F., BORN, E.W. An assessment of selenium to mercury in Greenland marine animals. *Science of the Total Environment*, n.245, p.15-24, 2000.

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.

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.

EDMONDS, J. S., FRANCESCONI, K. A. Trimethylarsine oxide in estuary catfish (*Cnidoglanis macrocephalus*) and school whiting (*Sillago bassensis*) after oral administration of sodium arsenate; and as a natural component of estuary catfish. *Science of the Total Environment*, v.64, p.317-323, 1987.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARIZATION. *Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of total arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) after dry ashing*. 2004. (European Standard prEN 14546).

FABRIS, G.; TUROCZY, N.J.; STAGNITTI, F. Trace metal concentrations in edible tissue of snapper, flathead, lobster, and abalone from coastal waters of Victoria, Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.63, p. 286-292, 2006.

FARKAS, A.; SALÁNKI, J.; SPECZIÁR, A. Age- and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low-contaminated site. *Water Research*, v.37, p. 959-964, 2003.

FATTORINI, D.; ALONSO-HERNANDEZ, A.; DIAZ-ASENCIO, M.; MUNOZ-CARAVACA, A.; PANNACCIULLI, F.G.; TANGHERLINI, M.; REGOLI, F. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring studies. *Marine Environmental Research*, v.58, p.845–850, 2004.

FAVARO, D.I.T., MAIHARA, V.A., ARMELIN, M.J.A. VASCONCELLOS, M.B.A. COZZOLINO, S.. Determination of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Sb, and Se concentrations by radiochemical neutron activation analysis in different brazilian regional diets. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 181, n.2, p.385-394, 1994.

FERREIRA A.G.; FARIA, V.V.; CARVALHO, C.E.V.; LESSA R.P.T.; SILVA, F.M.S. T. Total Mercury in the Night Shark, *Carcharhinus signatus* in the western equatorial atlantic ocean. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n.4, p. 629-634, 2004.

FINLEY, J.W., PENLAND, J.G. Adequacy or Deprivation of Dietary Selenium in Healthy Men: Clinical and Psychological Findings. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, n.11, p.11-27, 1998.

FRANCESCONI, K. A., EDMONDS, J. S., HATCHER, B. G. Examination of the arsenic constituents of the herbivorous marine gastropod *Tectus pyramis*: Isolation of tetramethylarsonium ion. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.90, p.313-316, 1988.

FREDRIKSSON, A., GARDLUND, A., BERGMAN, K., OSKARSSON, A., OHLIN, B., DANIELSSON, B. Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury in utero. *Pharmacology & Toxicology*, n.72, p.377-382, 1993.

GETTAR, R. T., GARAVAGLIA, R. N., GAUTIER, E. A., BATISTONI, D. A. Determination of inorganic and organic anionic arsenic species in water by ion chromatography coupled to hydride generation-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal Chromatography A*, n.884, p.211-221, 2000.

GONG, Z., LU, X., MA, M., WATT, C., LE, X. C. Arsenic speciation analysis. *Talanta*, v.58, n.1, p.77-96, 2002.

GOYER, R.A. Nutritional and metal toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61 (suppl), p.646-650, 1995

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.

GRAEME, K. A., POLLACK, C. V. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *The Journal of Emergency Medicine*, v.16, 45-46, 1998.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN P.J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 19, n.6, p.417-428, 1997.

GUNDERSON, E. L. FDA Total Diet Study, July 1986 to April 1991, dietary intakes of pesticides, selected elements, and other chemicals. *Journal of AOAC International*, v.78, p.1353-1363, 1995.

HANSEN, J.C., DEUTCH, B., PEDERSEN, H.S. Selenium status in Greenland Inuit. *Science of the Total Environment*, n. 331, p. 207-214, 2004.

HANSEN, J.C., DEGUCHI, Y. Selenium and fertility in animals and man. *Acta Veterinaria Scandinavica*, n.37, p.19-30, 1996.

HAWKES, W.C., HORNBOSTEL, L. Effects of Dietary Selenium on Mood in Healthy Men Living in a Metabolic Research Unit. *Biological Psychiatry*, n.39, p.121-128, 1996.

HEINRICH-RAMM, R.; MINDT-PRÜFERT, S.; SZADKOWSKI, D. Arsenic species excretion after controlled seafood consumption. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the biomedical and Life Sciences*, v.778, p.263-273, 2002.

HIGHAM, A.M., TOMKINS, R.P.T. Determination of trace quantities of selenium and arsenic in canned tuna fish by using electroanalytical technique. *Food Chemistry*, n.48, p. 85-93, 1993.

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.

HIRATA, S.; TOSHIMITSU, H.; AIHARA, M. Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical Sciences*, v.22, p.39-43, 2006.

HOPENHAYN-RICH, C.; BIGGS, M. L.; SMITH, A. H. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Cordoba, Argentina. *International Journal of Epidemiology*, v.27, n.4, p.561-569, 1998.

HORVAT, M. Mercury-do we know enough? In: EBDON, L.; PITTS, L.; CORNELIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O.F.X.; QUEVAUVILLER, P., eds. *Trace element speciation for environment, food and health*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. cap.7, p.127.

HORVAT, M., NOLDE, N., FAJON, V., JEREB, V., LOGAR, M., LOJEN, S., JACIMOVIC, R., FALNOGA, I., LIYA, Q., FAGANELI, J., DROBNE, D. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, v.304, p.231-256, 2003.

HOSSAIN, M.F. Arsenic contamination in Bangladesh - An overview. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.113, p.1-16, 2006.

HOWARD, A. G., ARBAB ZAVAR, M. H. Determination of inorganic arsenic(III) and arsenic(V), methylarsenic and dimethylarsenic species by selective hydride evolution atomic-absorption spectroscopy. *Analyst*, v.106, p.213-220, 1981.

HSIUNG, T.; HUANG, C. Quantitation of Toxic Arsenic Species and Arsenobetaine in pacific oysters using an off-line process with hydride generation-atomic absorption spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.2470-2478, 2006.

HUNG, D.Q.; NEKRASSOVA, O.; COMPTON, R.G. Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review. *Talanta*, v.64, p. 269–277, 2004.

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.

HYLANDER, L. D, GOODSITE, M.E. Environmental costs of mercury pollution. *Science of the Total Environment*, v.368, p.352–370, 2006.

JACOBSON, J.L. Contending with contradictory data in a risk assessment context: the case of methylmercury. *Neurotoxicology*, v.22, p. 667-675, 2001.

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.

JUREŠA,D.; BLANUŠA, M. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Additives & Contaminants*, v.20, n. 3, p.241–246, 2003.

KAISE, T., YAMAUCHI, H., HIRAYAMA, T., FUKUI, S. Determination of inorganic arsenic and organic arsenic compounds in marine organisms by hydride generation/ cold traps/ gas chromatography-mass spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, v.2, p.339-347, 1988.

KARIM, M. Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Water Research*, v. 34, n. 1, p 304-310, 2000.

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.

DENOBILO, M.

KHANSARI, F.E.; GHAZI-KHANSARI, M.; ABDOLLAHI, M. Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chemistry*, v.93, p.293–296, 2005.

KLAPEC, T.; MANDIĆ, M.L.; GRGIĆ, J. PRIMORAC, L.; IKIĆ, M.; LOVRIĆ, T.; GRGIĆ, C. HERCEG, Z. Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. *Science of the Total Environment*, v. 217, p.127-136, 1998.

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.

KOJIMA, C.; SAKURAI, T.; OCHIAI, M.; KUMATA, H.; QU, W.; WAALKES, M.P.; FUJIWARA, K. Cytotoxicological aspects of the organic arsenic compound arsenobetaine in marine animals. *Applied Organometallic Chemistry*, v.16, p. 421–426, 2002.

KROMHOUT, D. BOSSCHIETER, E.B., COULANDER , C.L. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New England Journal of medicine*, v. 312, n. 19, p. 1205-1209, 1985.

KRYSTEK, P., RITSEMA, R. Determination of methylmercury and inorganic mercury in shark fillets. *Applied Organometallic Chemistry*, v.18, p.640–645, 2004.

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.

LARSEN, E. H. Speciation of dimethylarsinyl-riboside derivatives (arsenosugars) in marine reference materials by HPLC-ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.352, n.6, p.582-588, 1995.

LE, X.C., LI, X.F., LAI, V., MA, M., YALCIN, S., FELDMANN, J. Simultaneous speciation of selenium and arsenic using elevated temperature liquid chromatography separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, n.53, p. 899–909, 1998.

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.

LEVANDER, O. A. A global view of human selenium nutrition. *Annual Review of Nutrition*, v.7, p.227–250, 1987.

LEVENSON, C.; AXELRAD, D.M. Too Much of a Good Thing? Update on Fish Consumption and Mercury Exposure. *Nutrition Reviews*, v. 64, n. 3, p. 139-145, 2006.

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.

LI, W.; WEI, C.; ZHANG, C.; VAN HULLE, M.; CORNELIS, R.; ZHANG X. A survey of arsenic species in chinese seafood. *Food and Chemical Toxicology*, v.41, p.1103-1110, 2003.

LIANG, L. N., SHI, J. B., HE, B., JIANG, G. B., YUAN, C. G. Investigation of methylmercury and total mercury contamination in mollusk samples collected from coastal sites along the Chinese Bohai Sea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.7373-7378, 2003.

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.

LIMA, A.P.S.; SARKIS, J.E.S.; SHIHOMATSU, H.M.; MÜLLER, R.C.S. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. *Environmental Research*, v. 97, p.236–244, 2005.

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.

LIN, C-J., PEHKONEN, S. O. The chemistry of atmospheric mercury: a review. *Atmospheric Environment*, v.33, p.2067-2079, 1999.

LIU, C.W.; HUANG, F.M.; HSUEH, Y.M. Revised cancer risk assessment of inorganic arsenic upon consumption of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from blackfoot disease hyperendemic areas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.74, p.1037–1044, 2005.

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, p. 57- 66, 2006.

LIU, D.L., YANG, Y.P., HU, M.H. Selenium content of marine food chain organisms from the coast of China. *Marine Environmental Research*, n.22, p. 151-165, 1987.

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 brasiliensis* do estuário de Cananéia- SP, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 61, n.1, p. 13-18, 2002.

MANDAL, B.K.; SUZUKI, K.T. Arsenic round the world: a review. *Talanta*, v.58, p.201-235, 2002.

MARCOTRIGIANO, G.O., STORELLI, M.M. Heavy metal, polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues in marine organisms: risk evaluation for consumers. *Veterinary Research Communications*, v. 27 suppl. 1, p.183-195, 2003.

MARCOVECCHIO, J.E., MORENO, V.J., PÉREZ, A. Metal Accumulation in Tissues of Sharks from the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Marine Environmental Research*, v.31, p. 263-274, 1991.

MCNAUGHTON, S.A., MARKS, G.C. Selenium content of Australian foods: A review of literature values. *Journal of Food Composition and Analysis*, n. 15, p.169-182, 2002.

MENG, X.; KORFIATIS, G.P.; CHRISTODOULATOS, C.; BANG, S. Treatment of arsenic in Bangladesh well water using a household co-precipitation and filtration system. *Water Research*, v. 35, n. 12, p.2805-2810, 2001.

MOLLER-MADSEN B, DANSCHER G. Localization of mercury in CNS of the rat. IV. The effect of selenium on orally administered organic and inorganic mercury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, n.108, p.457–73, 1991.

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.

MOORE, C.J. A review of mercury in the environment (its occurrence in marine fish). Office of environmental management. S.I.: South Carolina Department of Natural Resources, Marine Resources Division, Office of

Environmental Management, 2002. 22p. Disponível em: http://www.dnr.sc.gov/marine/img/mm_paper.pdf. Acesso em: 15 jan. 2007.

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.

MUÑOZ, O., VÉLEZ, D., MONTORO, R. Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III)+As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*, v.124, p.601-607, 1999.

MUÑOZ, O., DEVESA, V., SUÑER, M.A., VÉLEZ, D., MONTORO, R., URIETA, I., MACHO, M.L., JALÓN, M. Total and Inorganic Arsenic in Fresh and Processed Fish Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.48, p.4369-4376, 2000.

MUÑOZ, O.; BASTIAS, J.M.; ARAYA, M.; MORALES, A.; ORELLANA, C.; REBOLLEDO, R.; VELEZ, D. Estimation of the dietary intake of cadmium, lead, mercury, and arsenic by the population of Santiago (Chile) using a Total Diet Study. *Food Chemical Toxicology*, v.43, p.1647-1655, 2005.

MUÑOZ-OLIVAS, R., CÁMARA, C. Speciation related to human health. In: *Trace Element speciation for environment, food and health*. Ebdon, L.; Pitts, L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O. F. X.; Quevauviller, Ph. Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001, cap. 23, p 331.

MURPHY, J., HANNON, E.M., KIELY, M., FLYNN, A. CASHMAN, K.D. Selenium intakes in 18-64-y-old Irish adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, n.56, p. 402-408, 2002.

NARANMANDURA, H., SUZUKI, N. SUZUKI, K.T. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chemical Research in Toxicology*, v.19, p. 1010-1018, 2006.

National Institutes of Health. Dietary Supplement Fact Sheet: Selenium. Office of Dietary Supplements. Disponível em: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/selenium.asp>. Acesso em 20 janeiro 2007.

NAVARRO, M.A.S. *Desarrollo, y aplicación de metodologías analíticas, para la determinación de especies arsenicales y mercuriales en productos de la pesca*. Valência, 2005. Dissertação de Doutorado. Universidade de Valencia.

NAVARRO-ALARCÓN, M., LÓPEZ-MARTÍNEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment*, n.249, p.347–371, 2000.

NING, R.Y. Arsenic removal by reverse osmosis. *Desalination*, v.143, p.237–241, 2002.

OKEN, E.; WRIGHT, R.O.; KLEINMAN, K.P.; BELLINGER, D. AMARASIRIWARDENA, C.; HU, H.; RICH-EDWARDS, J.W.; GILLMAN, M.W. Maternal Fish Consumption, Hair Mercury, and Infant Cognition in a U.S. Cohort, *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 10, p.1376–1380, 2005

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Elementos traço na nutrição e saúde humanas*. São Paulo, Roca, 1998. 297p

OSMAN, K., SCHULTZ, A., AKESSON, B., MACIAG, A., VAHTER, M. Interactions between essential and toxic elements in children exposed to lead in Katowice, Poland. *Clinical Biochemistry*. v.31, p.657–665, 1998.

PAUL, M.C., TOIA, R.F., NAGY-FELSOBUKI, E.I.V. novel method for the determination of mercury and selenium in shark tissue using high-resolution inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, v.58, p.1687–1697, 2003.

PHILLIPS, D. J. H. Arsenic in aquatic organisms - a review, emphasizing chemical speciation. *Aquatic Toxicology*, v.16, p.151–186, 1990.

PINHO, A.P.; GUIMARÃES, J.R.D.; MARTINS, A.; COSTA, P.A.S.; OLAVO, G.; VALENTIN, J. Total mercury in muscle tissue of five shark species from brazilian offshore waters: effects of feeding habit, sex, and length. *Environmental Research*, v. 89, p. 250–258, 2002.

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.

PLESSI, M.; BERTELLI, D.; MONZANI, A. Mercury and Selenium Content in Selected Seafood. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.14, p.461–467, 2001.

RAYMAN M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, n.356, p. 233–241, 2000.

REILLY, C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science Technology*, v.9, p.114–118, 1998.

RENZONI, A., ZINO, F., FRANCHI, E. Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations. *Environmental Research*, v.77, p.68, 1998.

RIBA, I.; BLASCO, J.; JIMÉNEZ-TENORI, N.; DELVALLS, 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.

SAHA, J. C.; DIKSHIT, A. K.; BANDYOPADHYAY, M.; SAHA, K. C. A review of arsenic poisoning and its effects on human health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.29, p.281, 1999.

SALGADO, P.E.T., LARINI, L., LEPERA, J.S. In: LARINI, L. *Toxicologia*. 2 ed.2. São Paulo: Manole, 1987. cap.5, p.114-135.

SALGADO, P.E.T. Metais em alimentos. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.5, p. 405-426.

SALIM, A.; HASSANIN, M.A.; ZOHAIR, A. A simple procedure for reducing lead content in fish. *Food Chemical Toxicology*, v.41, p.595–597, 2003.

SAKUMA, A.M.; CAPITANI, E.M.; TIGLEA, P. Arsênio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. *Metais: Gerenciamento da toxicidade*. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap.8, p. 203–238.

SÁNCHEZ RODAS, D., GEISZINGER, A., GÓMEZ ARIZA, J. L., FRANCESCONI, K. A. Determination of an arsenosugar in oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analyst*, v.127, p.60-65, 2002.

SAKURAI, T.; OCHIAI, M.; KOJIMA, C.; KUMATA, H.; FUJIWARA, K. Study of in vitro cytotoxicity of arsenocholine, a trimethyl arsenic compound in seafood. *Applied Organometallic Chemistry*, v.16, p.415–420, 2002.

SANKAR, T.V.; ZYNUDHEEN, A.A.; ANANDAN, R.; NAIR, P.G.V. Distribution of organochlorine pesticides and heavy metal residues in fish and shellfish from Calicut region, Kerala, India. *Chemosphere*, v.65, p. 583-590, 2006.

SCHAEFFER, R.; SOEROES, C.; IPOLYI, I.; FODOR, P.; THOMAIDIS, N.S. Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea

by liquid chromatography–(photo-oxidation)–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 547, p. 109-118, 2005.

SCHROEDER, W. H., MUNTHER, J. Atmospheric mercury: An overview. *Atmospheric Environment*, v.32, p.809-822, 1998.

SCHUTZ, A., SKARPING, G., SKERFVING, S., MALMQUIST, K., Mercury. In: HERBER, R.F.M., STOEPLER, M. Eds., *Trace Element Analysis in Biological Specimens*. Elsevier, London, Amsterdam, New York and Tokyo, p. 403-446, 1994.

SEAP. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Consumo de peixe aumenta com parcerias. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br/noticias2.php?id=3121>. Acesso em 4 abril 2007.

SEIXAS, S.; BUSTAMANTE, P.; PIERCE, G. Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *The Science of the Total Environment*, v. 340, p.113-122, 2005.

SHIBATA, Y., MORITA, M. Characterization of organic arsenic compounds in bivalves. *Applied Organometallic Chemistry*, v.6, p.343-349, 1992.

SHIH, M.C. An overview of arsenic removal by pressure-driven membrane processes. *Desalination*, v. 172, p.85-97, 2005.

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.

SIMONOFF, M.; HAMON, C.; MORETTO, P.; LLABADOR, Y.; SIMONOFF, G. Selenium in Foods in France. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 1, p.295-302, 1988.

SMRKOLJ, P., POGRAJC, L., HLASTAN-RIBIC, C., STIBILJ, V. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*, n.90, p. 691-697, 2005.

SIRICHAKWAL, P.P.; PUWASTIEN, P.; POLNGAM, J.; KONGKACHUICHA, R. Selenium content of Thai foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 18, p. 47–59, 2005.

ŠLEJKOVEC, Z., BYRNE, A. R., SMODIŠ, B., ROSSBACH, M. Preliminary studies on arsenic species in some environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.354, n.5-6, p.592-595, 1996.

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.

SLOTH, J.J.; LARSEN, E.H.; JULSHAMN, K. Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.18, p.452-459, 2003.

SMITH, A. H.; GOYCOLEA, M.; HAQUE, R.; BIGGS, M. L. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *American Journal of Epidemiology*, v.147, n.7, p.660-669, 1998.

SPURGEON, A. Prenatal Methylmercury Exposure and Developmental Outcomes: Review of the Evidence and Discussion of Future Directions. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n.2, p.307-312, 2006.

STORELLI, M.M.; MARCOTRIGIANO, G.O. Content of mercury and cadmium in fish (*Thunnus alalunga*) and cephalopods (*Eledone moschata*) from the south-eastern Mediterranean Sea. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n.11, p.1051-1056, 2004.

STORELLI, M.M.; MARCOTRIGIANO, G.O. Fish consumption: risk of contamination by mercury. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, n.12, p.1007-1011, 2000.

SÚÑER, M. A.; DEVESA, V.; MUNOZ, O.; LOPEZ, F.; MONTORO, R.; ARIAS, A. M.; BLASCO, J. Total and inorganic arsenic in the fauna of the Guadalquivir estuary: environmental and human health implications. *Science of the Total Environment*, v.242, p.261-270, 1999.

SÚÑER, M. A.; DEVESA, V. CLEMENTE, M.J.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; URIETA, I.; JALÓN, M.; MACHO, M.L. Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.924-932, 2002.

SVENSSON, B.G., SCHÜTZ, A., NILSSON, A., AKESSON, I. SKERFVING, S. Fish as a source of exposure to mercury and selenium. *Science of the Total Environment*, v.126, p.61-74, 1992.

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.

TAYLOR, T.C. Selenium biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, n. 59, p. 111-127, 1990.

TERRY, P., LICHTENSTEIN P., FEYCHTING, M., AHLBOM, A., WOLK, A. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *Lancet*, v.357, p.1764-1766, 2001.

TIGLEA, P. CAPITANI, E.M. Selênio. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. *Metais: Gerenciamento da toxicidade*. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 9, p. 239-262.

TRASANDE, L. LANDRIGAN, P.J.; SCECHTER, C. Public Health and Economic Consequences of Methyl Mercury Toxicity to the Developing Brain. *Environmental Health Perspectives*, v.113, n. 5, p. 590-596, 2005.

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.

TSUDA, T.; BABAZONO, A.; OGAWA, T.; HAMAD, H.; MINO, Y.; AOYAMA, H.; KURAMATANI, N.; NAGIRA, T.; HOTTA, N.; HARADA, M.; INOMATA, S. Inorganic arsenic: A dangerous enigma for mankind. *Applied Organometallic Chemistry*, v.6, p.309-322, 1992.

TÜRKMEN, A.; TÜRKMEN, M.; TEPE, Y.; AKYURT, I. Heavy metals in three commercially valuable fish species from _Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. *Food Chemistry*, v.91, p.167-172, 2005.

TÜZEN, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, v.80, p.119-123, 2003.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Fact Sheet. Mercury update: impact on fish advisories. Washington, 2001. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscience/fishadvice/mercupd.pdf>. Acesso em: 28 maio 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological*

profile for selenium. Atlanta: ATSDR, 1996. 293p. (ATSDR toxicological profile).

URIETA, I., JALÓN, M., EGUILEOR, I. Food surveillance in the Basque Country (Spain) .2. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M(1), iron and zinc through the total diet study, 1990/91. *Food Additives and Contaminants*, v.13, p.29-52, 1996.

USERO, J.; IZQUIERDO, C.; MORILLO, J.; GRACIA, I. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environment International*, v.29, p.949–956, 2003.

UTHUS, E.O. Estimation of safe and adequate daily intake for arsenic. In: MERTZ, W.; ABERNATHY, C.O., OLIN, S.S., eds. *Risk assessment of essential elements*. Washington: ILSI Press, 1994. p.273-282.

VÉLEZ, D., YBÁÑEZ, N., MONTORO, R. Monomethylarsonic and dimethylarsinic acid contents in seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.859-864, 1996.

VÉLEZ, D., YBÁÑEZ, N., MONTORO, R. Determination of arsenobetaine in manufactured seafood products by liquid chromatography, microwave-assisted oxidation and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.12, p.91-96, 1997.

VENTURA, M.G.; FREITAS, M.C.; PACHECO, A.; MEERTEN, T.; WOLTERBEEK, H.T. Selenium content in selected Portuguese foodstuffs. *European Food Research and Technology*, v. 224, p. 395-401, 2007.

VLIEG, P. Selenium Concentration of the Edible Part of 74 New Zealand Fish Species. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 3, p.67-72, 1990.

WATANABE, T., KIRON, V., SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, v.151, p.185–207, 1997.

WATANABE C. Selenium deficiency and brain functions: the significance for methylmercury toxicity. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, n.55, p.581–589, 2001.

WATANABE C, YIN K, KASANUMA Y, SATOH H. In utero exposure to methylmercury and Se deficiency converge on the neurobehavioral outcome in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, n.21, p.83–88, 1999.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. *Methylmercury*. Geneva: OMS, 1990. (Environmental Health Criteria, 101). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm>. Acesso em 15 junho. 2006.

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).

WORLD HEALTH ORGANIZATION FOR THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. *Inorganic arsenic compounds other than arsine health and safety guide*. Geneva: World Health Organization, 1992. 32p. (Health and Safety Guide, n.70).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants*: prepared by the 33rd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneve, 21-30 March 1988. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. WHO Food Aditives Series, 24).

WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAM; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Selenium*. Geneva: World Health Organization, 1987. 306p. (Environmental Health Criteria, v.58).

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).

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).

XU, Y.; NAKAJIMA, T.; OHKI, A. Adsorption and removal of arsenic(V) from drinking water by aluminum-loaded Shirasu-zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, v.92, p.275-287, 2002.

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.

YANG, G., WANG, S., ZHOU R, SUN, S. Endemic selenium intoxication of humans in China. *American Journal of Clinical Nutrition*, n.37, p. 872-881, 1983.

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.

YONEDA, S., SUZUKI, K.T. Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, n.143, p.274-280, 1997.

YOSHIDA, T.; YAMAUCHI H.; SUNC, G.F. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose–response relationships in review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.198, p. 243-252, 2004.

YOUNG, V.R., NAHAPETIAN, A., JANGHORBANI, M. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, n.35, p. 1076-1088, 1982.

YSART, G., MILLER, P., CREWS, H., ROBB, P., BAXTER, M., DE L'ARGY, C., LOFTHOUSE, S., SARGENT, C., HARRISON, N. Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants*, v.16, p.391-403, 1999.

ZAW, M.; EMETT, M.T. Arsenic removal from water using advanced oxidation processes. *Toxicology Letters*, v.133, p.113–118, 2002.

ZHANG, J.; SASAKI, S.; AMANO, K.; KESTELOOT, H. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease, and stroke: na ecological study. *Preventive Medicine*, v. 28, p.520-529, 1999.

ZBIDEN, P., ANDREY, D, BLAKE, C. A routine ion chromatography ICP-MS method for the analysis of arsenic species applicable in the food industry. *Atomic spectroscopy* , v.21, n.6, p.205-215.

ANEXOS

1 – Ficha do aluno
2 – Instruções para Defesa
3 – Local de obtenção das amostras

Local de obtenção das amostras

Amostra	Procedência
T1	Feira livre
T2	Feira livre
T3	Feira livre
T4	Feira livre
T5	Feira livre
T6	Feira livre
T7	Feira livre
T8	Feira livre
T9	Mercado Municipal
T10	Hipermercado
T11	Hipermercado
T12	Hipermercado
T13	Hipermercado
T14	Hipermercado
T15	Hipermercado
T16	Hipermercado
T17	Hipermercado
T18	Hipermercado
T19	Hipermercado
T20	Hipermercado
T21	Hipermercado
T22	Hipermercado
T23	Feira livre
T24	Feira livre
T25	Feira livre
T26	Feira livre
T27	Feira livre
T28	Feira livre
T29	Hipermercado
T30	Hipermercado
T31	Hipermercado
T32	Hipermercado
T33	Hipermercado
T34	Hipermercado
T35	Hipermercado
T36	Hipermercado
T37	Hipermercado
T38	Mercado Municipal
T39	Mercado Municipal

Local de obtenção das amostras

Amostra	Procedência
T40	Mercado Municipal
T41	Mercado Municipal
T42	Mercado Municipal
T43	Mercado Municipal
T44	Mercado Municipal
T45	Mercado Municipal
T46	Mercado Municipal
T47	Mercado Municipal
T48	Mercado Municipal
T49	Mercado Municipal
T50	Mercado Municipal
T51	Mercado Municipal