



Isa Marlene Marmelo Gameiro

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

Influência de ingredientes usados na confeção de refeições à base de pescado na bioacessibilidade de elementos tóxicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor António Manuel Barros Marques
Investigador Principal, IPMA, I.P.

Co-orientadora: Prof.^a Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutora Maria Leonor Martins Brás de Almeida Nunes, IPMA

Vogal: Doutor António Manuel Barros Marques, IPMA



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018



Isa Marlene Marmelo Gameiro

Licenciada em Ciências Forenses e Criminais

Influência de ingredientes usados na confeção de refeições à base de pescado na bioacessibilidade de elementos tóxicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor António Manuel Barros Marques
Investigador Principal, IPMA, I.P.

Co-orientador: Prof.^a Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Doutora Maria Leonor Martins Brás de Almeida Nunes, IPMA
Vogal: Doutor António Manuel Barros Marques, IPMA



Setembro 2018

Copyright © Isa Marlene Marmelo Gameiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este ano amadureci mais do que em qualquer outro ano da minha vida. Aprendi muito e os meus conhecimentos tornaram-se mais sólidos. Foram muitas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram e me deram força para chegar até aqui.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Doutor António Marques e à Mestre Vera Barbosa (investigadores do Instituto Português do Mar e da Atmosfera) que me acompanharam ao longo da grande aventura que é escrever uma dissertação. Muito obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e pela simpatia que sempre demonstraram.

Agradeço também a todos os investigadores do IPMA pelo afável acolhimento e por transmitirem sempre boa disposição. Foi ótimo ter um contacto direto com a área da investigação!

A todos os meus docentes da FCT-UNL, obrigada por me terem ensinado tanto durante o mestrado. Um agradecimento especial à professora Maria Paula Duarte que aceitou ser minha co-orientadora. Muito obrigada por ter confiado em mim e nas minhas capacidades!

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família que sempre me apoiou incondicionalmente em tudo o que fiz. Obrigada ao meu “mano” Tiago que sempre me fez sorrir, mesmo em momentos de desespero. Aos meus avós Abílio e Eugénia, devo-lhes tudo. Se sou a pessoa que sou hoje, é graças a eles. Obrigada por acreditarem em mim, por cuidarem de mim, por me animarem sempre que estou triste ou desmotivada. Acho que nunca vos disse isto: obrigada por me amarem. Espero um dia chegar tão longe que consiga compensar-vos por tudo o que fizeram por mim.

Resumo

O pescado é considerado um alimento de alto valor nutricional, contudo pode representar uma via de exposição a diversos contaminantes que nele se acumulam por processos de bioacumulação/bioamplificação.

A concentração de contaminantes ingeridos num alimento nem sempre se reflete na quantidade que fica disponível para absorção (fração bioacessível). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do consumo de refeições completas à base de pescado na bioacessibilidade de elementos tóxicos, nomeadamente Hg em refeições de atum (*Thunnus spp.*) e Cd em refeições de sapateira (*Cancer paguros*). Isto permitiu avaliar se o tratamento culinário e/ou a presença de outros ingredientes pode interferir na absorção de contaminantes.

Os resultados preliminares demonstraram que o tratamento culinário do atum induz um aumento dos teores de Hg comparativamente à amostra crua. Contudo, a percentagem de Hg bioacessível diminuiu após o tratamento culinário. A adição de outros ingredientes às refeições de atum (refogado de cebola, arroz de tomate, batata e brócolos) promove uma redução do teor de Hg no atum, embora aumente a bioacessibilidade deste contaminante.

Quanto às refeições de sapateira, a adição de outros ingredientes induz a diminuição do teor de Cd na refeição, embora a percentagem de Cd bioacessível não sofra alterações significativas.

A concentração máxima permitida na União Europeia relativamente ao Hg no atum (1,0 mg/kg de peso fresco) não foi excedida em nenhum caso, não se tendo verificado riscos associados à exposição ao Hg através do consumo de duas refeições semanais para os diferentes grupos etários. No caso da sapateira, a concentração máxima de Cd (0,50 mg/kg de peso fresco para o músculo) foi largamente excedida nas vísceras, tendo-se verificado um risco elevado de exposição ao Cd através do consumo de 50 g semanais para todos os grupos etários.

Estas informações são úteis para ajudar os consumidores a efetuar uma seleção consciente das refeições de pescado que podem representar um risco de exposição a contaminantes pelos consumidores. Além disso, esta informação permite que as autoridades de segurança alimentar possam integrar estes dados na avaliação e comunicação de riscos.

Palavras-chave: bioacessibilidade, digestão *in vitro*, mercúrio, cádmio, pescado, contaminantes.

Abstract

Seafood has a high nutritional value, nevertheless, its consumption may be a route of exposure to many chemical contaminants which could bioaccumulate in seafood and undergo biomagnification processes.

The levels of ingested contaminants do not always reflect the amount that is available for absorption (bioaccessible fraction). In this context, the objective of the present study was to evaluate the effect of the consumption of complete seafood-based meals on the bioaccessibility of toxic elements, specifically Hg in tuna (*Thunnus* spp.) and Cd in crab (*Cancer paguros*) meals. This allow to evaluate if the culinary treatment and/or the presence of other ingredients can interfere in the absorption of contaminants.

The preliminary results showed that the culinary treatment of tuna increases the Hg levels compared to the raw sample. However, the Hg bioaccessible percentage decreases after the culinary treatment. The addition of other ingredients to tuna meals (onion stew, tomato rice, potatoes and broccolis) promotes a reduction in Hg levels in tuna, although it increases the bioaccessibility of this contaminant.

For crab meals, the addition of other ingredients induces a decrease in the Cd levels in the meal, although the Cd bioavailable percentage does not change significantly.

The maximum concentration allowed by the European Union for Hg in tuna (1,0 mg/kg of fresh weight) was not exceeded in any case and there was no risk of exposure to Hg through the consumption of 2 meals per week for the different age groups. In the case of the crab, the maximum concentration of Cd (0,50 mg/kg of fresh weight for muscle) was largely exceeded in the edible tissues (hepatopancreas and gonads), and there was a risk of exposure to Cd through the consumption of 50 g weekly for all age groups.

This information is useful to help consumers to make a conscious selection of their seafood meals. In addition, this information enables food safety authorities to integrate these data into risk assessment and communication strategies.

Keywords: bioaccessibility, *in vitro* digestion, mercury, cadmium, seafood, contaminants.

Índice geral

Página

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice geral	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xv
1. Introdução.....	1
1.1. A importância do pescado em Portugal.....	1
1.2. Benefícios e riscos associados ao consumo de pescado	4
1.2.1. Benefícios do consumo de pescado	5
1.2.1.1. Proteínas.....	5
1.2.1.2. Lípidos	6
1.2.1.3. Colesterol.....	7
1.2.1.4. Vitaminas	8
1.2.1.5. Minerais	8
1.2.2. Riscos do consumo de pescado	9
1.2.2.1. Elementos tóxicos.....	11
1.2.2.1.1. Mercúrio	13
1.2.2.1.2. Cádmio.....	16
1.2.3. Espécies de pescado afetadas pela contaminação com elementos tóxicos.....	18
1.2.3.1. Atum (<i>Thunnus</i> spp.)	18
1.2.3.1.1. Nomenclatura, características anatómicas e ciclo de vida	18
1.2.3.1.2. Distribuição geográfica e métodos de captura.....	19
1.2.3.2. Sapateira (<i>Cancer paguros</i>)	20
1.2.3.2.1. Nomenclatura, características anatómicas e ciclo de vida	20
1.2.3.2.2. Distribuição geográfica e métodos de captura.....	20
1.3. Influência dos tratamentos culinários na composição nutricional e contaminação do pescado.....	21
1.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade	22
1.5. Avaliação dos riscos e benefícios associados ao consumo de pescado	23
2. Objetivo do estudo	25
3. Materiais e métodos	27
3.1. Preparação das refeições e tratamentos culinários	27
3.1.1. Atum (<i>Thunnus</i> spp.)	27
3.1.2. Sapateira (<i>Cancer pagurus</i>).....	29
3.2. Método de digestão <i>in vitro</i>	30
3.3. Determinação do teor de mercúrio nas refeições de atum	33

Índice geral

	Página
3.4. Determinação do teor de cádmio nas refeições de sapateira	33
3.5. Análise estatística	35
3.6. Análise de risco	35
4. Resultados e discussão	37
4.1. Efeito dos tratamentos culinários nos teores de contaminantes	37
4.1.1. Mercúrio	37
4.1.2. Cádmio	40
4.2. Efeito dos tratamentos culinários na bioacessibilidade dos contaminantes	41
4.2.1. Mercúrio	41
4.2.2. Cádmio	43
4.3. Análise de risco	44
4.3.1. Análise de risco associado ao consumo de atum	46
4.3.2. Análise de risco associado ao consumo de sapateira	49
5. Conclusão e perspectivas futuras	53
6. Bibliografia	55
Anexo 1 – Ingredientes utilizados nos tratamentos culinários das diferentes refeições	63
Anexo 2 – Receita de bife de atum estufado com cebolada	65
Anexo 3 – Receita de atum com arroz de tomate	67
Anexo 4 – Pesos e quantidades utilizadas no tratamento culinário do atum	69
Anexo 5 – Receita de sapateira recheada	71
Anexo 6 – Pesos e quantidades utilizadas no tratamento culinário da sapateira	73
Anexo 7 – Quantidade de fração bioacessível e fração não bioacessível das refeições de atum e de sapateira	75
Anexo 8 – Análise estatística do teor de Hg (mg/kg) das refeições completas e do teor de Hg (mg/kg) do atum nas refeições	77
Anexo 9 – Análise estatística do teor de Cd (mg/kg) das refeições completas e do teor de Cd (mg/kg) da sapateira nas refeições	79
Anexo 10 – Análise estatística das percentagens de Hg bioacessível e dos teores de Hg das refeições completas de atum após a digestão	81
Anexo 11 – Análise estatística das percentagens de Cd bioacessível e dos teores de Cd das refeições completas de sapateira após a digestão	83
Anexo 12 – Análise estatística do teor de Hg (µg) de 2 refeições completas de atum antes e após a digestão	85
Anexo 13 – Análise estatística do teor de Cd (µg) de 50 g das refeições de sapateira antes e após a digestão	87

Índice de figuras

	Página
Figura 1.1 - Áreas da zona económica exclusiva de Portugal, da sua plataforma continental e da pesca costeira.	1
Figura 1.2 - Capturas (toneladas) segundo os principais tipos de espécies em 2016	2
Figura 1.3 - Consumo <i>per capita</i> de pescado (Kg/Capita/Ano) por Estado-Membro em 2015	2
Figura 1.4 - Capturas de pescado em Portugal entre 2008 e 2017 (em toneladas).....	3
Figura 1.5 - Informações relativas ao consumo <i>per capita</i> , capturas, importações e produção em aquicultura de Portugal, Espanha, França, Itália, Eslovénia, Croácia e Grécia	3
Figura 1.6 - Principais espécies de pescado capturado em Portugal em 2017	4
Figura 1.7 - Modelo ilustrativo do processo de bioamplificação dos contaminantes	11
Figura 1.8 - Modelo ilustrativo das fases de toxicocinética dos elementos tóxicos: absorção, transporte e excreção	12
Figura 1.9 - Ciclo do mercúrio (Hg).	14
Figura 1.10 - Representação esquemática da deposição do cádmio no fígado e no rim	17
Figura 1.11 - <i>Thunnus</i> spp. ou atum	18
Figura 1.12 - <i>Cancer paguros</i> ou sapateira.....	20
Figura 3.1 - Desenho experimental das refeições de atum.....	28
Figura 3.2 - Desenho experimental das refeições de sapateira.....	29
Figura 3.3 - Desenho experimental do protocolo de digestão <i>in vitro</i>	32
Figura 4.1 - Relação entre o teor de Hg (mg/kg) das refeições de atum antes da digestão e a % de Hg bioacessível	42
Figura 4.2 - Relação entre o teor de Cd (mg/kg) das refeições de sapateira antes da digestão e a % de Cd bioacessível	44
Figura 4.3 - Percentagens do limite de PTWI (Hg inorgânico) para o consumo de 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg	47
Figura 4.4 - Percentagens do limite de PTWI (MeHg) para o consumo de 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg	47

Índice de tabelas

	Página
Tabela 1.1 - Teores de minerais (mg/100 g) das principais espécies de pescado consumidas em Portugal	9
Tabela 1.2 - Hierarquia taxonómica do atum.....	18
Tabela 1.3 - Hierarquia taxonómica da sapateira.....	20
Tabela 1.4 - Teores máximos permitidos para a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) e para as concentrações máximas permitidas pela UE relativamente ao mercúrio e ao cádmio em pescado	24
Tabela 3.1 - Percentagem de peso dos ingredientes nas diferentes refeições em análise	29
Tabela 3.2 - Composição dos respetivos sucos digestivos na preparação de 200 mL de saliva, 200 mL de suco gástrico, 200 mL de suco duodenal e 200 mL de suco biliar	31
Tabela 3.3 - Programa do forno de digestão por microondas CEM-MARS, USA.....	33
Tabela 3.4 - Curva de calibração feita a partir da solução padrão de cádmio 1 µg/L	34
Tabela 3.5 - Parâmetros instrumentais para a determinação de cádmio ($\lambda = 228,8$ nm) por espectrofotometria de absorção atómica em forno de grafite.....	34
Tabela 4.1 - Teor de Hg (mg/kg) na refeição completa, na porção de atum de cada refeição e nos restantes ingredientes antes da digestão.....	37
Tabela 4.2 - Teor de Cd (mg/kg) na refeição completa e apenas na porção de sapateira de cada refeição antes da digestão	40
Tabela 4.3 - Percentagens de Hg bioacessível (%) e teores de Hg (mg/kg) nas refeições completas de atum após digestão.....	41
Tabela 4.4 - Percentagem de Cd bioacessível (%) e teores de Cd (mg/kg) nas refeições completas de sapateira após digestão	43
Tabela 4.5 - Quantidades máximas de Hg, MeHg e Cd que podem ser ingeridas considerando crianças de 23 kg, adolescentes de 43 kg, mulheres grávidas de 55 kg e adultos saudáveis de 70 kg	45
Tabela 4.6 - Teor de Hg (µg) em 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão.....	46
Tabela 4.7 - Número máximo de 2 refeições semanais de atum que os diferentes grupos etários podem consumir até atingir o risco (tendo em conta o teor de Hg bioacessível após a digestão).....	48
Tabela 4.8 - Teor de Cd (µg) em 50 g de refeição semanal de sapateira antes e depois da digestão	49
Tabela 4.9 - Percentagem do limite de PTWI ou PTMI para o consumo de 50 g de refeição de sapateira semanal e mensal, respetivamente, antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg.....	50
Tabela 4.10 - Quantidades máximas de refeições semanais e mensais de sapateira (g) que os diferentes grupos etários podem ingerir até atingir o PTWI ou o PTMI	51

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Cd - Cádmió

Cd-Alb - Complexo cádmio-albumina

Cd-GSH - Complexo cádmio-glutationa

Cd-MT - Complexo cádmio-metalotioneína

DDT - p-dicloro-difeniltricloroetano

DHA - Ácido gordo docosaheptaenóico

EPA - Ácido gordo eicosapentaenóico

GSH – Glutationa

HDL – Lipoproteínas de elevada densidade

Hg - Mercúrio

Hg⁰ - Mercúrio elementar

Hg¹⁺ - Ião mercuroso

Hg²⁺ - Ião mercúrico

INE - Instituto Nacional de Estatística

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MeHg - Metilmercúrio

MT - Metalotioneína

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

PAH - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Pb - Chumbo

PCB – Bifenilpoliclorados

PTMI – Ingestão mensal tolerável provisória

PTWI – Ingestão semanal tolerável provisória

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

SFA - Ácidos gordos saturados

UE - União Europeia

ZEE - Zona económica exclusiva

1. Introdução

1.1. A importância do pescado em Portugal

Portugal é o país europeu com maior tradição no sector da pesca (Ferraz de Arruda et al., 2011). Há muito tempo que o país confia na pesca como um dos principais meios de subsistência sendo que muitas comunidades do litoral fazem da pesca a sua principal atividade e fonte de rendimento. O sector da pesca assume, assim, uma relevância social, regional e local pois trata-se de um sector que contribui consideravelmente para o desenvolvimento local das comunidades costeiras, para a criação de empregos, manutenção/criação de atividades económicas e manutenção das próprias tradições culturais (DGPA, 2007; Almeida, 2014; Leitão et al., 2014; PROMAR, 2015).

Considerando apenas a dimensão terrestre, Portugal é um país relativamente pequeno e afastado do centro europeu. Porém, quando considerada a sua dimensão marítima, Portugal assume lugar de destaque com um enorme potencial geoestratégico, geopolítico e económico (Pinto, 2017). Portugal apresenta uma linha de costa com 2830 km e uma zona económica exclusiva (ZEE) de 1721,751 km² (incluindo o continente com 311,648 km² e as regiões autónomas dos Açores com 955,644 km² e da Madeira com 454,459 km²) (figura 1.1) (Matos, 2014; Pinto, 2017; Sea Around Us | Fisheries, Ecosystems and Biodiversity, 2018).

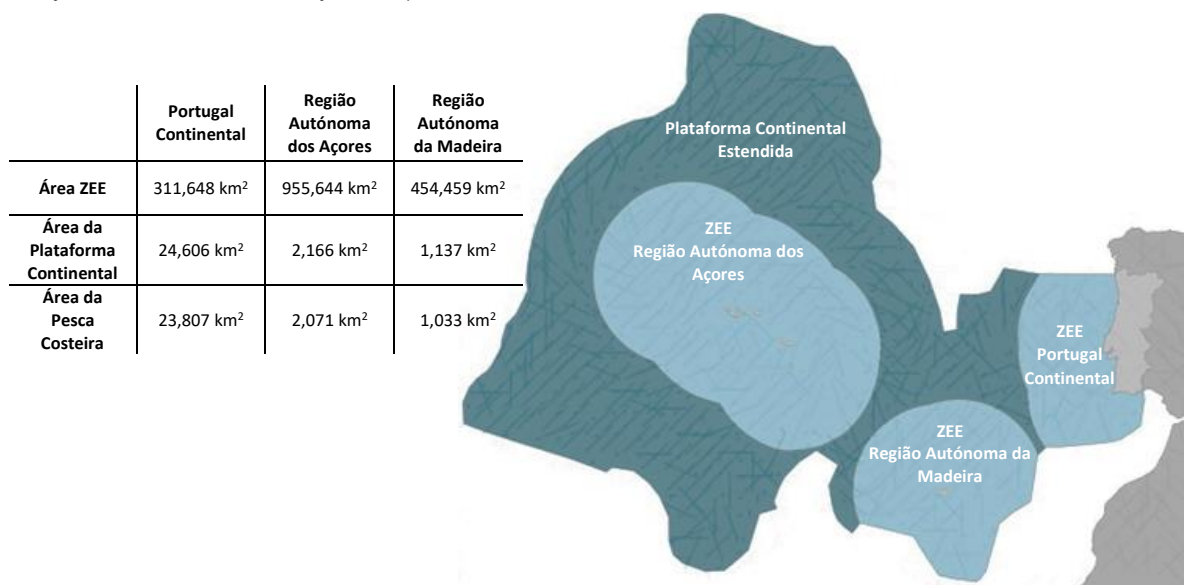


Figura 1.1 – Áreas da zona económica exclusiva de Portugal, da sua plataforma continental e da pesca costeira (Fonte: adaptado de Sea Around Us | Fisheries, Ecosystems and Biodiversity, 2018).

Apesar da extensa ZEE, a plataforma continental é exígua (cerca de 1,5% da ZEE) e, o facto de Portugal se situar numa zona de transição para ecossistemas mais quentes, traduz-se numa elevada diversidade, mas de baixa abundância de pescado (DGPA, 2007; Afonso, 2009; PROMAR, 2015; Pinto, 2017). Por outro lado, a ZEE dos Açores e da Madeira, embora mais extensas, têm reduzidas áreas de pesca com grande fragilidade biológica e reduzidas profundidades de exploração (DGPA, 2007; Pham et al., 2013; Shon et al., 2015). Desta forma as regiões autónomas dos Açores e da Madeira são responsáveis por uma menor percentagem de captura de pescado quando comparadas com Portugal Continental (figura 1.2) (INE, I.P., 2017).

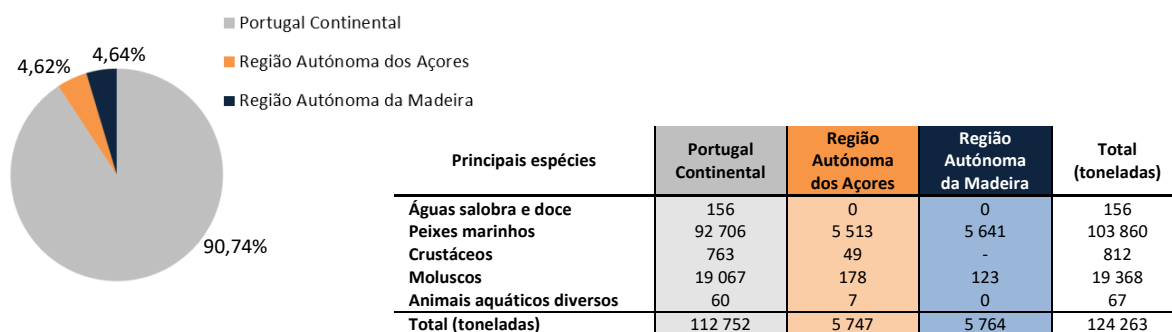


Figura 1.2 – Capturas (toneladas) segundo os principais tipos de espécies em 2016 (Fonte: adaptado de INE, I. P., 2017).

Portugal é o país da União Europeia com o consumo *per capita* de pescado mais elevado, tendo-se registado um valor de 55,9 kg/ano em 2015 (figura 1.3) (EUMOFA, 2017). Este valor coloca-o em 3º lugar a nível mundial, depois do Japão e da Islândia (Almeida, 2014; Marques, 2015). Comparando este valor com o da produção nacional que se encontra na ordem dos 23 kg/ano, claramente a produção nacional é insuficiente para cobrir as necessidades de consumo, resultando num saldo altamente deficitário na balança comercial de pescado, através da importação de produtos da pesca de outros países, principalmente Espanha e Países Nórdicos Europeus (Lopes, 2009; Ferraz de Arruda et al., 2011; PROMAR, 2015).

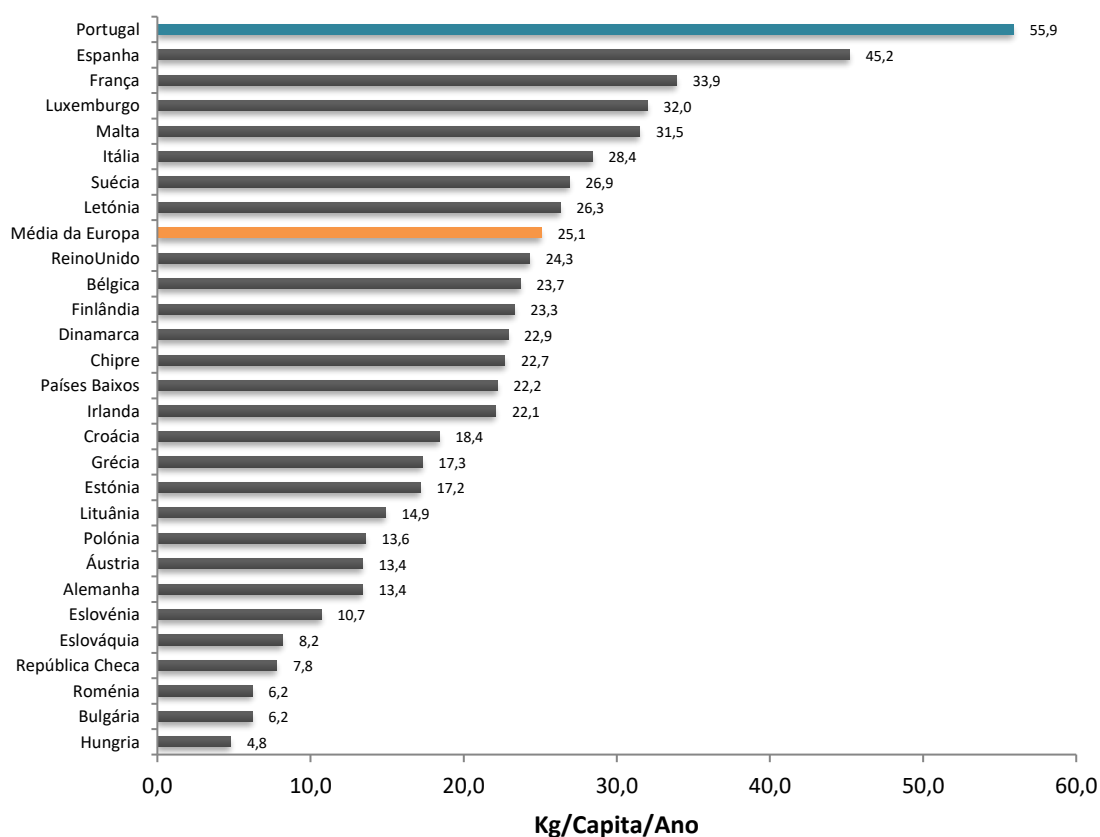


Figura 1.3 - Consumo *per capita* de pescado (Kg/Capita/Ano) por Estado-Membro em 2015 (equivalente a peso fresco) (Fonte: adaptado de EUMOFA, 2017).

Nos últimos anos, a pesca em Portugal tem vindo a perder importância em virtude das políticas europeias de sustentabilidade dos recursos e modernização da frota que levaram a uma redução do número de embarcações e pescadores (Machado, 2011). Em 2017 registou-se o menor volume de capturas de pescado de sempre, com cerca de 118.365 toneladas provenientes da pesca de peixes marinhos (INE, I.P., 2018) (figura 1.4).

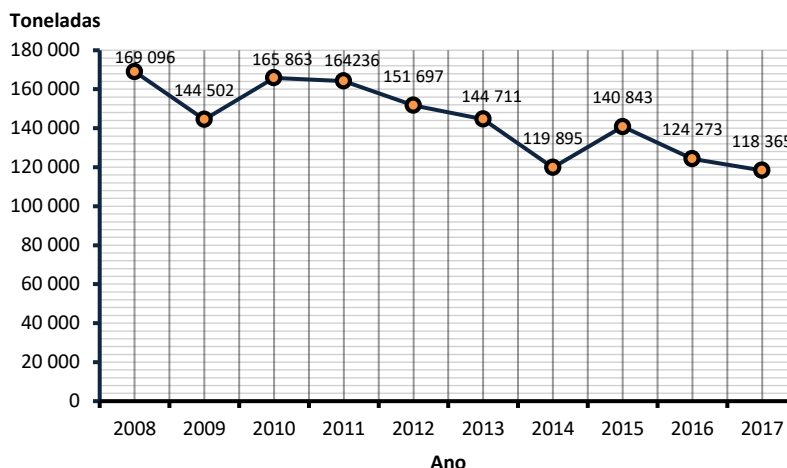


Figura 1.4 – Capturas de pescado em Portugal entre 2008 e 2017 (em toneladas) (Fonte: adaptado de INE, I. P., 2018).

De modo a colmatar a redução no volume de capturas de pescado, a aquicultura tem vindo a ser promovida em Portugal, contudo a sua produção não tem acompanhado as necessidades do país, pois representa, ainda, um papel reduzido na produção nacional de pescado (cerca de 2%) (figura 1.5) (DGPA, 2007; Machado, 2011).

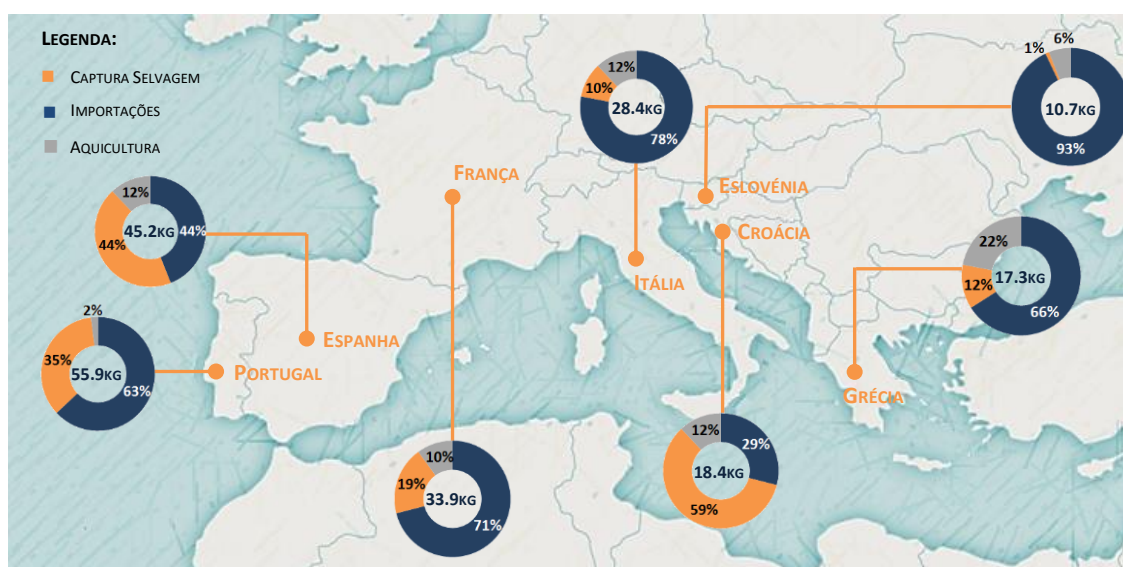


Figura 1.5 – Informações relativas ao consumo *per capita*, capturas, importações e produção em aquicultura de Portugal, Espanha, França, Itália, Eslovénia, Croácia e Grécia (Fonte: adaptado de EUMOFA, 2017; WWF, 2017).

As principais espécies de pescado capturado em território português são a cavala (*Scomber colias*), o carapau (*Trachurus trachurus*) e a sardinha (*Sardina pilchardus*) (figura 1.6). Os atuns aparecem apenas em 7º lugar a nível de capturas.

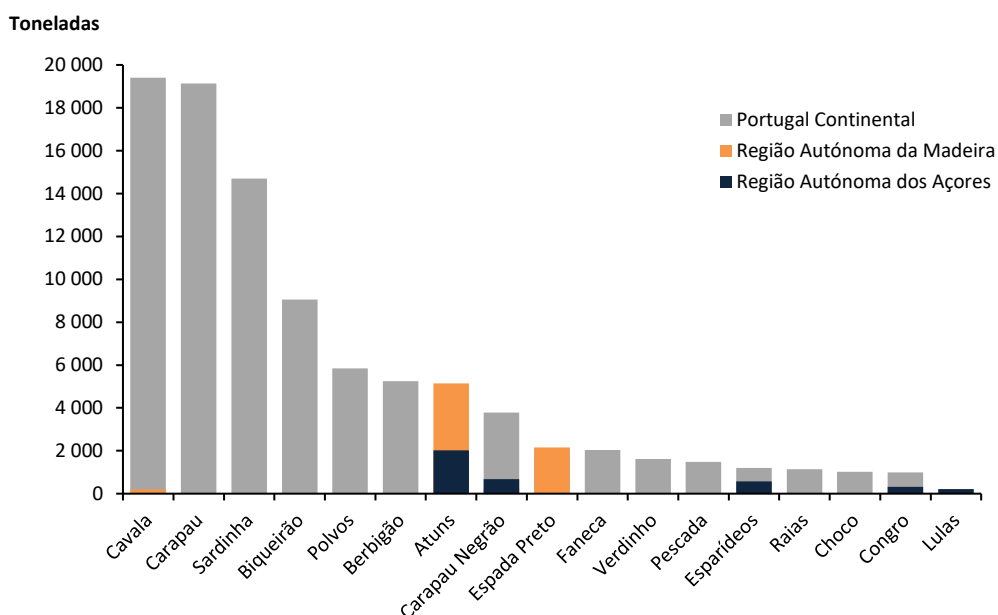


Figura 1.6 – Principais espécies de pescado capturado em Portugal em 2017 (Fonte: DGRM, 2017).

No entanto, quando se integram os dados das importações constata-se que as espécies mais consumidas em Portugal são a sardinha (*Sardina pilchardus*), robalo (*Dicentrarchus labrax*), peixe-espada preto (*Aphanopus carbo*), polvo (*Octopus vulgaris*), bacalhau (*Gadus morhua*), atum (*Thunnus* spp.), pescada (*Merluccius merluccius*), cavala (*Scomber colias*), carapau (*Trachurus trachurus*), choco (*Sepia officinalis*), dourada (*Sparus aurata*), entre outros peixes pelágicos (LPN, 2010). Relativamente aos crustáceos, as principais espécies consumidas são sapateira (*Cancer paguros*), santola (*Maja squinado*) e navalheira (*Necora puber*) (Ciência Viva, 2014).

1.2. Benefícios e riscos associados ao consumo de pescado

O pescado (incluindo peixe, crustáceos e moluscos) é considerado um alimento essencial para o consumo humano, sendo reconhecido e distinguido pelo seu alto valor nutricional (Marques, 2015). Em resposta à necessidade da implementação de uma vida saudável, o consumo de carne tem vindo a ser preterido pelo peixe e seus derivados por um crescente número de pessoas (Lopes, 2009).

O pescado apresenta um baixo teor de colesterol e elevado teor de nutrientes essenciais, nomeadamente proteínas de elevado valor biológico, ácidos gordos essenciais do tipo ómega-3, minerais e vitaminas, cujos benefícios têm vindo a ser demonstrados para a saúde dos consumidores (Matos, 2014). Contudo, o consumo de pescado pode, igualmente, incluir alguns perigos para o consumidor, pois podem acumular-se no pescado contaminantes biológicos e/ou químicos que resultam em intoxicações alimentares ou em enfermidades a longo prazo (Lopes, 2009). Desta forma, é importante identificar os potenciais benefícios e riscos associados ao consumo de pescado.

1.2.1. Benefícios do consumo de pescado

O pescado desempenha um papel importante na alimentação humana uma vez que representa, em diversas regiões do mundo, a principal fonte de proteínas de origem animal (Lopes, 2009).

Segundo a Sociedade Europeia de Cardiologia (Piepoli et al., 2016) é aconselhável consumir pelo menos duas refeições semanais de pescado de modo a promover o bom funcionamento do organismo e prevenir algumas patologias, sobretudo do foro cardiovascular e oncológico (Lichtenstein et al., 2006; Afonso, 2009; Sharma & Katz, 2013). Vários estudos epidemiológicos têm evidenciado que o consumo de pescado diminui o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, cancro, osteoporose, doenças auto-imunes e doenças inflamatórias (Machado, 2011; Nunes et al., 2011; Sharma & Katz, 2013). Para além disso, devido à diversidade de espécies, quer em tamanho, forma e composição, o pescado possibilita uma grande variedade de confeções para um consumo saudável.

Os géneros alimentícios que constituem o grupo de pescado são, na sua generalidade, alimentos altamente nutritivos, saborosos e de fácil digestão, variando a sua composição bioquímica de espécie para espécie, e, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, dependendo do grau de maturação sexual, idade, sazonalidade, origem geográfica, temperatura, salinidade, tipo de alimentação e padrões de migração (Murray & Burt, 1969; Huss, 1995; Lopes, 2009; Dias, 2012; Marques, 2015). Os principais constituintes do pescado são sobretudo a água (50-85%), proteínas (12-24%) e lípidos (0,1-22%), representando cerca de 98% do total da fração edível. Os restantes 2% são constituídos por compostos minoritários nomeadamente sais minerais (0,8-2%), hidratos de carbono e vitaminas. A quantidade de hidratos de carbono no pescado é geralmente inferior a 0,5%, embora nos moluscos possa exceder os 5% (Nunes et al., 2011; Marques, 2015).

1.2.1.1. Proteínas

As proteínas são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do corpo humano, manutenção e reparação dos tecidos, assim como para a produção de enzimas e hormonas necessárias ao bom funcionamento do organismo (Nunes et al., 2011; Ribeiro, 2011). A sua carência está associada a efeitos adversos ao nível da função cerebral, renal, mucosa intestinal e sua permeabilidade, podendo provocar também alterações no sistema imunitário e na diminuição do crescimento (Afonso, 2009).

O teor de proteínas é a componente mais estável do peixe, não se verificando uma grande variação dentro da mesma espécie e/ou ao longo do ano. A maioria das espécies apresenta no seu músculo um teor proteico de cerca de 17-20% (Belitz et al., 2009; Marques, 2015).

As proteínas do músculo dos produtos da pesca podem organizar-se em três grupos de acordo com as suas características físico-químicas: (i) as proteínas miofibrilares (por exemplo, actina, miosina, actomiosina e tropomiosina) que fazem parte do sistema contráctil ou estrutural do músculo, constituindo cerca de 70 a 80% do total das proteínas; (ii) proteínas sarcoplasmáticas (por exemplo, a mioglobina, a mioalbumina e enzimas) que representam cerca de 20 a 30% do teor proteico presente no músculo; e (iii) proteínas do tecido conjuntivo (por exemplo, colagénio e elastina) que são

extracelulares e representam cerca de 3% do total de proteínas nos peixes ósseos e 10% nos peixes cartilagueos (Belitz et al., 2009; FiB, 2009; Soares & Gonçalves, 2012; Marques, 2015).

A qualidade de uma fonte proteica é determinada essencialmente por fatores como a digestibilidade e a sua equilibrada composição em aminoácidos essenciais (Marques, 2015). Assim, as proteínas encontradas no pescado são consideradas proteínas de elevado valor nutricional, uma vez que possuem na sua composição todos os aminoácidos essenciais e beneficiam de uma elevada digestibilidade essencialmente por apresentarem uma baixa percentagem de tecido conjuntivo (Ribeiro, 2011; Sartori & Amancio, 2012; Soares & Gonçalves, 2012).

1.2.1.2. Lípidos

A designação lípidos engloba todos os constituintes de matéria gorda que, por sua vez, formam um grupo de compostos de natureza química muito variável (Maulvault, 2009).

Os lípidos desempenham várias funções biológicas importantes para os seres vivos, nomeadamente o armazenamento e transporte de energia, formação de membranas celulares e manutenção da sua integridade estrutural, síntese de eicosanóides tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (importantes na regulação de processos fisiológicos e no controlo de diversos sistemas do organismo, especialmente na inflamação, imunidade e como mensageiros do sistema nervoso central), e transporte de vitaminas lipossolúveis (FiB, 2009; Nunes et al., 2011). Para além das funções enumeradas, também contribuem para as características sensoriais do pescado, sobretudo textura e paladar, fornecendo também compostos essenciais como é o caso dos ácidos gordos polinsaturados do tipo n-3 (Kolakowska & Sikorski, 2003; Afonso, 2009; FiB, 2009).

O teor de lípidos no peixe pode variar muito (entre 0,1% e 45%), uma vez que é influenciado por diversos fatores como a espécie, estado de maturação, sazonalidade, sexo, alimentação, profundidade, temperatura e salinidade (Moradi et al., 2011; Nunes et al., 2011; Marques, 2015).

O pescado é geralmente classificado em três categorias, consoante o teor de gordura no seu tecido muscular: magro (< 0,1 - 0,4% de lípidos), gordo (> 16% de lípidos) e semi-gordo (0,4 - 16% de lípidos) (Belitz et al., 2009; Maulvault, 2009).

No pescado, o armazenamento dos lípidos varia de espécie para espécie, embora a sua deposição ocorra principalmente no músculo, fígado e cavidade abdominal a envolver as vísceras (Moradi et al., 2011). As espécies magras tendem a acumular uma maior fração das suas reservas lipídicas no fígado, ao passo que as espécies gordas acumulam preferencialmente no tecido muscular, influenciando assim as qualidades organoléticas do pescado (Huss, 1995; Afonso, 2009).

A cor do músculo também é relevante uma vez que o músculo escuro contém mais lípidos do que o claro (Afonso, 2009). Esta diferença está relacionada com a adaptação biológica das espécies uma vez que as espécies que apresentam um tecido muscular escuro efetuam grandes deslocações e movimentos constantes, precisando de um maior consumo energético, tendo por isso níveis mais

elevados de mioglobina (responsável pela coloração mais escura) e um maior teor lipídico (Huss, 1995; Afonso, 2009).

Os lípidos presentes no pescado são compostos principalmente por fosfolípidos, triglicéridos e esteróis, mas mais importante do que o teor lipídico dos produtos da pesca é a forma como estes são encontrados (por exemplo ácidos gordos e colesterol) e a existência de produtos provenientes da oxidação lipídica (por exemplo peróxidos e malonaldeído) (FiB, 2009; Moradi et al., 2011). O pescado apresenta ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) com perfil variável e com diferentes proporções consoante a espécie (Nunes et al., 2011; Núñez et al., 2018). No entanto, por norma, o peixe possui um baixo teor de ácidos gordos saturados comparativamente com o dos insaturados, o que é benéfico do ponto de vista fisiológico e nutricional. Estudos epidemiológicos e investigações clínicas têm vindo a provar que os PUFA, particularmente os ácidos gordos de cadeia longa n-3 (ómega-3), tais como o ácido gordo eicosapentaenóico (EPA, 20:5-n3) e o docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), são essenciais para a saúde do consumidor pois previnem a ocorrência de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes, diminuem o nível de colesterol no sangue, promovem o desenvolvimento de funções cerebrais e do sistema nervoso, e contribuem para o tratamento da artrite reumatoide, psoríase, colite ulcerativa e algumas perturbações do sistema imunitário (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Lopes, 2009; Hosomi et al., 2012; Soares & Gonçalves, 2012; Almeida, 2014; Marques, 2015; Núñez et al., 2018). Para além disso, parecem também ajudar na prevenção de algumas formas de cancro como por exemplo cancro da mama (Fabian et al., 2015), da próstata (Küllenberg de Gaudry & Massing, 2014) e do colo-rectal (Lee et al., 2017).

Não existe um valor limite de ingestão de EPA e DHA, contudo, estudos científicos realizados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar concluíram que a suplementação de EPA e DHA em doses até 5 g/dia não apresentam preocupações de segurança em adultos (EFSA, 2012c). Existem, porém, recomendações dietéticas baseadas em considerações de risco cardiovascular em adultos europeus para a ingestão de 250-500 mg/dia de EPA e DHA (EFSA, 2012c).

O peixe é a fonte mais importante de ácidos gordos ómega-3 para o ser humano uma vez que estes não podem ser sintetizados pelo próprio organismo e são indispensáveis para o normal funcionamento e crescimento de todos os tecidos (Lopes, 2009; Soares & Gonçalves, 2012).

1.2.1.3. Colesterol

O colesterol é uma substância lipídica indispensável na preservação das membranas celulares e produção de hormonas, vitamina D e ácidos biliares que facilitam a digestão das gorduras (Maulvault, 2009). Trata-se de um esteroide que está presente no pescado em níveis reduzidos, podendo o seu teor depender de vários fatores como o local de captura, sexo e estação do ano (Ribeiro, 2011; Marques, 2015).

Como o colesterol não se dissolve no sangue, o seu transporte é mediado por lipoproteínas que podem ser de baixa densidade (LDL), conhecidas como “colesterol mau” ou de elevada densidade

(HDL), também conhecidas como “colesterol bom” (Maulvault, 2009). Quando em excesso, as LDL podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares uma vez que o colesterol tende a acumular-se nas paredes das artérias que irrigam o coração e o cérebro, tornando-as estreitas e inflexíveis (Maulvault, 2009). Por outro lado, as HDL protegem as artérias pois facilitam a eliminação das LDL na circulação sanguínea (Maulvault, 2009).

Estudos científicos mostraram que o consumo de pescado leva ao aumento do tamanho das partículas de HDL, o que é benéfico pois estas lipoproteínas eliminam o colesterol das artérias, diminuindo assim o risco de doenças cardiovasculares (Erkkilä et al., 2014).

1.2.1.4. Vitaminas

Os teores de vitaminas no pescado variam não só entre espécies, como também entre indivíduos da mesma espécie, estando esta variação dependente da época do ano e do local de captura (Ribeiro, 2011; Marques, 2015). Os produtos da pesca geralmente não são uma fonte predominante de vitaminas, embora os níveis de vitamina do complexo B, nomeadamente a tiamina (B1), a riboflavina (B2), a piridoxina (B6) e a cianocobalamina (B12) sejam comparáveis aos de outros alimentos com alto teor proteico (Lopes, 2009; Nunes et al., 2011). Para além destas vitaminas, algumas espécies com maior teor lipídico, como é o caso do salmão, sardinha, linguado e robalo, fornecem também quantidades interessantes de vitaminas A, D e E (Belitz et al., 2009; Lopes, 2009; Ribeiro, 2011; Marques, 2015). As vitaminas apresentam diversas funções no organismo, principalmente no desenvolvimento e manutenção de vários tecidos/órgãos, dos quais são exemplo, entre outros, os olhos, os pulmões, a pele e os ossos. As vitaminas A e E são poderosos antioxidantes, pelo que previnem doenças cardíacas e certos tipos de cancro, como por exemplo o cancro da mama, próstata, bexiga, pele, colo-rectal, ovários, entre outros (Santos & Cruz, 2001; Doldo et al., 2015).

1.2.1.5. Minerais

Os minerais podem ser classificados como essenciais ou não essenciais. Estes elementos existem naturalmente no meio aquático, podendo ser bioacumulados pelo pescado (Celik et al., 2004; Cabañero et al., 2004).

Os minerais essenciais desempenham funções vitais no organismo, mesmo quando se encontram em pequenas concentrações, ao passo que os minerais não essenciais podem tornar-se tóxicos, mesmo em concentrações reduzidas (Celik et al., 2004; Afonso, 2009).

O teor de minerais na maioria do pescado situa-se entre 0,8 e 2,0 %, podendo variar de acordo com diferentes fatores intrínsecos (por exemplo a espécie, idade, sexo e maturidade sexual) ou extrínsecos (por exemplo a sazonalidade, área geográfica, temperatura, disponibilidade do elemento e salinidade) (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Ribeiro, 2011).

Em geral, considera-se que o pescado é uma excelente fonte de fósforo, potássio, iodo e selénio (Marques, 2015). Estes dois últimos minerais essenciais são relativamente abundantes no pescado,

comparativamente com outras fontes de alimento e desempenham um papel vital em diversos processos fisiológicos do organismo (Marques, 2015). Para além destes, o cálcio, o ferro e o magnésio também são encontrados no pescado, embora em quantidades mais reduzidas (Ribeiro, 2011) (tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Teores de minerais (mg/100 g) das principais espécies de pescado consumidas em Portugal (Bandarra et al., 2018).

Espécie (crua)	Minerais (mg/100 g)									
	Ca	P	Mg	Fe	Na	K	Mn	Cu	Zn	Cl
Atum (<i>Thunnus</i> spp.)	3,5	257	37	2,2	45	355	<0,02	0,20	1,5	73
Bacalhau (<i>Gadus morhua</i>)	33	116	23	0,2	1483	36	<0,02	<0,03	0,8	1990
Carapau (<i>Trachurus trachurus</i>)	69	263	33	1,2	80	403	<0,02	0,08	1,2	131
Cavala (<i>Scomber colias</i>)	39	282	37	1,1	78	360	0,02	0,17	2,2	85
Choco (<i>Sepia officinalis</i>)	8,1	273	49	0,1	200	320	<0,02	0,26	1,7	330
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	15	252	28	0,4	59	383	<0,02	<0,03	0,8	76
Peixe-espada preto (<i>Aphanopus carbo</i>)	14	181	29	0,1	138	332	<0,02	<0,03	0,5	176
Pescada (<i>Merluccius merluccius</i>)	15	219	26	0,5	69	408	<0,02	<0,03	0,7	85
Polvo (<i>Octopus vulgaris</i>)	13	165	43	0,7	259	236	<0,02	0,21	1,3	438
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	52	234	38	0,4	95	346	0,02	0,10	1,2	150
Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	70	296	29	1,7	65	404	<0,02	<0,03	1,7	152

Legenda: Ca – Cálcio; P – Fósforo; Mg – Magnésio; Fe – Ferro; Na – Sódio; K – Potássio; Mn – Manganês; Cu – Cobre; Zn – Zinco; Cl - Cloro.

1.2.2. Riscos do consumo de pescado

O meio aquático representa uma importante fonte de alimento para a população. Contudo, nem sempre este recurso foi explorado de forma equilibrada e sustentável (Lopes, 2009). O elevado crescimento populacional, a necessidade de se obterem maiores quantidades de pescado, o grande desenvolvimento tecnológico das últimas décadas e a implantação de indústrias poluentes junto às zonas costeiras e águas interiores, tem provocado profundas alterações nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para a contaminação de espécies, que pode resultar num problema de saúde pública (Hajeb et al., 2014; Marques, 2015; Silva, 2016).

O cuidado com a saúde e o bem-estar é uma preocupação crescente para a maior parte dos países, pelo que têm sido estabelecidos limites máximos permitidos para a presença de diversos contaminantes nos alimentos (denominados de contaminantes regulamentados), bem como recomendações de ingestão máxima toleráveis no sentido de se salvaguardar a saúde pública (CE, 2006; EFSA, 2011; EFSA, 2012b).

De facto, apesar de todos os benefícios nutricionais decorrentes do consumo de pescado, este pode igualmente conduzir a riscos para o consumidor por representar uma via de exposição a contaminantes ambientais (Saraiva, 2014; Lima et al., 2015; Al-Saleh et al., 2017; Nunez et al., 2018). Salienta-se que os contaminantes podem dividir-se em: a) biotoxinas de origem natural que se acumulam nos tecidos do pescado (Fleming et al., 2006; Soares & Gonçalves, 2012); b) contaminantes biológicos que provêm da contaminação das águas ou de um incorreto manuseamento e/ou

conservação do pescado; e c) contaminantes químicos que podem estar presentes na água de forma natural ou como resultado da atividade antropogénica (Lopes, 2009; Custódio, 2014; Marques, 2015). Muitos contaminantes emergentes ainda não estão regulados, não existindo ainda limites estabelecidos devido à escassa informação existente sobre esses contaminantes e os seus efeitos na saúde pública, como é o caso dos desreguladores endócrinos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, toxinas de microalgas nocivas, lixo marinho, entre outros (Reuver et al., 2017).

Relativamente aos contaminantes químicos regulamentados com potencial tóxico, estes podem ser classificados em:

- Compostos inorgânicos: como é o caso dos elementos tóxicos (ex. mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e chumbo (Pb)) (Huss, 1994; Nunes et al., 2011);

- Compostos orgânicos: como bifenilpoliclorados (PCB), dioxinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e p-dicloro-difeniltricloroetano (DDT) (Huss, 1994; Nunes et al., 2011).

A quantidade de um determinado contaminante presente no pescado depende da espécie, da dimensão, da origem geográfica, da idade, do padrão alimentar e da altura do ano (Matos, 2014).

De um modo geral, os contaminantes persistentes concentram-se nos tecidos do pescado por processos de bioacumulação e/ou bioamplificação (figura 1.7) (Nunez et al., 2018). A bioacumulação ou bioconcentração corresponde à fração do contaminante que é absorvido a partir do ambiente pelos organismos nos diferentes níveis tróficos. A bioamplificação ocorre quando se verifica a transferência de contaminantes entre níveis tróficos como resultado da predação, levando a que os teores de contaminante nos níveis tróficos superiores sejam progressivamente mais concentrados e, desta forma, amplificando as taxas de bioacumulação no topo da cadeia trófica (Silva, 2016). Isto significa que, quanto mais elevada for a posição do organismo na cadeia trófica, maior será a concentração do contaminante persistente encontrado nos tecidos alvos. Por outro lado, os indivíduos mais velhos apresentam geralmente maiores dimensões, necessitando de uma dieta baseada em presas de maiores dimensões, acabando assim por acumular maiores teores de contaminantes persistentes (Lopes, 2009; Silva, 2016).

A bioacumulação dos contaminantes no pescado é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, como por exemplo, o habitat da espécie, forma química em que os contaminantes se encontram, temperatura, pH, teor de oxigénio dissolvido, espécie, idade, sexo, massa corporal e condições fisiológicas (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Lopes, 2009; Zhelyazkov et al., 2018).

Atualmente, o consumo de pescado representa uma das principais fontes de exposição alimentar em relação a determinados contaminantes, pelo que a ingestão de grandes quantidades de espécies específicas de pescado pode representar um risco para o ser humano (Nunes et al., 2011; Matos, 2014; Al-Saleh et al., 2017).

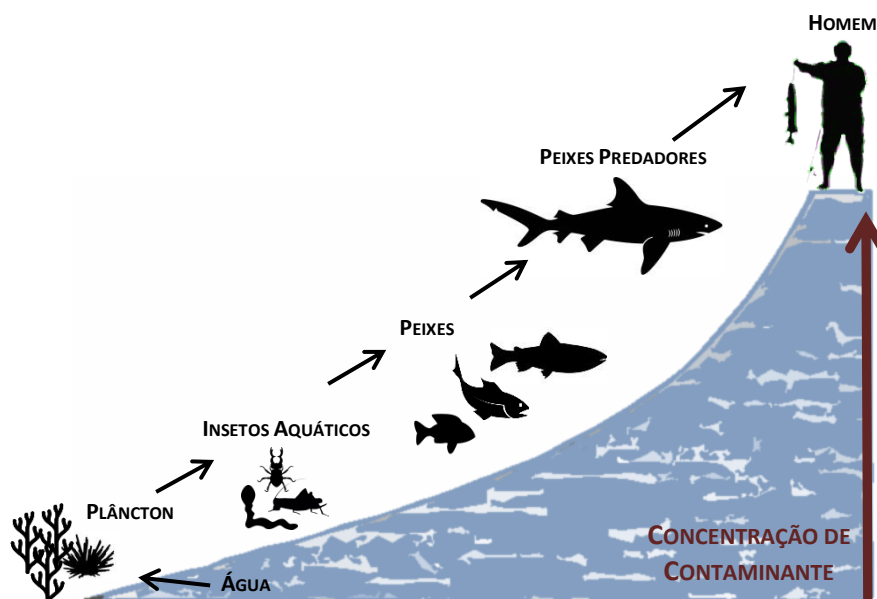


Figura 1.7 - Modelo ilustrativo do processo de bioamplificação dos contaminantes (Fonte: adaptado de Matos, 2014).

1.2.2.1. Elementos tóxicos

Uma importante classe de contaminantes associada ao consumo de pescado são os elementos tóxicos (Zhelyazkov et al., 2018). Os elementos tóxicos diferem de outras substâncias tóxicas por não serem criados nem destruídos pelo ser humano (Silva, 2016; Al-Saleh et al., 2017). Na sua generalidade, estes elementos são constituintes naturais da crosta terrestre e encontram-se amplamente dispersos na natureza (Lopes, 2009; Oliveira e Sá, 2013). Os mesmos podem ser distinguidos em duas classes: (i) os elementos essenciais que, mesmo em quantidades vestigiais são importantes para o normal funcionamento de determinadas vias metabólicas, apresentando grande relevância em processos fisiológicos e patológicos (ex. zinco, magnésio, selênio e cobre); e (ii) os elementos não essenciais que não possuem quaisquer efeitos funcionais conhecidos no organismo, sendo altamente tóxicos a concentrações reduzidas (ex. arsênio, mercúrio, cádmio e chumbo) (Nunes et al., 2011; Oliveira, 2012; Oliveira e Sá, 2013; Silva, 2016).

Os riscos de toxicidade associados aos elementos tóxicos podem ser imediatos ou de médio a longo prazo, dependendo da dose e da duração da exposição ao respetivo contaminante (Marques, 2015; Al-Saleh et al., 2017). A idade do consumidor é também um fator importante a ter em consideração na toxicidade dos elementos tóxicos, uma vez que os idosos e as crianças, são os grupos mais vulneráveis a intoxicações por estes elementos. No caso das crianças por apresentarem uma maior absorção gastrointestinal e maior permeabilidade da pele e, conseqüentemente, ingerirem mais contaminante por unidade de peso corporal que um adulto (Marques, 2015; Al-Saleh et al., 2017). No caso dos idosos, devido à longa permanência dos contaminantes no organismo, da lenta renovação celular e da deterioração dos parâmetros fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e homeostáticos, a capacidade de defesa contra os elementos tóxicos é bastante afetada (Hong, 2013).

A interação e toxicidade de um elemento no organismo humano pode ser dividida em três fases (figura 1.8):

1. Fase de Absorção: A absorção ocorre quando o agente tóxico passa do meio externo para o meio interno, ou seja, quando é introduzido no organismo e entra na corrente sanguínea. A absorção do elemento tóxico depende das características do agente químico e da membrana celular, sendo diferente consoante a via de exposição, visto que a absorção gastrointestinal é diferente da absorção pulmonar e da absorção dérmica (Oliveira e Sá, 2013; Ruppenthal, 2013);
2. Fase de Transporte ou Distribuição: Nesta fase o elemento é transportado para o resto do organismo, geralmente através da corrente sanguínea, podendo deslocar-se para diversos tecidos e órgãos onde provoca os seus efeitos tóxicos. Durante este processo, o agente tóxico pode ser biotransformado, eliminado ou armazenado (Oliveira e Sá, 2013). Os fatores que influenciam o transporte e a acumulação dos elementos tóxicos são a irrigação do órgão, o seu conteúdo aquoso ou lipídico e a integridade do órgão. Normalmente os elementos tóxicos são transportados ligados a macromoléculas (proteínas, enzimas e polipéptidos), formando complexos (Oliveira e Sá, 2013). Contudo, o efeito tóxico deve-se essencialmente à interação com os grupos sulfídrico (-SH) dos sistemas enzimáticos, provocando diversas alterações bioquímicas, que por sua vez, desencadeiam sintomas clínicos localizados ou sistémicos (Oliveira e Sá, 2013; Ruppenthal, 2013; Silva, 2016);
3. Fase de Excreção: Os elementos tóxicos que não são acumulados no organismo são, posteriormente, excretados essencialmente por via renal e fecal, podendo também ser excretados através das unhas, cabelo, suor e outras secreções (Oliveira e Sá, 2013; Ruppenthal, 2013).

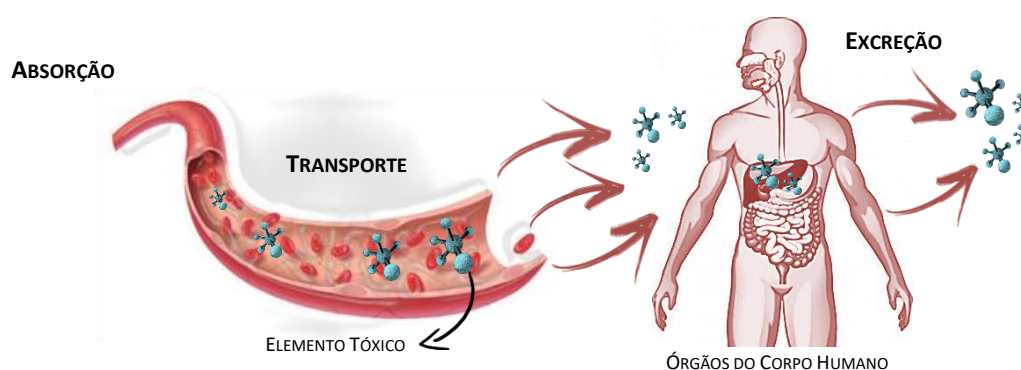


Figura 1.8 – Modelo ilustrativo das fases de toxicocinética dos elementos tóxicos: absorção, transporte e excreção.

Os elementos tóxicos são geralmente muito persistentes no meio ambiente e, embora a sua presença no meio aquático possa ter origem geológica natural (através de atividades naturais como o vulcanismo ou a erosão das rochas), resultam principalmente de ações antropogénicas (designadamente através de efluentes industriais e urbanos, agricultura, mineração e processos metalúrgicos, entre outros) (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Lima et al., 2015; Al-Saleh et

al., 2017; Nunez et al., 2018). Uma vez dispersos no meio ambiente, os elementos tóxicos são distribuídos naturalmente pelos diversos compartimentos ambientais. As chuvas ácidas aumentam a mobilização natural destes elementos para os cursos de água doce e oceanos, contribuindo assim para um aumento destes contaminantes nos meios hídricos (Lopes, 2009).

Em 2016, o pescado constituiu o grupo de alimentos com maior número de notificações de alerta emitidas pelo Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (sistema RASFF), tendo os elementos tóxicos sido dos principais perigos reportados (RASFF, 2017; Pięłowski, 2018). Dos diversos elementos tóxicos dispersos no meio aquático, o mercúrio e o cádmio apresentam maiores riscos para a saúde pública, sendo por isso objeto de regulamentação específica (Petroczi & Naughton, 2009; Marques, 2015).

1.2.2.1.1. Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um contaminante químico inorgânico que existe naturalmente no meio ambiente. Este pode ter origem natural (atividade vulcânica ou erosão de depósitos minerais das rochas e dos solos) ou antropogénica (extração de minérios e tintas, queima de combustíveis fósseis, estações industriais, eliminação de resíduos, agricultura aquando o uso de pesticidas e fungicidas, entre outros), sendo esta última a principal fonte de emissão de mercúrio que contribui para a contaminação dos solos e das águas (Bernhoft, 2012; Matos, 2014; Silva, 2016).

O mercúrio e os seus derivados têm sido utilizados para fins industriais, medicinais e cosméticos, nomeadamente na produção de cloro, instrumentos de medição e controlo (por exemplo, termómetros), lâmpadas fluorescentes, interruptores e material dentário (Machado, 2011). Contudo, este metal tem sido reconhecido como um elemento extremamente tóxico para os seres vivos (Marques, 2015). Este facto deve-se à possibilidade de inativação de enzimas, contendo grupos coordenantes com grande afinidade para iões deste elemento (especialmente grupos sulfidrilo) e também devido a efeitos sobre a permeabilidade de membranas celulares (Afonso, 2009).

Na base da especiação química do Hg podemos encontrar este elemento sob três formas, cada uma com as suas características toxicológicas e efeitos na saúde: (i) mercúrio como composto elementar (Hg^0); (ii) mercúrio nas suas formas inorgânicas (também designados de sais de mercúrio); e (iii) mercúrio nas suas formas orgânicas (Bernhoft, 2012; Marques, 2015).

Os sais de mercúrio orgânico e inorgânico são mais tóxicos do que o mercúrio elementar (Afonso, 2009). Dentro do mercúrio inorgânico, o ião mercúrico (Hg^{2+}) é mais tóxico do que o ião mercurioso (Hg^+), uma vez que os seus sais são mais solúveis (Afonso, 2009). Relativamente aos compostos orgânicos, o mercúrio pode apresentar-se sob a forma de metilmercúrio (MeHg), dimetilmercúrio e etilmercúrio, sendo que o metilmercúrio é o composto mais lipossolúvel e com maior toxicidade (Marques, 2015).

O mercúrio elementar (Hg^0) existe no estado líquido à temperatura ambiente e é pouco absorvido por via gastrointestinal, apresentando um risco mínimo para a saúde, quando a exposição ocorre por esta via (Matos, 2014). Contudo, como é altamente volátil, pode ser facilmente absorvido pelo pulmão,

podendo originar casos de intoxicação, geralmente devido a exposições ocupacionais (Matos, 2014; Silva, 2016). Cerca de 80% do mercúrio libertado para a atmosfera está sob a forma de mercúrio elementar, enquanto 15% é libertado para o solo a partir de fertilizantes, fungicidas e resíduos sólidos urbanos e os restantes 5% são libertados a partir de efluentes industriais para a água (Holmes et al., 2009; Matos, 2014).

Uma vez libertado o Hg no ambiente, inicia-se o “ciclo do mercúrio” (figura 1.9), em que as diferentes formas de Hg são sujeitas a transformações físicas e químicas complexas que envolvem reações de redução e oxidação, bem como reações de metilação e desmetilação por parte de microrganismos (Matos, 2014).

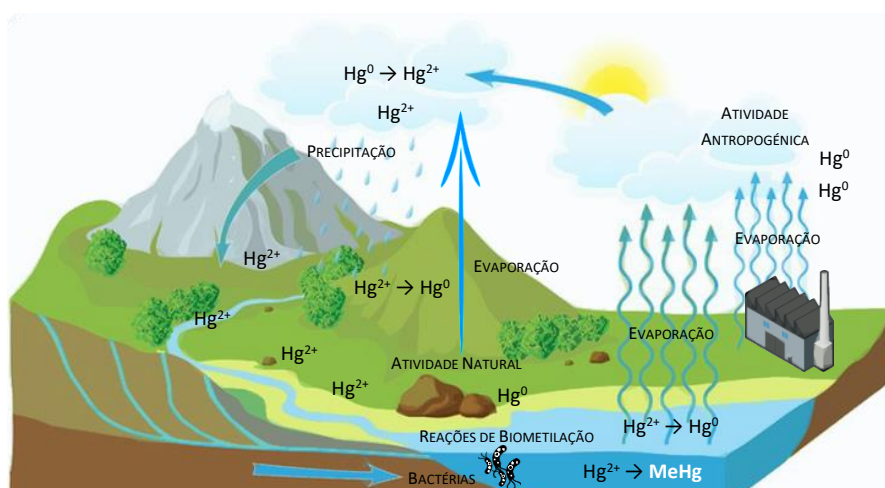


Figura 1.9 – Ciclo do mercúrio (Hg) (Fonte: adaptado de Selin, 2009).

No meio ambiente, o vapor de mercúrio (Hg^0) evapora a partir da superfície terrestre e, na atmosfera, pode ser convertido numa forma solúvel (Hg^{2+}), através de reações com oxidantes atmosféricos, como por exemplo o oxigênio, ozono e cloro, a qual é muito mais solúvel e regressa assim à superfície terrestre através da precipitação (Matos, 2014). No solo e na água, o mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) pode ser novamente convertido na forma elementar (Hg^0) e ser reemitido para a atmosfera, permanecendo no ambiente por longos períodos de tempo ou então pode ser alvo de transformações microbianas, isto é, reações de biometilação por bactérias, dando origem ao metilmercúrio ($MeHg$) (Matos, 2014). Os fatores mais importantes que influenciam a metilação biológica são a disponibilidade de substâncias inorgânicas de Hg, a natureza da comunidade microbiana, temperatura, pH, salinidade, teor de carbono orgânico e potencial redox (Machado, 2011).

Como o metilmercúrio é um composto lipofílico, é facilmente absorvido pelo sistema gastrointestinal do pescado (Oliveira, 2012; Marques, 2015), ocorrendo uma bioacumulação progressiva deste composto ao longo do ciclo de vida do organismo e ao longo da cadeia trófica (bioamplificação), podendo inclusive ser absorvido pelo Homem e desencadear reações toxicológicas graves (Holmes et al., 2009; Marques, 2015).

Quando ocorre a ingestão de mercúrio em quantidades elevadas os principais órgãos-alvo afetados são os sistemas neurológico, renal e hepático (Marques, 2015). Os maiores efeitos provocados pela exposição a níveis elevados de mercúrio, mais concretamente de metilmercúrio, são

efeitos neurotóxicos que em indivíduos adultos se manifestam por um entorpecimento dos membros, dificuldade em articular as palavras, perda de visão e audição, irritabilidade, graves lesões cerebrais, coma e morte (Holmes et al., 2009; Oliveira e Sá, 2013; Marques, 2015).

Quando se encontra em concentrações baixas, o mercúrio não representa um perigo toxicológico para os consumidores, mas a sua bioacumulação a longo prazo pode ser prejudicial, por ser eliminado muito lentamente no organismo humano e ter um tempo de semi-vida relativamente longo (aproximadamente 70 dias) (Bernhoft, 2012; Marques, 2015).

A toxicocinética do mercúrio (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) está altamente dependente da forma química a que a pessoa é exposta, da dose, da idade da pessoa, da duração da exposição, da via de exposição (por inalação, ingestão ou absorção cutânea) e dos padrões de consumo de pescado (Holmes et al., 2009; Machado, 2011).

O Hg^0 , quando ingerido, não é significativamente absorvido ou transformado pelo sistema digestivo do ser humano, sendo pouco tóxico para o organismo e quase totalmente excretado através das fezes (Holmes et al., 2009; Machado, 2011). O mesmo acontece quando esta forma de mercúrio entra em contacto direto com a pele, uma vez que causa sintomas leves tais como irritação da pele, dermatite ou erupções cutâneas (Machado, 2011). Quando absorvido, o Hg elementar é distribuído por todo o corpo, sendo capaz de atravessar as barreiras hemato-encefálica e placentária (Bernhoft, 2012; Silva, 2016), afetando principalmente o sistema nervoso (Holmes et al., 2009; Machado, 2011). A intoxicação por Hg^0 provoca tremores, irritabilidade, excitação, nervosismo, insónias, alterações neuromusculares (tais como fraqueza, atrofia muscular ou espasmos musculares), dores de cabeça, polineuropatia (tais como a parestesia, hiperatividade e condução nervosa), alterações de personalidade, visão turva, disartria, perda de memória e défices de desempenho da função cognitiva (Holmes et al., 2009; Machado, 2011; Oliveira e Sá, 2013).

Quanto ao Hg inorgânico (geralmente Hg^{2+}), a sua absorção ocorre maioritariamente com a inalação de aerossóis de cloreto de Hg, podendo também ser absorvido através da pele (Bernhoft, 2012). A absorção de Hg^{2+} é geralmente promovida com o aumento do pH intestinal, a dieta de leite (mais relevante nos recém-nascidos) e o aumento da atividade no trato gastrointestinal (Holmes et al., 2009; Machado, 2011). O mercúrio inorgânico tem uma capacidade limitada de entrar na corrente sanguínea, cérebro e barreiras placentárias, podendo ser excretado através do leite materno, saliva, suor, bÍlis e fezes (Holmes et al., 2009; Machado, 2011). O principal órgão de acumulação de Hg^{2+} é o rim, podendo resultar numa necrose tubular aguda ou em glomerulonefrite imunológica (Machado, 2011), danos no sistema digestivo e renal, arritmia e cardiomiopatia e, em caso de exposições dérmicas, pode provocar dermatites (Holmes et al., 2009; Machado, 2011; Oliveira e Sá, 2013).

Por fim, o Hg orgânico apresenta uma elevada toxicidade, sendo a sua forma mais conhecida o metilmercúrio (MeHg) que, após ingestão, é rapidamente absorvido ao longo do trato gastrointestinal, sendo a sua absorção feita quase na totalidade (cerca de 95%) (Holmes et al., 2009; Machado, 2011; Silva, 2016). A distribuição do MeHg é feita através da corrente sanguínea e uniformemente nos tecidos devido ao seu elevado potencial para atravessar membranas biológicas (Machado, 2011). A excreção do MeHg ocorre principalmente através das fezes, embora possa ocorrer através do cabelo, urina e

leite materno (Machado, 2011). Nos adultos, o principal sistema afetado pela intoxicação por MeHg é o sistema nervoso central, produzindo efeitos nefastos que incluem dificuldades de locomoção, fraqueza generalizada, redução dos sentidos (visão, audição, tacto, paladar e olfacto), tremores, perda de consciência e, em casos extremos, pode provocar a morte (Holmes et al., 2009). Em mulheres grávidas, uma vez na corrente sanguínea, o mercúrio pode atravessar facilmente a placenta para o feto em desenvolvimento que, por ser mais vulnerável aos efeitos neurotóxicos do mercúrio, pode estar sujeito a anomalias neurológicas das quais se destacam atrasos na locomoção e fala, bem como a redução de capacidades cognitivas (Holmes et al., 2009; Bernhoft, 2012; Machado, 2011).

1.2.2.1.2. Cádmio

O cádmio (Cd) é outro elemento tóxico com elevada toxicidade, pois bastam pequenas quantidades para revelar efeitos agudos e crônicos nos humanos (Saraiva, 2014).

Apesar dos minérios de Cd não serem abundantes, este encontra-se na natureza de forma generalizada, estando presente em quantidades mensuráveis em quase tudo o que comemos, bebemos e respiramos (Sinicropi et al., 2010). Apesar das principais fontes de Cd na atmosfera serem de origem natural (atividade vulcânica e erosão de rochas sedimentares e fosfatos marinhos), a principal proveniência deste elemento é antropogénica (utilização em fontes industriais, no fabrico de pilhas e baterias, vidro, fotografias, pigmentos para tintas e plásticos, esmaltes, produtos pirotécnicos, atividades agrícolas, através do uso de pesticidas fosfatados que contêm Cd e provocam a contaminação de diversos alimentos) (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Sinicropi et al., 2010; Oliveira, 2012; Ruppenthal, 2013).

O consumo de pescado pode representar uma importante via de exposição humana ao Cd. Contudo, as plantas apresentam um poder de absorção superior para o Cd, sendo um dos exemplos mais conhecidos a planta do tabaco, em que o fumo do tabaco constitui uma das principais fontes de exposição ao Cd (Goyer & Clarkson, 1996; Castro-González & Méndez-Armenta, 2008; Uwakwe & Ibiem, 2009).

O Cd pode ser absorvido por via respiratória (15 a 30 %) ou gastrointestinal (5 a 8 %), sendo que a absorção gastrointestinal pode aumentar com a carência de cálcio ou ferro ou em dietas baixas em proteína (Oliveira, 2012; Oliveira e Sá, 2013). O tempo de semi-vida do Cd é muito longo, superior a 10 anos, aumentando assim a probabilidade de ocorrência de efeitos cumulativos, mesmo em baixos níveis de ingestão (Goyer & Clarkson, 1996; Oliveira e Sá, 2013).

Uma vez absorvido, o Cd é transportado no sangue ligado maioritariamente a proteínas do plasma (em especial à albumina), sendo distribuído por todo o organismo, mas acumulando-se principalmente no fígado e rins, principais locais de armazenamento a longo prazo (Lopes, 2009; Sinicropi et al., 2010; Angeletti et al., 2014). Quando a exposição é reduzida e prolongada no tempo (situação que se verifica na exposição por ingestão), o Cd acumula-se maioritariamente nos rins. No entanto, quando a exposição é mais elevada, o nível de Cd aproxima-se nos rins e fígado (Lopes, 2009).

No fígado, o Cd promove a síntese de metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular e rica em cisteína, que funciona como ligante de elementos tóxicos (Goyer & Clarkson, 1996; Sinicropi et al., 2010). Ocorrido este mecanismo, o complexo cádmio-metalotioneína (Cd-MT) é libertado do fígado para o plasma e eliminado através da urina (Sinicropi et al., 2010). O complexo Cd-MT não eliminado pode ser filtrado pelos glomérulos, posteriormente absorvido nos túbulos renais e conseqüentemente clivado nos lisossomas, libertando assim o ião Cd^{2+} que, provoca uma nova síntese de metalotioneína (figura 1.10) (Goyer & Clarkson, 1996; Sinicropi et al., 2010). Por esta razão, pode detetar-se uma concentração apreciável de Cd na forma de complexo Cd-MT sem se verificarem danos (Afonso, 2009). Uma vez superada a capacidade de produção de metalotioneína, os níveis de Cd excedem a concentração crítica, podendo ocorrer o desenvolvimento de uma insuficiência renal e originar outras conseqüências que põem em perigo a saúde do indivíduo (Goyer & Clarkson, 1996; Oliveira e Sá, 2013).

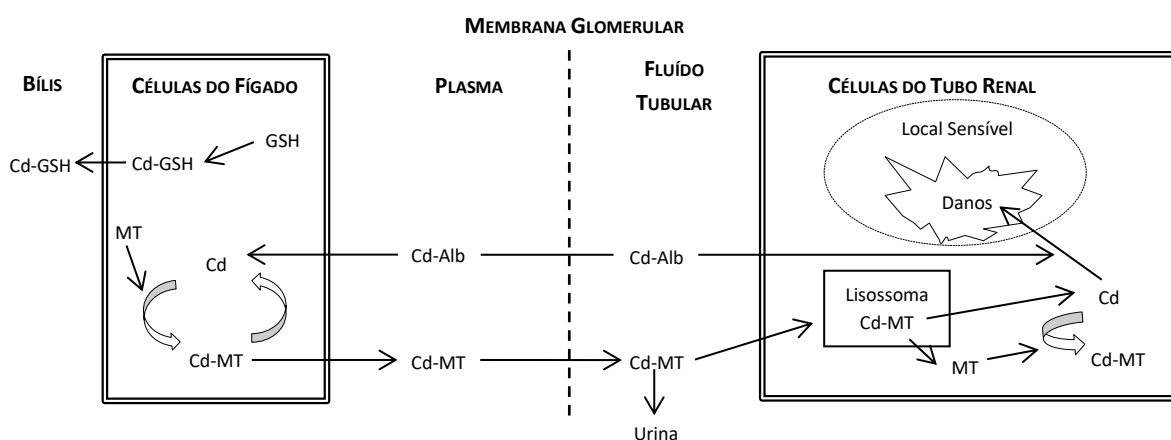


Figura 1.10 – Representação esquemática da deposição do cádmio no fígado e no rim (Fonte: adaptado de Sinicropi et al., 2010).

O Cd absorvido é excretado maioritariamente através da urina. Contudo, este processo é insuficiente e lento, o que explica o longo tempo de semi-vida do Cd no organismo, enquanto que o Cd não absorvido é eliminado por via fecal, sendo a excreção deste metal muito reduzida no leite materno (inferior a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de leite) (Lopes, 2009).

Alguns ensaios de farmacologia experimental têm revelado que dietas enriquecidas em zinco diminuem os sinais de toxicidade do Cd, devido ao facto do zinco induzir uma produção acelerada de metalotioneínas que, por sua vez, complexam o ião Cd e funcionam como um mecanismo de destoxificação (Afonso, 2009).

No que respeita aos efeitos tóxicos do Cd, quando ingerido em doses elevadas, pode originar efeitos de toxicidade aguda que envolvem náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (Lopes, 2009). Em caso de inalação do Cd, podem ocorrer dores de cabeça e insuficiência respiratória, podendo, em doses elevadas, provocar enfisema pulmonar, lesões renais e efeitos no sistema cardiovascular e esquelético (Goyer & Clarkson, 1996; Lopes, 2009; Sinicropi et al., 2010). A exposição crónica ao Cd tem estado associada ao desenvolvimento de múltiplos efeitos de toxicidade que incluem, doenças pulmonares, doenças crónicas do sistema renal, efeitos nefrotóxicos (por exemplo, disfunções

renais como a glicosúria e a proteinúria), doenças cardiovasculares e ósseas (osteomalacia e osteoporose), bem como danos nos sistemas nervoso, imunológico, hepático e sexual (como por exemplo, alterações nos níveis hormonais, toxicidade em embriões e no sistema reprodutor, nomeadamente ao nível dos ovários e testículos e degeneração ou perda completa de espermatozoides) (Goyer & Clarkson, 1996; Liu et al., 2009; Sinicropi et al., 2010; Angeletti et al., 2014; Al-Saleh et al., 2017). Para além de todos estes efeitos toxicológicos existem evidências do Cd originar o aparecimento de tumores em diferentes órgãos, incluindo o pulmão, próstata e pâncreas, estando este metal classificado como agente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC) (IARC, 2018).

1.2.3. Espécies de pescado afetadas pela contaminação com elementos tóxicos

A incidência de contaminantes no pescado é um problema que tem ganho um enorme destaque ao nível da segurança alimentar. Sendo Portugal o país da União Europeia com o maior consumo de pescado *per capita*, torna-se importante estudar algumas das espécies mais consumidas e nas quais ocorrem acumulações de elementos tóxicos específicos (EUMOFA, 2017). Desta forma, serão abordadas como espécies alvo neste trabalho o atum (*Thunnus* spp.) para a qual é frequente detetar níveis elevados de Hg, e a sapateira (*Cancer paguros*) para a qual é frequente detetar níveis elevados de Cd (Peterson et al., 1973; Overnell, 1986).

1.2.3.1. Atum (*Thunnus* spp.)

1.2.3.1.1. Nomenclatura, características anatómicas e ciclo de vida

Thunnus spp. (South, 1845) (figura 1.11) pertence à família Scombridae, na qual estão incluídos os chamados atuns e espécies similares (tabela 1.2) (WoRMS, 2018). Esta família é caracterizada por indivíduos com um corpo alongado, fusiforme e pouco comprido lateralmente, tendo uma grande variabilidade de dimensões que podem ir desde os 45 cm até aos 5 m de comprimento (Collette & Nauen, 1983; Costa, 2013).



Figura 1.11 – *Thunnus* spp. ou atum (Costa, 2013).

Tabela 1.2 - Hierarquia taxonómica do atum (Fonte: adaptado de WoRMS, 2018).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Superfilo	Vertebrata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Perciformes
Família	Scombridae
Género	<i>Thunnus</i>

As espécies de atum apresentam pequenos dentes cónicos, pequenas escamas por todo o corpo e uma coloração que, apesar de poder variar de espécie para espécie, se caracteriza por ser de um azul-escuro metálico nas costas, lados inferiores e barriga esbranquiçada, sem riscas escuras ou manchas nos lados, sendo que em várias espécies os *finlets* podem possuir um amarelo brilhante e serem afiados e pretos (Collette & Nauen, 1983).

Os atuns nadam de boca aberta, forçando a entrada de águas para as brânquias, sendo este, um método eficiente para garantir a oxigenação do sangue ao nível das brânquias sem grande dispêndio energético (Costa, 2013). Existem diferenças entre espécies no que diz respeito à reprodução. As cinco espécies mais capturadas em Portugal são:

- *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758), também conhecido como “bonito”, tem um crescimento rápido e uma vida reprodutiva curta de aproximadamente 7 anos, podendo as fêmeas produzir entre 100 mil e 2 milhões de oócitos por ano (Costa, 2013);

- *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788), também conhecido como “albacora”, sendo distinto das outras espécies de atuns devido às suas tonalidades amareladas nas barbatanas dorsal e anal (Costa, 2013);

- *Thunnus obesus* (Lowe, 1839), também conhecido como “atum-patudo”, diferindo das outras espécies de atum por possuir os olhos grandes e redondos. Tem um crescimento extremamente rápido, a sua desova é realizada normalmente duas vezes por ano, produzindo em cada uma das desovas 3 a 6 milhões de oócitos (Costa, 2013);

- *Thunnus alalunga* (Bonnaterre, 1788), também conhecido por “atum-voador”, sendo caracterizado pelas suas longas barbatanas peitorais. Atinge a maturidade por volta dos 5 anos, podendo a fêmea produzir entre 2 a 3 milhões de oócitos por época de desova (Costa, 2013);

- *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), também conhecido por “atum rabilho”, sendo o atum com o crescimento mais lento, onde o seu período de reprodução pode atingir os 20 anos e as fêmeas podem produzir mais de 10 milhões de oócitos por ano (figura 1.10) (Costa, 2013).

1.2.3.1.2. Distribuição geográfica e métodos de captura

Os atuns são espécies oceânicas que podem nadar a mais de 500 m de profundidade, dependendo da espécie e do tamanho (Collette & Nauen, 1983). As espécies de atum são essencialmente compostas por migradores, apresentando uma grande variabilidade de habitats e condições ambientais (Costa, 2013). O facto de serem excelentes nadadores com a capacidade de atingirem grandes velocidades durante longos períodos de tempo, de conseguirem elevar a sua temperatura corporal face à temperatura exterior e poderem ser encontrados numa grande amplitude de temperaturas, leva a que estes indivíduos tenham uma vasta distribuição, podendo ser encontrados nos Oceanos Pacífico, Atlântico e Índico (Collette & Nauen, 1983; Costa, 2013).

As espécies de atum são normalmente capturadas à superfície, com recurso a redes de cerco ou à técnica de salto e vara, podendo também ser capturadas em palangres em mar aberto (Collette & Nauen, 1983; Costa, 2013).

1.2.3.2. Sapateira (*Cancer paguros*)

1.2.3.2.1. Nomenclatura, características anatómicas e ciclo de vida

Cancer paguros (Linnaeus, 1758) (figura 1.12), de nome comum sapateira, é da família Cancridae (tabela 1.3) (WoRMS, 2018). Caracteriza-se por ser uma espécie com um corpo pesado, formato oval, cor vermelho-acastanhada e com enormes pinças de ponta preta, estando as restantes quatro pares de patas cobertas de pilosidades (Barrento, 2010). Os indivíduos maiores podem apresentar uma carapaça



Figura 1.12 – *Cancer paguros* ou sapateira (Sealord photography, 2018).

muito larga (até 25 cm, embora a maior parte se situe nos 15 cm), estando a taxa de crescimento dependente da idade e do sexo do indivíduo, bem como da profundidade a que estes se encontram (normalmente os machos são maiores do que as fêmeas e apresentam carapaças de maiores dimensões a profundidades mais elevadas) (Barrento, 2010; WoRMS, 2018).

Tabela 1.3 - Hierarquia taxonómica da sapateira (Fonte: adaptado de WoRMS, 2018).

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Classe	Malacostraca
Ordem	Decapoda
Família	Cancridae
Género	<i>Cancer</i>
Espécie	<i>Cancer pagurus</i>

A reprodução da sapateira ocorre durante a Primavera e Verão, sendo feita por cópula, após a fêmea mudar a carapaça. As fêmeas carregam os ovos no abdómen por 6-9 meses e libertam as larvas no final da primavera/início do verão (Barrento, 2010). A duração do estágio larval é de 1-6 meses, podendo existir uma dispersão superior a 10 km e a idade da maturidade é atingida por volta dos 10 anos, sendo a esperança média de vida desta espécie entre os 20 e os 100 anos (WoRMS, 2018).

1.2.3.2.2. Distribuição geográfica e métodos de captura

A sapateira é muito abundante em águas costeiras do noroeste da Europa, particularmente ao largo das costas da Noruega, Escócia e Inglaterra, bem como no Mar do Norte, Canal da Mancha e até à costa de Portugal (Barrento, 2010). Esta espécie pode ser encontrada sob pedregulhos ou em fundos rochosos, arenosos ou lodosos a profundidades até 300 m e com variações de temperaturas entre os 4 e os 16 °C (Barrento, 2010).

A sapateira é geralmente capturada com armadilhas, sendo vendida maioritariamente fresca e inteira (Barrento, 2010).

1.3. Influência dos tratamentos culinários na composição nutricional e contaminação do pescado

O pescado é um alimento imprescindível na gastronomia portuguesa, podendo ser consumido cru em casos pontuais (por exemplo nas refeições de *sushi*) mas, geralmente é sujeito a tratamentos culinários, de entre os quais se destacam o pescado grelhado, assado, frito e/ou cozido em água ou vapor (Ouédraogo & Amyot, 2011; Dias, 2012). Estes tratamentos melhoram o sabor e a qualidade do pescado uma vez que, além de promoverem as características organolépticas, também inativam os microrganismos patogénicos, aumentando consequentemente a segurança e vida útil do pescado (Machado, 2011).

Para além destas consequências, o processamento culinário a que o pescado é sujeito pode induzir alterações na sua composição química e nutricional, incluindo os perfis de ácidos gordos e aminoácidos, características sensoriais e digestibilidade (Maulvault, 2009; Machado, 2011). Geralmente, o tratamento culinário induz uma perda significativa de água decorrente do aumento de temperatura, o que promove a concentração dos restantes constituintes, como por exemplo proteínas, lípidos e os próprios elementos tóxicos (Machado, 2011; Maulvault et al., 2011; Girard et al., 2018).

Os tratamentos culinários também podem degradar ou libertar certos nutrientes essenciais, pelo que a escolha do método a utilizar no processamento do pescado é um fator bastante relevante (Machado, 2011).

A cozedura em vapor é considerada como o tratamento culinário mais saudável uma vez que promove uma menor oxidação dos nutrientes, incluindo ácidos gordos polinsaturados (Machado, 2011). Grelhar representa outra forma benéfica de consumir pescado, embora possa existir uma diminuição de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Machado, 2011). Dos tratamentos culinários enunciados, a fritura é o que induz uma maior alteração na qualidade nutricional dos alimentos, nomeadamente no perfil de ácidos gordos devido à absorção do óleo de fritura e às elevadas temperaturas a que os alimentos são sujeitos (Maulvault, 2009). Desta forma, existe um maior risco de oxidação com a fritura, principalmente dos ácidos gordos polinsaturados, como o eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), considerados essenciais, pelo que este tratamento culinário deve ser evitado (Maulvault, 2009).

Os tratamentos culinários também influenciam os teores de contaminantes, uma vez que estudos científicos recentes têm demonstrado que a concentração de contaminantes em amostras de pescado é superior após o tratamento culinário (Alves et al., 2017b). Contudo, o tratamento culinário também tem um efeito significativo na bioacessibilidade dos nutrientes e contaminantes, como é o exemplo do mercúrio que, durante a digestão *in vitro*, se torna menos bioacessível em amostras cozinhadas (Maulvault et al., 2011; Ouédraogo & Amyot, 2011; Schmidt et al., 2015; Alves et al., 2017b; Girard et al., 2018).

1.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade

A ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição a muitos contaminantes, tais como os elementos tóxicos (Hur et al., 2011). Existem diversos fatores que influenciam a liberação dos contaminantes químicos, nomeadamente as características da amostra em análise, atividade e concentração enzimática, composição iónica, temperatura, pH, tempo de incubação e a própria mecânica da digestão (Hur et al., 2011; Machado, 2011). Desta forma, a quantidade de um contaminante ingerido num produto nem sempre reflete a quantidade que fica disponível para absorção sistémica (Versantvoort et al., 2005). Apenas uma fração (muitas vezes variável, dependendo da matriz alimentar, tipo de processamento e armazenamento) é absorvida e utilizada pelo organismo (Versantvoort et al., 2005; Machado, 2011; Alves et al., 2017a). É importante distinguir dois conceitos que representam um instrumento de avaliação e gestão de risco associado à ingestão de alimentos perecíveis de contaminação: Bioacessibilidade e Biodisponibilidade.

Bioacessibilidade é definida como a quantidade de uma substância (nutriente ou contaminante) libertada do alimento para o fluido gastrointestinal durante o processo digestivo, ficando disponível para absorção pela mucosa intestinal (Versantvoort et al., 2005). Por outro lado, a biodisponibilidade corresponde à fração da substância (nutriente ou contaminante) que atravessa a mucosa intestinal e entra na corrente sanguínea, podendo exercer efeitos no organismo (Versantvoort et al., 2005).

A bioacessibilidade pode ser vista como um indicador da biodisponibilidade oral máxima de qualquer constituinte alimentar, pelo que avaliar a fração bioacessível de um contaminante que pode potencialmente alcançar a circulação sistémica é essencial para avaliar a exposição a determinados contaminantes ou nutrientes, e o conseqüente risco ou benefício para a saúde do consumidor (Versantvoort et al., 2005; Alves et al., 2017b).

O estudo da bioacessibilidade requer a utilização de um modelo adequado de digestão (Afonso et al., 2018). Apesar da relevância fisiológica e de se aproximarem mais da realidade, os modelos *in vivo* nem sempre podem ser utilizados, atendendo a razões éticas, constrangimentos técnicos, tempo despendido, custos elevados e elevada variabilidade interindividual (Machado, 2011). Por outro lado, os modelos de digestão *in vitro* atualmente desenvolvidos são considerados como metodologias reprodutíveis, válidas, rápidas, de baixo custo e independentes de fatores fisiológicos (Minekus et al., 2014; Alves et al., 2017b). Estes modelos *in vitro* foram desenvolvidos para simular de forma simplificada o processo de digestão humana a nível oral, gástrico e intestinal, permitindo a determinação da bioacessibilidade de componentes alimentares a partir da sua matriz durante o trânsito gastrointestinal (Versantvoort et al., 2005; Maulvault et al., 2011; Alves et al., 2017b). Estes modelos de digestão *in vitro* pretendem recriar as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, nomeadamente, a composição química dos fluídos digestivos (fluido salivar, fluido gástrico, fluido duodenal e fluido biliar), pH e tempo de permanência característico em cada compartimento (Versantvoort et al., 2005; Machado, 2011; Minekus et al., 2014; Alves et al., 2017b).

Existem dois tipos de metodologias *in vitro*: os modelos digestivos estáticos e os modelos digestivos dinâmicos (Ferreira, 2014). Nos modelos estáticos o trato gastrointestinal humano é simulado sequencialmente através da aplicação de uma agitação de forma a simular os movimentos

peristálticos, mas mantendo constante o pH e a temperatura ao longo de cada fase do procedimento (Ferreira, 2014). Relativamente aos modelos dinâmicos, existe a preocupação de simular as mudanças de condições que acontecem nos diferentes estádios digestivos (Ferreira, 2014). Desta forma, tem-se particular atenção à concentração de enzimas, pH, viscosidade, tamanho das partículas e distribuição dos nutrientes ao longo de todo o processo digestivo (Ferreira, 2014).

Apesar dos modelos digestivos dinâmicos se aproximarem mais da realidade, ainda não estão otimizados e validados para certas matrizes alimentares, sendo modelos mais caros e complexos, que só agora começam a ser desenvolvidos e utilizados na indústria farmacêutica (Ferreira, 2014).

Os resultados obtidos nos modelos *in vitro* são muitas vezes diferentes dos encontrados nos modelos *in vivo*, devido essencialmente às dificuldades na precisão das condições físico-químicas altamente complexas e dos eventos fisiológicos que ocorrem no trato digestivo (Machado, 2011; Minekus et al., 2014). No entanto, atualmente as metodologias *in vitro* estão bem estabelecidas e são consideradas como uma das ferramentas mais adequadas pelas autoridades de segurança alimentar (Alves et al., 2017a).

1.5. Avaliação dos riscos e benefícios associados ao consumo de pescado

O potencial risco para a saúde pública decorrente da exposição a certos contaminantes tem sido objeto de investigação, regulamentação e debate.

O pescado desempenha um papel importante para uma dieta equilibrada, sendo um alimento rico em nutrientes, tais como proteínas, vitaminas e minerais (Matos, 2014). Conforme anteriormente referido, o pescado é também uma importante fonte de ácidos gordos essenciais, os quais representam consideráveis benefícios para a saúde pública (Matos, 2014). Atualmente, a maioria das organizações de segurança alimentar recomendam o consumo de uma a duas porções de pescado por semana (aproximadamente 150-300 g) (EFSA, 2015). Contudo, como todos os alimentos, o pescado também pode ser uma fonte de contaminantes nocivos com potencial impacto na saúde humana (Reuver et al., 2017).

Entidades reconhecidas mundialmente como a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), a Organização Mundial da Saúde (WHO), a Administração para os Alimentos e Drogas dos Estados Unidos da América (FDA) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) realizam análises de risco e benefício associadas ao consumo de alimentos contaminados com base em estudos e pareceres científicos relacionados com a toxicidade desses mesmos contaminantes (Machado, 2011).

“Risco” pode ser definido como a probabilidade de um efeito adverso afetar negativamente um determinado organismo, população ou ambiente, como resultado da exposição a um perigo (Rivera-Velasquez et al., 2013). “Benefício”, por sua vez, pode ser definido como algo que promove ou aumenta a saúde e o bem-estar dos seres vivos (Bernardo, 2017).

A avaliação de riscos e benefícios pode ser feita por duas abordagens diferentes: determinística e probabilística (Rivera-Velasquez et al., 2013). O método determinístico consiste em atribuir um único valor representativo a cada parâmetro de exposição que influencia o risco, resultando num valor de risco único. Este método é muito limitado pois uma única atribuição de valor resulta numa maior sobrestimação do risco e, conseqüentemente, a decisões conservadoras (Richardson, 1996; Rivera-Velasquez et al., 2013). O método probabilístico é um método mais realista que o determinístico pois considera o grau de variabilidade e incerteza de cada parâmetro de exposição, descrevendo o comportamento do risco em termos probabilísticos. Desta forma, a análise probabilística pode fornecer mais informações através de curvas de distribuições de probabilidade que avaliam diferentes intervalos de risco, cada um com uma probabilidade específica (Richardson, 1996; Rivera-Velasquez et al., 2013).

Na avaliação de riscos e benefícios são utilizados limites de ingestão semanal tolerável (PTWI) e concentrações máximas permitidas pela União Europeia para os contaminantes, mais especificamente Hg e Cd, no pescado, baseados nos resultados obtidos a partir de estudos de toxicidade (tabela 1.4).

Tabela 1.4 – Teores máximos permitidos para a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) e para as concentrações máximas permitidas pela UE relativamente ao mercúrio e ao cádmio em pescado (CE, 2006; EFSA, 2011; EFSA, 2012b).

Limite máximo permitido	Contaminantes	
	Mercúrio	Cádmio
Peixe (mg/kg peso fresco variando consoante a espécie)	0,50 – 1,0	0,050 – 0,25
Crustáceos (mg/kg peso fresco)	0,50	0,50
Moluscos bivalves (mg/kg peso fresco)	Não definido	1,0
Cefalópodes (sem vísceras) (mg/kg peso fresco)	Não definido	1,0
Ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) (µg/kg peso corporal)	4,0 (mercúrio inorgânico) 1,3 (metilmercúrio)	2,5

A realização de estudos de avaliação de risco e benefício são muito importantes uma vez que têm permitido melhorar os padrões de segurança e qualidade alimentar e assegurar a existência de produtos seguros para os consumidores (Bernardo, 2017).

2. Objetivo do estudo

Apesar do pescado ser considerado um alimento de alto valor nutricional pode, igualmente, acarretar alguns perigos para o ser humano por representar uma via de exposição a diversos contaminantes, nos quais se destacam os elementos tóxicos como é o caso do mercúrio (comum em espécies predadoras) e do cádmio (presente em maior quantidade no hepatopâncreas dos crustáceos) que se acumulam no corpo destes organismos por processos de bioacumulação/bioamplificação (Nunez et al., 2018; Zhelyazkov et al., 2018). Contudo, a concentração de contaminante ingerido nem sempre reflete na quantidade que fica disponível para absorção, isto é, a fração bioacessível que é libertada do alimento para o fluido gastrointestinal após o processo digestivo (Versantvoort et al., 2005). Além disso, geralmente as refeições são compostas por diferentes ingredientes, acompanhamentos e especiarias que podem influenciar a quantidade de nutrientes e contaminantes a ser potencialmente absorvidos, influenciando assim os riscos e benefícios associados ao consumo de pescado. Infelizmente a generalidade dos estudos apenas contempla o alimento isoladamente e cru, não integrando o efeito do processamento culinário, a complexidade da refeição (interação de matrizes) e a bioacessibilidade dos elementos.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do consumo de refeições completas à base de pescado na bioacessibilidade de elementos tóxicos, nomeadamente mercúrio em refeições de atum (*Thunnus spp.*) e cádmio em refeições de sapateira (*Cancer paguros*) para que seja possível verificar se o tratamento culinário e/ou a presença de outros ingredientes pode interferir na absorção de contaminantes da amostra antes e após o processo digestivo.

Este estudo é importante para ajudar os consumidores a selecionar informadamente as refeições de pescado e para permitir às autoridades de segurança alimentar que integrem essas informações nas estratégias de avaliação de risco e na comunicação aos consumidores.

3. Materiais e métodos

3.1. Preparação das refeições e tratamentos culinários

As espécies analisadas incluíram o atum (*Thunnus spp.*) e a sapateira (*Cancer paguros*), por se tratarem de espécies que frequentemente possuem concentrações elevadas de mercúrio (atum) e cádmio (sapateira).

Para a preparação de diferentes refeições de pescado, todos os ingredientes, incluindo o atum e a sapateira, foram adquiridos numa grande superfície comercial da região de Lisboa, Portugal. As informações relativas à quantidade, peso e origem de cada um dos ingredientes podem ser consultadas no anexo 1. Aquando da aquisição das amostras foi tida especial atenção ao número do lote e à origem de captura das espécies de atum e de sapateira.

Todas as amostras (cruas e confeccionadas) foram individualmente homogeneizadas (Moulinex La Picadora 750 W), embaladas em frascos de vidro devidamente identificados e isolados (parafilm) e armazenadas a -20 °C (frigorífico negativo AN 700 lts Olitrem) até posterior análise.

3.1.1. Atum (*Thunnus spp.*)

Foram adquiridas postas de bifes de atum ultracongelados (800 g) (anexo 1) prontas a serem confeccionadas (sem vísceras, espinhas e pele). As postas de atum foram divididas em duas frações: uma para análise em cru (100 g) e outra para o tratamento culinário (400 g).

Após o tratamento culinário, foram preparadas seis refeições de atum: (i) atum estufado sem refogado, (ii) atum estufado com refogado, (iii) atum estufado com refogado, batata e brócolos, (iv) atum estufado com refogado e batatas, (v) atum estufado com refogado e brócolos e (vi) atum estufado com refogado e arroz de tomate (figura 3.1). O que diferenciou as refeições entre si foi a adição de ingredientes e, no caso do atum estufado sem refogado, a remoção do refogado à refeição.

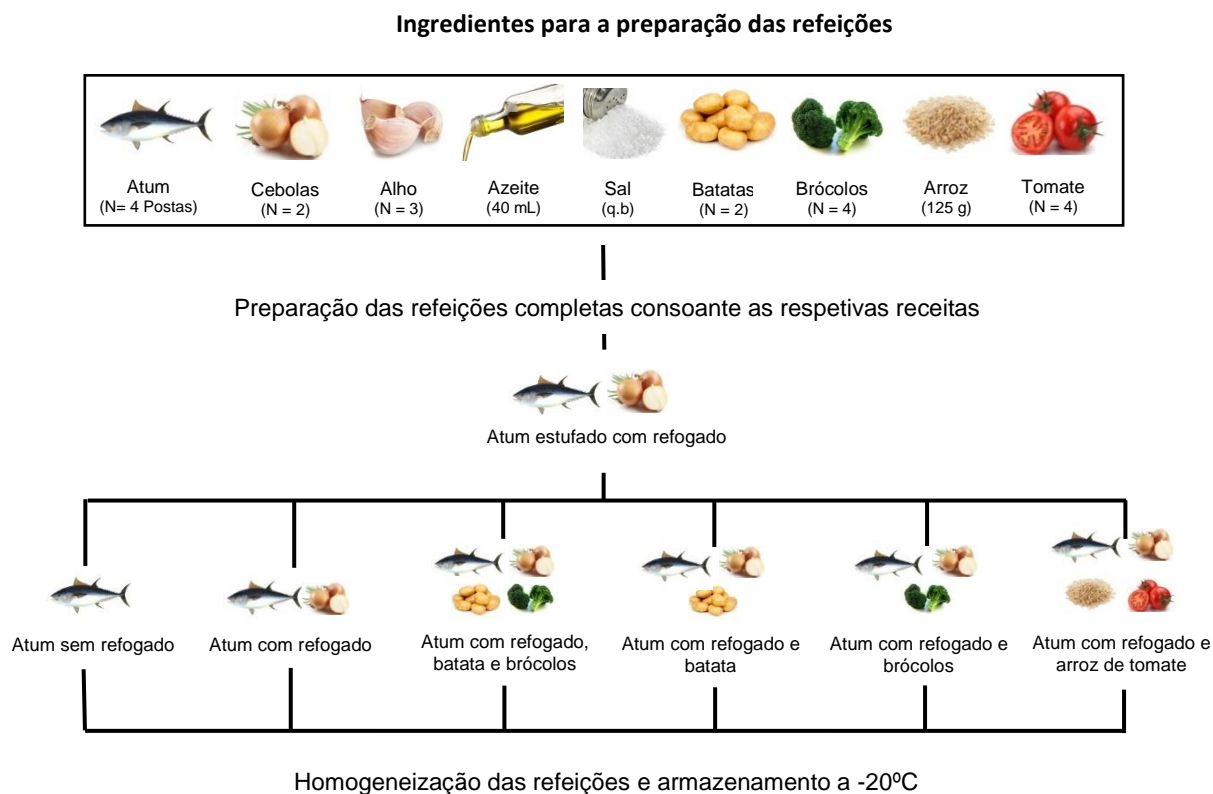


Figura 3.1 – Desenho experimental das refeições de atum.

As postas de atum foram confeccionadas todas da mesma forma, sendo estufadas com molho de cebolada, seguindo a receita descrita no anexo 2. Inicialmente, adicionou-se 1,5% de sal em relação ao peso das postas e aguardou-se 15 minutos. Depois preparou-se o refogado (2 dentes de alho + 1 cebola + 15 mL azeite + 3 tomates + 400 mL água milli-Q) numa panela de inox, utilizando um fogão Teka 4G SL a gás e deixou-se levantar fervura. Após o refogado se encontrar a ferver, as postas de atum foram adicionadas para cozedura durante 8 minutos.

As batatas e os brócolos foram cozidos separadamente a vapor num forno de cozedura Combi-Master CM 6 (Rational Großküchen Technik GmbH). O tempo de cozedura das batatas descascadas foi de 14 minutos e 8 minutos para os brócolos, ambos a uma temperatura de 100°C.

A preparação do arroz de tomate foi segundo adaptação da receita presente no anexo 3. Assim, preparou-se um refogado (3/4 cebola + 1/2 dente alho picado + 25 mL azeite) numa panela de inox utilizando o fogão Teka 4G SL e adicionou-se 1 tomate (sem pele e cortado), 125 g de arroz carolino e 250 mL de água milli-Q, deixando o arroz cozer durante 15 minutos.

Todos os registos das pesagens antes e após o tratamento culinário encontram-se disponíveis no anexo 4. Após os tratamentos culinários de todos os ingredientes, as diferentes refeições de atum foram preparadas para análise conforme a tabela 3.1.

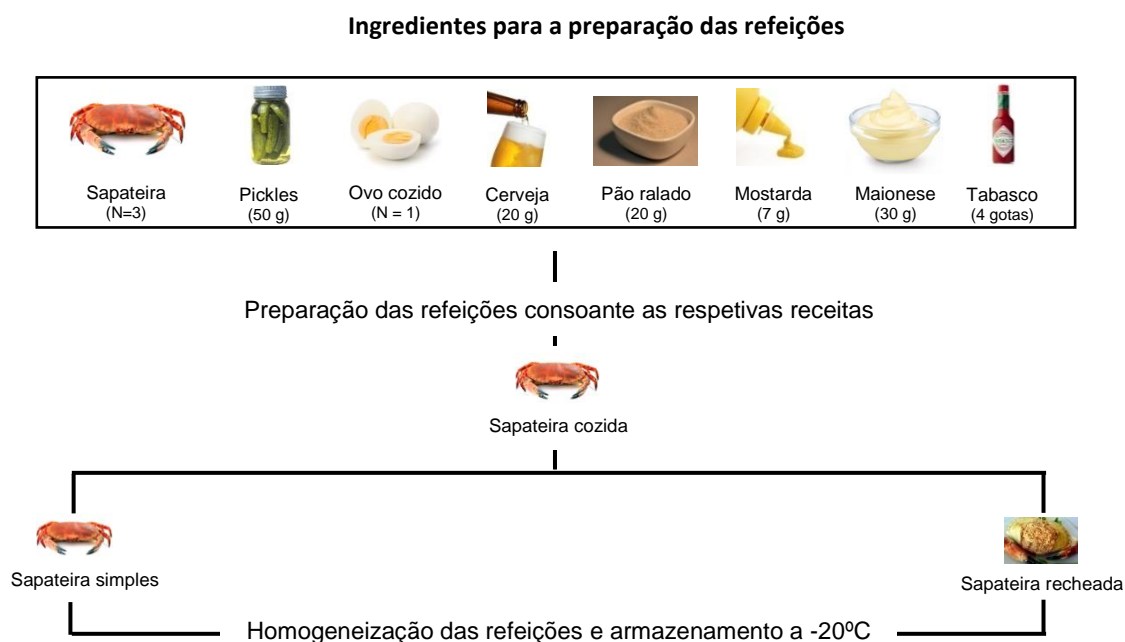
Tabela 3.1 – Percentagem de peso dos ingredientes nas diferentes refeições em análise.

Refeição	Ingrediente			
Atum cru	Atum cru			
	100%			
Atum estufaço sem refogado	Atum estufado			
	100%			
Atum estufado com refogado	Atum estufado	Refogado de cebolada		
	51,7%	48,3%		
Atum estufado com refogado, batata e brócolos	Atum estufado	Refogado de cebolada	Batata	Brócolos
	33,0%	30,8%	30,4%	5,9%
Atum estufado com refogado e batata	Atum estufado	Refogado de cebolada	Batata	
	35,0%	32,7%	32,3%	
Atum estufado com refogado e brócolos	Atum estufado	Refogado de cebolada	Brócolos	
	47,3%	44,2%	8,4%	
Atum estufado com refogado e arroz de tomate	Atum estufado	Refogado de cebolada	Arroz de tomate	
	29,4%	27,4%	43,2%	

3.1.2. Sapateira (*Cancer pagurus*)

Foram adquiridas 3 sapateiras selvagens inteiras, cozidas e congeladas (400 g cada) (anexo 1). Procedeu-se à amostragem do hepatopâncreas e das gónadas (massa edível) de cada uma das sapateiras, homogeneizando-se (varinha mágica Braun 600W) e dividindo-se em duas frações: uma para a refeição de sapateira simples (cerca de 200 g) e outra para a refeição de sapateira recheada (cerca de 100 g) (figura 3.2).

A confeção da sapateira recheada foi feita seguindo a receita presente no anexo 5. À massa edível para preparação da sapateira recheada adicionou-se 20 g de pão ralado, 1 ovo cozido, 50 g de pickles, 20 g de cerveja, 7 g de mostarda, 30 g de maionese e 4 gotas de tabasco, procedendo-se novamente à homogeneização da amostra (varinha mágica Braun 600W). Os pesos foram registados (ver anexo 6).

**Figura 3.2** – Desenho experimental das refeições de sapateira.

3.2. Método de digestão *in vitro*

Com as amostras das refeições preparadas, realizaram-se os ensaios de bioacessibilidade através de um método de digestão *in vitro* estático otimizado por Alves et al. (2017).

Todo o material utilizado na digestão *in vitro* foi previamente descontaminado com uma solução de ácido nítrico a 20% (Honeywell Fluka, 65%).

Os componentes inorgânicos e orgânicos utilizados na preparação dos respectivos sucos digestivos foram os seguintes: KCl (Merck, 104936), KSCN (Sigma, P2713), NaH₂PO₄ (Panreac, 122018.1210), Na₂SO₄ (Merck, 1.06649.1000), NaCl (OmniPur, LC7710), NaHCO₃ (Merck, 1.06329.1000), CaCl₂.2H₂O (Sigma, C5080), NH₄Cl (Riedel-de Haen, 12125-02-9), KH₂PO₄ (Merck, 4873) e MgCl₂ (Chem-Lab NV, 7791-18-6), Ureia (Sigma, U5128), Ácido Glucorónico (Sigma, G5269), Glucose (Sigma, G5400) e Hidrocloreto de Glucosamina (Sigma, G1514). Foram também utilizados componentes bioativos, nomeadamente α -amylase de *Aspergillus oryzae* (Sigma, 86250), Ácido Úrico (Sigma, U2625), Mucina do estômago suíno (Sigma, M2378), Albumina de Soro Bovino (Sigma, A7906), Pepsina da mucosa de estômago suíno (Sigma, P7125), Pancreatina do pâncreas suíno (Sigma, P1625), Lipase do pâncreas suíno, tipo II (Sigma, L3126), Tripsina do pâncreas suíno (Sigma, T0303), α -quimotripsina do pâncreas bovino (Sigma, C4129) e bÍlis de suÍno (Sigma, B8631).

A tabela 3.2 descreve a quantidade adicionada de cada um dos componentes orgânicos, inorgânicos e bioativos na composição dos respectivos sucos digestivos, nomeadamente na preparação de 200 mL de saliva, 200 mL de suco gástrico, 200 mL de suco duodenal e 200 mL de suco biliar.

Tabela 3.2 – Composição dos respetivos sucos digestivos na preparação de 200 mL de saliva, 200 mL de suco gástrico, 200 mL de suco duodenal e 200 mL de suco biliar.

	Fase oral	Fase gástrica	Fase intestinal	
	Saliva (200 mL)	Suco gástrico (200 mL)	Suco duodenal (200 mL)	Suco biliar (200 mL)
Componentes inorgânicos	Volume (mL)	Volume (mL)	Volume (mL)	Volume (mL)
KCl (89,6 g L ⁻¹)	4.0	3.6	2.4	1.6
KSCN (20 g L ⁻¹)	4.0	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ (88,8 g L ⁻¹)	4.0	1.2	-	-
Na ₂ SO ₄ (57 g L ⁻¹)	4.0	-	-	-
NaCl (175,3 g L ⁻¹)	0.8	6.2	16.0	12.0
NaHCO ₃ (84,7 g L ⁻¹)	8.0	-	2.66	27.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O (22,2 g L ⁻¹)	-	7.2	0.288	0.160
NH ₄ Cl (30,6 g L ⁻¹)	-	4.0	-	-
KH ₂ PO ₄ (8 g L ⁻¹)	-	-	4.0	-
MgCl ₂ (5 g L ⁻¹)	-	-	4.0	-
Componentes orgânicos	Volume (mL)	Volume (mL)	Volume (mL)	Volume (mL)
Ureia (25 g L ⁻¹)	3.2	1.4	1.6	4.0
Ácido glucorónico (2 g L ⁻¹)	-	4.0	-	-
Glucose (65 g L ⁻¹)	-	4.0	-	-
Hidrocloreto de glucosamina (33 g L ⁻¹)	-	4.0	-	-
Componentes bioativos	Quantidade (mg)	Quantidade (mg)	Quantidade (mg)	Quantidade (mg)
α-amilase	180	-	-	-
Ácido úrico	6	-	-	-
Mucina	10	-	-	-
BSA	-	400	400	720
Pepsina	-	1000	-	-
Pancreatina	-	1200	3600	-
Lipase	-	-	600	-
Tripsina	-	-	6.4	-
α-chymotrypsin	-	-	69.6	-
Bilis	-	-	-	12000
Água ultrapura (Milli-Q)	Aferição dos respetivos balões			

A preparação dos sucos digestivos foi feita no próprio dia, mesmo antes do início da digestão de forma a garantir a viabilidade dos sucos digestivos e a evitar a degradação/inibição enzimática.

O procedimento realizado para simular o processo digestivo das amostras encontra-se esquematizado na figura 3.3. No processo digestivo *in vitro*, as amostras referentes a cada refeição de pescado, foram realizadas em triplicado, e por cada processo digestivo foram realizados controlos negativos (simulação do processo sem amostra contendo apenas os sucos digestivos).

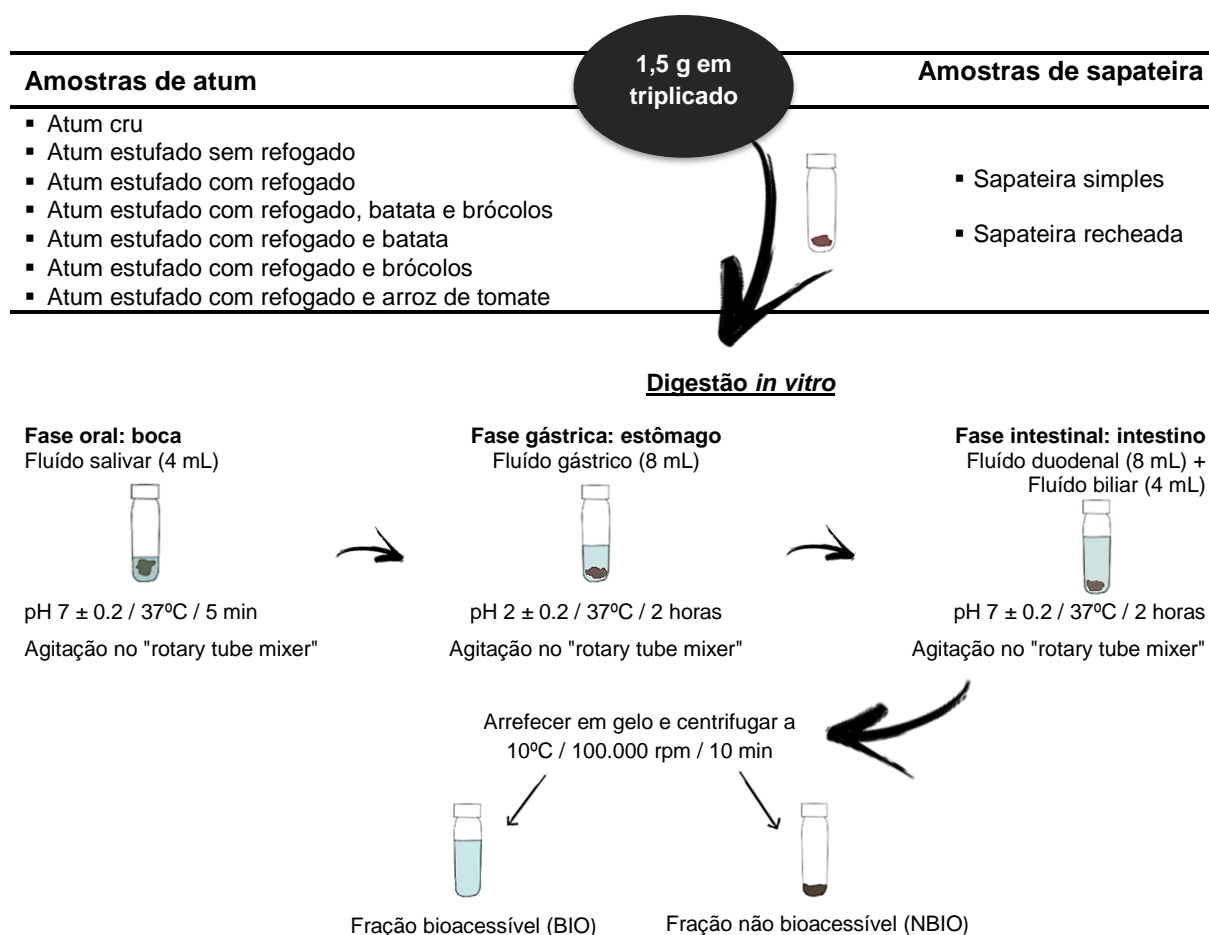


Figura 3.3 – Desenho experimental do protocolo de digestão *in vitro*.

Inicialmente pesou-se 1,5 g de cada amostra (em triplicado) para tubos de nalgene (Nalgene™ high-speed PPCO centrifuge tubes) devidamente identificados e pesados. Depois, iniciou-se as diferentes fases do processo digestivo. A primeira fase consiste na fase oral que tem como objetivo simular o momento em que o alimento se encontra na boca. Para tal foram adicionados 4 mL de saliva a cada um dos tubos de nalgene e corrigiu-se o pH (NaOH 1M ou HCl 1M) para 7.0 ± 0.2 (pH meter 539, WTW). De seguida colocaram-se os tubos num agitador de tubos com disco rotativo (25 rpm; LSCI, Portugal) inserido numa estufa (Select 400W) a 37°C durante 5 minutos. A segunda fase (fase gástrica) simulou a amostra no estômago. Nesta fase adicionou-se 8 mL de suco gástrico, ajustou-se o pH a 2.0 ± 0.2 e incubou-se durante 2 horas a 37°C. A terceira e última fase representa a fase intestinal que simula a amostra no intestino. Nesta fase adicionou-se 8 mL de suco duodenal e 4 mL de suco biliar, ajustou-se o pH a 7.0 ± 0.2 e incubou-se durante 2 horas a 37°C.

Findo o processo digestivo, os tubos foram retirados da estufa, colocados em gelo até arrefecer e centrifugados (Kubota 6800) a 100.000 rpm, a 10°C durante 10 minutos, para permitir a separação da fração líquida bioacessível (BIO) e da fração residual não bioacessível (NBIO). Depois de separadas as duas frações, pesou-se a quantidade de fração bioacessível e de fração não bioacessível, estando todos os registos das pesagens disponíveis no anexo 7.

3.3. Determinação do teor de mercúrio nas refeições de atum

O teor de mercúrio presente nas amostras de atum foi determinado por espectrometria de absorção atômica, utilizando um analisador automático de mercúrio (LECO AMA254 Mercury Analyzer). Este aparelho utiliza como técnica a geração de vapor de Hg, sendo o procedimento baseado na decomposição da amostra por combustão (Alves et al., 2017a).

No caso das amostras sólidas pesou-se, aproximadamente 10 mg, enquanto que para as amostras líquidas (bioacessíveis) pesou-se aproximadamente 100 µL. De modo a evitar possíveis interferências dos teores de gordura das amostras sólidas, adicionou-se óxido de alumínio antes de se iniciar a leitura no analisador automático LECO.

A precisão do aparelho foi verificada através de material certificado de referência (10 mg proteína de peixe; DORM-4; National Research Council Canada) cujos valores obtidos (0,419 mg/kg) se encontraram dentro do valor certificado ($0,412 \pm 0,036$ mg/kg). O limite de detecção do aparelho era de 0,004 mg/kg e o limite de quantificação era de 0,011 mg/kg.

Os valores de Hg total foram expressos em mg/kg e apresentados como média \pm desvio padrão.

3.4. Determinação do teor de cádmio nas refeições de sapateira

O teor de cádmio nas amostras de sapateira foi determinado por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite, segundo o método baseado na norma NP EN 14084:2003 (CEN, 2003).

Para a análise do teor de Cd pesou-se 0,5 g de amostras sólidas e 1 mL de amostras líquidas em vasos de digestão. A cada um dos vasos adicionou-se 4 mL de ácido nítrico 65% suprapuro (Merck, 1.00441.1000) e 1,5 mL de peróxido de hidrogénio 30% suprapuro (Merck, 1.07209.1000). Para além das amostras, foram também preparados dois controlos apenas com ácido nítrico e peróxido de hidrogénio. De seguida, as amostras foram digeridas em microondas (CEM-MARS5, USA) de acordo com o programa presente na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Programa do forno de digestão por microondas CEM-MARS5, USA.

Passos (nº)	Potência (Watts)	Rampa (minutos)	Pressão (psi)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	1200	25	350	210	15

Finda a digestão, as amostras arrefeceram até atingirem a temperatura ambiente e foram transferidas para balões de 25 mL, ajustando-se o volume com água ultrapura (sistema Milli-Q Plus Millipore).

Como as amostras apresentavam à partida uma elevada concentração de cádmio foi necessário fazer diluições. Assim para as amostras sólidas, antes da digestão *in vitro*, fez-se uma diluição de 1:25 e para as amostras líquidas, fração bioacessível, foi realizada uma diluição de 1:10.

O espectrofotômetro de absorção atômica por forno de grafite (Varian, Spectrum AA 220Z, Austrália), foi calibrado com uma solução padrão de Cd com 1 µg/L de Cd(NO₃)₂ em HNO₃ 0,5 M (Merck). A concentração de Cd na amostra foi obtida a partir de uma curva de calibração preparada com a solução padrão de Cd 1 µg/L (tabela 3.4).

Os parâmetros instrumentais para a determinação de cádmio ($\lambda = 228,8$ nm) por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite estão presentes na tabela 3.5.

Tabela 3.4 – Curva de calibração feita a partir da solução padrão de cádmio 1 µg/L.

Concentração (µg/L)	Absorvância
0	0,0025
0,1	0,0112
0,2	0,0235
0,4	0,0489
0,6	0,0727
0,8	0,0942
1	0,1118

Tabela 3.5 – Parâmetros instrumentais para a determinação de Cd ($\lambda = 228,8$ nm) por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite.

Passo (nº)	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Fluxo de gás (L/min)	Gás	Leitura
1	85	5,0	3,0	Árgon	Não
2	95	40,0	3,0		Não
3	120	10,0	3,0		Não
4	350	5,0	3,0		Não
5	350	1,8	3,0		Não
6	350	2,0	0,0		Não
7	1800	0,8	0,0		Sim
8	1800	2,0	0,0		Sim
9	1800	2,0	3,0		Não

O equipamento foi programado para dispensar 15 µL e fazer duas injeções por amostra, sendo o resultado obtido a partir da média (mg/kg) das duas injeções.

A precisão do aparelho foi verificada através de material certificado de referência (10 mg proteína de peixe; DORM-4; National Research Council Canada) cujos valores obtidos (0,287 mg/kg) se encontraram dentro do valor certificado (0,299 ± 0,018 mg/kg). O limite de detecção do aparelho era de 0,002 mg/kg e o limite de quantificação era de 0,006 mg/kg.

Os valores de Cd foram expressos em mg/kg e apresentados como média ± desvio padrão.

3.5. Análise estatística

De forma a determinar se existiam diferenças significativas no teor de Hg e de Cd das diferentes refeições realizou-se uma análise paramétrica denominada “ANOVA One-Way”, seguida de “Teste Tukey” ou “Teste Unequal N”, escolha essa dependente do número de replicados em análise. Para tal foram previamente testados os pressupostos da análise, isto é, a normalidade dos resíduos e a homogeneidade de variâncias. Quando não se verificaram os pressupostos, os dados foram transformados (log).

A homogeneidade de variâncias foi respeitada em todos os casos. Contudo, devido ao reduzido número de dados, a normalidade dos resíduos não se verificou. Apesar desta limitação, realizou-se a análise paramétrica por se tratar de um método mais robusto quando comparado com a análise não paramétrica.

O nível de significância para a análise estatística efetuada foi de 0,05, tendo sido utilizado o software STATISTICA 7.0 © no tratamento dos dados.

3.6. Análise de risco

A análise de risco foi feita tendo em conta os valores de ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de cada contaminante (4 µg/kg de peso corporal para o Hg inorgânico, 1,3 µg/kg de peso corporal para o MeHg e 2,5 µg/kg de peso corporal para o Cd) (EFSA, 2011; EFSA, 2012b) e o valor de ingestão mensal tolerável provisório (PTMI) do cádmio (25 µg/kg de peso corporal) (WHO, 2013).

Desta forma utilizaram-se valores padrão de peso corporal médio da população europeia para crianças (3-10 anos) de 23 kg, adolescentes (10-14 anos) de 43 kg, mulheres grávidas (18-35 anos) de 55 kg e adultos saudáveis (+ 18 anos) de 70 kg (EFSA, 2012a).

No caso do atum, a análise de risco foi feita para as refeições completas, tendo em atenção o consumo recomendável de duas porções semanais de pescado (equivalente a 300 g) (EFSA, 2015) e considerando que as crianças comem a mesma quantidade que os adultos. Relativamente à sapateira, a análise de risco foi feita para um consumo de 50 g de refeição semanal ou mensal tanto para adultos como para crianças (Maulvault et al., 2011).

Assim, foi efetuada uma análise determinística, tendo sido calculada a percentagem de aproximação ao limite de PTWI antes e depois da digestão (incluindo a bioacessibilidade) das refeições cozinhadas, com o intuito de verificar quais os segmentos da população que poderão estar em risco ao ingerir as refeições. Foi também calculada a quantidade máxima de refeição que cada segmento da população poderá ingerir para atingir o limite máximo semanal ou mensal recomendável.

4. Resultados e discussão

4.1. Efeito dos tratamentos culinários nos teores de contaminantes

O pescado pode ser consumido de inúmeras formas, mas, geralmente, é sujeito a tratamentos culinários que melhoram o sabor e a qualidade do pescado (Machado, 2011). Alguns estudos têm vindo a focar-se no efeito dos tratamentos culinários na composição química e nutricional do pescado, mais concretamente nos teores proteicos, lipídicos e de elementos tóxicos, como é o caso do Hg e Cd (Machado, 2011; Maulvault et al., 2011; Alves et al., 2017b; Girard et al., 2018). No entanto, a generalidade dos estudos não integra o efeito do tratamento culinário juntamente com a introdução de outros ingredientes numa refeição de pescado. O presente estudo foi inovador neste aspecto uma vez que se avaliou não só o efeito do tratamento culinário como também o efeito da introdução de outros ingredientes no teor de contaminantes da amostra.

4.1.1. Mercúrio

Os resultados obtidos relativamente ao teor de mercúrio (Hg) presente nas diferentes refeições de atum encontram-se na tabela 4.1. A análise estatística desses resultados pode ser consultada no anexo 8.

Tabela 4.1 - Teor de Hg (mg/kg) na refeição completa, na porção de atum de cada refeição e nos restantes ingredientes antes da digestão.

Refeição	Teor de Hg na refeição completa (mg/kg)	Teor de Hg da porção de atum na refeição (mg/kg) ¹
Atum cru	0,167 ± 0,005 ^b	0,167 ± 0,005 ^{bc}
Atum sem refogado	0,218 ± 0,012 ^a	0,218 ± 0,012 ^a
Atum com refogado	0,119 ± 0,006 ^c	0,220 ± 0,012 ^a
Atum com refogado + arroz de tomate	0,051 ± 0,001 ^f	0,134 ± 0,005 ^c
Atum com refogado + batata + brócolos	0,063 ± 0,000 ^e	0,167 ± 0,000 ^{bc}
Atum com refogado + batata	0,069 ± 0,001 ^e	0,174 ± 0,004 ^b
Atum com refogado + brócolos	0,099 ± 0,005 ^d	0,197 ± 0,012 ^{ab}
Ingrediente	Teor de Hg (mg/kg)	
Refogado	< 0,011*	
Arroz de tomate	< 0,011*	
Batata	< 0,011*	
Brócolos	< 0,011*	

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Hg ($p < 0,05$) entre cada refeição.

* O teor de Hg dos ingredientes (mg/kg) encontrava-se abaixo do Limite de Quantificação (0,011 mg/kg) do analisador automático de mercúrio (LECO AMA254 Mercury Analyzer).

¹ O teor de Hg da porção de atum nas refeições foi calculado através das proporções de cada ingrediente na refeição completa. Para tal utilizou-se para cada ingrediente o limite máximo de quantificação (upper bound) do aparelho (0,011 mg/kg) pois ao sobreestimar os valores, minimizou-se o risco.

Pelos resultados obtidos foi possível verificar que o Hg presente nas refeições completas provinha maioritariamente do atum uma vez que se constatou que a concentração deste elemento tóxico nos restantes ingredientes era muito reduzida (< 0,011 mg/kg). Esta informação está de acordo com

estudos anteriores no qual o Hg não foi detetado em ingredientes como batata, arroz, azeite e feijão verde, por se encontrar abaixo do limite de deteção ($< 0,007$ mg/kg) do estudo em questão (Perelló et al, 2008).

O teor de Hg no atum cru (0,167 mg/kg) encontrava-se em conformidade com o teor máximo permitido pela Comissão Europeia (1,0 mg/kg de peso fresco para o atum) (CE, 2006), tratando-se inclusivé de uma concentração relativamente baixa quando comparada com outros estudos feitos para o atum (Perelló et al, 2008; Torres-Escribano et al., 2011; Afonso et al., 2015). Os teores de Hg diferem entre espécies, podendo essa variabilidade depender dos processos de captação do Hg ou da interação de parâmetros bióticos como idade, tamanho, sexo, metabolismo e hábitos alimentares (Grieb et al., 1990; Lansens et al., 1991; Bloom, 1992; Cabañero et al., 2004). Os baixos teores de Hg registados no atum cru indiciam que as amostras analisadas correspondiam a porções de atuns pequenos onde a bioacumulação é geralmente mais baixa. Outra justificação poderá estar no habitat de proveniência dos atuns, pois se a proveniência for de zonas menos contaminadas, a acumulação de Hg no organismo dos atuns é naturalmente mais reduzida (Nicklisch et al., 2017).

Nas refeições completas, o teor de Hg total variou entre 0,051 a 0,218 mg/kg, existindo diferenças significativas entre as refeições. Um dos resultados mais relevantes foi o aumento do teor de Hg do atum após tratamento culinário de 0,167 para 0,218 mg/kg. Neste caso não houve adição de outros ingredientes, pelo que o aumento do teor de Hg se deveu exclusivamente ao tratamento culinário.

Geralmente, espécies como atum, sardinha, pescada e peixe-espada, tendem a aumentar os teores de Hg após tratamento culinário, aumento esse que depende do tratamento culinário empregado, sendo normalmente superior em amostras fritas e grelhadas (Burger et al., 2003; Perelló et al., 2008; Afonso et al., 2015).

Durante a confeção culinária do pescado ocorrem mudanças físicas, químicas e sensoriais que podem levar ao desenvolvimento de cores, aromas e modificações na capacidade de retenção da água e na textura devido à desnaturação de proteínas (Afonso et al., 2015). Para além disso, ocorrem perdas de água e gordura que podem justificar o aumento do teor de Hg no atum após tratamento culinário. Burguer et al. (2003) verificou que o Hg presente no músculo do peixe não parece ser libertado durante o tratamento culinário, permanecendo ligado às proteínas. Assim, como o pescado retém a mesma quantidade de Hg, quando calculada a concentração de Hg com base no peso da amostra, a concentração aumenta porque existe uma perda de água e conseqüentemente perda de peso da amostra (Burguer et al., 2003).

Quando foram adicionados os outros ingredientes às refeições de atum, o teor de Hg diminuiu significativamente, sendo em todos os casos inferior ao teor de Hg no atum cru (0,167 mg/kg). Este resultado era expectável uma vez que a adição de outros ingredientes faz com que o teor de Hg diminua por peso de refeição, uma vez que a refeição deixa de ter só atum e passa a ter outros ingredientes que não possuem teores tão elevados de Hg. Um bom exemplo é a refeição de “atum com refogado + arroz de tomate” que apresenta um menor teor de Hg (mg/kg) por possuir uma menor proporção de atum (29,4%) comparado com a soma dos restantes ingredientes, refogado (27,4%) e arroz de tomate (43,2%), respetivamente.

Os teores de Hg das porções de atum foram calculados através das proporções de cada ingrediente nas refeições completas. Pelos resultados obtidos verificou-se que apenas o contacto das postas de atum com diferentes ingredientes (com exceção do refogado) diminuiu o teor de Hg no atum (uma vez que estes foram cozinhados separadamente).

O “atum com refogado” e o “atum sem refogado” não apresentaram diferenças significativas pois ambos estiveram em contacto com o refogado (o “atum sem refogado” foi cozinhado com o refogado, mas armazenado individualmente).

A diferença mais significativa do contacto do “atum com refogado” com os outros ingredientes foi observada quando se adicionou “arroz de tomate”, verificando-se uma diminuição de cerca de 39% do teor de Hg no atum. Também existiram diferenças significativas quando se adicionaram “batata e brócolos” (diminuição de 24%) e “batata” (diminuição de 21%). O contacto apenas com “brócolos” não revelou diferenças significativas. Estes resultados evidenciam que, provavelmente, terá ocorrido transferência de Hg do atum para os restantes ingredientes. De modo a confirmar esta teoria, deveriam ter sido analisados os ingredientes individualmente depois de estarem em contacto com o atum, o que infelizmente não foi possível. Caso se comprovasse a existência dessa transferência, os ingredientes que melhor reduziam o teor de Hg no atum seriam, por ordem decrescente o “arroz de tomate”, a junção de “batata e brócolos” e as “batatas”. Estes resultados também podem dever-se à transferência de constituintes dos outros ingredientes para o atum, contudo seriam necessários estudos mais detalhados para comprovar essa teoria.

Outra potencial justificação para tais resultados poderia estar na má homogeneização dos ingredientes e, quando retirada uma porção para análise, esta poderia conter uma menor quantidade de Hg. Contudo, a probabilidade desse erro ter ocorrido é mínima, pois as análises foram feitas em triplicado e o desvio padrão era muito reduzido, indiciando amostras homogéneas. Para além disso, seria improvável ter acontecido o mesmo em todas as amostras.

Até ao momento existem dúvidas em relação ao facto da legislação em vigor contemplar apenas os teores de Hg em amostras cruas, pois pode não existir fiabilidade na avaliação do risco associado à exposição a contaminantes, tendo em conta que normalmente o pescado é consumido cozinhado e em conjunto com outros ingredientes (Marques et al., 2011). Avaliando os resultados obtidos para o atum, constata-se que a amostra crua reproduz eficazmente o teor de Hg que pode ser ingerido, tendo em conta que não existiram diferenças significativas entre os teores de Hg no atum cru e as porções de atum em contacto com os outros ingredientes. Contudo, noutras espécies o cenário pode ser completamente diferente, sendo necessários estudos mais específicos.

Do ponto de vista de segurança alimentar, as informações mais importantes dizem respeito às refeições completas pois, por norma, o ser humano consome atum juntamente com outros ingredientes. Assim, é importante compreender que o teor de Hg do atum aumenta com o tratamento culinário, mas a adição de outros ingredientes, para uma determinada quantidade de refeição, reduz a quantidade de atum consumido, e conseqüentemente diminui a exposição dos consumidores ao Hg.

4.1.2. Cádmio

Os resultados obtidos relativamente ao teor de cádmio (Cd) nas diferentes refeições de sapateira encontram-se na tabela 4.2. Os resultados da análise estatística podem ser consultados no anexo 9.

Tabela 4.2 – Teor de Cd (mg/kg) na refeição completa e apenas na porção de sapateira de cada refeição antes da digestão.

Refeição	Teor de Cd na refeição completa (mg/kg)	Teor de Cd da porção de sapateira na refeição (mg/kg) ¹
Sapateira simples	9,430 ± 0,954 ^a	9,430 ± 0,954 ^a
Sapateira recheada	4,475 ± 0,172 ^b	9,451 ± 0,401 ^a

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Cd ($p < 0,05$) entre cada refeição.

¹ O teor de Cd presente na porção de sapateira da refeição “sapateira recheada” foi calculado através das proporções de sapateira e recheio.

Apesar dos teores de Cd não terem sido quantificados nos ingredientes utilizados para a confeção da sapateira recheada, sabe-se que a o Cd presente na refeição provém maioritariamente do hepatopâncreas da sapateira.

Pelos resultados obtidos foi possível verificar que o teor de Cd presente no hepatopâncreas da sapateira (9,430 mg/kg) encontrava-se bastante acima do teor máximo permitido pela Comissão Europeia (0,50 mg/kg de peso fresco para o músculo) (CE, 2006), apesar desse limite estar estabelecido apenas para o músculo dos crustáceos, não existindo ainda legislação para o hepatopâncreas, independentemente deste também ser amplamente consumido (Marques et al., 2011; Maulvault et al., 2012). A maioria do pescado possui baixos níveis de Cd, com exceção do marisco (lagostas, caranguejos, ostras, gastrópodes e vieiras), especialmente hepatopâncreas de caranguejos e lagostas, nos quais as concentrações de Cd podem chegar até aos 40 mg/kg (Falconer et al., 1986; Marques et al., 2011).

Nas refeições completas, o teor de Cd variou entre 4,475 e 9,430 mg/kg, existindo diferenças significativas entre as refeições. Como as sapateiras foram adquiridas já cozidas, não foi possível averiguar se o tratamento térmico teve ou não influência nas concentrações de Cd. Porém, estudos anteriores demonstraram que o tratamento culinário (cozedura) da sapateira promove o aumento dos teores de Cd na parte edível (Maulvault et al., 2011; Wiech et al., 2017)

Nesta investigação, a diferença entre os teores de Cd nas duas refeições deveu-se à adição de outros ingredientes na refeição de sapateira recheada. Assim, na sapateira recheada, houve uma diminuição significativa do teor de Cd para 4,475 mg/kg uma vez que, para a mesma quantidade de refeição, reduziu-se a quantidade de hepatopâncreas e adicionaram-se outros ingredientes que, por sua vez, possuíam baixos teores de Cd.

Quanto ao teor de Cd da porção de sapateira da refeição “sapateira recheada”, este foi calculado através das proporções dos ingredientes, não se tendo observado diferenças significativas entre o teor de Cd na “sapateira simples” e o teor de Cd na “sapateira recheada”. Desta forma, nesta situação concreta foi possível verificar que o contacto do hepatopâncreas com os restantes ingredientes não afetou o teor de Cd da sapateira.

4.2. Efeito dos tratamentos culinários na bioacessibilidade dos contaminantes

O estudo da bioacessibilidade dos contaminantes é muito importante uma vez que a quantidade total de um contaminante ingerido nem sempre reflete a quantidade que fica disponível para absorção sistêmica (Versantvoort et al., 2005). Neste caso, após ter sido aplicado o método de digestão *in vitro* a cada refeição, obteve-se como produto final uma fração líquida (bioacessível) e uma fração residual (sólida). Destas duas, a fração bioacessível é a fração que atinge a circulação sistêmica e que, por sua vez, corresponde à quantidade máxima de contaminante que fica disponível para absorção no organismo. Assim, a sua determinação, foi essencial na avaliação da exposição aos contaminantes e na avaliação do risco para a saúde dos consumidores (Versantvoort et al., 2005; Alves et al., 2017a).

4.2.1. Mercúrio

Os resultados obtidos relativamente à percentagem de mercúrio (Hg) bioacessível e ao teor de Hg presente nas refeições após a digestão (calculado a partir das percentagens bioacessíveis) encontram-se na tabela 4.3. Os resultados da análise estatística podem ser consultados no anexo 10.

Tabela 4.3 – Percentagens de Hg bioacessível (%) e teores de Hg (mg/kg) nas refeições completas de atum após digestão.

Refeição	% de Hg bioacessível	Teor de Hg na refeição completa depois da digestão (mg/kg)
Atum cru	42,2 ± 1,9 ^a	0,071 ± 0,002 ^a
Atum sem refogado	13,5 ± 0,8 ^d	0,029 ± 0,002 ^b
Atum com refogado	21,8 ± 1,5 ^c	0,026 ± 0,001 ^{bc}
Atum com refogado + arroz de tomate	31,2 ± 2,2 ^b	0,016 ± 0,001 ^e
Atum com refogado + batata + brócolos	28,4 ± 0,7 ^b	0,018 ± 0,000 ^{de}
Atum com refogado + batata	30,7 ± 0,7 ^b	0,021 ± 0,000 ^{cd}
Atum com refogado + brócolos	30,9 ± 1,3 ^b	0,031 ± 0,002 ^b

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Hg ($p < 0,05$) entre cada refeição.

Como se pode constatar na tabela 4.3 existiram diferenças significativas nas percentagens de Hg bioacessível das diferentes refeições. Todas as percentagens foram inferiores a 50%, significando que a quantidade que pode ser absorvida pelo organismo após a digestão é inferior à quantidade de contaminante ingerido.

Girard et al. (2018) estudou a bioacessibilidade de Hg em diferentes espécies de pescado, tendo observado uma variação de 9 a 100%, muitas vezes com grandes variações dentro da mesma espécie. Torres-Escribano et al. (2011) obteve percentagens de Hg bioacessível no atum inferiores (13-19% para atum cru e 6-10% para atum cozinhado) em comparação com o presente estudo. Porém, essas diferenças não são questionáveis uma vez que estudos anteriores provaram que a bioacessibilidade de contaminantes é influenciada pelo processamento e preparação do pescado (Amiard et al., 2008; He et al., 2010). Para além disso, os modelos de digestão *in vitro* aplicados, apesar de tentarem simular as condições fisiológicas do organismo, podem revelar alterações consideráveis (por exemplo pH, tempo de permanência, enzimas, entre outros) que provocam diferenças entre os estudos (Laird et al., 2009).

Neste estudo, a refeição de “atum cru” apresentou a maior percentagem de Hg bioacessível (42%), enquanto que a refeição de “atum sem refogado” apresentou a menor (13%) bioacessibilidade. Este resultado indica que o tratamento culinário diminui o Hg bioacessível em atum. Diversos estudos têm demonstrado que a bioacessibilidade dos metais é afetada pelo tratamento culinário, principalmente devido à perda de água (Amiard et al., 2008; He et al., 2010; He & Wang, 2011). Segundo Torres-Escribano et al. (2011), o aumento da temperatura (e conseqüente perda de água) diminui a bioacessibilidade do Hg porque altera a conformação estrutural das proteínas do músculo do peixe. O Hg é reconhecido por possuir uma forte afinidade por proteínas (Ouédraogo & Amyot, 2011) portanto, estas alterações ao nível das proteínas, impedem o acesso das enzimas utilizadas no método de digestão *in vitro*. Para além disso, a desnaturação das proteínas das fibras musculares leva ao encolhimento do tecido e à formação de frações mais duras e compactas, o que torna as proteínas menos digeríveis e os seus componentes menos bioacessíveis (Kulp et al., 2003).

Para além dos resultados já discutidos, verificou-se ainda que a adição de outros ingredientes promoveu a percentagem de Hg bioacessível da refeição, embora nunca ultrapassando a percentagem de Hg bioacessível na refeição de “atum cru”. Relativamente a estes resultados, não existiram diferenças significativas na % bioacessível de Hg em refeições com diferentes ingredientes (batata, brócolos ou arroz de tomate), com exceção do “atum com refogado” que apresentou uma % de Hg bioacessível menor (22%) quando comparada com as refeições com outros ingredientes. Muito provavelmente os ingredientes adicionados possuem propriedades que potenciam a bioacessibilidade do Hg. Porém, ainda não foram realizados estudos que demonstrem essa capacidade. Um estudo anterior mostrou que alguns alimentos ricos em fitoquímicos e polifenóis (por exemplo, chá verde, extrato de chá preto, proteína de soja e farelo de trigo) podem reduzir significativamente a bioacessibilidade do Hg (Shim et al., 2009; Girard et al., 2018). Isso acontece porque esses alimentos possuem catequinas, teaflavinas e flavonoides (polifenóis antioxidantes) em abundância, que têm demonstrado ser bons quelantes naturais e sequestradores de metais, formando complexos insolúveis com o Hg e reduzindo assim a sua bioacessibilidade (Shim et al. 2009). Deste modo, a refeição de “atum com brócolos” deveria ter apresentado uma menor percentagem de Hg bioacessível, uma vez que o brócolo é um ingrediente muito rico em fitoquímicos (Renaud et al., 2014). No entanto, tal não se verificou, provavelmente porque a interação do Hg com os polifenóis pode ter sido interrompida por outros constituintes, como aconteceu num estudo realizado com sumo de toranja (Shim et al., 2009).

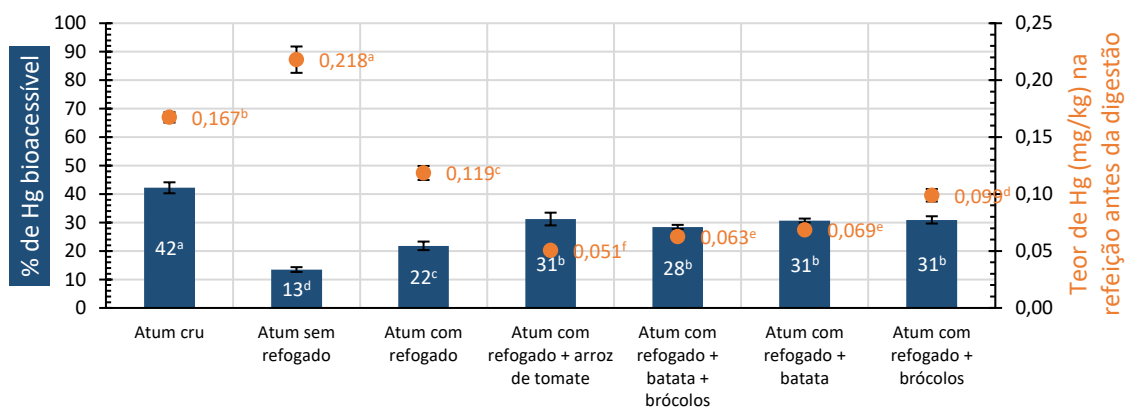


Figura 4.1 - Relação entre o teor de Hg (mg/kg) das refeições de atum antes da digestão e a % de Hg bioacessível.

A análise da figura 4.1 é importante na compreensão da importância do estudo da bioacessibilidade.

No caso do “atum sem refogado”, apesar desta refeição ter apresentado o teor de Hg mais elevado (0,218 mg/kg), foi a refeição que obteve uma menor percentagem bioacessível (13%). Por sua vez, a refeição “atum com refogado + arroz de tomate”, apesar de ter tido o menor teor de Hg (0,051 mg/kg), apresentou uma das maiores percentagens bioacessíveis (31%). Estes resultados permitem verificar que uma maior percentagem de bioacessibilidade nem sempre se traduz numa maior quantidade disponível para absorção (neste caso 13% de 0,218 mg/kg é maior do que 31% de 0,051 mg/kg).

Pelos dados obtidos, verificou-se que a percentagem de Hg bioacessível (após a digestão) foi independente do teor de Hg inicial na refeição (antes da digestão). Estudos anteriores também demonstraram não existir correlação entre a bioacessibilidade do Hg e a sua concentração inicial (Laird et al., 2009; He & Wang, 2011). Assim, de forma a melhorar a avaliação de risco associado à exposição a contaminantes através do consumo de pescado, deveriam ser feitos estudos de bioacessibilidade específicos, para diminuir a atual sobrestimação do risco e aproximar-se da realidade.

4.2.2. Cádmio

Os resultados obtidos relativamente à percentagem de cádmio (Cd) bioacessível e ao teor de Cd presente nas refeições de sapateira após a digestão (calculado a partir das percentagens bioacessíveis) encontram-se na tabela 4.4. Os resultados da análise estatística podem ser consultados no anexo 11.

Tabela 4.4 – Percentagem de Cd bioacessível (%) e teores de Cd (mg/kg) nas refeições completas de sapateira após digestão.

Refeição	% de Cd bioacessível	Teor de Cd na refeição completa depois da digestão (mg/kg)
Sapateira simples	98,0 ± 5,6 ^a	9,242 ± 0,935 ^a
Sapateira recheada	98,8 ± 3,9 ^a	4,420 ± 0,170 ^b

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Cd ($p < 0,05$) entre cada refeição.

Como se pode constatar pela tabela 4.4 não existiram diferenças significativas nas percentagens de Cd bioacessível das diferentes refeições. As percentagens foram muito elevadas ($\geq 98\%$), o que é um resultado muito preocupante, pois significa que praticamente todo o Cd presente nas refeições fica disponível para absorção pelo organismo.

Maulvault et al. (2011) também obteve elevadas percentagens de Cd bioacessível em sapateiras cruas (95%) e cozidas (84%), justificando os altos valores pelas características nutricionais e estruturais do hepatopâncreas pois, tratando-se de um tecido muito macio, líquido e gorduroso, permite uma maior área de contacto com os sucos digestivos.

Amiard et al. (2008) averiguou a bioacessibilidade do Cd em diferentes tipos de pescado e constatou que esta difere de espécie para espécie (20% em vieiras, 36% no mexilhão verde, 48% em amêijoas, 68% em ostras e 72% em búzios). Uma justificação para a diferença de valores em comparação com o presente estudo pode estar nas características específicas das matrizes. Além disso, os modelos de digestão *in vitro* estáticos podem introduzir alterações (por exemplo pH, tempo de permanência, enzimas, entre outros) que provocam diferenças entre os estudos (Laird et al., 2009).

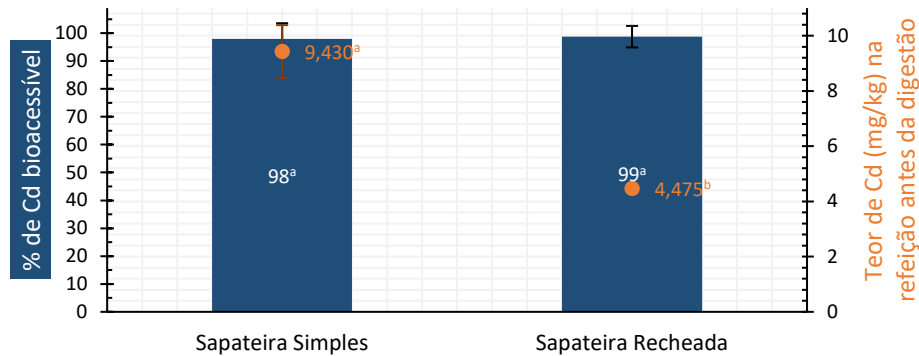


Figura 4.2 - Relação entre o teor de Cd (mg/kg) nas refeições de sapateira antes da digestão e a % de Cd bioacessível.

Pela análise da figura 4.2 é possível verificar que as percentagens de Cd bioacessível foram muito elevadas (98% na sapateira simples e 99% na sapateira recheada), não existindo diferenças significativas entre as refeições. Desta forma, a ingestão de outros ingredientes com o hepatopâncreas da sapateira não interferiu na bioacessibilidade do Cd, pois apesar de ter havido um aumento de 1%, esse valor não foi significativo.

Apesar de ambas as refeições terem apresentado uma percentagem bioacessível elevada, a refeição de “sapateira simples” representa um maior risco para os consumidores uma vez que o seu teor de Cd (9,430 mg/kg) foi bastante superior ao da “sapateira recheada” (4,475 mg/kg).

4.3. Análise de risco

O pescado é uma das principais fontes de exposição alimentar a determinados contaminantes, podendo representar um risco para o ser humano (Al-Saleh et al., 2017).

Como já foi referido, o mercúrio e o cádmio são elementos tóxicos comumente encontrados nas espécies de atum (*Thunnus* spp.) e sapateira (*Cancer paguros*), respetivamente (Peterson et al., 1973; Overnell, 1986), o que leva a um aumento da preocupação ao nível da segurança alimentar, por se tratarem de espécies muito consumidas entre a população.

O cuidado com a saúde e o bem-estar tem tido um grande destaque a nível mundial pelo que, no sentido de se salvaguardar a saúde pública, têm sido estabelecidos limites máximos permitidos para a presença de diversos contaminantes no pescado, bem como recomendações de ingestão toleráveis (CE, 2006; EFSA, 2011; EFSA, 2012b).

Os teores máximos de Hg permitidos pela Comissão Europeia variam consoante as espécies sendo que, para o atum, o teor máximo de Hg permitido é de 1,0 mg/kg de peso fresco e para a

sapateira, o teor máximo de Cd permitido é de 0,50 mg/kg de peso fresco para o músculo (CE, 2006). Relativamente aos limites de ingestão semanal tolerável provisional (PTWI), estes valores variam consoante o contaminante, sendo, segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, 4 µg/kg de peso corporal no caso do Hg inorgânico, 1,3 µg/kg de peso corporal no caso do MeHg e 2,5 µg/kg de peso corporal no caso do Cd (EFSA, 2011; EFSA, 2012b). Para além destes, o Comité Científico de especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) definiu também um limite de ingestão mensal tolerável provisional (PTMI) para o Cd com o intuito de refletir a sua longa permanência no organismo humano. O valor de PTMI estabelecido é de 25 µg/kg de peso corporal (WHO, 2013).

Desta forma, a análise de risco associada ao consumo de atum e de sapateira foi feita tendo em conta os valores de ingestão semanal tolerável provisional (PTWI) dos dois contaminantes e o valor de ingestão mensal tolerável provisional (PTMI) do Cd. Nas refeições de atum, para além de se ter feito a análise de risco para o PTWI do Hg inorgânico (4,0 µg/kg de peso corporal), considerou-se também o pior dos cenários, isto é, considerou-se que todo o mercúrio estava na forma de MeHg (PTWI de 1,3 µg/kg de peso corporal), uma vez que o metilmercúrio pode constituir mais de 90% do mercúrio total presente no peixe (CE, 2006).

A avaliação do risco de exposição humana aos contaminantes presentes nas refeições depende de diversos fatores como o teor de contaminante na refeição, a quantidade de refeição ingerida e o peso corporal da população em estudo (Jardim & Caldas, 2009). Desta forma foram utilizados valores padrão de peso corporal médio da população europeia para crianças dos 3-10 anos (23 kg), adolescentes dos 10-14 anos (43 kg), mulheres grávidas dos 18-35 anos (55 kg) e adultos saudáveis com mais de 18 anos (70 kg) (EFSA, 2012a). As quantidades máximas de contaminante que podem ser ingeridas por cada indivíduo podem ser consultadas na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Quantidades máximas de Hg, MeHg e Cd que podem ser ingeridas considerando crianças de 23 kg, adolescentes de 43 kg, mulheres grávidas de 55 kg e adultos saudáveis de 70 kg (EFSA, 2012a). Os teores máximos foram calculados segundo os valores de PTWI e PTMI estabelecidos pelas entidades reguladoras.

Grupo etário	Teor máximo de Hg inorgânico que pode ingerir (µg)	Teor máximo de MeHg que pode ingerir (µg)	Teor máximo de Cd que pode ingerir (µg)	
	Por semana ¹	Por semana ²	Por semana ³	Por mês ⁴
Criança (3-10 anos)	92	29,9	57,5	575
Adolescente (10-14 anos)	172	55,9	107,5	1075
Mulher grávida (18-35 anos)	220	71,5	137,5	1375
Adulto (+18 anos)	280	91	175	1750

¹ PTWI (Hg) = 4 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2012b)

² PTWI (MeHg) = 1,3 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2012b)

³ PTWI (Cd) = 2,5 µg/kg de peso corporal (EFSA, 2011)

⁴ PTMI (Cd) = 25 µg/kg de peso corporal (WHO, 2013)

Como é possível observar na tabela 4.5, as crianças apresentam uma maior vulnerabilidade ao risco comparativamente com os demais grupos etários. Isto deve-se ao facto de possuírem um menor peso corporal. Assim, ao estarem expostas à mesma quantidade de refeição com a mesma quantidade de contaminante, o teor máximo de contaminante que podem ingerir é menor, logo a probabilidade de estarem em risco é elevada.

Não existe um PTWI ou um PTMI específico para crianças ou mulheres grávidas pelo que são utilizados os mesmos valores em todos os grupos etários. Desta forma, o teor máximo de contaminante que as grávidas podem ingerir é superior ao das crianças e dos adolescentes em todos os casos. Contudo, durante a gestação, é muito importante reduzir o consumo de refeições contaminadas, principalmente com o Hg, uma vez que este, em excesso, pode provocar danos graves no sistema neurológico e no desenvolvimento cognitivo do bebé (Holmes et al., 2009; Bernhoft, 2012). Desta forma, as mulheres grávidas são também um dos grupos mais vulneráveis à presença de contaminantes no organismo.

4.3.1. Análise de risco associado ao consumo de atum

A análise de risco das refeições de atum foi feita para um consumo recomendável de duas porções semanais de pescado (equivalente a 300 g) (EFSA, 2015) para todos os grupos etários. Assim, calculou-se para cada uma das refeições, a quantidade total de refeição completa que continha 300 g de atum. Esse cálculo foi feito tendo em conta a proporção de atum em cada refeição (tabela 3.1 do capítulo materiais e métodos). A tabela 4.6 refere-se ao teor de Hg presente nas duas refeições semanais antes e depois da digestão. Os resultados da análise estatística podem ser consultados no anexo 12.

Tabela 4.6 – Teor de Hg (μg) em 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão.

Refeição*	Teor de Hg (μg) em 2 refeições semanais	
	Antes da digestão	Depois da digestão**
Atum cru (300 g)	50,201 \pm 1,354 ^c	21,185 \pm 0,572 ^a
Atum sem refogado (300 g)	65,402 \pm 3,472 ^{ab}	8,816 \pm 0,468 ^e
Atum com refogado (580 g)	68,772 \pm 3,555 ^a	14,998 \pm 0,775 ^d
Atum com refogado + arroz de tomate (1021 g)	51,675 \pm 1,483 ^c	16,140 \pm 0,463 ^{cd}
Atum com refogado + batata + brócolos (910 g)	57,012 \pm 0,005 ^{bc}	16,217 \pm 0,002 ^{cd}
Atum com refogado + batata (857 g)	58,770 \pm 1,147 ^{abc}	18,044 \pm 0,352 ^{bc}
Atum com refogado + brócolos (634 g)	62,711 \pm 3,473 ^{ab}	19,395 \pm 1,074 ^{ab}

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Hg ($p < 0,05$) entre cada refeição.

*Todas as refeições completas incluem 300 g de atum (cálculo feito com base nas percentagens de atum presente em cada refeição – tabela 3.1 do capítulo materiais e métodos).

**O teor de Hg depois da digestão foi calculado através da média das percentagens de Hg bioacessível das refeições completas (tabela 4.3).

Como é possível observar na tabela 4.6, os teores de Hg após a digestão são bastante inferiores aos inicialmente presentes nas refeições uma vez que nem todo o Hg fica disponível para absorção no organismo. Quanto maior é o teor de Hg numa refeição, maior a probabilidade de um determinado grupo etário se encontrar em risco. Assim, seria de esperar que a avaliação do risco antes da digestão apresentasse níveis mais preocupantes.

Desta forma foi calculada a percentagem de aproximação ao limite de PTWI antes e depois da digestão com o intuito de verificar se algum dos grupos etários estaria em risco ao ingerir as quantidades recomendáveis. A figura 4.3 diz respeito às percentagens de PTWI do mercúrio inorgânico (PTWI de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) enquanto a figura 4.4 se traduz no pior dos cenários possíveis, considerando o PTWI para o mercúrio quando se encontra na forma de metilmercúrio (PTWI de 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal).

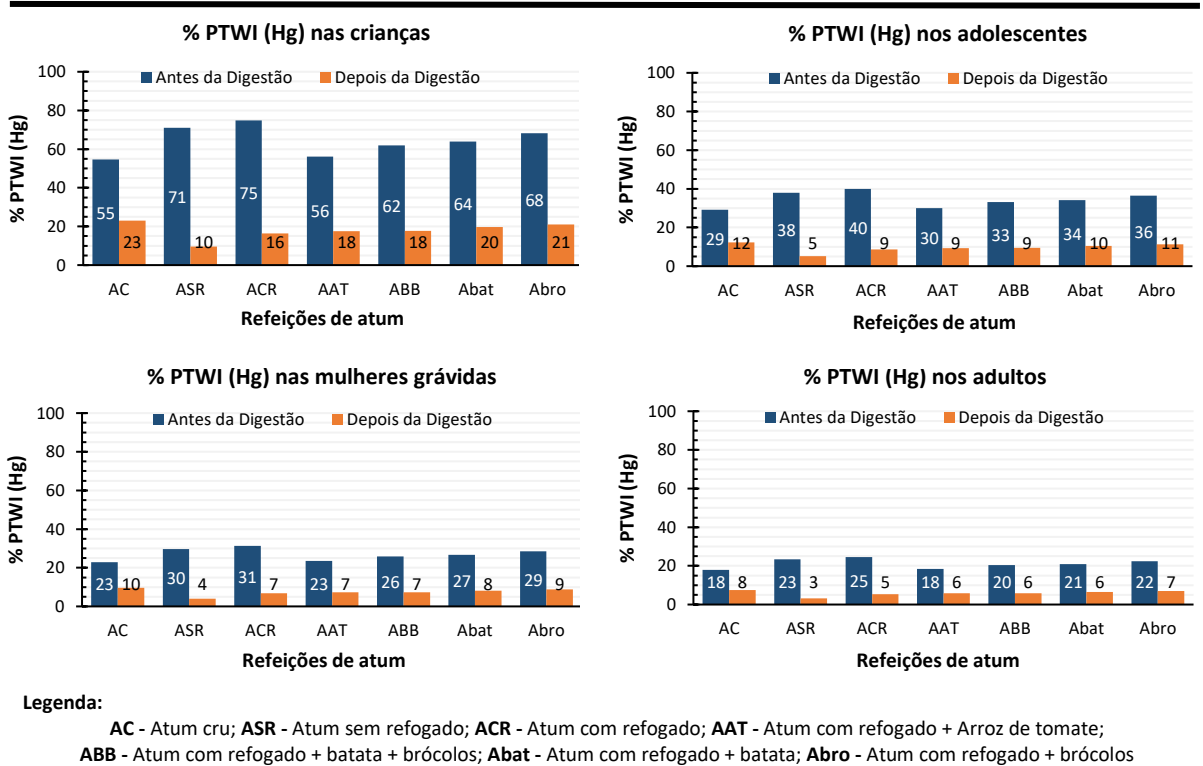


Figura 4.3 – Percentagens do limite de PTWI (Hg inorgânico) para o consumo de 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg.

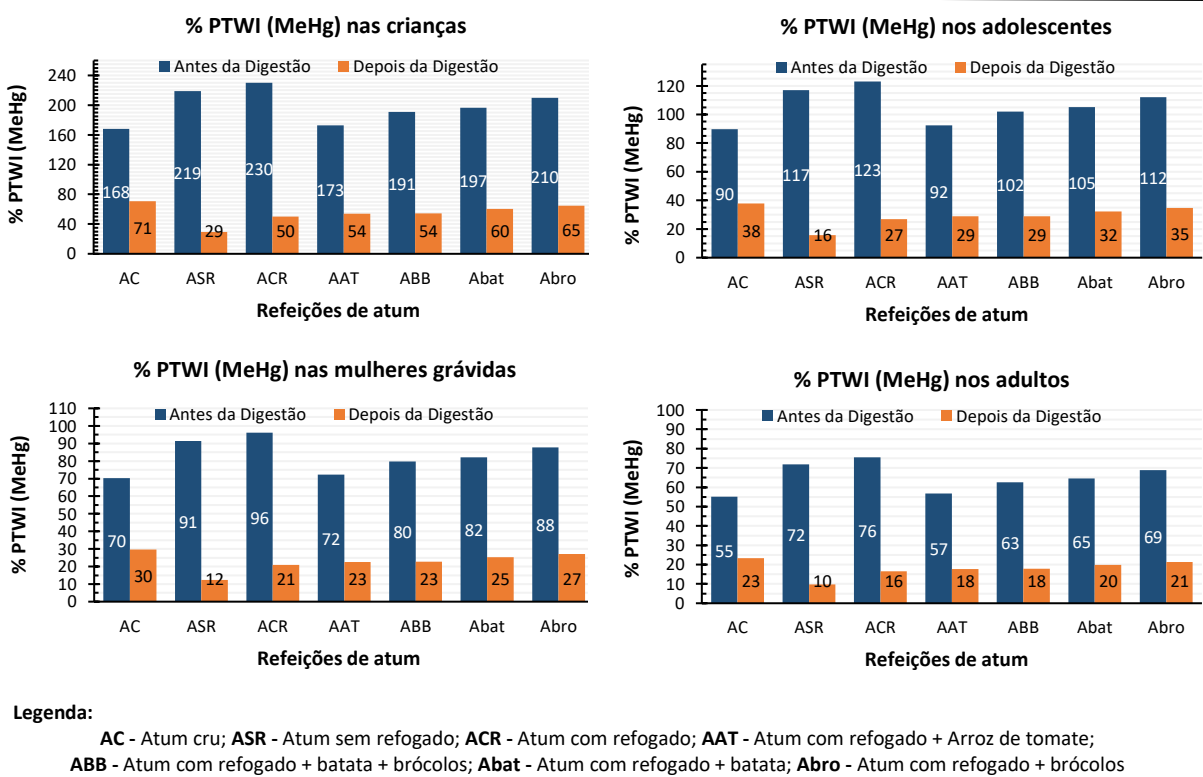


Figura 4.4 – Percentagens do limite de PTWI (MeHg) para o consumo de 2 refeições de atum semanais antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg.

Como é possível observar pela figura 4.3 o limite de PTWI (Hg inorgânico) (100%) não foi ultrapassado em nenhum grupo etário, o que significa que a ingestão de 300 g /semana do atum analisado não representaria um risco potencial para o ser humano. De facto, as crianças foram o grupo etário mais vulnerável pois apresentaram percentagens superiores, chegando inclusive a ultrapassar os 50%. Contudo, essas percentagens (55-75%) referiam-se ao teor de Hg antes da digestão, o que é uma sobreestimação para o estudo uma vez que o mais importante são os resultados após a digestão que dizem respeito ao Hg disponível para absorção no organismo.

Quanto às percentagens do limite de PTWI (Hg inorgânico) depois da digestão foram muito reduzidas (10-23% nas crianças; 5-12% nos adolescentes; 4-10% nas mulheres grávidas; 3-8% nos adultos), verificando-se as maiores percentagens nas refeições de “atum cru” e de “atum com refogado + brócolos”.

A figura 4.4 representou o pior cenário possível uma vez que se considerou que todo o Hg se encontrava na forma de MeHg. Como é possível observar pela figura 4.4 os valores de ingestão semanal de mercúrio foram bastante elevados antes da digestão, ultrapassando, inclusive, o valor de PTWI (100%), o que significa um potencial risco para o consumidor. Contudo, os resultados mais importantes são os obtidos depois da digestão que dizem respeito ao Hg disponível para absorção no organismo. Estes últimos resultados, embora díspares entre as diferentes populações (29-71% nas crianças; 16-38% nos adolescentes; 12-30% nas mulheres grávidas; 10-23% nos adultos), encontraram-se abaixo do limite de PTWI (MeHg) (100%), o que significa que não existia um risco potencial para o consumidor.

Como não se observou um risco acrescido no consumo das refeições analisadas foi determinado o número máximo de refeições que o consumidor poderia fazer até atingir o risco de exposição ao Hg inorgânico e ao MeHg (tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Número máximo de 2 refeições semanais de atum que os diferentes grupos etários podem consumir até atingir o risco (tendo em conta o teor de Hg bioacessível após a digestão).

Refeição	Criança (3-10 anos)		Adolescente (10-14 anos)		Mulher grávida (18-35 anos)		Adulto (+18 anos)	
	Número máximo de refeições semanais até atingir o risco							
	Hg	MeHg	Hg	MeHg	Hg	MeHg	Hg	MeHg
Atum cru (300 g)	4	1	8	3	10	3	13	4
Atum sem refogado (300 g)	10	3	20	6	25	8	32	10
Atum com refogado (580 g)	6	2	11	4	15	5	19	6
Atum com refogado + arroz de tomate (1021 g)	6	2	11	3	14	4	17	6
Atum com refogado + batata + brócolos (910 g)	6	2	11	3	14	4	17	6
Atum com refogado + batata (857 g)	5	2	10	3	12	4	16	5
Atum com refogado + brócolos (634 g)	5	2	9	3	11	4	14	5

Com base nos resultados apresentados na tabela 4.7 é possível ter uma percepção de quantas refeições semanais um determinado grupo etário pode fazer sem exceder o limite de ingestão semanal tolerável do Hg inorgânico (4 µg/kg de peso corporal) e do MeHg (1,3 µg/kg de peso corporal).

A refeição de “atum sem refogado” é a refeição que pode ser mais vezes consumida, isto porque foi a que apresentou um menor teor de Hg após a digestão. Por sua vez, a refeição de “atum cru” é a que menos deve ser consumida por ter sido a que apresentou um maior teor de Hg após a digestão.

Atendendo a estes valores, pode-se concluir que o risco de exposição ao Hg associado ao consumo de atum é reduzido já que as quantidades máximas de refeições semanais obtidas são superiores ao que normalmente uma pessoa consome. Contudo, um consumo descuidado pode potenciar os riscos para a saúde do consumidor menos atento, principalmente para refeições de “atum cru” e “atum com refogado + brócolos”. No caso das crianças e das grávidas é necessária uma atenção redobrada por se tratarem de grupos mais vulneráveis à exposição a este contaminante.

4.3.2. Análise de risco associado ao consumo de sapateira

A análise de risco de exposição a Cd associada ao consumo de refeições de sapateira foi feita para um consumo de 50 g semanais (Maulvault et al., 2011) para todos os grupos etários. A tabela 4.8 refere-se ao teor de Cd presente nas refeições completas antes e depois da digestão. Os resultados da análise estatística podem ser consultados no anexo 13.

Tabela 4.8 – Teor de Cd (µg) em 50 g de refeição semanal de sapateira antes e depois da digestão.

Refeição	Teor de Cd (µg) em 50 g de refeição	
	Antes da digestão	Depois da digestão*
Sapateira simples	471,479 ± 47,702 ^a	462,121 ± 46,755 ^a
Sapateira recheada	223,766 ± 8,619 ^b	221,000 ± 8,512 ^b

- Diferentes letras representam a existência de diferenças significativas no teor de Cd ($p < 0,05$) entre cada refeição.

*O teor de Cd depois da digestão foi calculado através da média das percentagens de Cd bioacessível das refeições completas de sapateira (tabela 4.4).

Como é possível observar na tabela 4.8, os teores de Cd após a digestão são bastante idênticos aos inicialmente presentes nas refeições, uma vez que a percentagem de Cd bioacessível foi muito elevada em ambas as refeições.

De seguida, foi calculada a percentagem de aproximação ao limite de PTWI antes e depois da digestão com o intuito de verificar se algum dos grupos etários estaria em risco ao ingerir a quantidade de 50 g de refeição de sapateira (tabela 4.9).

Tabela 4.9 - Percentagem do limite de PTWI ou PTMI para o consumo de 50 g de refeição de sapateira semanal e mensal, respetivamente, antes e depois da digestão nas diferentes populações: crianças dos 3-10 anos de 12 kg; adolescentes dos 10-14 anos de 43 kg; mulheres grávidas dos 18-35 anos de 55 kg; e adultos com +18 anos de 70 kg.

Refeição		Criança (3-10 anos)	Adolescente (10-14 anos)	Mulher grávida (18-35 anos)	Adulto (+18 anos)
	Consumo de 50 g semanais (PTWI)				
Sapateira simples	Antes da digestão	820%	439%	343%	269%
	Depois da digestão	804%	430%	336%	264%
Sapateira recheada	Antes da digestão	389%	208%	163%	128%
	Depois da digestão	384%	206%	161%	126%
Consumo de 50 g mensais (PTMI)					
Sapateira simples	Antes da digestão	82%	44%	34%	27%
	Depois da digestão	80%	43%	34%	26%
Sapateira recheada	Antes da digestão	39%	21%	16%	13%
	Depois da digestão	38%	21%	16%	13%

Como é possível observar na tabela 4.9, o consumo de 50 g semanais constitui um risco para todos os grupos etários uma vez que o limite PTWI foi ultrapassado em todas as refeições (> 100%). As crianças foram o grupo etário mais vulnerável, ultrapassando o limite de ingestão cerca de 8 vezes no caso da “sapateira simples” e 4 vezes no caso da “sapateira recheada”.

Nesta avaliação de risco, as percentagens de PTWI das refeições de sapateira “antes da digestão” e “depois da digestão” não variaram muito entre si uma vez que as percentagens de Cd bioacessível foram bastante elevadas, o que significa que praticamente todo o Cd se encontrava disponível para absorção pelo organismo.

Apesar do consumo das 50 g de refeição semanal representar um risco para qualquer consumidor, o mesmo não se verificou para um consumo de 50 g mensais. Neste último caso, como é possível observar na tabela 4.9, a percentagem de PTMI não foi ultrapassada em nenhum grupo etário, encontrando-se na maioria das refeições abaixo dos 50%, com exceção da refeição “sapateira simples” nas crianças (80%).

Como se observou um risco à exposição ao Cd através do consumo das refeições de sapateira analisadas, foi determinada a quantidade máxima de refeição de sapateira (g) que o consumidor poderia ingerir até atingir o PTWI e o PTMI de exposição ao Cd (tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Quantidades máximas de refeições semanais e mensais de sapateira (g) que os diferentes grupos etários podem ingerir até atingir o PTWI ou PTMI.

Refeição	Criança (3-10 anos)	Adolescente (10-14 anos)	Mulher grávida (18-35 anos)	Adulto (+18 anos)
	Quantidade máxima de refeição semanal (g) até atingir o risco (PTWI)			
Sapateira simples	6	12	15	19
Sapateira recheada	13	24	31	40
Quantidade máxima de refeição mensal (g) até atingir o risco (PTMI)				
Sapateira simples	62	116	149	189
Sapateira recheada	130	243	311	396

Com base nos resultados apresentados na tabela 4.10 compreende-se que o consumo de “sapateira recheada” representa um menor risco para os consumidores do que a “sapateira simples”, pois o teor de Cd por quilo de refeição é menor na refeição de “sapateira recheada”. Contudo, ambas as refeições devem ser ingeridas com muita moderação, principalmente se se tratar de um consumo semanal, já que a probabilidade de atingir o PTWI é muito elevada.

Assim, pode-se concluir que a ingestão de hepatopâncreas de sapateira (com ou sem recheio) pode trazer riscos para a saúde dos consumidores, pelo que é importante limitar o consumo deste tipo de alimento.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Em resposta à necessidade de assegurar uma vida mais saudável, o pescado tem vindo a ganhar um enorme destaque e preferência dos consumidores, sendo atualmente um dos alimentos mais consumidos no mundo, particularmente em Portugal.

Considerado um alimento essencial numa alimentação saudável e equilibrada, o pescado possui um alto valor nutricional, não só por ser uma fonte de proteínas de elevado valor biológico, como também por possuir vitaminas, minerais e ácidos gordos essenciais (ómega-3). Contudo, este alimento pode também acumular elementos tóxicos que resultam em intoxicações alimentares ou enfermidades a longo prazo.

No presente estudo foi possível verificar que os elementos tóxicos Hg e Cd provenientes de determinadas espécies de pescado (Hg em *Thunnus* spp. e Cd em *Cancer paguros*) são afetados pelo tratamento culinário e pela presença de outros ingredientes numa refeição completa.

Relativamente às refeições de atum, constatou-se que o tratamento culinário tem influência nos teores de Hg, uma vez que se confirmou um aumento da concentração de Hg em amostras cozidas. Contudo, a adição de outros ingredientes promoveu a diminuição do teor de Hg disponível por quilo de refeição. O contacto do atum com outros ingredientes (refogado, arroz de tomate, batata e brócolos) também pareceu promover uma redução do teor de Hg no atum. No entanto, estudos mais específicos e detalhados devem ser feitos para comprovar esta evidência.

Quanto ao estudo da bioacessibilidade do Hg em amostras de atum, constatou-se que o tratamento culinário diminui a percentagem de Hg bioacessível. Todavia, a adição dos restantes ingredientes às refeições promoveu a bioacessibilidade deste contaminante, não chegando em nenhum caso a ultrapassar a percentagem de Hg bioacessível do atum cru.

A concentração máxima de Hg permitida na União Europeia (1,0 mg/kg de peso fresco) não foi excedida para o atum, não se tendo verificado qualquer risco nos grupos etários estudados (crianças dos 3-10 anos; adolescentes dos 10-14 anos; mulheres grávidas dos 18-35 anos; e adultos com +18 anos). Contudo, o facto dos limites estabelecidos pelas autoridades não serem excedidos não deve ser interpretado como ausência total de risco, uma vez que ainda existem incertezas relativas à avaliação toxicológica dos contaminantes, como por exemplo a existência de efeitos sinérgicos ou antagonísticos por parte de outros contaminantes, nutrientes ou flora microbiana, que devem ser tidos em consideração. Para além disso é de salientar que as amostras de atum analisadas continham teores reduzidos de Hg, logo a percentagem de risco foi baixa, o que não significa que aconteça o mesmo com outras espécies de atum com teores mais elevados.

Quanto às refeições de sapateira, verificou-se que a adição de outros ingredientes levou a uma diminuição do teor de Cd por quilo de refeição. Porém os ingredientes não interferiram na percentagem de Cd bioacessível, tendo-se obtido percentagens muito elevadas ($\geq 98\%$) para a matriz em estudo (hepatopâncreas de sapateira).

A concentração máxima de Cd permitida na União Europeia (0,50 mg/kg de peso fresco para o músculo) foi largamente excedida nas amostras de sapateira analisadas, tendo-se verificado um risco de exposição ao Cd através do consumo de 50 g semanais para toda a população. Por outro lado, o consumo de 50 g mensais não demonstrou ser um risco para a população, apesar das crianças serem o grupo mais vulnerável à exposição do Cd.

Face aos resultados obtidos, é possível concluir que a constante monitorização dos teores de contaminantes no pescado e uma avaliação de risco que seja mais realista é imprescindível para a garantia de um elevado nível de segurança alimentar. Assim, é necessário desenvolver ferramentas capazes de quantificar a toxicidade, bioacessibilidade e absorção dos diferentes elementos tóxicos nos produtos alimentícios. Ressalva-se ainda a importância de uma comunicação contínua que promova a consciencialização sobre os riscos e benefícios associados ao consumo de pescado na saúde e segurança do consumidor.

6. Bibliografia

- Afonso, C. (2009). *Produtos da Pesca capturados na costa portuguesa: Benefícios e Perigos associados ao seu consumo* (Doutoramento em Farmácia). Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Coelho, I., Castanheira, I., & Lourenço, H. et al. (2018). Bioaccessibility in risk-benefit analysis of raw and cooked seabream consumption. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 68, 118-127. doi: 10.1016/j.jfca.2016.10.003.
- Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Oliveira, R., Lourenço, H., & Viula, A. et al. (2015). Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus* spp.) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. *Environmental Research*, 143, 130-137. doi: 10.1016/j.envres.2015.04.019.
- Almeida, C. (2014). *Seafood consumption in Portugal: Patterns, drivers and sustainability* (Thesis for the degree in Doctor of Sea Sciences). Faculty of Sciences of the University of Lisbon.
- Al-Saleh, I., Al-Rouqi, R., Elkhatib, R., Abduljabbar, M., & Al-Rajudi, T. (2017). Risk assessment of environmental exposure to heavy metals in mothers and their respective infants. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health*, 220(8), 1252-1278. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.07.010.
- Alves, R., Maulvault, A., Barbosa, V., Cunha, S., Kwadijk, C., & Álvarez-Muñoz, D. et al. (2017a). Preliminary assessment on the bioaccessibility of contaminants of emerging concern in raw and cooked seafood. *Food And Chemical Toxicology*, 104, 69-78. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.029.
- Alves, R., Maulvault, A., Barbosa, V., Fernandez-Tejedor, M., Tediosi, A., & Kotterman, M. et al. (2017b). Oral bioaccessibility of toxic and essential elements in raw and cooked commercial seafood species available in European markets. *Food Chemistry*. In Press. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.045.
- Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P., & Wang, W. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food And Chemical Toxicology*, 46(6), 2010-2022. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.041.
- Angeletti, R., Binato, G., Guidotti, M., Morelli, S., Pastorelli, A., & Sagratella, E. et al. (2014). Cadmium bioaccumulation in Mediterranean spider crab (*Maya squinado*): Human consumption and health implications for exposure in Italian population. *Chemosphere*, 100, 83-88. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.12.056.
- Bandarra, N., Calhau, M., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M., & Bártolo, H. et al. (2018). *Composição Química e Nutricional do Pescado*. Consultado a 16/08/2018, Disponível em <https://www.ipma.pt/resources/www/docs/publicacoes.site/pescado/inicio.htm>.
- Barrento, S. (2010). *Nutritional quality and physiological responses to transport and storage of live crustaceans traded in Portugal* (Tese de Doutoramento em Ciências Animal - Especialidade Nutrição). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Berlin: Springer.
- Bernardo, I. (2017). *Avaliação de riscos e benefícios da população portuguesa, crianças em idade pré-escolar e adultos, associados ao consumo de espécies de peixe alvo* (Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Bernhoft, R. (2012). Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental And Public Health*, 2012, 1-10. doi: 10.1155/2012/460508.
- Bloom, N. (1992). On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. *Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences*, 49(5), 1010-1017. doi: 10.1139/f92-113.
- Burger, J., Dixon, C., Boring, S., & Gochfeld, M. (2003). Effect of Deep-Frying Fish on Risk from Mercury. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A*, 66(9), 817-828. doi: 10.1080/15287390306382.
- Cabañero, A., Madrid, Y., & Cámara, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526(1), 51-61. doi: 10.1016/j.aca.2004.09.039.

- Castro-González, M., & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 26(3), 263-271. doi: 10.1016/j.etap.2008.06.001.
- CE. (2006). Commission Regulation 1881/2006 of 19 December setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 364: 5-24.
- Celik, U., Cakli, S., & Oehlenschlager, J. (2004). Determination of the lead and cadmium burden in some northeastern Atlantic and Mediterranean fish species by DPSAV. *European Food Research and Technology*, 218(3), 298-305. doi: 10.1007/s00217-003-0840-y.
- CEN. (2003). European Standard EN 14084. *Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion*. CEN-European Committee for Standardization, 16 p.
- Ciência Viva. (2014). As espécies mais populares do MAR de Portugal: Num restaurante perto de si. Consultado a 15/08/2018, Disponível em <http://www.cienciaviva.pt/peixes>.
- Collette, B., & Nauen, C. (1983). *Scombrids of the world*. Rome: United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Costa, L. (2013). *O Atum em Portugal de 1896 a 2011: Contributos para a sua história ambiental, ecológica e económica* (Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Gestão Ambiental). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal e Centro de Oceanografia.
- Custódio, A. (2014). *Efeito da Temperatura na Bioacumulação e Eliminação do Metilmercúrio em Robalo (Dicentrarchus labrax)* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- DGPA. (2007). *Plano Estratégico Nacional para a Pesca 2007-2013*. Lisboa: MADRP - Direção Geral das Pescas e Aquicultura. Consultado a 11/04/2018, Disponível em http://www.promar.gov.pt/Download/PROMAR/PEN_Pesca.pdf.
- Dias, M. (2012). *Qualidade sensorial de peixes de aquacultura vs peixes capturados no mar* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Segurança e Qualidade Alimentar em Restauração). Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril.
- Doldo, E., Costanza, G., Agostinelli, S., Tarquini, C., Ferlosio, A., & Arcuri, G. et al. (2015). Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *Biomed Research International*, 2015, 1-14. doi: 10.1155/2015/624627.
- EFSA. (2011). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, 9(2), 1975. doi: 10.2903/j.efsa.2011.1975.
- EFSA. (2012a). Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal*, 10(3), 2579. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2579.
- EFSA. (2012b). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 10(12). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2985.
- EFSA. (2012c). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA Journal*, 10(7). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2815.
- EFSA. (2015). Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal*, 13(1), 3982. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3982.
- Erkkilä, A., Schwab, U., Lehto, S., de Mello, V., Kangas, A., & Soininen, P. et al. (2014). Effect of fatty and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: A controlled trial. *Journal Of Clinical Lipidology*, 8(1), 126-133. doi: 10.1016/j.jacl.2013.09.007.
- EUMOFA. (2017). *The EU Fish Market*. EUMOFA, European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products.
- Fabian, C., Kimler, B., & Hursting, S. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research*, 17(1). doi: 10.1186/s13058-015-0571-6.

- Falconer, C., Davies, I., & Topping, G. (1986). Cadmium in edible crabs (*Cancer pagurus* L.) from Scottish coastal waters. *Science Of The Total Environment*, 54, 173-183. doi: 10.1016/0048-9697(86)90263-9.
- Ferraz de Arruda, L., Martins, P., Silva, A., Moraes, J., Vaz-Pires, P., Ozório, R., & Oetterer, M. (2011). O Setor Pesqueiro em Portugal - Relato de Caso. *Boletim Do Instituto De Pesca*, vol. 37(2), 199-207.
- Ferreira, M. (2014). *Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta* (Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Animal.
- Fleming, L., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., & Knap, A. et al. (2006). Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 53(10-12), 545-560. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.08.012.
- FiB. (2009). Propriedades funcionais das proteínas do peixe. *Food Ingredients Brasil - Edição Nº 8*. Consultado a 11/04/2018, Disponível em <http://revista-fi.com.br/edicoes/8/fib-edicao-8>.
- Girard, C., Charette, T., Leclerc, M., Shapiro, B., & Amyot, M. (2018). Cooking and co-ingested polyphenols reduce in vitro methylmercury bioaccessibility from fish and may alter exposure in humans. *Science Of The Total Environment*, 616-617, 863-874. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.236.
- Goyer, R., & Clarkson, T. (1996). Toxic Effects of Metals. Em L. Casarett, C. Klaassen, M. Amdur & J. Doull, *Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons* (6th ed., pp. 811-867). New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Grieb, T., Bowie, G., Driscoll, C., Gloss, S., Schofield, C., & Porcella, D. (1990). Factors affecting mercury accumulation in fish in the upper michigan peninsula. *Environmental Toxicology And Chemistry*, 9(7), 919-930. doi: 10.1002/etc.5620090710.
- Hajeb, P., Sloth, J., Shakibazadeh, S., Mahyudin, N., & Afsah-Hejri, L. (2014). Toxic Elements in Food: Occurrence, Binding, and Reduction Approaches. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 13(4), 457-472. doi: 10.1111/1541-4337.12068.
- He, M., Ke, C., & Wang, W. (2010). Effects of Cooking and Subcellular Distribution on the Bioaccessibility of Trace Elements in Two Marine Fish Species. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 58(6), 3517-3523. doi: 10.1021/jf100227n.
- Holmes, P., James, K., & Levy, L. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?. *Science Of The Total Environment*, 408(2), 171-182. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.09.043.
- Hong, Y. (2013). Aging Society and Environmental Health Challenges. *Environmental Health Perspectives*, 121(3), a68-a69. doi: 10.1289/ehp.1206334.
- Hosomi, R., Yoshida, M., & Fukunaga, K. (2012). Seafood Consumption and Components for Health. *Global Journal Of Health Science*, 4(3). doi: 10.5539/gjhs.v4n3p72.
- Hur, S., Lim, B., Decker, E., & McClements, D. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.036.
- Huss, H. (1994). *Assurance of seafood quality*. Rome: FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado a 11/04/2018, Disponível em <http://www.fao.org/docrep/003/t1768e/t1768e00.htm>.
- Huss, H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*. Rome: FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado a 11/04/2018, Disponível em <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V718-0E00.HTM>.
- IARC. (2018). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Consultado a 11/04/18, Disponível em http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/-latest_classif.php
- INE, I. P. (2017). *Estatísticas da Pesca 2016*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P.
- INE, I. P. (2018). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P.
- Jardim, A., & Caldas, E. (2009). Exposição Humana a Substâncias Químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. *Quim. Nova*, 32(7), 1898-1909.

- Kolakowska, A., & Sikorski, Z. (2003). The Role of Lipids in Food Quality. Em Z. Sikorski & A. Kolakowska, *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Boca Raton (Florida): CRC PRESS.
- Küllenberg de Gaudry, D., & Massing, U. (2014). Stellenwert von langkettigen Omega-3-Fettsäuren bei Prostatakrebs. *Der Urologe*, 53(11), 1620-1624. doi: 10.1007/s00120-014-3612-3.
- Kulp, K., Fortson, S., Knize, M., & Felton, J. (2003). An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food And Chemical Toxicology*, 41(12), 1701-1710. doi: 10.1016/s0278-6915(03)00197-2.
- Laird, B., Shade, C., Gantner, N., Chan, H., & Siciliano, S. (2009). Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. *Science Of The Total Environment*, 407(23), 6003-6008. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.08.014.
- Lansens, P., Leermakers, M., & Baeyens, W. (1991). Determination of methylmercury in fish by headspace-gas chromatography with microwave-induced-plasma detection. *Water Air & Soil Pollution*, 56(1), 103-115. doi: 10.1007/bf00342265.
- Lee, J., Sim, T., Lee, J., & Na, H. (2017). Chemopreventive and Chemotherapeutic Effects of Fish Oil derived Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Colon Carcinogenesis. *Clinical Nutrition Research*, 6(3), 147. doi: 10.7762/cnr.2017.6.3.147.
- Leitão, F., Baptista, V., Erzini, K., Iritani, D., & Zeller, D. (2014). *Reconstruction of mainland Portugal fisheries catches 1950-2010* (Working Paper). Fisheries Centre, The University of British Columbia.
- Lichtenstein, A., Appel, L., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., & Franch, H. et al. (2006). Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 114(1), 82-96. doi: 10.1161/circulationaha.106.176158.
- Lima, D., Santos, C., Silva, R., Yoshioka, E., & Bezerra, R. (2015). Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Brasil. *Acta Amazonica*, 45(4), 405-414. doi: 10.1590/1809-4392201403995.
- Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 238(3), 209-214. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.029.
- Lopes, A. (2009). *Avaliação da contaminação em metais pesados no pescado: Análise da situação do pescado comercializado em Portugal e dos alertas emitidos pelo sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.
- LPN. (2010). *Que peixe comer?*. Consultado a 10/08/2018, Disponível em <http://www.quepeixecomer.lpn.pt/>.
- Machado, R. (2011). *Bioacessibilidade do mercúrio em peixe-espada preto (Alphanopus carbo Lowe, 1839) sujeito a diferentes tratamentos culinários* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Marques, H. (2015). *Composição nutricional e risco toxicológico do pescado consumido em Portugal* (Artigo Científico de Revisão Sistemática Final). New Atlântica, University Institution of Portugal.
- Marques, A., Lourenço, H., Nunes, M., Roseiro, C., Santos, C., & Barranco, A. et al. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*, 44(2), 510-522. doi: 10.1016/j.foodres.2010.12.003.
- Matos, J. (2014). *Influência da bioacessibilidade do selênio, mercúrio e metilmercúrio na identificação do benefício/perigo associado ao consumo de Tintureira crua e cozinhada* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Maulvault, A. (2009). *Valor nutricional de algumas espécies consumidas em Portugal* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha - Especialização em Aquacultura e Pescas). Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve.
- Maulvault, A., Anacleto, P., Lourenço, H., Carvalho, M., Nunes, M., & Marques, A. (2012). Nutritional quality and safety of cooked edible crab (*Cancer pagurus*). *Food Chemistry*, 133(2), 277-283. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.023.

- Maulvault, A., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H., Nunes, M., & Coelho, I. et al. (2011). Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2808-2815. doi: 10.1016/j.fct.2011.07.059.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., & Bourlieu, C. et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.
- Moradi, Y., Bakar, J., Motalebi, A., Syed Muhamad, S., & Che Man, Y. (2011). A Review on Fish Lipid: Composition and Changes During Cooking Methods. *Journal Of Aquatic Food Product Technology*, 20(4), 379-390. doi: 10.1080/10498850.2011.576449.
- Murray, J., & Burt, J. (1969). *The Composition of Fish*. FAO Corporate Document Repository. Consultado a 13/03/2018, Disponível em <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x59-16e00.htm#Contents>.
- Nicklisch, S., Bonito, L., Sandin, S., & Hamdoun, A. (2017). Mercury levels of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) are associated with capture location. *Environmental Pollution*, 229, 87-93. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.070.
- Nunes, M., Bandarra, N., & Batista, I. (2011). Health benefits associated with seafood consumption. Em C. Alasalvar, F. Shahidi, K. Miyashita & U. Wanasundara, *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications* (pp. 369-376). Wiley-Blackwell.
- Núñez, R., García, M., Alonso, J., & Melgar, M. (2018). Arsenic, cadmium and lead in fresh and processed tuna marketed in Galicia (NW Spain): Risk assessment of dietary exposure. *Science Of The Total Environment*, 627, 322-331. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.253.
- Oliveira, M. (2012). *Moluscos Bivalves em Portugal: Composição Química e Metais Contaminantes* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Oliveira e Sá, H. (2013). *Agentes quelantes com utilização terapêutica* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências e de Saúde.
- Ouédraogo, O., & Amyot, M. (2011). Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. *Environmental Research*, 111(8), 1064-1069. doi: 10.1016/j.envres.2011.09.018.
- Overnell, J. (1986). Occurrence of cadmium in crabs (*Cancer pagurus*) and the isolation and properties of cadmium metallothionein. *Environmental Health Perspectives*, 65, 101-105. doi: 10.1289/ehp.8665101.
- Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J., & Domingo, J. (2008). Effects of Various Cooking Processes on the Concentrations of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead in Foods. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 56(23), 11262-11269. doi: 10.1021/jf802411q.
- Peterson, C., Klawe, W., & Sharp, G. (1973). Mercury in Tunas: A Review. *Fishery Bulletin*, 71(3).
- Petroczi, A., & Naughton, D. (2009). Mercury, cadmium and lead contamination in seafood: A comparative study to evaluate the usefulness of Target Hazard Quotients. *Food And Chemical Toxicology*, 47(2), 298-302. doi: 10.1016/j.fct.2008.11.007.
- Pham, C., Canha, A., Diogo, H., Pereira, J., Prieto, R., & Morato, T. (2013). Total marine fishery catch for the Azores (1950–2010). *ICES Journal Of Marine Science*, 70(3), 564–577. doi: 10.1093/icesjms/fst024.
- Piepoli, M., Hoes, A., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., & Catapano, A. et al. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*, 37(29), 2315-2381. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.
- Piğłowski, M. (2018). Heavy Metals in Notifications of Rapid Alert System for Food and Feed. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 15(2), 365. doi: 10.3390/ijerph15020365.
- Pinto, R. (2017). *Análise de dados da fiscalização da pesca – Estudo da evolução e exploração dos recursos piscícolas no ecossistema marinho português* (Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Militares Navais). Escola Naval.

- PROMAR. (2015). *Programa Operacional Pescas 2007-2013*. Consultado a 14/04/2018, Disponível em http://www.promar.gov.pt/Download/PROMAR/PO_janeiro2015.pdf.
- RASFF. (2017). *RASFF Annual Report 2016*. Luxembourg: European Commission. Consultado a 17/08/2018, Disponível em https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf.
- Renaud, E., Lammerts van Bueren, E., Myers, J., Paulo, M., van Eeuwijk, F., Zhu, N., & Juvik, J. (2014). Variation in Broccoli Cultivar Phytochemical Content under Organic and Conventional Management Systems: Implications in Breeding for Nutrition. *Plos ONE*, 9(7), e95683. doi: 10.1371/journal.pone.0095683.
- Reuver M., Barbosa V., Marques A., Calis T., Ferrari F., Cunha S.C. & Fernandes J.O. (2017). *Safe Seafood Guide for Industry: Emerging Chemical Contaminants*. Consultado a 25/04/2018, Disponível em Seafood. <http://www.ecsafeseafood.eu>.
- Ribeiro, B. (2011). *Desenvolvimento de produtos reestruturados de corvina (Argyrosomus regius) de Aquacultura* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Richardson, G. (1996). Deterministic Versus Probabilistic Risk Assessment: Strengths and Weaknesses in a Regulatory Context. *Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2(1), 44-54. doi: 10.1080/10807039.1996.10387459.
- Rivera-Velasquez, M., Fallico, C., Guerra, I., & Straface, S. (2013). A Comparison of deterministic and probabilistic approaches for assessing risks from contaminated aquifers: An Italian case study. *Waste Management & Research*, 31(12), 1245-1254. doi: 10.1177/0734242x13507305.
- Ruppenthal, J. (2013). *Toxicologia*. Santa Maria - RS: Colégio Técnico Industrial de Santa Maria. Consultado a 25/04/2018, Disponível em http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos_seguranca/sexta_etapa/toxicologia.pdf.
- Santos, H., & Cruz, W. (2001). A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 47(3), 303-308.
- Saraiva, M. (2014). *Quantificação de metais pesados e de musks sintéticos em produtos alimentares* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Sartori, A., & Amancio, R. (2012). Pescado: Importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar E Nutricional*, 19(2), 83-93.
- Schmidt, L., Bizzi, C., Duarte, F., Muller, E., Krupp, E., Feldmann, J., & Flores, E. (2015). Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish. *Food Control*, 47, 413-419. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.040.
- Sea Around Us | Fisheries, Ecosystems & Biodiversity. (2018). *Catches by Taxon in the waters of Portugal (mainland)*. Consultado a 13/03/2018, Disponível em <http://www.seaaroundus.org/data/#/eez/620?chart=catch-chart&dimension=taxon&measure=tonnage-&limit=10>.
- Sealord photography. (2018). *European shellfish. Sealord photography*. Consultado a 26/04/2018, Disponível em www.sealordphotography.net/SustainabilityandEnvironment-/Food/Seafood/European-shellfish/i-k5xScNB.
- Selin, N. (2009). Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annual Review of Environment And Resources*, 34(1), 43-63. doi: 10.1146/annurev.environ.051308.084314.
- Sharma, R., & Katz, J. (2013). Fish Proteins in Coronary Artery Disease Prevention: Amino Acid–Fatty Acid Concept. Em R. Watson & V. Preedy, *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease* (pp. 525–542). San Diego, CA: Elsevier/Academic Press.
- Shim, S., Ferruzzi, M., Kim, Y., Janle, E., & Santerre, C. (2009). Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry*, 112(1), 46-50. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.030.
- Shon, S., Delgado, J., Morato, T., Pham, C., Zyllich, K., Zeller, D., & Pauly, D. (2015). *Reconstruction of marine fisheries catches for Madeira Island, Portugal from 1950-2010* (Working Paper). Fisheries Centre, The University of British Columbia.

- Silva, M. (2016). *Determinação da concentração de mercúrio, e outros elementos traço, em tecidos de peixe-zebra (Danio rerio)* (Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Sinicropi, M., Amantea, D., Caruso, A., & Saturnino, C. (2010). Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Archives Of Toxicology*, *84*(7), 501-520. doi: 10.1007/s00204-010-0544-6.
- Soares, K., & Gonçalves, A. (2012). Qualidade e segurança do pescado. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, *71*(1), 1-10.
- Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Vélez, D., & Montoro, R. (2011). Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, *91*(6), 981-986. doi: 10.1002/jsfa.4241.
- Uwakwe, A., & Ibiam, U. (2009). Levels of cadmium in different brands of cigarettes sold in Abakaliki metropolis of Nigeria. *African Journal Of Biochemistry Research*, *3*(8), 317-320.
- Versantvoort, C., Oomen, A., Van de Kamp, E., Rompelberg, C., & Sips, A. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(1), 31-40. doi: 10.1016/j.fct.2004.08.007.
- WHO. (2013). *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. World Health Organization.
- Wiech, M., Vik, E., Duinker, A., Frantzen, S., Bakke, S., & Maage, A. (2017). Effects of cooking and freezing practices on the distribution of cadmium in different tissues of the brown crab (*Cancer pagurus*). *Food Control*, *75*, 14-20. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.011.
- WoRMS. (2018). *WoRMS - World Register of Marine. WoRMS - World Register of Marine Species*. Consultado a 20/04/2018, Disponível em <http://www.marinespecies.org/>.
- WWF. (2017). *Seafood and the Mediterranean: Local Tastes, Global Markets*. WWF – World Wide Fund For Nature.
- Zhelyazkov, G., Yankovska-Stefanova, T., Mineva, E., Stratev, D., Vashin, I., & Dospatliev, L. et al. (2018). Risk assessment of some heavy metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and veined rapa whelks (*Rapana venosa*) for human health. *Marine Pollution Bulletin*, *128*, 197-201. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.024.

Anexo 1 – Ingredientes utilizados nos tratamentos culinários das diferentes refeições

Ingredientes/Espécie	Quantidade/peso (g)	Lote/Validade	Origem
Bifes de atum ultracongelados, Auchan <i>Espécie Thunnus spp.</i>	400 g	Lote – 8043 Validade: 08/2019	Capturado no Oceano Índico Oeste por anzóis e aparelhos de anzol
	400 g	Lote – 8031 Validade: 07/2019	Capturado no Oceano Pacífico Centro-Oeste por anzóis e aparelhos de anzol
Cebola	N = 2		Portugal
Dentes de alho	N = 3		Portugal
Oliveira da Serra - Azeite virgem extra do olival português	500 mL	362A L-7355256 07:44 Validade: 12/2018	Portugal
Sal grosso, Pingo Doce	1 Kg	Lote – FL313543	Portugal
Batata vermelha	N = 2		Portugal
Brócolos Florões ultracongelados, Auchan	400 g	Lote – 18101761 8003 022 61 07:55 Validade: 01/2020	Portugal
Tomate rama	N = 4		Portugal
Arroz carolino Bom Sucesso	500 g	Lote – SEG0218 Validade: 01/2019	Portugal
Sapateira selvagem cozida inteira, Gelpeixe <i>Espécie Cancer paguros</i>	400 g (x 3)	Lote – 7360 Validade: 06/2019	Capturada no Atlântico Nordeste, Rockall, costa noroeste da Escócia e Irlanda do Norte ou Mar do Norte; Arte de pesca: Nassas e armadilhas.
Pão ralado clássico, Espiga	200 g	L018015 16:28 Validade: 18/12/2018	Portugal
Pickles, Auchan	350 g	LIS011201 Validade: 01/2020	Portugal
Ovos frescos Categoria A - Classe M, Auchan	N = 1	Validade: 23/03/2018	Portugal
Cerveja Cristal, alc. 5.1% vol.	33 cl	L9402082 18:08 Validade: 01/2019	
Mostarda Calvé	206 g	L8040BP099 21:03 Validade: 09/02/2019	Portugal
Maionese, Auchan	225 mL	L2019180334 16:34 Validade: 10/2018	Portugal
Tabasco	60 mL	Lote – 092717 Validade: 09/2022	Louisiana, U.S.A.

Anexo 2 – Receita de bife de atum estufado com cebolada

Ingredientes:

- 2 Bifes de atum (cada bife com aproximadamente 200 g)
- 3 Tomates cortados aos cubos pequenos
- 1 Cebola média picada
- 1 Colher de azeite (\approx 15 mL)
- 2 Dentes de alho picados
- Sal q.b.

Preparação:

- 1 - Faz-se um refogado com o azeite, a cebola, o alho e o tomate. Deixa-se refogar um pouco;
- 2 - Junta-se o sal e um pouco de água. Deixa-se levantar fervura;
- 3 - Colocam-se os bifes de atum e deixam-se refogar por apenas 7 minutos para que não fiquem secos (certifique-se que os bifes ficam tapados na totalidade com o refogado).

Disponível em: <https://omeumundosaudavel.blogspot.pt/bife-de-atum-estufado-9955> [Acesso no dia 12/02/2018 às 11:55].

Anexo 3 – Receita de atum com arroz de tomate

Ingredientes

- 4 Tomates maduros
- 2 Dentes de alho
- 3 Cebolas pequenas
- 500 g de arroz
- 400 g de atum
- 100 mL de azeite
- 1000 mL de água

Preparação

- 1 - Num tacho colocam-se a cebola, o alho picado e o azeite e deixa-se alourar;
- 2 - Deita-se o tomate e o arroz e deixa-se apurar durante 4 minutos;
- 3 – Acrescenta-se o atum e deixa-se refogar durante 6 minutos, em lume brando;
- 4 – Acrescenta-se 1 L de água fervente. Deixa-se cozer durante 15 minutos.

Disponível em: <https://lifestyle.sapo.pt/sabores/receitas/arroz-catum> [Acesso no dia 01/02/2018 às 16:58].

Anexo 4 - Pesos e quantidades utilizadas no tratamento culinário do atum

Atum				
	Peso cru (g)	Peso 1,5% sal adicionado (g)	Peso com 1,5% sal (g)	Peso estufado (g)
Posta 1	106,054	1,608	104,169	75,343
Posta 2	106,942	1,602	106,822	78,511
Posta 3	109,135	1,638	109,082	84,226
Posta 4	120,013	1,803	119,785	91,101
Total	442,144	6,651	439,858	329,181

Refogado	
<i>Ingredientes</i>	Peso (g)
Cebola	132,597
Dentes de alho	4,933
Azeite	15,197
Tomate	320,665
Água milli-Q	400,000
Total cozinhado	307,562

Arroz de Tomate	
<i>Ingredientes</i>	Peso (g)
Arroz carolino	125,021
Tomate	94,590
Cebola	119,253
Dentes de alho	1,344
Azeite	21,138
Água milli-Q	250,000
Total cozinhado	483,756

Batatas	
	Peso (g)
Cru	319,100
Cozinhadas	303,320

Brócolos	
	Peso (g)
Cru	79,824
Cozinhados	58,759

Anexo 5 – Receita de sapateira recheada

Ingredientes

- 1 Sapateira cozida
- 20 g de pão
- 50 g de pickles
- 1 Ovo cozido
- 20 g de cerveja
- 1 Colher de chá de mostarda (≈ 7 g)
- 2 Colheres de sopa de maionese (≈ 30 g)
- 4 Gotas de tabasco (picante)

Preparação

- 1 - Coloque no copo o pão, o ovo cozido, os pickles e pique durante 5 segundos;
- 2 - Adicione a cerveja, a mostarda, a maionese e o tabasco e envolva durante 8 segundos;
- 3 - Junte o miolo da sapateira e misture durante 6 segundos;
- 4 - Coloque o recheio na carapaça e leve ao frigorífico durante 45 minutos;
- 5 – Sirva com tostas.

Disponível em: <https://pt.petitchef.com/receitas/prato-principal/sapateira-recheada-fid-199565> [Acesso no dia 01/02/2018 às 17:06].

Anexo 6 – Pesos e quantidades utilizadas no tratamento culinário da sapateira

Sapateira		
	Peso da sapateira (g)	Peso do hepatopâncreas + gónadas (g)
Sapateira 1	410,000	119,143
Sapateira 2	450,000	134,155
Sapateira 3	420,000	103,486
Total	1280,000	356,784

Recheio	
<i>Ingredientes</i>	Peso (g)
Pão ralado	20,071
Ovo cozido	54,715
Pickles	49,418
Cerveja	20,425
Mostarda	6,997
Maionese	30,138
Tabasco	0,152
Total recheio	181,916

Total sapateira recheada	321,189
---------------------------------	----------------

Anexo 7 – Quantidade de fração bioacessível e fração não bioacessível das refeições de atum e de sapateira

Identificação da amostra	Código da amostra	Fração bioacessível (g)	Fração não bioacessível (g)
Amostras de atum			
Branco 1 - 1º dia	B1A - 1º	25,2152	
Branco 2 - 1º dia	B2A - 1º	25,0657	
Branco 1 - 2º dia	B3A - 2º	24,6110	
Branco 2 - 2º Dia	B4A - 2º	24,4940	
Atum cru (1)	AC-1	26,2701	0,7229
Atum cru (2)	AC-2	26,2692	0,8448
Atum cru (3)	AC-3	26,2682	0,7683
Atum sem refogado (1)	ASR - 1	27,1503	1,1971
Atum sem refogado (2)	ASR - 2	27,3826	1,1049
Atum sem refogado (3)	ASR - 3	27,5040	0,9197
Atum com refogado (1)	ACR - 1	25,9137	1,1320
Atum com refogado (2)	ACR - 2	26,3779	1,1876
Atum com refogado (3)	ACR - 3	26,5820	1,0367
Atum + arroz de tomate (1)	AAT - 1	26,2185	0,7281
Atum + arroz de tomate (2)	AAT - 2	26,6794	0,8903
Atum + arroz de tomate (3)	AAT - 3	26,6382	0,6285
Atum + batata + brócolo (1)	ABB - 1	26,1727	0,7724
Atum + batata + brócolo (2)	ABB - 2	26,1465	0,9489
Atum + batata + brócolo (3)	ABB - 3	25,9594	1,1656
Atum + batata (1)	Abat - 1	25,8317	1,0659
Atum + batata (2)	Abat - 2	26,6429	0,6675
Atum + batata (3)	Abat - 3	26,1779	1,0177
Atum + brócolo (1)	Abro - 1	26,4423	0,8284
Atum + brócolo (2)	Abro - 2	26,2975	1,0611
Atum + brócolo (3)	Abro - 3	26,2483	0,8940
Amostras de sapateira			
Branco 1	B1-S	24,4665	
Branco 2	B2-S	24,2983	
Sapateira simples (1)	SS-1	26,5602	0,5967
Sapateira simples (2)	SS-2	27,0671	0,4434
Sapateira simples (3)	SS-3	27,0055	0,5259
Sapateira recheada (1)	SR-1	26,4550	0,5589
Sapateira recheada (2)	SR-2	26,3822	0,5634
Sapateira recheada (3)	SR-3	26,3660	0,5843

Anexo 8 – Análise estatística do teor de Hg (mg/kg) das refeições completas e do teor de Hg (mg/kg) do atum nas refeições

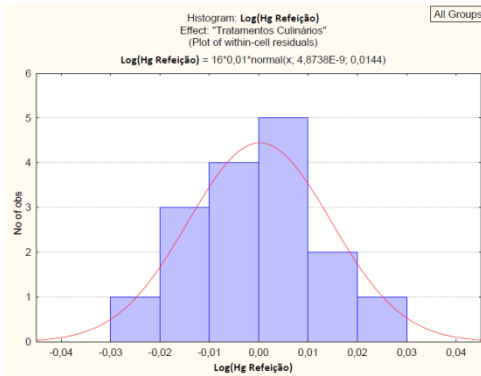


Figura 1 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa com diferentes tratamentos culinários (histograma).

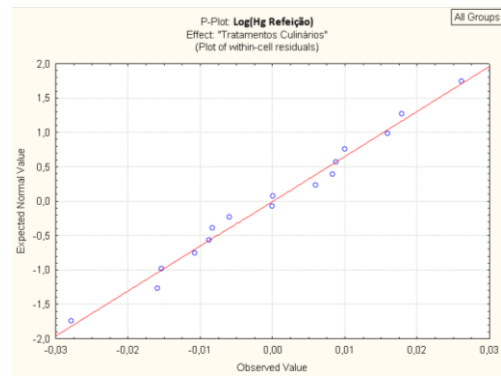


Figura 2 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa com diferentes tratamentos culinários (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa com diferentes tratamentos culinários.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spread Effect: "Tratamentos Culinários")				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Log(Hg Refeição)	345261,1	0,300743	9,932682	6	0,127516

Tabela 2 – Análise estatística do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa com diferentes tratamentos culinários.

Unequal N HSD; variable Log(Hg Refeição) (Spreadsheet1)						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Error: Between MS = ,00034, df = 9,0000						
Cell No.	Tratamentos Culinários	Log(Hg Refeição) Mean	1	2	3	4
4	Atum com Arroz de Tomate	-1,29591	****			
5	Atum com Batata e Bróculo	-1,20321	****			
6	Atum com Batata	-1,16373	****			
7	Atum com Bróculo	-1,00509		****		
3	Atum com Refogado	-0,92653			****	
1	Atum Cru	-0,77649				****
2	Atum sem Refogado	-0,66193				****

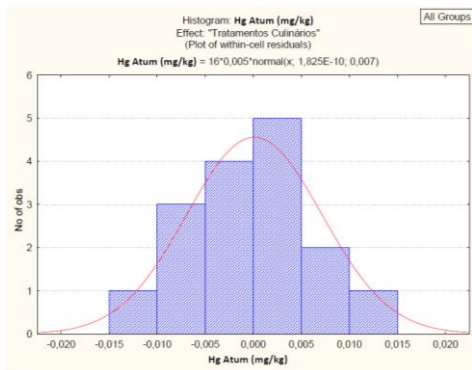


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da porção de atum nas refeições com diferentes tratamentos culinários (histograma).

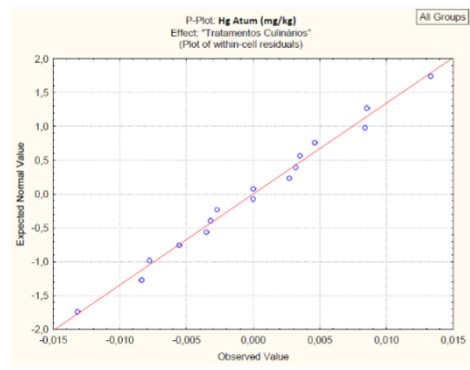


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da porção de atum nas refeições com diferentes tratamentos culinários (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Hg (mg/kg) da porção de atum nas refeições com diferentes tratamentos culinários.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet2) Effect: "Tratamentos Culinários"				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Hg Atum (mg/kg)	424846,8	0,300211	10,71476	6	0,097602

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Hg (mg/kg) da porção de atum nas refeições com diferentes tratamentos culinários.

Unequal N HSD; variable Hg Atum (mg/kg) (Spreadsheet2)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,00008, df = 9,0000				
Cell No.	Tratamentos Culinários	Hg Atum (mg/kg) Mean	1	2
4	Atum com Arroz de Tomate	0,133979	****	
5	Atum com Batata e Bróculo	0,166535	****	
1	Atum Cru	0,167337	****	
6	Atum com Batata	0,173725	****	
7	Atum com Bróculo	0,197253		****
2	Atum sem Refogado	0,218005		****
3	Atum com Refogado	0,219756		****

Anexo 9 – Análise estatística do teor de Cd (mg/kg) das refeições completas e do teor de Cd (mg/kg) da sapateira nas refeições

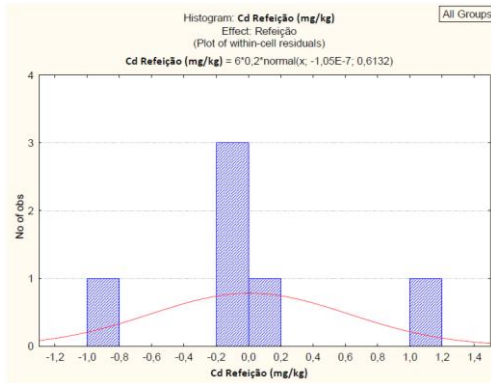


Figura 1 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa (histograma).

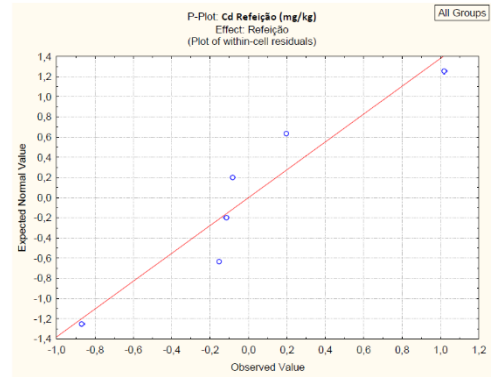


Figura 2 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Cd Refeição (mg/kg)	30,63348	0,968388	3,360071	1	0,066795

Tabela 2 – Análise estatística do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa.

Tukey HSD test; variable Cd Refeição (mg/kg) (Spreadsheet1)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,46996, df = 4,0000				
Refeição	Cd Refeição (mg/kg) Mean	1	2	
Cell No. 2	Sapateira Recheada	4,475323	****	
1	Sapateira Simples	9,429572	****	

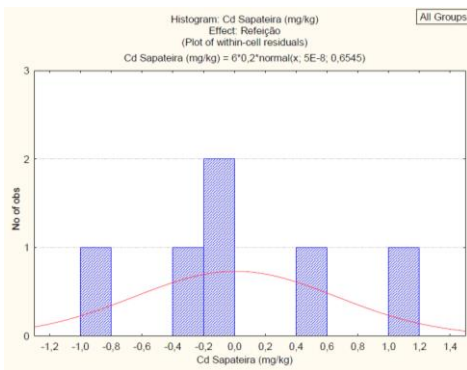


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da porção de sapateira nas refeições (histograma).

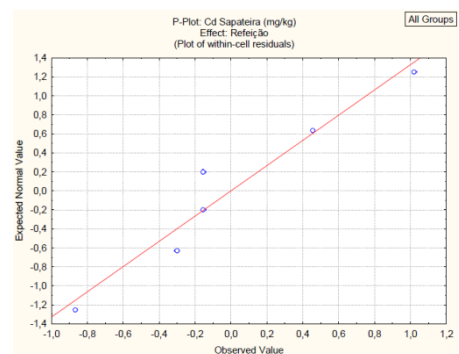


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da porção de sapateira nas refeições (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Cd (mg/kg) da porção de sapateira nas refeições.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Cd Sapateira (mg/kg)	5,662571	0,849908	1,076542	1	0,299472

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Cd (mg/kg) da porção de sapateira nas refeições.

Tukey HSD test; variable Cd Sapateira (mg/kg) (Spreadsheet1)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = ,53547, df = 4,0000				
Refeição	Cd Sapateira (mg/kg) Mean	1		
Cell No. 1	Sapateira Simples	9,429572	****	
2	Sapateira Recheada	9,450924	****	

Anexo 10 – Análise estatística das percentagens de Hg bioacessível e dos teores de Hg das refeições completas de atum após a digestão

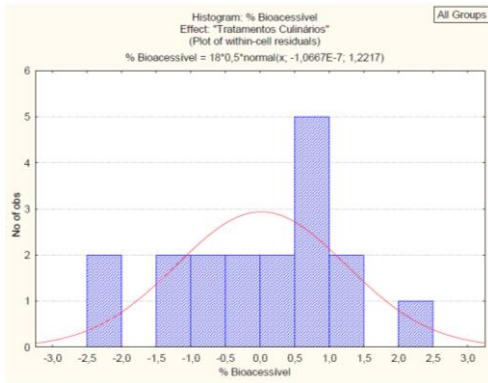


Figura 1 - Normalidade dos resíduos da percentagem de Hg bioacessível nas refeições completas de atum (histograma).

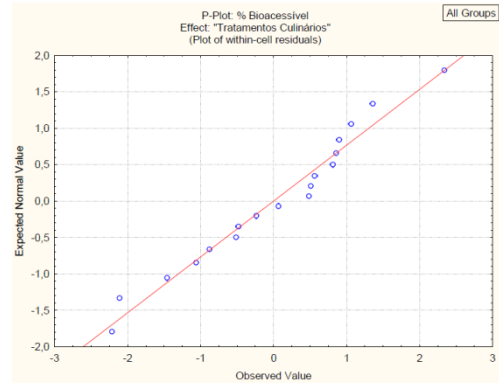


Figura 2 - Normalidade dos resíduos da percentagem de Hg bioacessível nas refeições completas de atum (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias da percentagem de Hg bioacessível nas refeições completas de atum.

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet10) Effect: "Tratamentos Culinários"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
% Bioacessível	10,70632	0,348669	2,859600	6	0,826251

Tabela 2 – Análise estatística da percentagem de Hg bioacessível nas refeições completas de atum.

Unequal N HSD; variable % Bioacessível (Spreadsheet10) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 2,3067, df = 11,000						
Cell No.	Tratamentos Culinários	% Bioacessível Mean	1	2	3	4
2	Atum sem Refogado	13,48018		****		
3	Atum com Refogado	21,80866			****	
5	Atum com Batata e Bróculo	28,44569	****			
6	Atum com Batata	30,70333	****			
7	Atum com Bróculo	30,92774	****			
4	Atum com Arroz de Tomate	31,23351	****			
1	Atum Cru	42,20030				****

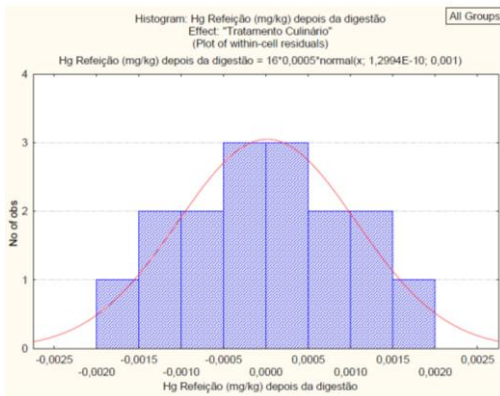


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa após digestão (histograma).

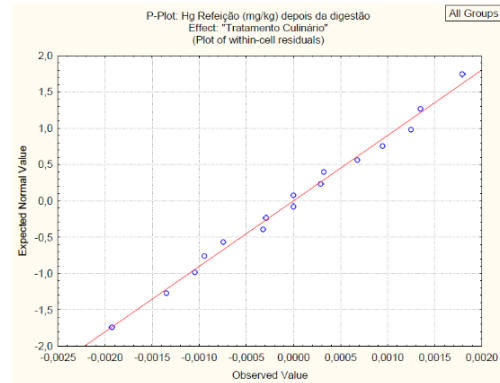


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa após digestão (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa após digestão.

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet2) Effect: "Tratamento Culinário"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Hg Refeição (mg/kg) depois da digestão	1249378	0,327156	11,86919	6	0,064951

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Hg (mg/kg) da refeição completa após digestão.

Unequal N HSD; variable Hg Refeição (mg/kg) depois da digestão (Spreadsheet2) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = ,00000, df = 9,0000							
Cell No.	Tratamento Culinário	Hg Refeição (mg/kg) depois da digestão Mean	1	2	3	4	5
4	Atum com Arroz de Tomate	0,015805		****			
5	Atum com Batata e Bróculo	0,017816			****	****	
6	Atum com Batata	0,021062				****	****
3	Atum com Refogado	0,025846	****				
2	Atum sem Refogado	0,029388	****				
7	Atum com Bróculo	0,030599	****				
1	Atum Cru	0,070617					****

Anexo 11 – Análise estatística das percentagens de Cd bioacessível e dos teores de Cd das refeições completas de sapateira após a digestão

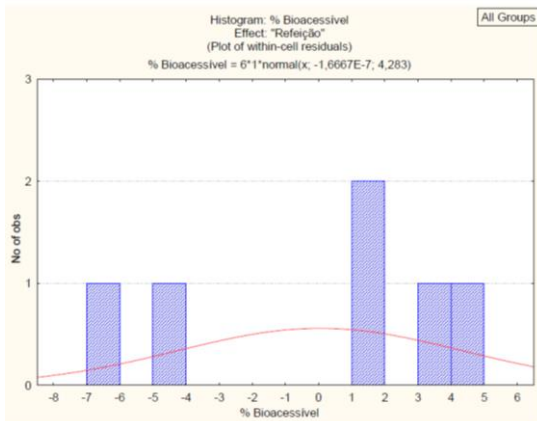


Figura 1 - Normalidade dos resíduos da percentagem de Cd bioacessível nas refeições completas de sapateira (histograma).

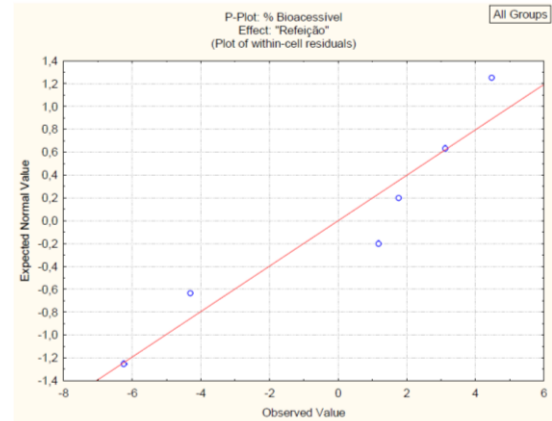


Figura 2 - Normalidade dos resíduos da percentagem de Cd bioacessível nas refeições completas de sapateira (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias da percentagem de Cd bioacessível nas refeições completas de sapateira.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet10)				
	Effect: "Refeição"				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
% Bioacessível	2,089286	0,676301	0,212421	1	0,644876

Tabela 2 – Análise estatística da percentagem de Cd bioacessível nas refeições completas de sapateira.

Tukey HSD test; variable % Bioacessível (Spreadsheet10)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = 22,931, df = 4,0000			
Cell No.	Refeição	% Bioacessível Mean	
1	Sapateira Simples	98,01527	****
2	Sapateira Recheada	98,76383	****

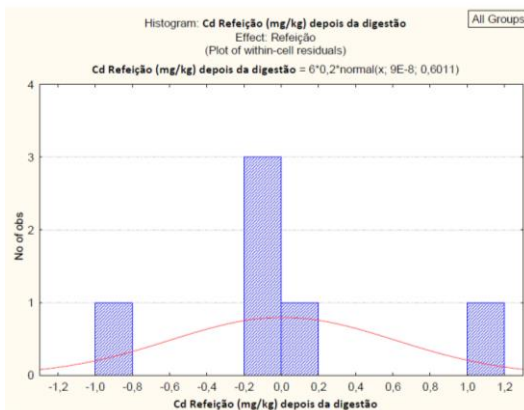


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa de sapateira após digestão (histograma).

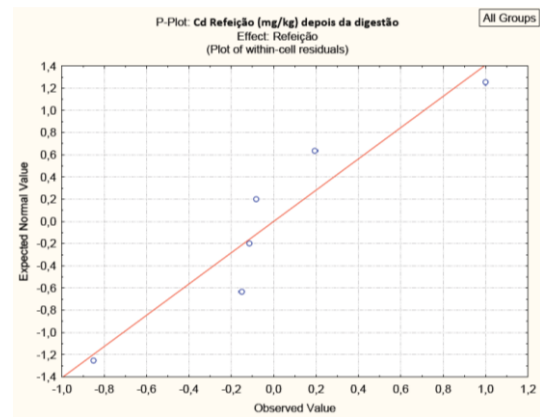


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa de sapateira após digestão (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa de sapateira após digestão.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet2)				
	Effect: Refeição				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Cd Refeição (mg/kg) depois da digestão	30,17088	0,967919	3,337275	1	0,067727

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Cd (mg/kg) da refeição completa de sapateira após digestão.

Tukey HSD test; variable Cd Refeição (mg/kg) depois da digestão (Spreadsheet2)			
Homogenous Groups, alpha = ,05000			
Error: Between MS = ,45171, df = 4,0000			
Cell No.	Refeição	Cd Refeição (mg/kg) depois da digestão Mean	
2	Sapateira Recheada	4,420000	****
1	Sapateira Simples	9,242420	****

Anexo 12 – Análise estatística do teor de Hg (μg) de 2 refeições completas de atum antes e após a digestão

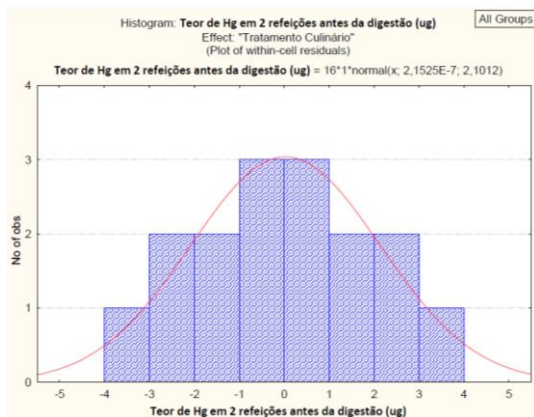


Figura 1 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg de 2 refeições completas de atum antes da digestão (histograma).

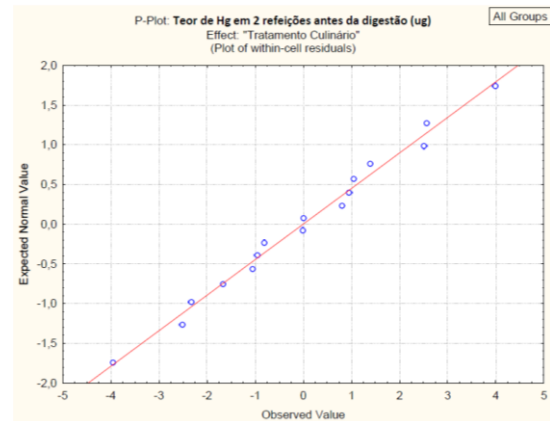


Figura 2 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg de 2 refeições completas de atum antes da digestão (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias do teor de Hg de 2 refeições completas de atum antes da digestão.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr	df	p
Teor de Hg em 2 refeições antes da digestão (ug)	424846,8	0,300211	10,71476	6	0,097602

Tabela 2 – Análise estatística do teor de Hg de 2 refeições completas de atum antes da digestão.

Unequal N HSD, variable Teor de Hg em 2 refeições antes da digestão (ug) (Spreadsheet2)					
Homogenous Groups, alpha = ,05000					
Error: Between MS = 7,3584, df = 9,0000					
Tratamento Culinário	Teor de Hg em 2 refeições antes da digestão (ug) Mean	1	2	3	
Cell No. 1	Atum Cru	50,20124	****		
4	Atum com Arroz de Tomate	51,67454	****		
5	Atum com Batata e Brocolu	57,01202	****	****	
6	Atum com Batata	58,76996	****	****	****
7	Atum com Brocolu	62,71126	****	****	****
2	Atum sem Refogado	65,40157	****	****	****
3	Atum com Refogado	68,77200	****	****	****

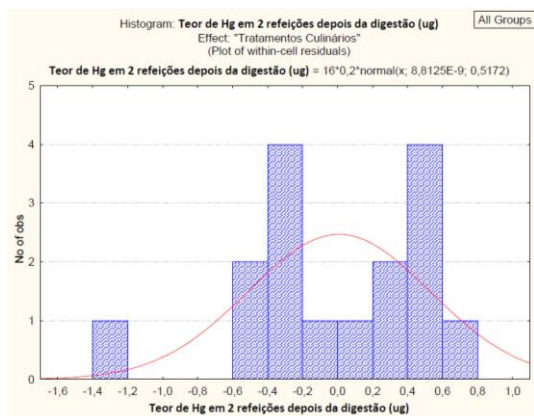


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg de 2 refeições completas de atum após a digestão (histograma).

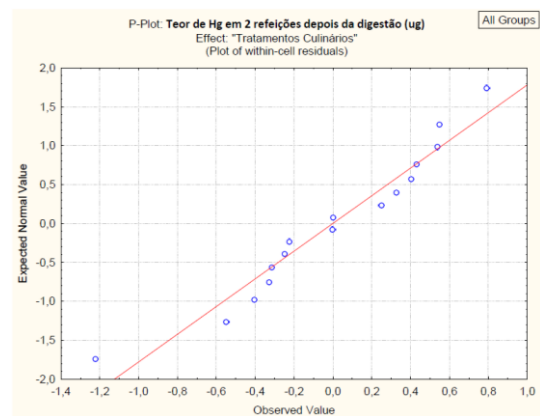


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Hg de 2 refeições completas de atum após a digestão (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Hg de 2 refeições completas de atum após a digestão.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr	df	p
Teor de Hg em 2 refeições depois da digestão (ug)	479265,3	0,437199	10,30123	6	0,112526

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Hg de 2 refeições completas de atum após a digestão.

Unequal N HSD, variable Teor de Hg em 2 refeições depois da digestão (ug) (Spreadsheet)						
Homogenous Groups, alpha = ,05000						
Error: Between MS = ,44582, df = 9,0000						
Tratamentos Culinários	Teor de Hg em 2 refeições depois da digestão (ug) Mean	1	2	3	4	5
Cell No. 2	Atum sem Refogado	8,81625				****
3	Atum com Refogado	14,99825	****			
4	Atum com Arroz de Tomate	16,13977	****	****		
5	Atum com Batata e Brocolu	16,21746	****	****	****	
6	Atum com Batata	18,04434	****	****	****	****
7	Atum com Brocolu	19,39518	****	****	****	****
1	Atum Cru	21,18507	****	****	****	****

Anexo 13 – Análise estatística do teor de Cd (μg) de 50 g das refeições de sapateira antes e após a digestão

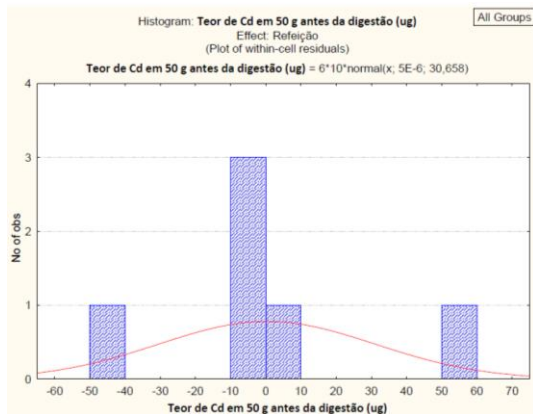


Figura 1 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira antes da digestão (histograma).

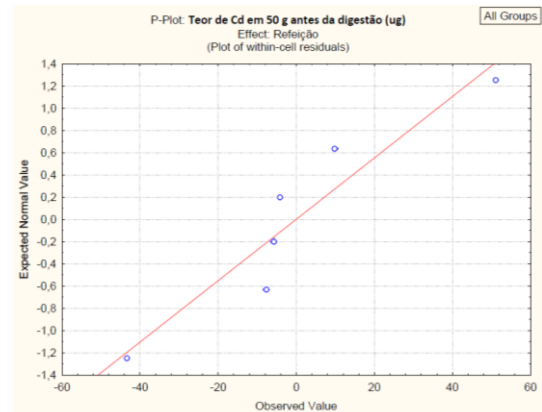


Figura 2 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira antes da digestão (P-P).

Tabela 1 – Homogeneidade de variâncias do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira antes da digestão.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet2)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Teor de Cd em 50 g antes da digestão (ug)	30,63348	0,968388	3,360071	1	0,066795

Tabela 2 – Análise estatística do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira antes da digestão.

Tukey HSD test, variable Teor de Cd em 50 g antes da digestão (ug) (Spreadsheet2)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1174,9, df = 4,0000				
Refeição	Teor de Cd em 50 g antes da digestão (ug)	1	2	
Cell No.	Mean			
2	Sapateira Recheada	223,7661	****	
1	Sapateira Simples	471,4786	****	

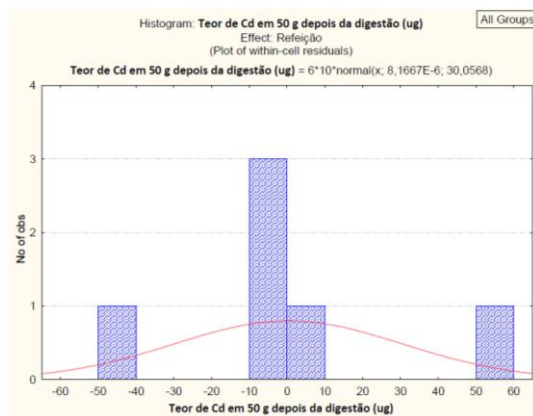


Figura 3 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira após a digestão (histograma).

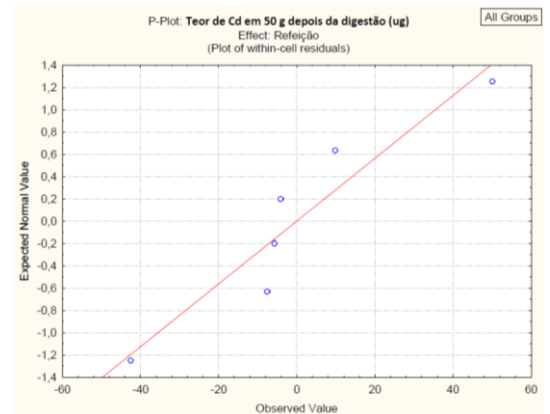


Figura 4 - Normalidade dos resíduos do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira após a digestão (P-P).

Tabela 3 – Homogeneidade de variâncias do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira após a digestão.

	Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet5)				
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Teor de Cd em 50 g depois da digestão (ug)	30,17088	0,967919	3,337275	1	0,067727

Tabela 4 – Análise estatística do teor de Cd de 50g das refeições de sapateira após a digestão.

Tukey HSD test, variable Teor de Cd em 50 g depois da digestão (ug) (Spreadsheet5)				
Homogenous Groups, alpha = ,05000				
Error: Between MS = 1129,3, df = 4,0000				
Refeição	Teor de Cd em 50 g depois da digestão (ug)	1	2	
Cell No.	Mean			
2	Sapateira Recheada	221,0000	****	
1	Sapateira Simples	462,1210	****	