



UFSM

Tese de Doutorado

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CULINÁRIO NA CONCENTRAÇÃO
E BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DE METAIS, NÃO-METAIS E
ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM FRUTOS DO MAR**

Lucas Schmidt

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CULINÁRIO NA CONCENTRAÇÃO
E BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DE METAIS, NÃO-METAIS E
ESPÉCIES DE ARSÊNIO EM FRUTOS DO MAR**

por

Lucas Schmidt

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química**

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CULINÁRIO NA CONCENTRAÇÃO E
BIODISPONIBILIDADE *IN VITRO* DE METAIS, NÃO-METAIS E ESPÉCIES DE
ARSÊNIO EM FRUTOS DO MAR**

Elaborada por


Lucas Schmidt

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM - RS)



Prof. Dra. Paola de Azevedo Mello (UFSM – RS)



Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan (UFSM – RS)



Prof. Dr. Sergio Roberto Mortari (UNIFRA – RS)



Prof. Dr. Adilson Ben da Costa (UNISC - RS)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, pela infraestrutura e apoio prestados ao longo do doutorado.

À University of Cincinnati e ao Grupo do professor Joseph Caruso - *Metallomics*, pelo suporte e possibilidade de execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq pela bolsa de estudos durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, pela oportunidade, orientação, amizade, incentivo constante para meu crescimento pessoal e pelo exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa científica no Brasil.

Ao Prof. Dr. Joseph Caruso e ao Prof. Dr. Julio Landero, pela oportunidade, orientação, amizade, e dedicação ao ensino e a pesquisa científica.

Aos Professores Dr. Adilson Bem da Costa, Dr. Sergio R. Mortari, Dr. Rodrigo C. Bolzan e, Dra. Paola A. Mello, pelas sugestões e contribuições como banca examinadora.

A todos os colegas e professores do Laboratório de Análises Química Industrial e Ambiental, pelo convívio, amizade e troca de ideias sobre os assuntos mais diversos que de certa forma contribuíram para o meu crescimento pessoal ao longo dos anos do mestrado e doutorado.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, pelo sempre dedicado auxílio.

E finalmente, agradeço e dedico este trabalho aos meus pais, Celestino e Fátima, à minha irmã Kelly, à minha namorada Thieli, e às minhas filhas Isis e Lara.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Metais pesados em frutos do mar | 4 |
| 2.1.1 Arsênio | 5 |
| 2.1.2 Cádmió | 8 |
| 2.1.3 Cobre..... | 9 |
| 2.1.4 Cromo..... | 9 |
| 2.1.5 Chumbo..... | 10 |
| 2.1.6 Mercúrio | 11 |
| 2.2 Influência do tratamento culinário na concentração de metais e não- metais em frutos do mar..... | 13 |
| 2.3 Ensaio de biodisponibilidade de contaminantes inorgânicos de frutos do mar | 15 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Instrumentação e materiais diversos..... | 18 |
| 3.2 Reagentes..... | 23 |
| 3.3 Amostras | 24 |
| 3.4 Tratamento preliminar | 25 |
| 3.5 Caracterização da amostra | 26 |
| 3.6 Tratamentos culinários | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6.1 | Preparo das amostras cruas (tipo sashimi) | 27 |
| 3.6.2 | Cozimento (imersão em água em ebulição) | 28 |
| 3.6.3 | Fritura (imersão em óleo vegetal) | 28 |
| 3.6.4 | <i>Sautéing</i> | 28 |
| 3.7 | Secagem e moagem | 31 |
| 3.8 | Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> – Ensaio de biodisponibilidade | 31 |
| 3.9 | Decomposição da amostra para determinação elementar total de metais e não-metais | 33 |
| 3.10 | Determinação de Hg por ICP-MS utilizando um sistema de introdução de amostra integrado | 34 |
| 3.11 | Análise de especiação de As | 35 |
| 3.11.1 | Otimização da fase móvel | 35 |
| 3.11.2 | Otimização do método de extração | 35 |
| 3.11.3 | Avaliação do método de extração | 36 |
| 3.12 | Cálculos e expressão dos resultados | 37 |
| 4 | APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS | 39 |
| 4.1 | Avaliação do método de decomposição para a determinação de metais e não-metais | 40 |
| 4.2 | Avaliação do método de análise de especiação de As | 42 |
| 4.2.1 | Separação cromatográfica | 42 |
| 4.2.2 | Método de extração | 44 |
| 4.2.3 | Ensaio de recuperação e exatidão | 48 |
| 4.2.4 | Figuras de mérito | 50 |
| 4.3 | Otimização dos tratamentos culinários | 50 |
| 4.4 | Avaliação da amostragem para avaliação do tratamento culinário | 53 |
| 4.4.1 | Concentração <i>versus</i> Legislação vigente | 56 |
| 4.5 | Influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metais em frutos do mar | 58 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.6 | Razão molar Se/Hg e riscos associados à saúde | 67 |
| 4.7 | Avaliação do efeito do tratamento culinário na concentração das espécies de As em frutos do mar | 69 |
| 4.8 | Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de frutos do mar antes e após os tratamentos culinários | 75 |
| 4.9 | Biodisponibilidade das espécies de As de frutos do mar após diferentes tratamentos culinários | 80 |
| 4.10 | Considerações relacionadas aos estudos recentes de riscos e benefícios do consumo de frutos do mar | 84 |
| 5 | CONCLUSÕES | 86 |
| | APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES..... | 89 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | (a) Bloco digestor com capacidade para 24 frascos de decomposição; (b) Sistema de digestão assistida por micro-ondas com radiação focalizada (MAD) com capacidade para 48 frascos..... | 18 |
| Figura 2. | Esquema do sistema HPLC-ICP-QQQ com introdução de PI pós-coluna. 1. Fase móvel; 2. Degaseificador; 3. Bomba de pistão; 4. Autoamostrador; 5. Pré-coluna PRP-X100 (20 x 2 mm, 10 µm); 6. Coluna PRP-X100 (250 x 4,1 mm, 10 µm); 7. Válvula de injeção; 8. Alça de amostragem (50 µL); 9. Bomba peristáltica (2 mL min ⁻¹); 10. Solução do padrão interno..... | 21 |
| Figura 3. | Amostragem utilizada para a avaliação da influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metais das amostras de (a) ostras (tecido íntegro) e (b) vieiras (músculo adutor)..... | 26 |
| Figura 4. | Sistemas utilizados para o processo de (a) cozimento, (b) fritura e (c) <i>sautéing</i> | 29 |
| Figura 5. | Fluxograma das principais etapas envolvidas neste trabalho. | 30 |
| Figura 6. | Esquema do método de simulação gastrointestinal utilizado neste trabalho. | 33 |
| Figura 7. | Perfil de (—) pressão e (—) temperatura alcançados durante a decomposição de 90 mg de amostra liofilizada de tubarão por (a) MAD (em sistema fechado) e por (b) MAD (em sistema fechado) com a amostra pré-digerida em bloco digestor (121 °C)..... | 41 |
| Figura 8. | Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de As. Injeção de 50 µL de uma solução contendo 2 µg L ⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, MMA e As(V) usando fase móvel composta de (NH ₄) ₂ HPO ₄ 10 mmol L ⁻¹ com (—) pH = 8,72; (—) pH = 8,65; (—) pH = 8,55; (—) pH = 8,25. | 42 |
| Figura 9. | Influência do metanol na intensidade do sinal das espécies de As. Injeção de 50 µL de uma solução contendo 2 µg L ⁻¹ (como As) de AsB, As(III), DMA, MMA e As(V) usando fase móvel composta de (NH ₄) ₂ HPO ₄ 10 mmol L ⁻¹ (pH = 8,65) com (—) 1% de metanol e (—) sem metanol..... | 43 |
| Figura 10. | Eficiência de extração de As usando diferentes massas de amostra (n = 3). | 46 |
| Figura 11. | Aspecto das amostras de TUBARÃO que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = <i>sauté</i> . 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão..... | 51 |
| Figura 12. | Aspecto das amostras de CAMARÃO que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = <i>sauté</i> . 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão..... | 52 |
| Figura 13. | Aspecto das amostras de LULA que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = <i>sauté</i> . 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão..... | 52 |
| Figura 14. | Aspecto das amostras de VIEIRAS que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = <i>sauté</i> . 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão..... | 53 |
| Figura 15. | Concentração de metais e não-metais em amostra de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários (n ≥ 2). U = crua; C = cozida; F = frita; S = | |

- sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$)..... 59
- Figura 16. Concentração de metais e não-metals em amostra de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Pb < LQ..... 60
- Figura 17. Concentração de metais e não-metals em amostra de LULA após diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Pb < LQ..... 61
- Figura 18. Concentração relativa de metais e não-metals na fração A das amostras de VIEIRAS após diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ Fração B (amostra controle, U1); ■ Fração A sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ Fração A com diferença significativa da amostra U1 ($p < 0,05$). Hg e Pb < LQ..... 62
- Figura 19. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metals nas amostras de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários. Cd < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A8). 76
- Figura 20. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metals nas amostras de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários. Cd, Pb e Se < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A9). 77
- Figura 21. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metals nas amostras de LULA após diferentes tratamentos culinários. Cd, Cu, Hg e Pb < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A10). 78
- Figura A1. Perfil cromatográfico da solução de calibração $2 \mu\text{g L}^{-1}$ das espécies de As 89
- Figura A2. Perfil cromatográfico das espécies de As presentes nas amostras *in natura* (sem tratamento culinário, U1) de (a) tubarão, (b) camarão, (c) lula, (d) vieira, (e) ostra e (f) DORM-3 90
- Figura A3. Aspecto da digestão de 90 mg de amostra liofilizada de tubarão (a) antes da pré-digestão no bloco digestor, (b) após digestão por MAD com amostra pré-digerida em bloco digestor e, (c) após transferência e diluição com água ultra pura do digerido no frasco de PP de 15 mL 91

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1. | Nome, abreviatura e estrutura química de algumas espécies de As comumente presentes em frutos do mar (adaptado de Francesconi ¹⁶)..... | 6 |
| Tabela 2. | Condições operacionais do sistema ICP-QQQ para a determinação de metais e não-metais. | 20 |
| Tabela 3. | Condições operacionais do sistema ICP-MS para a determinação de Hg. | 20 |
| Tabela 4. | Condições operacionais do sistema HPLC-ICP-QQQ para a análise de especiação de As. | 22 |
| Tabela 5. | Programa do sistema de introdução de amostra integrado utilizado para minimizar efeitos de memória na determinação de Hg. | 34 |
| Tabela 6. | Concentração de As, Cd, Cr, Cu, Hg e Pb no CRM DORM-3 ($n = 5$)..... | 41 |
| Tabela 7. | Eficiência da extração de As total em frutos do mar usando diferentes soluções extratoras. | 45 |
| Tabela 8. | Avaliação da estabilidade das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$, como As) nos extratos aquosos das amostras de tubarão e DORM-3 armazenados sob refrigeração e congelados ($n = 3$)..... | 47 |
| Tabela 9. | Resultados dos ensaios de recuperação das espécies de As ($n = 3$). | 48 |
| Tabela 10. | Concentração das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$, como As) no material de referência certificado DORM-3 obtida neste e em outros trabalhos da literatura. | 49 |
| Tabela 11. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) de metais e não-metais nas amostras <i>in natura</i> de tubarão, camarão e lula ($n = 3$). | 53 |
| Tabela 12. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) de metais e não-metais nas frações das amostras <i>in natura</i> de ostras e vieiras ($n = 5$). | 54 |
| Tabela 13. | Níveis máximos de contaminantes inorgânicos em frutos do mar ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) estabelecidos pelos órgãos regulamentadores..... | 56 |
| Tabela 14. | Razão molar de Se/Hg em frutos do mar antes e após os tratamentos culinários. | 68 |
| Tabela 15. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de TUBARÃO antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$). . | 69 |
| Tabela 16. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de CAMARÃO antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$). 70 | 70 |
| Tabela 17. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de LULA antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$). | 71 |
| Tabela 18. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de OSTRAS antes e após os tratamentos culinários ($n = 2$). ... | 72 |
| Tabela 19. | Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de VIEIRAS antes e após os tratamentos culinários ($n = 2$). | 73 |
| Tabela 20. | Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metais nas amostras <i>in natura</i> de OSTRAS, VIEIRA e DORM-3 após o ensaio de biodisponibilidade..... | 78 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tabela 21. | Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de TUBARÃO após os diferentes tratamentos culinários. | 81 |
| Tabela 22. | Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de CAMARÃO após os diferentes tratamentos culinários. | 81 |
| Tabela 23. | Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de LULA após os diferentes tratamentos culinários. | 82 |
| Tabela 24. | Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de ostra, vieira e DORM-3. | 82 |
| Tabela 25. | Biodisponibilidade das espécies de As relativa à concentração da respectiva espécie presente na amostra de fruto do mar crua. | 83 |
| Tabela A1. | Composição centesimal das amostras <i>in natura</i> de frutos do mar ($n = 3$). | 89 |
| Tabela A2. | Valores de pH da água de cozimento após o tratamento culinário C1 e C2. | 89 |
| Tabela A3. | Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de TUBARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). | 92 |
| Tabela A4. | Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de CAMARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). | 94 |
| Tabela A5. | Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de LULA após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). | 96 |
| Tabela A6. | Balanço de massas de metais e não-metais nas amostras de VIEIRAS (#7 a #13) após os diferentes tratamentos culinários ($n = 2$). | 98 |
| Tabela A7. | Concentração de metais e não-metais nas frações "A" (após o tratamento culinário) e "B" (sem tratamento culinário, U1) das amostras de OSTRAS (#7 a #13). | 100 |
| Tabela A8. | Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários. | 101 |
| Tabela A9. | Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários. | 102 |
| Tabela A10. | Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de LULA após diferentes tratamentos culinários. | 103 |
| Tabela A11. | Limite de quantificação de metais e não-metais nas amostras de frutos do mar, meios de cocção e na fração biodisponível. | 104 |
| Tabela A12. | Limite de quantificação (ng g^{-1}) das espécies de As nas amostras de frutos do mar e na fração biodisponível. | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| AAS | espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>atomic absorption spectrometry</i> |
| AsC | arsenocolina |
| AFS | espectrometria de fluorescência atômica, do inglês <i>atomic fluorescence spectrometry</i> |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| As(III) | arsenito |
| As(V) | arsenato |
| AsB | arsenobetaína |
| AsLip | arsenolipídios |
| AsSug | arseno-açúcares |
| As? | espécie de arsênio não identificada |
| BDP | biodisponibilidade |
| C1 | amostra cozida sem condimentos |
| C2 | amostra cozida temperada com sal e suco de limão |
| CRM | material de referência certificado, do inglês <i>certified reference material</i> |
| CVG | geração química de vapor, do inglês <i>chemical vapor generation</i> |
| DMA | dimetil-arsênio |
| EFSA | Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, do inglês <i>European Food Safety Authority</i> |
| EU | União Européia, do inglês <i>European Union</i> |
| F1 | amostra frita sem condimentos |
| F3 | amostra frita temperada com alho, sal e suco de limão |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FDA | Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i> |
| GC | cromatografia a gás, do inglês <i>gas chromatography</i> |
| HPLC | cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> |
| i.d. | diâmetro interno, do inglês <i>internal diameter</i> |
| ICP-MS | espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> |
| ICP-QQQ | espectrômetro de massas triplo-quadrupolo com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometry</i> |
| ISIS | sistema de introdução de amostra integrado, do inglês <i>integrated sample introduction system</i> |

| | |
|------------------|--|
| PI | padrão interno |
| JECFA | <i>FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants</i> |
| LC | cromatografia a líquido, do inglês <i>liquid chromatography</i> |
| LD | limite de detecção |
| LQ | limite de quantificação |
| m/z | razão massa/carga |
| MAD | digestão assistida por micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted digestion</i> |
| MeOH | metanol |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul (bloco econômico da América Latina) |
| MMA | monometil-arsênio |
| MWCO | ponto de corte de peso molecular, do inglês <i>molecular weight cut-off</i> |
| P | pressão |
| p.e. | ponto de ebulição |
| PEEK | poli(éter etil cetona), do inglês <i>polyetheretherketone</i> |
| PIPES | piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico) sal dissódico, do inglês <i>1,4-Piperazinediethanesulfonic acid disodium salt</i> |
| P _{max} | pressão máxima |
| PP | polipropileno |
| PTFE | politetrafluoretileno, do inglês <i>polytetrafluoroethylene</i> |
| PTWI | tolerância provisória de ingestão semanal, do inglês <i>provisional tolerable weekly intake</i> |
| Q1 | primeiro separador de massa quadrupolar |
| Q2 | segundo separador de massa quadrupolar |
| RF | radiofrequência |
| rpm | rotações por minuto |
| RSD | desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> |
| TR | tempo de retenção |
| S1 | amostra <i>sauté</i> sem condimentos |
| S3 | amostra <i>sauté</i> temperada com alho, sal e suco de limão |
| TMA ⁺ | íon tetrametilarsônio |
| U1 | amostra sem tratamento culinário e sem condimentos |
| U2 | amostra crua temperada com sal e suco de limão |
| US | ultrassom |
| USEPA | Agência de Proteção Ambiental, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| v/v | volume/volume |
| WHO | Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i> |
| ΔT | diferença de temperatura |
| ρ | resistividade elétrica |
| Σ | somatório |

RESUMO

Nas últimas décadas uma ampla variedade de métodos analíticos e estudos de biodisponibilidade, interações químicas, metabolismo e toxicidade foram feitos para a avaliação dos riscos associados à contaminação de metais pesados em frutos do mar. Dentre estes, a maioria foi realizada em amostras cruas, e as poucas pesquisas envolvendo a avaliação da influência do tratamento culinário sobre o comportamento destes contaminantes envolvem interpretações inexatas em relação ao comportamento do contaminante após o processo de cocção. Baseando nestes aspectos, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do tratamento culinário na concentração e biodisponibilidade (*in vitro*) de metais (Cd, Cr, Cu, Hg e Pb) e não-metais (As, Se, S e as espécies de As) de cinco espécies de frutos do mar (tubarão, camarão, lula, ostras e vieiras). Avaliaram-se três diferentes processos de cocção (cozimento, fritura e *sautéing*), além da amostra crua. Além disso, foi avaliada a influência da presença e ausência de condimentos (alho, sal e suco de limão) para cada tratamento. Todos os condimentos (alho, sal e suco de limão) e meios de cocção (água, óleo e manteiga) envolvidos durante os tratamentos culinários foram coletados para a avaliação do balanço de massas de cada tratamento. Após cada tratamento culinário as amostras de frutos do mar foram liofilizadas e cominuídas. A determinação de metais e não-metais foi feita usando um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (ICP-QQQ). Parâmetros como massa e formato da amostra, tempo e temperatura de cocção, foram todos previamente otimizados e selecionados. Além disso, foram avaliados parâmetros do método de especiação, tais como: fase móvel, solução extratora, robustez, massa de amostra e ensaio de recuperação de analitos (AsB, As(III), As(V), DMA e MMA). As espécies de As foram identificadas e quantificadas por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-QQQ). A metodologia empregada neste estudo mostrou-se adequada para o propósito deste trabalho. Além disso, a avaliação e seleção do tipo de amostragem mostrou ser de suma importância para este estudo. Todas as amostras apresentaram perdas significativas de As (15 a 45%) após o processo de cozimento em água. Além disso, foram observadas perdas significativas de Cd (37 a 53%) nas amostras de vieiras que sofreram o processo de cozimento, fritura e *sautéing*; e de Hg (14 a 33%) nas amostras de tubarão e camarão que sofreram os processos de cozimento, fritura e *sautéing*. Não foi observada influência entre os tratamentos que utilizaram e não utilizaram condimentos (alho, sal e suco de limão). Entre as amostras estudadas neste trabalho, a amostra de tubarão galha-preta (*Carcharhinus limbatus*) foi a que apresentou as maiores concentrações de As e Hg, sendo que, tanto As quanto Hg, apresentaram concentrações de 280 e 245%, acima do limite máximo recomendado pela ANVISA, respectivamente. Além disso, essa amostra apresentou uma razão molar de Se/Hg < 1, apresentando maiores riscos à saúde dos consumidores. O método de análise de especiação de As apresentou boa robustez em relação à estabilidade da solução extratora, massa de amostra e uso de diferentes matrizes. A espécie de As majoritária encontrada em todas as amostras foi a AsB. As espécies de As apresentaram uma alta estabilidade frente ao tratamento culinário e ao ensaio de biodisponibilidade. A taxa biodisponível (em %) das espécies de As relativa à espécie de As originalmente presente na amostra crua apresentou um comportamento similar. Adicionalmente, o Hg apresentou uma alteração significativa da biodisponibilidade devido à influência do tratamento culinário. No entanto, a biodisponibilidade dos demais analitos mostrou-se independente do tratamento culinário que a amostra sofreu.

ABSTRACT

Over the last decades a wide variety of analytical methods and bioavailability, interactions, metabolism and toxicity studies were performed in order to evaluate the risks associated with contamination of heavy metals in seafood. Furthermore, most of these studies were performed using raw samples, and the few studies involving the assessment of influence of culinary treatment on heavy metals behavior involve inaccurate interpretations regarding the contaminant behavior after the cooking process. According to these aspects the present study aims to evaluate the influence of culinary treatment over metals (Cd, Cr, Cu, Hg and Pb) and non-metals (As, Se, S and species of As) concentration and bioavailability (in vitro) of five seafood species (shark, shrimp, squid tube, oysters and scallops). Three cooking procedures (boiling, frying and *sautéing*) plus the uncooked sample were evaluated for each seafood species. In addition, the presence and absence of spices (garlic, salt and lemon juice) was evaluated for each treatment. All seasonings (garlic, salt and lemon juice) and cooking medium (water, oil and butter) involved during the culinary treatments were collected for further mass balance evaluation. After each culinary treatment the seafood samples were freeze-dried and grinded. Metals and non-metals determination was performed using a inductively coupled plasma triple-quadrupole mass spectrometry (ICP-QQQ). Parameters such as weight, sample size, cooking time and temperature were previously optimized and selected. Moreover, parameters such as mobile phase, extraction solution, stability, sample weight and recovery test (AsB, As(III), As(V), DMA and MMA) were evaluated for speciation method development. Arsenic species were identified and quantified by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-LC-QQQ). The methodology used to investigate the culinary treatments influence on heavy metal concentration in seafood was considered as suitable for the purpose of this work. In addition, the sampling step evaluation proved to be very important for this study. All samples presented significant loss of As (15 to 45%) after the boiling process. Moreover, significant losses were observed for Cd (37 to 53%) in scallops samples which have undergone the boiling, frying and *sautéing* process; and Hg losses (14 to 33%) in shark and shrimp samples which have undergone the boiling, frying and *sautéing* process. No influence was observed between the culinary treatments with and without spices (garlic, salt and lemon juice). Among the studied samples in this work, the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) sample was the one with the highest As and Hg concentration, and both As and Hg presented concentrations of 280 and 245% higher than the maximum level recommended by ANVISA, respectively. Moreover, this sample had a molar ratio of Se/Hg < 1, presenting higher risks to consumer health. The As speciation analysis method presented a good robustness regarding to the extraction solution stability, sample weight and use of different matrices. The major As species found in all samples was AsB. The As species show a high stability regarding the cooking treatment and the bioavailability assay. The bioavailable rate (%) of As species related to the As species originally present in the raw sample showed a similar behavior. Additionally, Hg presented a significant change in bioavailability due to the influence of culinary treatment. However, the bioavailability of other analytes from cooked samples proved to be independent of the culinary treatment.

1 INTRODUÇÃO

Os frutos do mar representam uma importante fonte de proteínas, minerais essenciais, vitamina D e ácidos graxos poliinsaturados, como os ômega-3. Os ômega-3 auxiliam na diminuição dos níveis de triglicerídeos e LDL (lipoproteína de baixa densidade, conhecido como o mau colesterol), conseqüentemente diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares.¹ No entanto, alguns frutos do mar podem acumular altos teores de elementos tóxicos em seus tecidos, tais como As, Cd, Hg e Pb.²

Cerca de 80% da produção mundial de frutos do mar é destinada como fonte direta de alimentos ao ser humano. O restante (cerca de 20%) é utilizado na produção de ração para a alimentação animal e produção de óleo de peixe, as quais indiretamente são também destinadas à dieta humana.³ Desta, uma proporção considerável sofre algum tipo de tratamento culinário antes de ser ingerida na dieta. É comprovado que o emprego de altas temperaturas durante o processo de cocção, pode levar à degradação e/ou solubilização de muitos nutrientes, vitaminas e lipídeos.^{4,5} Ou seja, os compostos presentes nos alimentos (macronutriente e/ou micronutriente e/ou contaminante) podem ser afetados pelas condições do tratamento culinário.

Atualmente, existem poucos estudos relacionados à avaliação da influência do tratamento culinário no comportamento da composição de contaminantes inorgânicos em alimentos. Dentre estes, é possível encontrar alguns estudos envolvendo frutos do mar, os quais reportam tanto redução quanto aumento do teor de um dado elemento no alimento após o tratamento culinário, sem levar em consideração cálculos de balanço de massas na interpretação dos resultados.

¹ EFSA, Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (Fish and Shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury, European Food Safety Authority, 2014.

² Olmedo, P., *et al.*, *Environ. Int.* 59 (2013) 63-72.

³ FAO, FISH TO 2030 - Prospects for Fisheries and Aquaculture, Fisheries and Aquaculture Department, 2013.

⁴ Ersoy, B., Özeren, A., *Food Chem.* 115 (2009) 419-422.

⁵ Tornberg, E., *Meat Sci.* 70 (2005) 493-508.

O fato de um dado contaminante aumentar sua concentração em uma amostra após o processo de cocção é, possivelmente, devido a forma de expressar os resultados. A maioria destes estudos não considera no balanço de massas a quantidade de massa absorvida (ex.: óleo de fritura) e/ou perdida (ex.: água, gordura, etc.) durante cada processo de cocção, o que pode gerar interpretações inexatas e valores subestimados e/ou superestimados em relação às perdas de um dado analito após o processo de cocção. Além disso, outro fator importante que deve ser considerado durante este tipo de estudo, é a avaliação de uma amostragem adequada para a seleção das porções de frutos do mar, de forma a simular uma amostra única (homogênea) em relação a todos os tratamentos culinários, caso contrário a avaliação não será representativa e as interpretações conseqüentemente serão afetadas. Além da avaliação de diferentes tratamentos culinários, atualmente, pesquisas envolvendo estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade de metais e não-metals de frutos do mar também têm sido realizadas cada vez mais como uma ferramenta para melhor avaliar o potencial tóxico destes contaminantes presentes nestes alimentos. No entanto, pesquisas que abordam a avaliação de biodisponibilidade após tratamentos culinários são muito escassas e, mais ainda, são escassas as que abordam análise de especiação após a investigação do efeito do tratamento culinário na biodisponibilidade destas espécies químicas.

O conhecimento do teor total de um dado contaminante em um alimento pode não ser suficiente para avaliar os riscos associados à saúde. A quantidade total do contaminante não necessariamente reflete a quantidade biodisponível ao organismo. Em geral, somente uma porção desta quantidade é absorvida e metabolizada no organismo.⁶ A avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade pode ser realizada tanto através de ensaios *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que, geralmente, é efetuada por métodos de digestão *in vitro*, as quais simulam a digestão gastrointestinal em reatores de bancada em laboratório e apresentam como vantagem um maior controle de variáveis e um menor custo.

Nas últimas décadas uma ampla variedade de métodos analíticos e estudos de biodisponibilidade, interações, metabolismo e toxicidade foram desenvolvidos para a avaliação de contaminantes em frutos do mar. Apesar deste tipo de pesquisa ainda

⁶ Versantvoort, C. H. M., *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 31-40.

ser objeto de muito estudo, há ainda áreas carentes pouco exploradas e elucidadas.⁷

De maneira geral, a maioria dos estudos avaliando a presença de metais pesados em frutos do mar foi desenvolvida em amostras sem tratamento culinário, e os poucos estudos envolvendo a avaliação da influência destes tratamentos na alteração da concentração destes contaminantes, envolvem interpretações inexatas em relação ao comportamento do analito após o processo de cocção. Além disso, poucos trabalhos utilizam e discutem uma amostragem que seja suficientemente representativa para a avaliação do efeito do tratamento culinário na concentração e biodisponibilidade de metais e não-metals de frutos do mar. Baseado nisso, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência de diferentes tratamentos culinários (sem cocção, cozida, frita e *sauté*) na concentração e biodisponibilidade (*in vitro*) de metais (Cd, Cr, Cu, Hg e Pb), não-metals (As, Se, S) e espécies de As em frutos do mar, bem como, avaliar uma amostragem adequada para este propósito.

⁷ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 324-345.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metais pesados em frutos do mar

O termo “metal pesado” na área da química, possui várias definições e controvérsias., sendo que, atualmente, não existe nenhuma definição oficial para este termo. Diversos pesquisadores e autores citam definições para “metal pesado”, porém não há uma definição de consenso. Em 2002, Duffus⁸ apresentou à União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) os resultados de uma extensa revisão bibliográfica sobre as definições do termo “metal pesado” nas últimas décadas. As principais definições estavam relacionadas, principalmente, à massa específica (> 3 a $> 7 \text{ g cm}^{-3}$), massa atômica, número atômico, toxicidade, entre outras.

Apesar de não haver uma definição oficial para este termo, muitos trabalhos consideram metais pesados os elementos que podem apresentar riscos à saúde em baixas concentrações e não necessariamente classificados como metais (ex.: As e Se). Dentre estes elementos, destacam-se o As, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb e Se.⁸⁻¹⁰ Estes elementos são geralmente encontrados no meio ambiente em baixas concentrações. Baseado nisso, alguns pesquisadores preferem adotar o termo “elementos traços” ao invés de “metais pesados”. No entanto, novamente este termo fica limitado, uma vez que é possível também encontrar estes elementos em concentrações altas em algumas amostras. Desta maneira, o presente trabalho adota o termo metal pesado para os elementos que podem apresentar riscos à saúde, tais como As, Cd, Cu, Cr, Hg e Pb.

Em geral, organismos aquáticos apresentam alta capacidade de acumular estes elementos, principalmente As, Cd, Hg e Pb.⁹ Os frutos do mar são uma importante fonte de proteína, minerais essenciais, vitamina D e ácidos graxos poliinsaturados, como os ômega-3.¹ No entanto, alguns deles podem acumular altos

¹ EFSA, Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (Fish and Shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury, European Food Safety Authority, 2014.

⁸ Duffus, J. H., *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 793-807.

⁹ Hajeb, P., *et al.*, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 457-472.

¹⁰ Järup, L., *Br. Med. Bull.* 68 (2003) 167-182.

teores de metais pesados em seus tecidos, o que pode representar risco à saúde dos consumidores.^{2,11} A bioacumulação de metais pesados em frutos do mar varia de acordo com o habitat, a espécie, a idade, o sexo e os órgãos constituintes.^{12,13} Apesar de alguns metais pesados (As, Cd, Cr(VI), Hg e Pb) não apresentarem nenhuma função biológica conhecida, outros são essenciais em pequenas quantidades, dentre estes destacam-se o Cu, Cr(III), e Se.¹³

2.1.1 Arsênio

O fato de o As se acumular em altas concentrações em organismos marinhos, principalmente frutos do mar, deve-se à similaridade das propriedades química do As ao N e ao P. O As pode ser encontrado sob diversas formas em frutos do mar, tanto inorgânicas (As(III) e As(V)) quanto orgânicas. A maioria dessas espécies existe ligada covalentemente a compostos orgânicos. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais espécies de As encontradas em frutos do mar.

Espécies inorgânicas de As são amplamente distribuídas no meio ambiente e encontradas, principalmente, como As(III) e As(V). Em ambientes onde há a presença de oxigênio o As(V) é favorecido termodinamicamente. No entanto, no meio ambiente o As(V) é facilmente convertido a As(III) e vice-versa. Estas espécies são, geralmente, encontradas juntas, em proporções que dependerão do potencial redox do meio. Em ambientes aquáticos, o As(V) é a espécie majoritária, mas é possível encontrar também As(III), DMA e MMA nas camadas mais superficiais.^{14,15}

A concentração de As total em ambientes aquáticos é tipicamente menor que $10 \mu\text{g L}^{-1}$, frequentemente menor que $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Já em frutos do mar essa concentração é relativamente maior. A maioria dos frutos do mar apresentam pequenas quantidades de As inorgânico, sendo a maior parte composta por As orgânico, principalmente na forma de AsB.¹⁶

² Olmedo, P., *et al.*, *Environ. Int.* 59 (2013) 63-72.

¹¹ Amirah, M. N., *et al.*, *J. Environ. Pollut. Human Health* 1 (2013) 1-5.

¹² Mitra, A., Ghosh, R., *Global J. Anim. Sci. Res.* 2 (2014) 33-45.

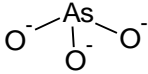
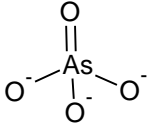
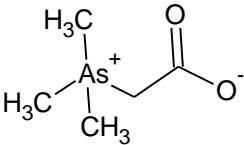
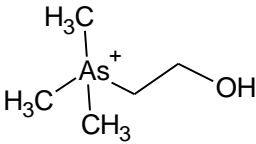
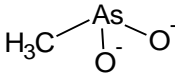
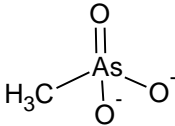
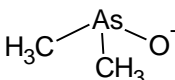
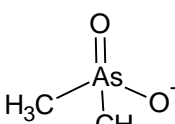
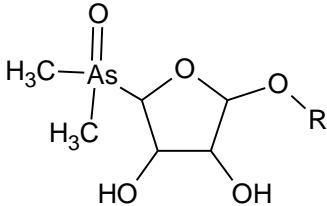
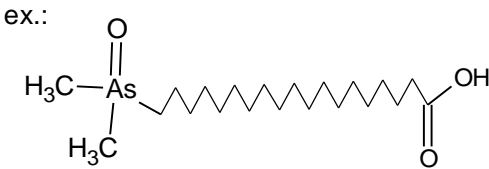
¹³ El-Moselhy, K. M., *et al.*, *Egypt. J. Basic Appl. Sci. Res.* 1 (2014) 97-105.

¹⁴ Andreae, M. O., *Deep Sea Res.* 25 (1978) 391-402.

¹⁵ Borak, J., Hosgood, H. D., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47 (2007) 204-212.

¹⁶ Francesconi, K. A., *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 373-381.

Tabela 1. Nome, abreviatura e estrutura química de algumas espécies de As comumente presentes em frutos do mar (adaptado de Francesconi¹⁶).

| Nome | Abreviatura | Estrutura química |
|------------------------|-------------|---|
| arsenito | As(III) |  |
| arsenato | As(V) |  |
| arsenobetaina | AsB |  |
| arsenocolina | AsC |  |
| monometil arsênio(III) | MMA(III) |  |
| monometil arsênio(V) | MMA(V) |  |
| dimetil arsênio(III) | DMA(III) |  |
| dimetil arsênio(V) | DMA(V) |  |
| arseno-açúcares | AsSug |  |
| arsenolipídios | AsLip | ex.:  |

¹⁶ Francesconi, K. A., *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 373-381.

A espécie AsB foi primeiramente identificada em 1977 por Edmonds *et al.*¹⁷, e representa a espécie de As majoritária encontrada na maioria dos frutos do mar, principalmente em animais marinhos.¹⁶⁻¹⁸ A concentração de AsB em organismos de água doce é geralmente, muito menor que aquela em organismos marinhos. Evidências sugerem que a causa da concentração de AsB ser relativamente maior em organismos marinhos está relacionada à salinidade do meio ambiente aquático. A estrutura química da AsB é similar à estrutura da betaína (conhecida também como glicinabetaína), sendo que a única diferença estrutural é a substituição do átomo de As por N. A betaína tem um efeito osmótico em animais aquáticos invertebrados. Como um osmólito, a betaína desempenha um papel de proteção contra o estresse ambiental (ex.: salinidade) em células, proteínas e enzimas.¹⁶

Espécies orgânicas metiladas de As, tais como MMA e DMA são, também, frequentemente encontradas em frutos do mar. Já outras espécies metiladas, tais como o óxido de trimetilarsina (TMAO) e o íon tetrametilarsônio (TMA⁺) também são, encontradas em alguns frutos do mar, mas em concentrações relativamente menores que as de MMA e DMA.^{15,19} Adicionalmente, existem inúmeras espécies de AsSug presentes em frutos do mar, mais precisamente em algas marinhas, sendo que dezenas dessas espécies já foram identificadas e estão descritas na literatura.^{19,20} Os AsSug são geralmente as espécies de As majoritárias presentes em algas marinhas e, também, em alguns animais que se alimentam de algas.²⁰ No entanto, para a grande maioria dos animais marinhos a espécie de As majoritária é de fato a AsB. Outras espécies de As, como AsLip e outras espécies de As-alquil ainda são objeto de estudo e atualmente poucas informações são citadas na literatura em relação à toxicidade destas espécies.¹⁹

Em relação às espécies de As, as trivalentes geralmente possuem uma maior toxicidade que as pentavalentes, enquanto que as espécies inorgânicas tendem a possuir maior toxicidade que as orgânicas. Espécies de As inorgânicas são consideradas altamente tóxicas. A toxicidade geralmente diminui com o aumento do

¹⁵ Borak, J., Hosgood, H. D., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47 (2007) 204-212.

¹⁶ Francesconi, K. A., *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 373-381.

¹⁷ Edmonds, J. S., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 1543-1546.

¹⁸ Edmonds, J. S., Francesconi, K. A., *Mar. Pollut. Bull.* 26 (1993) 665-674.

¹⁹ EFSA, *EFSA Journal* 7 (2009) 1351.

²⁰ Sartal, C. G., *et al.*, *Arsenic in Seaweed: Presence, Bioavailability and Speciation*, Taylor & Francis Group, 2015, pp. 276-351.

grau de metilação da espécie de As (MMA, DMA e TMAO).²¹ Já a AsB é considerada uma espécie não-tóxica.

As espécies de As trivalentes e pentavalentes possuem, aparentemente, biodisponibilidade similar. Entretanto, os processos bioquímicos apresentam afinidade diferenciada para as diferentes espécies de As, sendo que as espécies trivalentes ligam-se, preferencialmente, aos grupos tióis de proteínas, inibindo a função de várias enzimas.²² Cabe ressaltar, que estudos de toxicidade de outras espécies de As (ex.: AsLip, AsSug) ainda são muito limitados.

A exposição prolongada ao As, principalmente As inorgânico, pode causar câncer de pele, de rim, de pulmão e outros. A exposição crônica pode ainda incluir danos ao sistema nervoso central, além de doenças cardiovasculares.²³

2.1.2 Cádmi

O cádmio é um elemento de alta toxicidade que pode ser encontrado naturalmente na água, solo e atmosfera. Por ser um subproduto da exploração do Zn e Pb, e por ser utilizado na fabricação de baterias, tornou-se uma das principais fontes de contaminação do meio ambiente.²⁴ Em ambiente aquático o Cd pode acumular-se no sedimento e, por estar aderido à partículas suspensas, torna-se biodisponível aos organismos aquáticos. Além disso, a complexação do Cd com íons Cl⁻ na água do mar aumenta ainda mais a sua biodisponibilidade e, portanto, a sua bioacumulação em organismos aquáticos. O Cd entra na cadeia alimentar dos frutos do mar através da contaminação da água e/ou biota. Nos animais aquáticos, o Cd acumula-se preferencialmente no fígado e rim, mas pode ser encontrado em concentrações significativas em outros órgãos e músculos também.^{24,25} Dentre os frutos do mar, os moluscos apresentam maiores concentrações que os peixes e crustáceos.²⁶

Como um ácido mole de Lewis, o Cd forma complexos fortes com S presente em proteínas, e quando associados à estas proteínas provocará seus efeitos tóxicos. O Cd é um elemento não-essencial e com alta toxicidade ao ser humano. O rim é

²¹ Leermakers, M., *et al.*, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1-10.

²² Liebl, B., *et al.*, *Appl. Organomet. Chem.* 9 (1995) 531-540.

²³ Oberoi, S., *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23 (2014) 1187-1194.

²⁴ UNEP, Final Review of Scientific Information on Cadmium United Nations Environment Programme, 2010.

²⁵ Ruangsomboon, S., Wongrat, L., *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) 15-20.

²⁶ EFSA, Cadmium in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, European Food Safety Authority, 2009, pp. 1-139.

considerado o órgão mais afetado em relação a ingestão deste elemento através da alimentação, sendo que, os principais efeitos incluem a excreção de proteínas na urina e danos esqueléticos. Muitos destes efeitos tóxicos do Cd estão relacionados, também, com a sua competição com o Zn em ligações com enzimas.^{24,26}

Atualmente, a legislação brasileira²⁷ estabelece limites máximos de Cd em frutos do mar de acordo com a espécie (0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes, 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para crustáceos e 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para moluscos cefalópodes e bivalves).

2.1.3 Cobre

O Cu é um elemento essencial ao ser humano e diversos animais. Assim, tanto a deficiência quanto o excesso deste elemento podem gerar danos à saúde humana. A toxicidade do Cu é, geralmente, associada com uma ingestão aguda deste metal. O Cu encontra-se biodisponível como Cu(I) e Cu(II) e exerce funções em reações redox essenciais ao organismo, tais como na respiração mitocondrial e na síntese da melanina.²⁸ No entanto, a ingestão de altas concentrações de Cu tem sido associada com doenças neurológicas, como o mal de Alzheimer, além de causar danos ao fígado.²⁸ A principal fonte de exposição do ser humano ao Cu é através da alimentação. Dentre os frutos do mar que apresentam os maiores teores de Cu destacam-se os moluscos.²⁸ Apesar do Cu apresentar toxicidade em altas concentrações, atualmente não existe legislação vigente no Brasil que limita os níveis máximos de Cu em frutos do mar.

2.1.4 Cromo

Existem diversos estados de oxidação do Cr, porém somente as espécies de Cr(III) e Cr(VI) são significativamente biodisponíveis no meio ambiente. O Cr(III) é essencial para o metabolismo de carboidratos e lipídeos, enquanto o Cr(VI) apresenta efeitos tóxicos mutagênicos e cancerígenos.^{29,30} O Cr(VI) apresenta uma solubilidade

²⁴ UNEP, Final Review of Scientific Information on Cadmium United Nations Environment Programme, 2010.

²⁶ EFSA, Cadmium in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, European Food Safety Authority, 2009, pp. 1-139.

²⁷ ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013, 2013.

²⁸ Stern, B. R., *et al.*, *J. Toxicol. Environ. Health*, B 10 (2007) 157-222.

²⁹ Bielicka, A., *et al.*, *Pol. J. Environ. Stud.* 14 (2005) 5-10.

³⁰ EFSA, *EFSA Journal* 12 (2014) 3595.

relativamente maior que o Cr(III) e, portanto, sua labilidade é muito maior em ambientes aquáticos. Tanto o Cr(III) quanto o Cr(VI) são absorvidos pelos organismos aquáticos, sendo que grande parte do Cr(VI) é reduzido a Cr(III) através de reações redox que ocorrem no metabolismo do organismo, sendo que, em geral, a espécie de Cr predominante em frutos do mar é o Cr(III).^{29,31} Dentre os frutos do mar que apresentam os maiores teores de Cr destacam-se os moluscos e crustáceos.²⁹ Apesar de o Cr apresentar maior toxicidade dependendo do seu estado de oxidação, atualmente não existe legislação vigente no Brasil que estabeleça limites para este elemento em frutos do mar.

2.1.5 Chumbo

O Pb, assim como Cd, é um metal pesado de alta toxicidade. Os principais usos de Pb estão relacionados às indústrias de baterias, de tintas e corantes, de catalisadores, entre outras. Apesar de tintas e corantes com chumbo serem proibidas em alguns países, em outros elas ainda são bastante comercializadas. As principais fontes de contaminação por Pb ao ser humano são através do ar e alimentação e, dentre os alimentos que apresentam as maiores concentrações deste elemento, destacam-se os moluscos e crustáceos. Além disso, o Pb pode apresentar diferentes toxicidades, dependendo de sua espécie química. Em geral, todas as espécies de Pb são consideradas tóxicas, porém as espécies orgânicas são consideradas mais tóxicas que as espécies inorgânicas de Pb (Pb²⁺). Alguns estudos demonstram que a principal forma de Pb em frutos do mar é Pb²⁺. No entanto, é possível encontrar espécies orgânicas de Pb em concentrações menores também acumuladas em frutos do mar.^{9,32,33} Uma vez absorvido pelo organismo o Pb é, geralmente, retido por proteínas e, então, transportado pelo sangue até tecidos onde pode ser acumulado e biotransformado. Quando absorvido pelo organismo, o Pb pode apresentar efeitos nocivos ao sistema hematológico, sistema nervoso central e sistema renal. A intoxicação por este elemento também é conhecida como saturnismo, o qual pode causar retardo mental, deficiência do fígado, distúrbios no sistema reprodutor, perda

⁹ Hajeb, P., *et al.*, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 457-472.

²⁹ Bielicka, A., *et al.*, *Pol. J. Environ. Stud.* 14 (2005) 5-10.

³¹ Neff, J. M., Chapter 7 - Chromium in the Ocean, Elsevier, 2002, pp. 131-143.

³² Pastorelli, A. A., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2012) 1913-1921.

³³ Chen, Y., *et al.*, *Electrophoresis* 35 (2014) 1346-1352.

de memória, entre outros danos.^{9,32} Atualmente a legislação brasileira²⁷, estabelece limites máximos de Pb em frutos do mar de acordo com a espécie (0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes, 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para crustáceos, 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para moluscos cefalópodes e 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para moluscos bivalves).

2.1.6 Mercúrio

Este elemento encontra-se distribuído no planeta com os seguintes isótopos naturais e abundâncias: ^{202}Hg (29,8%), ^{200}Hg (23,13%), ^{199}Hg (16,84%), ^{201}Hg (13,22%), ^{198}Hg (10,02%), ^{204}Hg (6,85%) e ^{196}Hg (0,15%).³⁴

Os principais usos deste metal incluem as amálgamas dentárias, interruptores de inclinação, termômetros, lâmpadas, pigmentos, baterias, reagentes, barômetros, entre outros.^{35,36} O Hg pode ser encontrado sob diversas formas no meio ambiente, sendo as principais o Hg elementar, Hg inorgânico (Hg^{2+} e Hg_2^{2+}) e diversas espécies orgânicas. No entanto, as principais espécies de Hg encontradas em frutos do mar são as espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , sendo esta última a espécie de Hg majoritária para a maioria dos peixes. O CH_3Hg^+ é a espécie de Hg mais comum dentre suas formas orgânicas. Como esperado para um ácido mole de Lewis, o CH_3Hg^+ forma complexos extremamente fortes com S e Se. A alta afinidade por grupos sulfidrila e selenóis, que estão presentes em proteínas, é uma das principais razões de sua alta toxicidade.³⁷ Já com halogênios o Hg forma complexos estáveis na seguinte ordem $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F}$.³⁸

Todas as espécies de Hg são consideradas tóxicas. No entanto, o CH_3Hg^+ possui uma toxicidade relativamente maior que o Hg^{2+} . Alguns estudos relatam que a toxicidade do CH_3Hg^+ é cerca de 100 vezes maior do que a toxicidade do Hg inorgânico.³⁹ Dependendo do nível de exposição, a dose metabolizada pode ser fatal. A exposição ao Hg pode provocar efeitos nocivos para o sistema nervoso, digestivo,

⁹ Hajeb, P., *et al.*, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 457-472.

²⁷ ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013, 2013.

³² Pastorelli, A. A., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2012) 1913-1921.

³⁴ Hintelmann, H., *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.

³⁵ Huber, K., *Mercury Use: Industry*, 1997, pp. 407 - 435.

³⁶ Kuiken, T., *Mercury products guide: The hidden dangers of mercury*, National Wildlife Federation, 2002, pp. 17-34.

³⁷ Micaroni, R. C. d. C. M., *et al.*, *Quim. Nova* 23 (2000) 487-495.

³⁸ Hintelmann, H., *Sample preparation for mercury speciation*, Elsevier, 2003, pp. 1063-1080.

³⁹ Chen, D., *et al.*, *Application Note, Agilent Technologies* (2005) 8.

respiratório, imunológico, além dos rins e pulmões.⁴⁰ Atualmente, a principal fonte de exposição de Hg ao ser humano é através do consumo de peixes, sendo que a principal espécie de Hg em músculo de peixe está na forma de CH_3Hg^+ (> 90%).⁴¹⁻⁴⁴ A intoxicação por Hg danifica células do sistema nervoso central, podendo provocar distúrbios visuais como escotomas e redução do campo visual. Além disso, pode causar ataxia, parestesia, perda de audição, disartria, deterioração mental, tremor muscular, distúrbio da motilidade e, nos casos de exposição grave, paralisia e morte.⁴⁵⁻⁴⁷

Um caso mundialmente conhecido ocorreu na Baía de Minamata no Japão em 1953, onde uma indústria despejou nas águas da baía uma grande quantidade de CH_3Hg^+ que era produzido como sub-produto da produção de acetaldeído. A principal fonte de alimento da população de Minamata era proveniente de peixes desta baía que estavam altamente contaminados com esta espécie de Hg.^{41,48-50} Inicialmente, gatos e pássaros começaram a apresentar sequelas e comportamentos estranhos e, posteriormente, os seres humanos também apresentaram sintomas típicos de intoxicação com Hg. Na época este caso ficou conhecido como a “doença de Minamata”.

Atualmente a legislação brasileira²⁷, estabelece limites máximos de Hg em frutos do mar de acordo com a espécie (0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes, 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para peixes predadores, 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para crustáceos e 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para moluscos cefalópodes e bivalves).

²⁷ ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013, 2013.

⁴⁰ WHO, Mercury in Health Care: Policy Paper, World Health Organization, 2005.

⁴¹ Bisinoti, M. C., Jardim, W. F., *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.

⁴² EPA, Mercury Update: Impact on Fish Advisories, Environmental Protection Agency, 2001.

⁴³ Hacon, S., *et al.*, *J. Geochem. Explor.* 58 (1997) 209-216.

⁴⁴ Horvat, M., Gibičar, D., *Speciation of Mercury: Environment, Food, Clinical, and Occupational Health*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005, pp. 281-304.

⁴⁵ Counter, S. A., Buchanan, L. H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 209-230.

⁴⁶ JECFA, Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, World Health Organization, 2004, pp. 132-139.

⁴⁷ Leong, C. C. W., *et al.*, *Neuroreport* 12 (2001) 733-737.

⁴⁸ Harada, M., *Crit. Rev. Toxicol.* 25 (1995) 1-24.

⁴⁹ Miranda, M. R., *et al.*, *Oecol. Bras.* 11 (2007) 240-251.

⁵⁰ Schrier, R. W., *Diseases of the kidney & urinary tract*, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp. 1153-1159.

2.2 Influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metais em frutos do mar

Apesar de ainda pouco explorados, na literatura são descritos alguns estudos relacionados à influência do tratamento culinário na composição de contaminantes inorgânicos em alimentos. Dentre estes estudos é possível encontrar alguns envolvendo frutos do mar, no qual é descrito tanto a redução quanto o aumento do teor de um dado contaminante no alimento, após determinado tratamento culinário.

Dabeka *et al.*⁵¹ fizeram um estudo com alimentos cozidos e observaram um aumento considerável do teor de As em frutos do mar que sofreram processos de cocção. Os autores atribuíram este aumento às perdas de massa da amostra durante o processo de cocção. Em outro estudo, Morgan *et al.*⁵² estudaram o efeito do processo de cocção na alteração do teor de Hg em peixes. Eles avaliaram processos de cocção comumente usados para o preparo de peixes (fritura, assagem, cozimento e defumagem). Tais autores observaram que a concentração de Hg total foi maior após todos os procedimentos de cocção. No entanto, eles concluíram que este aumento ocorreu devido à perda de umidade e gordura durante cada processo de cocção, indicando que a concentração de Hg manteve-se constante.

Ersoy *et al.*⁵³ avaliaram a influência de 4 processos de cocção (assagem, cozimento na grelha, cozimento no forno de micro-ondas e fritura) na concentração de elementos tóxicos em filés de robalo. Foi observado pelos autores que as porções de filé cozidas em micro-ondas e assadas sofreram uma redução ($p < 0,05$) no teor de Pb. Além disso, foi constatado, também, um aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de Cd nas amostras cozidas em micro-ondas e um aumento significativo ($p < 0,05$) no teor de As nas porções de filés que foram cozidas em micro-ondas ou fritas. Os autores relatam que a causa deste aumento é desconhecida, porém eles sugerem que este aumento no teor de As e Cd deve-se, possivelmente, às mudanças do teor de umidade na amostra que ocorrem durante o processo de cocção. No entanto, eles não utilizaram cálculos de balanço de massas para quantificar as reais perdas (se houver) de As e Cd.

⁵¹ Dabeka, R. W., *et al.*, *J AOAC Int.* 76 (1993) 14-25.

⁵² Morgan, J. N., *et al.*, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 7 (1997).

⁵³ Ersoy, B., *et al.*, *Food Chem.* 99 (2006) 748-751.

Em outro trabalho realizado por Ersoy e Özeren.⁴ foi avaliado o efeito dos mesmos processos de cocção (assado, grelhado, cozido no micro-ondas e frito) na alteração do teor mineral de bagre africano. Novamente, os autores observaram um aumento considerável do teor de alguns elementos (Cu, Na, K, Ca, Fe, Mn, Mg e Zn) para as amostras que sofreram o processo de cocção. No entanto, os autores não justificam a causa da perda e/ou aumento do teor mineral ocorrida durante cada processo de cocção. Observações similares em relação às perdas e, principalmente, aumento do teor de minerais em peixes cozidos tem sido, também, relatados em outros trabalhos.⁵⁴⁻⁵⁶

Devesa *et al.*⁵⁷ observaram tanto a redução quanto o aumento do teor de As em amostras de frutos do mar (peixes, moluscos e crustáceos) que sofreram diferentes processos de cocção (cozido na grelha, no micro-ondas, na água, no vapor, no forno e na torradeira). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para mesma amostra crua. Os autores atribuíram as perdas de As à solubilização e/ou volatilização deste elemento durante o processo de cocção. Em relação ao aumento do teor de As, eles sugerem que a causa deve-se, provavelmente, às perdas de massa (água, proteína, lipídeo e carboidratos) que ocorrem durante o processo de cocção, resultando na concentração de As na amostra. No entanto, como na maioria dos trabalhos, as perdas de massa de água e outros compostos (proteínas, lipídeos e carboidratos) não são relacionadas quantitativamente com as perdas do analito (neste caso As).

O fato de um dado contaminante aumentar, aparentemente, sua concentração em uma amostra após o processo de cocção é devido a forma de expressar os resultados. A maioria dos estudos não considera no balanço de massas a quantidade absorvida (ex.: óleo de fritura) e/ou perdida (ex.: água, gordura, etc.) durante cada processo de cocção. Isto resulta em interpretações inexatas e valores subestimados e/ou superestimados em relação às perdas de um dado analito após o processo de cocção.

⁴ Ersoy, B., Özeren, A., *Food Chem.* 115 (2009) 419-422.

⁵⁴ Gokoglu, N., *et al.*, *Food Chem.* 84 (2004) 19-22.

⁵⁵ Marimuthu, K., *et al.*, *J. Food Sci. Technol.* 49 (2012) 373-377.

⁵⁶ Perelló, G., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11262-11269.

⁵⁷ Devesa, V., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4132-4140.

Em 2015, Schmidt *et al.*⁵⁸ avaliaram o comportamento de espécies de Hg (CH_3Hg^+ e Hg^{2+}) em peixes após diferentes tratamentos culinários (sem cocção, cozimento, fritura e assagem) através de cálculos que expressavam os resultados das amostras cozidas em base de massa crua de peixe (massa de amostra antes do tratamento culinário), evitando assim, resultados subestimados e superestimados que poderiam ocorrer devido a diluição do analito por absorção de massa (ex.: óleo de fritura) na amostra e pela concentração do analito devido à perda de massa da amostra (ex.: gordura, água, etc), respectivamente. Os autores observaram perdas de Hg total de até 33% após o processo de fritura e, não foram observadas conversões significativas entre as espécies de Hg (CH_3Hg^+ e Hg^{2+}).

2.3 Ensaio de biodisponibilidade de contaminantes inorgânicos de frutos do mar

O conhecimento somente do teor de um dado contaminante em um alimento pode não ser suficiente para avaliar os riscos associados deste à saúde. A quantidade total do contaminante não necessariamente reflete a quantidade biodisponível no organismo. Em geral somente uma porção desta quantidade é absorvida e metabolizada no organismo.⁶ Além da avaliação de diferentes tratamentos culinários, pesquisas envolvendo estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade de metais e não-metals de frutos do mar também têm sido feitas cada vez mais como uma ferramenta para melhor avaliar o potencial tóxico destes contaminantes presentes nestes alimentos.

É importante definir dois termos biológicos: bioacessibilidade e biodisponibilidade. A bioacessibilidade é definida como a fração de um dado elemento que é liberado da matriz do alimento após sua ingestão, e solubilizado no trato gastrointestinal.^{20,59,60} No entanto, o termo biodisponibilidade representa a fração do elemento solubilizado que é absorvida no trato intestinal e se torna biodisponível no organismo, podendo ser estocado, distribuído para outros tecidos e

⁶ Versantvoort, C. H. M., *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 31-40.

²⁰ Sartal, C. G., *et al.*, *Arsenic in Seaweed: Presence, Bioavailability and Speciation*, Taylor & Francis Group, 2015, pp. 276-351.

⁵⁸ Schmidt, L., *et al.*, *Food Control* 47 (2015) 413-419.

⁵⁹ Fernández-García, E., *et al.*, *Nutr. Res.* 29 (2009) 751-760.

⁶⁰ Carbonell-Capella, J. M., *et al.*, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 155-171.

metabolizado.^{20,59,60} A avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade pode ser realizada tanto através de ensaios *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que geralmente é efetuada por métodos de digestão *in vitro*, os quais simulam a digestão gastrointestinal em reatores de bancada em laboratório e apresentam como vantagem um maior controle de variáveis e um menor custo.

Baseando-se nestas definições, uma série de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade foi realizada nos últimos 20 anos para uma melhor avaliação dos riscos e benefícios associados aos contaminantes e nutrientes em diversas matrizes de frutos do mar.

Torres-Escribano *et al.*⁶¹ avaliaram a bioacessibilidade de Hg em espécies de peixes predadores (sarda, atum, peixe-espada e tubarão), bastante consumidos na Espanha, após o processo de cozimento em chapa sem o uso de condimentos. O teste de bioacessibilidade foi desenvolvido por digestão gastrointestinal *in vitro*. Os autores observaram um aumento na concentração de Hg após o processo de cocção, atribuindo esse aumento, principalmente, à perda de água ou outros compostos da amostra durante o processo de cocção. No entanto, foi observado que o Hg bioacessível (BAc, %) foi reduzido significativamente após o cozimento (BAc = 42 ± 26% na amostra crua para BAc = 26 ± 16% na amostra cozida). A determinação de Hg foi feita por CVG-AFS.

Recentemente, Bermejo-Barrera *et al.*^{20,62-70} fizeram uma série de estudos de bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade em frutos do mar que sofreram ou não tratamento culinário. Em uma revisão realizada pelo mesmo grupo de pesquisa⁷, eles descreveram uma visão geral da importância de métodos analíticos que visam ao estudo não somente da concentração de contaminantes em alimentos mas, também, da bioacessibilidade e biodisponibilidade destes frente a digestões gastrointestinais *in*

⁷ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 324-345.

²⁰ Sartal, C. G., *et al.*, *Arsenic in Seaweed: Presence, Bioavailability and Speciation*, Taylor & Francis Group, 2015, pp. 276-351.

⁵⁹ Fernández-García, E., *et al.*, *Nutr. Res.* 29 (2009) 751-760.

⁶⁰ Carbonell-Capella, J. M., *et al.*, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 155-171.

⁶¹ Torres-Escribano, S., *et al.*, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 981-986.

⁶² Sartal, C. G., *et al.*, *Microchem. J.* 105 (2012) 65-71.

⁶³ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Food Chem.* 124 (2011) 1747-1752.

⁶⁴ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Food Chem.* 130 (2012) 552-560.

⁶⁵ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Food Chem.* 139 (2013) 872-877.

⁶⁶ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Microchem. J.* 108 (2013) 174-179.

⁶⁷ García-Sartal, C., *et al.*, *Microchem. J.* 108 (2013) 92-99.

⁶⁸ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 24-32.

⁶⁹ Domínguez-González, R., *et al.*, *Talanta* 82 (2010) 1668-1673.

⁷⁰ García-Sartal, C., *et al.*, *Microchem. J.* 98 (2011) 91-96.

vivo e/ou *in vitro*. Adicionalmente, eles destacam a necessidade da avaliação do efeito dos tratamentos culinários em alimentos frente à bioacessibilidade, biodisponibilidade, estabilidade, e transformações de espécies químicas durante testes *in vivo* e/ou *in vitro*. Finalmente, eles ressaltaram que as condições de análise de especiação (preparo de amostra, separação e detecção) devem ser avaliadas e otimizadas para estas novas pesquisas.

Laird *et al.*⁷¹ fizeram um estudo avaliando a biodisponibilidade de espécies de Hg na dieta humana após um experimento *in vitro* de uma digestão gastrointestinal. Eles simularam a digestão de 16 tipos de alimentos e analisaram a concentração de Hg total por CVG-AAS, enquanto as espécies de Hg foram determinadas por LC-CVG-AFS. Para a extração das espécies de Hg foi utilizada uma solução complexante contendo tioureia e HCl. Neste estudo eles demonstraram que a quantidade de Hg biodisponível é independente da quantidade original no alimento. Adicionalmente, os resultados indicaram uma conversão de CH₃Hg⁺ para Hg²⁺, provavelmente devido à influência de microrganismos desmetiladores presentes na digestão gastrointestinal.

Apesar de haver diversos estudos que abordam o desenvolvimento de novos métodos analíticos, estudos de biodisponibilidade, toxicidade, interações e metabolismo de metais pesados em frutos do mar, ainda há muito a ser explorado e elucidado nesta área,⁷ o que abriu espaço para os estudos desenvolvidos neste trabalho.

⁷ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 324-345.

⁷¹ Laird, B. D., *et al.*, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 6003-6008.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação e materiais diversos

Para a decomposição das amostras por via úmida, foi utilizado um bloco de digestão (modelo SH-1, Southwest Science, EUA) com 24 posições para frascos de digestão de vidro borosilicato de 10 mL (Discover, CEM, EUA) com tampa com revestimento de PTFE e alívio de pressão. Além disso, para algumas amostras foi utilizado também o forno de micro-ondas (Discover SP-D, CEM) equipado com autoamostrador de 48 posições para frascos de digestão de vidro borosilicato de 10 mL (Discover, CEM), os mesmos frascos utilizados no bloco digestor. As condições máximas de operação deste sistema com estes frascos (vidro borosilicato) são de 240 °C e 300 psi (21 bar), respectivamente.

A Figura 1 mostra os sistemas de digestão utilizados para a decomposição das amostras.

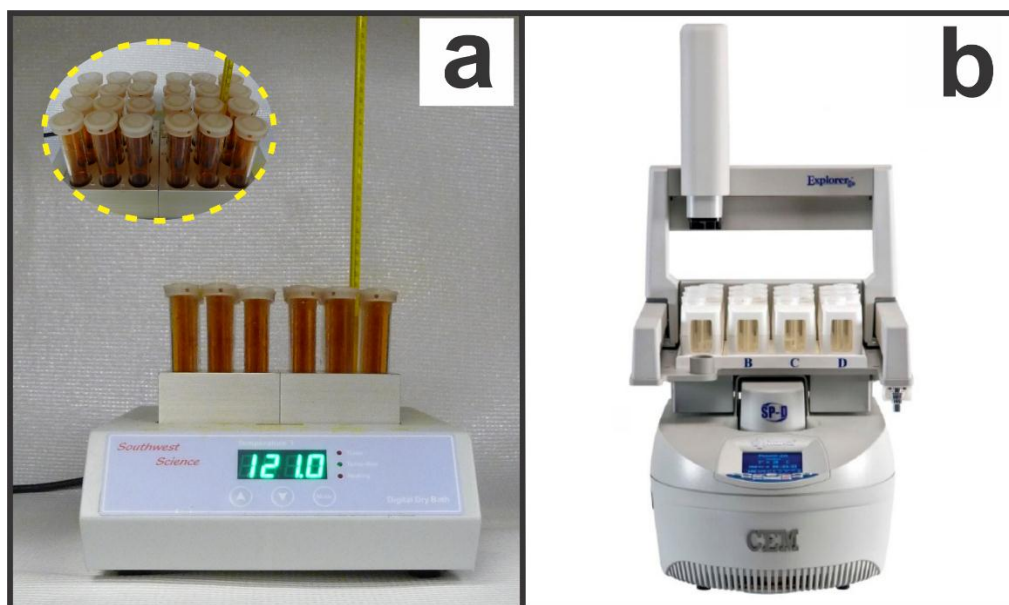


Figura 1. (a) Bloco digestor com capacidade para 24 frascos de decomposição; (b) Sistema de digestão assistida por micro-ondas com radiação focalizada (MAD) com capacidade para 48 frascos.

A determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, S e Se foi feita por espectrometria de massas triplo-quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS 8800, Agilent Technologies), conhecida também como ICP-QQQ ou ICP-MS/MS. O instrumento de ICP-QQQ foi equipado com um nebulizador concêntrico, uma câmara de nebulização de quartzo do tipo duplo-passo com resfriamento Peltier e um autoamostrador (ASX-500 series) de 240 posições para frascos de 15 mL com mais 5 posições para frascos de lavagem de 250 mL. Além disso, foram usados na cela de colisão/reação do ICP-QQQ, He (6.0, pureza de 99,9999%), como gás de colisão, e O₂ (5.0, pureza de 99,999%), como gás de reação.

A avaliação e os ajustes das condições de operação do instrumento de ICP-QQQ foram feitos de modo a se obter a melhor razão sinal/ruído para os analitos em cada método (Tabelas 2, 3 e 4). Cabe ressaltar que, para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, S e Se, foram monitorados e avaliados, com e sem gás de colisão e, com e sem o uso de padrão interno (PI) os seguintes isótopos: ⁴⁵Sc (PI), ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁷²Ge (PI), ⁷⁵As, ⁷⁷Se, ⁷⁸Se, ⁸⁹Y (PI), ¹¹¹Cd, ¹¹⁴Cd, ¹¹⁵In (PI), ¹⁵⁹Tb (PI), ²⁰¹Hg, ²⁰²Hg, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb e ²⁰⁹Bi (PI). Além disso, no modo O₂, foram monitorados ³³S¹⁶O (m/z = 49) e ³⁴S¹⁶O (m/z = 50), ⁷⁵As¹⁶O (m/z = 91) e ⁸⁹Y¹⁶O (m/z = 105, PI).

Na Tabela 2 estão mostradas as condições operacionais selecionadas para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Pb, S e Se por ICP-QQQ e na Tabela 3 são mostradas as condições operacionais selecionadas para a determinação de Hg.

Tabela 2. Condições operacionais do sistema ICP-QQQ para a determinação de metais e não-metais.

| Parâmetros | Modo 1 (Modo He) | Modo 2 (Modo O ₂) |
|--|--|---|
| Potência da RF, W | 1550 | 1550 |
| Profundidade de amostragem, mm | 8,5 | 8,5 |
| Plasma, L min ⁻¹ | 15 | 15 |
| Gás de nebulização, L min ⁻¹ | 1,03 | 1,05 |
| Gás <i>make up</i> , L min ⁻¹ | 0,14 | 0,10 |
| Bomba peristáltica*, rps | 0,10 | 0,10 |
| Câmara de nebulização, °C | 2 | 2 |
| Diâmetro interno da tocha, mm | 2,5 | 2,5 |
| <i>Skimmer cone</i> | Ni | Ni |
| Cela de colisão/reação | He (3 ml min ⁻¹) | O ₂ (30%) |
| Q1 → Q2 (PI) | ⁵² Cr → ⁵² Cr (⁸⁹ Y) | ³³ S → ⁴⁹ SO (¹⁰⁵ YO) |
| | ⁶⁵ Cu → ⁶⁵ Cu (⁸⁹ Y) | ⁷⁵ As → ⁹¹ AsO (¹⁰⁵ YO) |
| | ⁷⁵ As → ⁷⁵ As (⁷² Ge) | — |
| | ⁷⁷ Se → ⁷⁷ Se (⁸⁹ Y) | — |
| | ¹¹¹ Cd → ¹¹¹ Cd (¹¹⁵ In) | — |
| | ²⁰⁷ Pb → ²⁰⁷ Pb (²⁰⁹ Bi) | — |

*Utilizando Tygon® de 1.02 mm i.d.

Tabela 3. Condições operacionais do sistema ICP-MS para a determinação de Hg.

| Parâmetros | Condições |
|--|--|
| Potência da RF, W | 1550 |
| Profundidade de amostragem, mm | 8,5 |
| Gás de nebulização, L min ⁻¹ | 1,05 |
| Gás <i>make up</i> , L min ⁻¹ | 0,10 |
| Bomba peristáltica*, rps | 0,10 |
| Câmara de nebulização, °C | 2 |
| Diâmetro interno da tocha, mm | 2,5 |
| <i>Skimmer cone</i> | Ni |
| Cela de colisão/reação | Sem gás |
| Tempo de integração/massa, ms | 7000 |
| Isótopo | ²⁰² Hg (¹⁵⁹ Tb, PI) |
| Autoamostrador | ASX-500 |

*Utilizando Tygon® de 1.02 mm i.d.

Para a determinação das espécies de As, foi utilizado um sistema de cromatografia a líquido (1100 Series, Agilent Technologies), composto por uma bomba de HPLC binária (modelo G1312A), um degaseificador a vácuo (modelo G1379A) e um autoamostrador com válvula de injeção contendo 100 posições para frascos de 2 mL (modelo G1313A). Para a separação das espécies de As foram utilizadas uma coluna de troca aniônica PRP-X100 (Hamilton, 250 × 4,1 mm, 10 µm) e uma pré-coluna PRP-X100 (20 × 2 mm, 10 µm). A vazão da fase móvel foi mantida em 1,0 mL min⁻¹, no modo isocrático. Com auxílio de uma tubulação de PEEK (i.d. = 254 µm), a saída da coluna de HPLC foi conectada ao nebulizador concêntrico do sistema de introdução do ICP-QQQ.

Além disso, uma válvula de injeção com 6 canais (Agilent Tehnnologies, G1316A) e uma bomba peristáltica (MiniPlus 2, Gilson, França) foram usadas para a introdução pós-coluna da solução de padrão interno. A injeção do PI ocorreu após 1 min do início da separação cromatográfica, e a válvula retornou do modo de injeção para o modo de carregamento após 30 s. A ilustração do sistema HPLC-ICP-QQQ com introdução de PI pós-coluna utilizado pode ser observada na Figura 2.

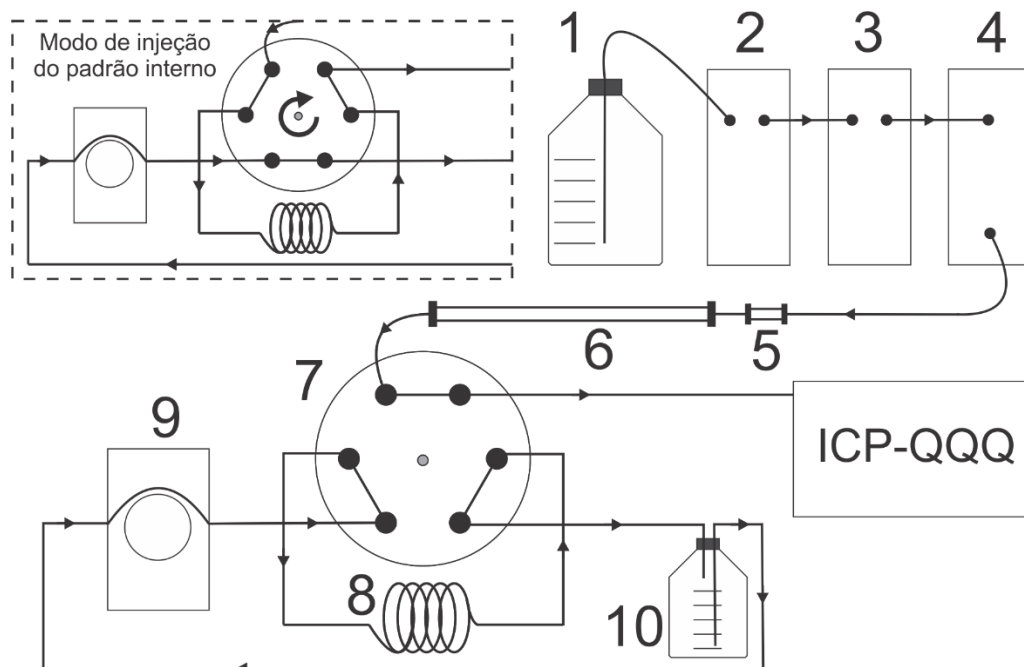


Figura 2. Esquema do sistema HPLC-ICP-QQQ com introdução de PI pós-coluna. 1. Fase móvel; 2. Degaseificador; 3. Bomba de pistão; 4. Autoamostrador; 5. Pré-coluna PRP-X100 (20 × 2 mm, 10 µm); 6. Coluna PRP-X100 (250 × 4,1 mm, 10 µm); 7. Válvula de injeção; 8. Alça de amostragem (50 µL); 9. Bomba peristáltica (2 mL min⁻¹); 10. Solução do padrão interno.

Na Tabela 4 são mostradas as condições operacionais do sistema HPLC-ICP-QQQ usadas para a análise de especiação de As.

Tabela 4. Condições operacionais do sistema HPLC-ICP-QQQ para a análise de especiação de As.

| Parâmetros | Condições |
|---|---|
| HPLC | |
| Coluna | PRP-X100 (250 x 4,1 mm, 10 µm) |
| Fase móvel | (NH ₄) ₂ HPO ₄ 10 mmol L ⁻¹ em 1% MeOH (pH 8,65) |
| Vazão da fase móvel, ml min ⁻¹ | 1,00 |
| Volume de injeção, µL | 50 |
| Padrão interno (PI) | 3 µg L ⁻¹ de As(V) (50 µL) |
| ICP-QQQ | |
| Potência da RF, W | 1550 |
| Profundidade de amostragem, mm | 9,5 |
| Gás de nebulização, L min ⁻¹ | 0,70 |
| Gás de diluição, L min ⁻¹ | 0,10 |
| Bomba peristáltica (dreno), rps | 0,30 (Tygon® de 1,52 mm i.d.) |
| Câmara de nebulização, °C | - 2 |
| Diâmetro interno da tocha, mm | 1,0 |
| <i>Skimmer cone</i> | Pt |
| Cela de colisão/reação | O ₂ (30%) |
| Tempo de aquisição do sinal, s | 960 |
| Q1 → Q2 | ⁷⁵ As → ⁷⁵ As ¹⁶ O (m/z = 91) |

Todas as pesagens foram feitas em balança analítica (modelo AG204 DR, Mettler Toledo) com resolução de 0,1 mg. A secagem e a determinação de umidade das amostras foram feitas em um liofilizador analítico com condensador de - 48 °C (Millrock Technology, modelo BT48). Uma centrifuga (Clay Adams, modelo Dynac) com capacidade para 24 frascos de 15 mL, e outra (Fisher Scientific, modelo AccuSpin Micro 17/17R) com capacidade para 24 frascos de 2 mL foi usada no preparo das amostras para posterior análise de especiação de As.

Para os processos de cocção foram utilizados uma chapa aquecedora (modelo 11-500-16SH, Fisher Scientific) e béqueres de vidro borossilicato de 400 mL munidos com tampas de vidro relógio.

Frascos de polipropileno (PP) grau analítico (*Metal-free*) de 15 e 50 mL com fundo cônico e tampa rosca (Metal-Free, Life Science Products Inc.) foram usados para o acondicionamento das amostras e soluções.

Presilhas de 3 cm de comprimento em PP usadas para vedar as extremidades dos sacos de diálise foram confeccionadas no próprio laboratório a partir dos zíperes de sacos de PP com zíper de aderência (*grip seal bags*).

Uma incubadora com mesa agitadora orbital (Innova 4230, Brunswick Scientific, EUA), equipada com um *holder* (suporte) para 25 frascos Erlenmeyer de 50 mL foi utilizada para a incubação das amostras.

O software MassHunter 4.1 (versão C.01.01, Agilent Technologies) foi utilizado para o processamento dos dados do ICP-QQQ.

3.2 Reagentes

A água utilizada foi bidestilada e deionizada em uma coluna de troca iônica ($\rho \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). HNO_3 concentrado (67-70%, m/m) de alta pureza para análise de traços (Trace Metal Grade, Fisher Chemical) e HCl concentrado (34-37%, m/m) de alta pureza (Trace Metal Grade, Fisher Chemical) foram utilizados nos procedimentos envolvidos neste trabalho.

A solução de padrão interno (PI) de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de Bi, Ge, In, Tb e Y foi preparada em HNO_3 5% (v/v) a partir de uma solução de PI multielementar ICP-MS-IS-3, na concentração de 10 mg L^{-1} (High-Purity Standards, EUA).

As soluções de referência para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Pb, Se ($0,1$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas em HNO_3 5% (v/v) a partir de uma solução padrão multielementar para ICP-MS (CL-ICV-1, SPEX CertiPrep®, EUA). As soluções de referência de S (1000 mg L^{-1} , High-Purity Standards, EUA) foram preparadas na faixa de 1 a 100 mg L^{-1} em HNO_3 5% (v/v). As soluções de referência de Hg (1000 mg L^{-1} , SPEX CertiPrep®, EUA) foram preparadas na faixa de $0,1$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em 5 mg L^{-1} de Au (1000 mg L^{-1} , SPEX CertiPrep®, EUA) e 5% (v/v) de HNO_3 .

Soluções de calibração de As(III), As(V), AsB, DMA e MMA ($0,1$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ como As) foram preparadas diariamente a partir das soluções estoques de 1000 mg L^{-1} (como As) de As(III), As(V), AsB, DMA e MMA que foram previamente preparadas a partir da dissolução dos sais de NaAsO_2 (S-7400, Sigma), KH_2AsO_4 (A6631, Sigma),

$C_5H_{11}AsO_2$ (11093, Sigma), $(CH_3)_2AsO_2Na \cdot 3H_2O$ (C0250, Sigma), $CH_3AsO(ONa)_2 \cdot 6H_2O$ (N11817, Supelco) em água, respectivamente.

O material de referência certificado (CRM) de proteína de peixe DORM-3 (*Fish Protein, Certified Reference Material for Trace Metals*) foi obtido do NRC - National Research Council Canada.

A solução de condimento de sal e suco de limão foi preparada a partir de NaCl (Certified ACS, Fisher Chemical, EUA) e suco de limão siciliano (*Citrus limon L. Burm.*) previamente filtrado em membrana de fibra de vidro (Fisher Scientific, USA). O alho (*Allium sativum*) utilizado como condimento foi obtido na forma comercial, moída e desidratada (Simply Organic®, EUA).

A fase móvel contendo $(NH_4)_2HPO_4$ 10 mmol L⁻¹ (pH 8,65) foi preparada diariamente pela dissolução do sal $(NH_4)_2HPO_4$ (Certified ACS, Fisher Chemical, EUA) em água contendo 1% (v/v) de metanol grau HPLC (Acros Organics®, EUA). O pH da fase móvel foi ajustado com uma solução de NH_3 saturada em água (Certified ACS, Fisher Chemical, EUA). Uma solução de metanol grau HPLC a 50% (v/v) foi utilizada para a limpeza diária e estocagem da coluna cromatográfica.

As soluções utilizadas para a digestão gastrointestinal foram sempre preparadas imediatamente antes dos experimentos. A solução gástrica foi preparada pela dissolução de pepsina suína (P7000, Sigma, EUA) em HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução intestinal foi preparada pela dissolução de uma mistura de pancreatina suína (P1750, Sigma, EUA) e sais da bile (aproximadamente 50% de clorato de sódio e 50% de desoxicolato de sódio, B8756, Sigma, EUA) em uma solução 0,1 mol L⁻¹ de $NaHCO_3$ (Certified ACS, Fisher Chemical, EUA). A solução tampão 75 mmol L⁻¹ de piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfônico) sal dissódico (PIPES) foi preparada através da dissolução do sal de PIPES (P3768, Sigma, EUA) em água e o pH foi ajustado a 7,5 com HCl 3 mol L⁻¹.

3.3 Amostras

Para o desenvolvimento deste estudo, cinco espécies de frutos do mar, tais como, o filé de tubarão galha-preta (*Carcharhinus limbatus*), camarões tigre-gigante (*Penaeus monodon*), lula (*Loligo opalescens*), ostras (*Crassostrea virginica*) e vieiras (*Argopecten irradians*) foram adquiridas frescas em um mercado de frutos do mar

localizado em Cincinnati, OH, EUA. A seleção das amostras de frutos do mar foi baseada na distinção entre elas e a sua popularidade em pratos tradicionais.

3.4 Tratamento preliminar

Primeiramente, cada amostra foi tratada individualmente de acordo com as suas características. Cerca de 2 kg de filé de tubarão (sem pele) e 1 kg de camarão sem cabeça e cauda, e, sem casca foram homogeneizados, separadamente, com auxílio de um liquidificador. Após a homogeneização, cada amostra foi moldada em cerca de 20 porções (8 tratamentos culinários, $n \geq 2$) com dimensões de aproximadamente $40 \times 50 \times 15$ mm. Para a moldagem, as amostras foram pressionadas manualmente em uma embalagem de polietileno. As porções de tubarão e camarão resultaram em uma massa final de 38 ± 1 e 30 ± 2 g, respectivamente.

Apesar de não ser comum homogeneizar frutos do mar antes de tratamentos culinários, neste estudo, uma etapa de homogeneização das amostras (tubarão e camarão) foi previamente realizada para a padronização de massa, volume e principalmente, para homogeneizar a distribuição elementar em cada amostra. Desta maneira, um menor número de replicatas foi necessário para avaliar os efeitos de cada tratamento culinário.

Entretanto, este procedimento de homogeneização não foi aplicado para as amostras de lula, ostras e vieiras. Essas amostras, tornam-se liquefeitas se forem homogeneizadas da mesma forma que as amostras de tubarão e camarão. Desta maneira, optou-se por outras duas formas de amostragem.

Para a amostra de lula (manto) foi utilizado um único manto de lula para todos os tratamentos culinários. Por apresentar um manto liso, aparentemente homogêneo, e o tamanho ser suficiente para ser dividido em 16 porções (8 tratamentos culinários, $n = 2$), a lula foi fracionada em 16 porções na forma de anéis, sendo que cada porção apresentou uma massa final de 9 ± 1 g.

No entanto, as amostras de ostras e vieiras não apresentaram massa individual suficiente para serem fracionadas em pelo menos 8 porções (8 tratamentos culinários, $n = 1$). Desta maneira, cada ostra fresca desconchada e cada vieira (músculo adutor) foi dividida em duas frações (“A” e “B”), sendo que a fração “A” foi utilizada para o tratamento culinário e a fração “B” foi utilizada como controle (sem

tratamento culinário), como mostrado na Figura 3. Cada fração de ostra e de vieira apresentou uma massa final de 7 ± 2 e 5 ± 1 g, respectivamente.

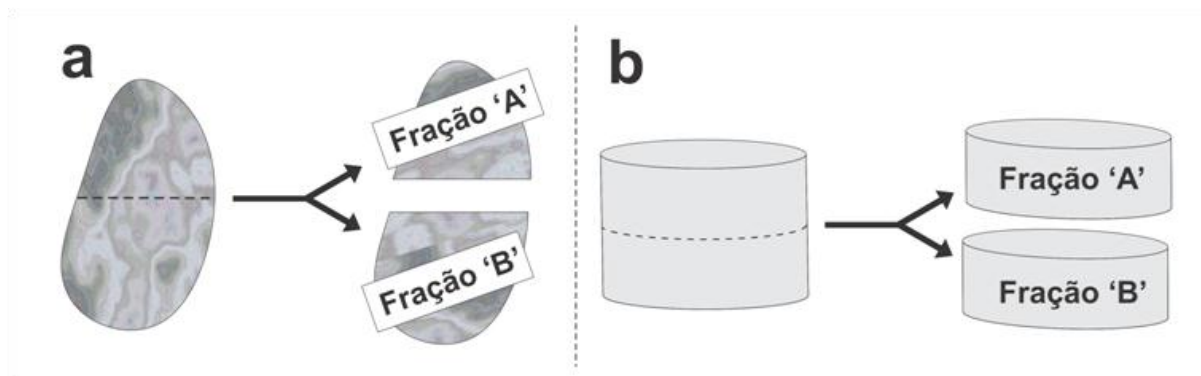


Figura 3. Amostragem utilizada para a avaliação da influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metals das amostras de (a) ostras (tecido íntegro) e (b) vieiras (músculo adutor).

3.5 Caracterização da amostra

Inicialmente foi feita uma caracterização dos macronutrientes presentes em cada amostra de fruto do mar na forma *in natura*. Foram determinados os teores de umidade por secagem a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante, lipídeos pelo método de Bligh and Dyer⁷², proteína por Kjeldahl (Method 976.06, AOAC, 2006)⁷³ e cinzas por calcinação em mufla à $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (AOAC, 2006)⁷³. Os resultados destas análises estão apresentados na Tabela A1 do Apêndice A somente como informação complementar.

3.6 Tratamentos culinários

Cinco espécies de frutos do mar foram avaliadas através de 8 tratamentos culinários: Amostras cruas com e sem condimentos (sal e suco de limão); cozidas por imersão em água em ebulição, com e sem condimentos (sal e suco de limão); fritas por imersão em óleo vegetal, com e sem condimentos (alho, sal e suco de limão); e *sauté* na manteiga, com e sem condimentos (alho, sal e suco de limão).

A quantidade de sal, suco de limão e alho que foi adicionado foi baseada em receitas culinárias tradicionais. Todas as porções de amostras foram pesadas

⁷² Bligh, E. G., Dyer, W. J., *Can. J. Biochem. Phys.* 37 (1959) 911-917.

⁷³ AOAC, Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, 2006.

primeiramente em recipientes plásticos (barquinha de pesagem em poliestireno) para a adição dos condimentos, e essa etapa foi efetuada sempre 15 min antes de cada processo de cocção. Para uma distribuição homogênea do alho, sal e suco de limão sobre a amostra, utilizaram-se alho moído e uma solução de 75 mg L⁻¹ de NaCl em suco de limão previamente filtrado. Esta solução foi adicionada sempre 15 min antes de cada processo de cocção na concentração final 100 µL g⁻¹ (750 mg de sal + 10 mL de suco de limão por 100 g de amostra) na amostra. Adicionalmente, para os processos de fritura e *sautéing* foi adicionado o alho na concentração de 7 mg g⁻¹ (equivalente, aproximadamente, a 1 dente de alho médio por 100 g de amostra).

Optou-se pelo uso de recipientes de vidro para todos os processos de cocção com o objetivo de padronizar o tipo de material, facilitar a limpeza e minimizar possíveis adsorções de analitos com metais provenientes de recipientes metálicos ou cerâmicos. Ainda, dentre os recipientes usados comumente para a cocção de alimentos, o vidro é o que confere menor transferência de contaminantes ao alimento.^{74,75}

Finalmente, cabe ressaltar que foi otimizado o tempo de cada procedimento de cocção (cozimento, fritura e *sautéing*) com o objetivo de se obter um alimento (amostra de fruto do mar) com a textura e consistência característica de cada processo. Utilizando a amostragem previamente descrita no item 3.4, otimizou-se o tempo de cada procedimento de cocção com cada espécie de amostra (tubarão, camarão, lula, ostras e vieiras). Por apresentar uma menor massa, as amostras de lula, ostras e vieiras foram cozidas, fritas e *sauté* por um tempo menor que as amostras de tubarão e camarão.

3.6.1 Preparo das amostras cruas (tipo sashimi)

O preparo das amostras cruas foi feito em temperatura ambiente (≈ 20 °C) com e sem o uso de condimentos (sal e suco de limão). Para as amostras com condimentos, o sal e o suco de limão foram adicionados sobre a porção da amostra 15 min antes de pesá-la e congelá-la para etapa de liofilização.

⁷⁴ Kollipara, U. K., Brittin, H. C., *J. Am. Diet. Assoc.* 96 (1996) 508-510.

⁷⁵ Kuligowski, J., Halperin, K. M., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (1992) 211-215.

3.6.2 Cozimento (imersão em água em ebulição)

O processo de cozimento consistiu em cozer as porções de frutos do mar (com e sem condimentos) por imersão em água em ebulição. Em um béquer de vidro de 400 mL, 150 g de água foram aquecidas até ebulição ($\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) com auxílio de uma chapa aquecedora (Figura 4a). Em seguida, adicionou-se a porção da amostra ao béquer e procedeu-se o cozimento por 10 min para as amostras de tubarão e camarão, e por 8 min para as amostras de lula, ostras e vieiras.

Após o cozimento, a amostra e a água remanescente no béquer foram pesados e, a amostra e uma alíquota de 10 mL da água remanescente foi armazenada para a investigação do balanço de massas do processo de cocção.

3.6.3 Fritura (imersão em óleo vegetal)

O processo de fritura consistiu em fritar as porções de frutos do mar (com e sem condimentos) por imersão em óleo vegetal (óleo de soja) pré-aquecido a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em um béquer de vidro de 400 mL, 100 g de óleo de soja foram aquecidos a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ com auxílio de uma chapa aquecedora (Figura 4b). Em seguida, adicionou-se a porção da amostra ao óleo quente e procedeu-se a etapa de fritura por 5 min (virando a porção a cada 2,5 min) para as amostras de tubarão e camarão, e por 2 min (virando a porção a cada 1 min) para as amostras de lula, ostras e vieiras.

Após a fritura, a amostra e o óleo remanescente no béquer foram pesados e, a amostra e uma alíquota de 5 mL do óleo remanescente foi armazenada para a investigação do balanço de massas do processo de cocção.

3.6.4 Sautéing

O processo *sautéing* consistiu em fritar superficialmente as porções de frutos do mar (com e sem condimentos) em manteiga. Para isso, $5,0 \pm 0,1$ g de manteiga foram adicionados a um béquer previamente aquecido ($\approx 250\text{ }^{\circ}\text{C}$) em uma chapa aquecedora (Figura 4c). Em seguida, a porção da amostra foi adicionada à manteiga fundida e procedeu-se a etapa de fritura superficial por 5 min (virando a porção a cada 2,5 min) para as amostras de tubarão e camarão, e por 2 min (virando a porção a cada 1 min) para as amostras de lula, ostras e vieiras.

Após o processo, a amostra e a manteiga remanescente no béquer foram pesadas e, a amostra e uma alíquota de 2 mL da manteiga remanescente foi armazenada para a investigação do balanço de massas do processo de cocção.

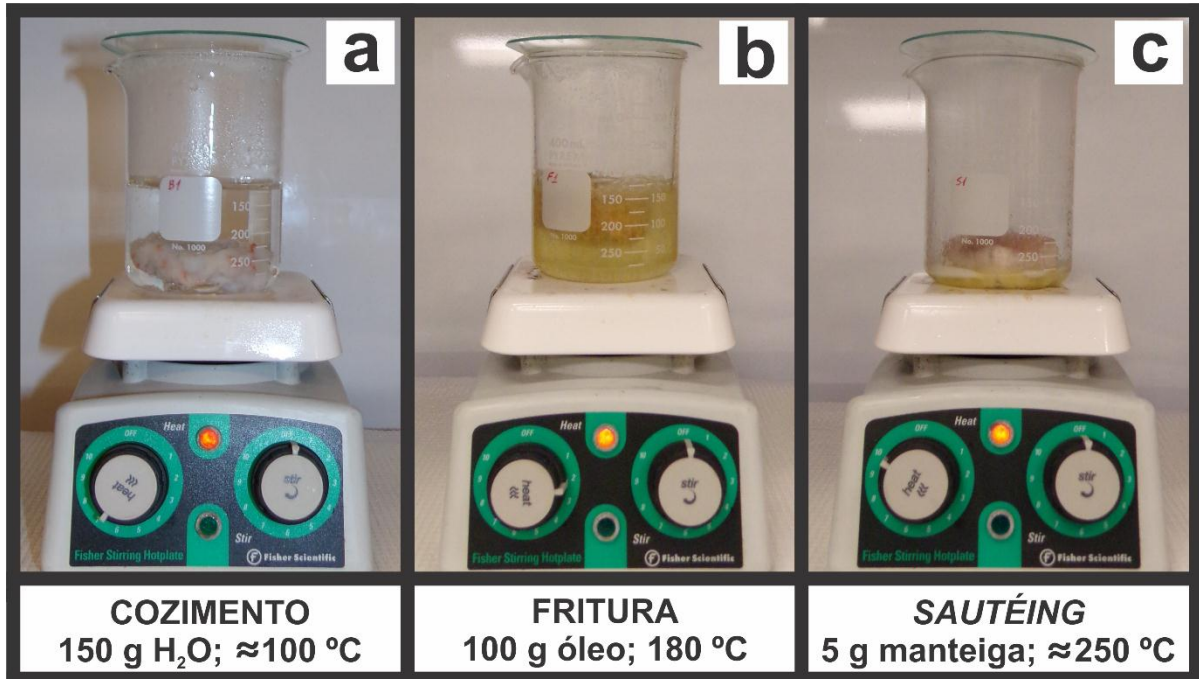


Figura 4. Sistemas utilizados para o processo de (a) cozimento, (b) fritura e (c) *sautéing*.

Na Figura 5 está representado um fluxograma das principais etapas envolvidas neste trabalho.

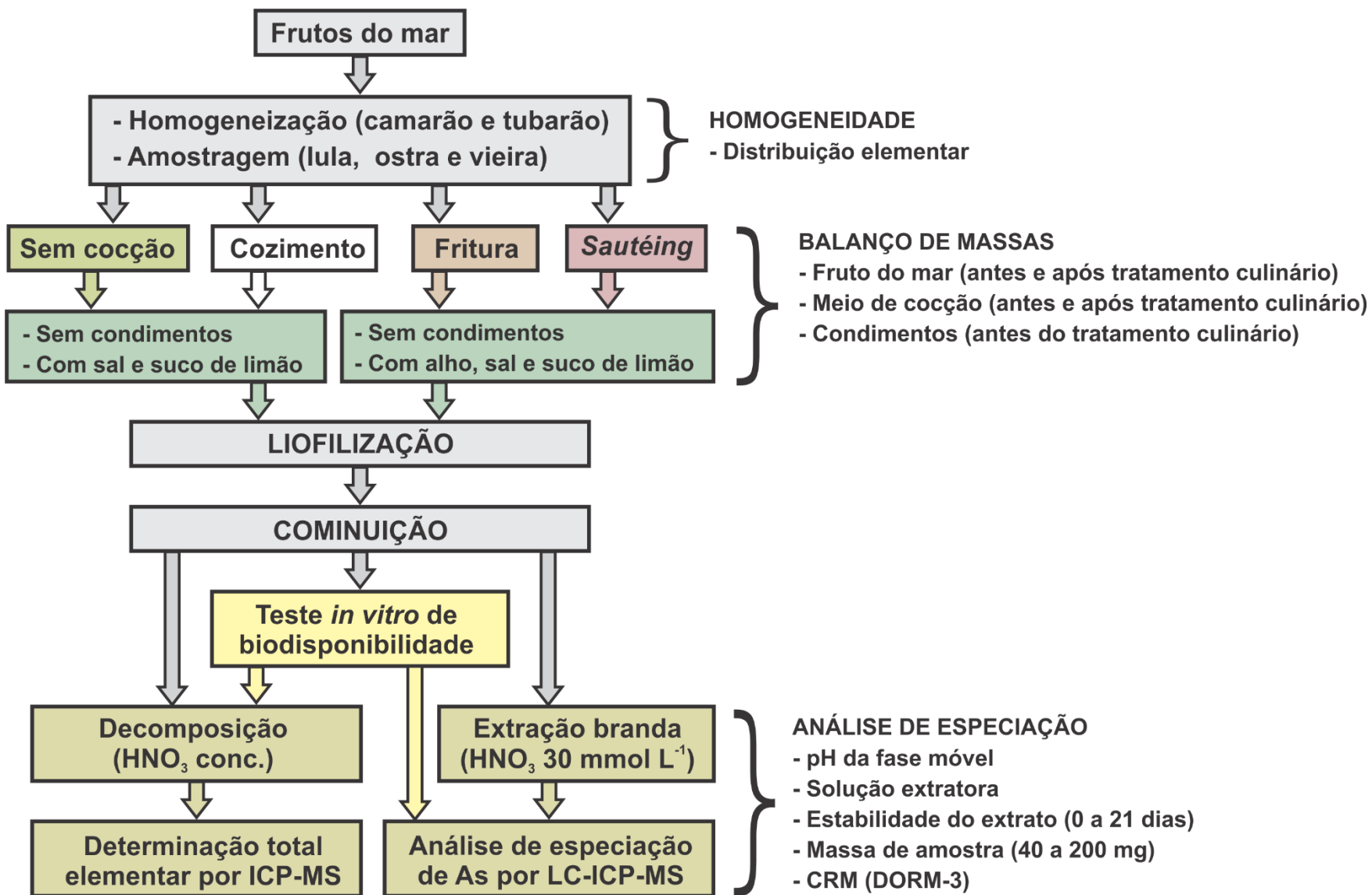


Figura 5. Fluxograma das principais etapas envolvidas neste trabalho.

3.7 Secagem e moagem

Após os tratamentos culinários, todas as amostras processadas (inclusive as amostras cruas) foram transferidas, pesadas e liofilizadas até peso constante no próprio frasco de PP (de 15 ou 50 mL com orifícios na tampa para a remoção da umidade). Além de minimizar a degradação microbiana da amostra, a etapa de secagem facilita a etapa de homogeneização, digestão, e extração das espécies de As.

Em seguida, as amostras secas foram cominuídas criogenicamente em um almofariz de ágata. Para isso, os frascos de PP com as amostras previamente liofilizadas foram mantidos em contato com um banho de argônio líquido por 4 min, seguido da transferência e moagem da amostra no almofariz. Após a cominuição, as amostras foram armazenadas nos frascos de PP e refrigeradas a 4 °C ao abrigo de luz até o momento da próxima etapa (ensaios de biodisponibilidade, decomposição e extração).

3.8 Digestão gastrointestinal *in vitro* – Ensaio de biodisponibilidade

A avaliação de biodisponibilidade de metais pesados e espécies de As foi realizada em duplicata para as amostras de tubarão (com e sem tratamento culinário), camarão (com e sem tratamento culinário), lula (com e sem tratamento culinário), ostras (sem tratamento culinário), vieiras (sem tratamento culinário) e, adicionalmente, para o material de referência certificado DORM-3.

Primeiramente, a membrana tubular de diálise de celulose de alta pureza de 10 kDa de MWCO (H1, CelluSep®, EUA) foi descontaminada diariamente antes do início dos experimentos. Para a descontaminação, a membrana foi cortada em tubos de 10 cm de comprimento e então descontaminada. Para a descontaminação, as membranas foram enxaguadas (2 vezes) com água em um béquer por 15 min, aquecidas com água a 80 °C por 30 min (1 vez), enxaguadas novamente com água por mais 3 vezes, e então mantidas no béquer (coberto com um vidro relógio) com água até o momento do uso.

O método de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* foi adaptado de trabalhos anteriores do grupo de Bermejo-Barrera *et al.*^{20,62-70}. A digestão gastrointestinal *in vitro* foi feita transferindo 500 mg de amostra liofilizada e 20 mL de água a um frasco de Erlenmeyer de 50 mL. Após 15 min de repouso, a mistura foi ajustada a pH 2 com uma solução de HCl 6 mol L⁻¹; então adicionou-se 150 µL da solução gástrica (pepsina 6%, m/v em HCl 0,1 mol L⁻¹) à mistura e os frascos foram incubados à 37 °C em uma incubadora com mesa agitadora orbital a 150 rpm por 120 min. Em seguida, os frascos foram colocados em um banho de gelo para interrupção da reação enzimática e seguiu-se para a etapa de digestão intestinal.

A digestão intestinal foi feita adicionando-se 5 mL de solução intestinal (solução de 0,4% de pancreatina e 2,5% de sais da bile em NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹) ao digerido gástrico e, então, uma membrana de diálise, previamente descontaminada e contendo 10 mL de uma solução tampão de PIPES 75 mmol L⁻¹ (pH 7,5), foi colocada dentro de cada frasco. Os frascos foram colocados à 37 °C em uma incubadora com mesa agitadora orbital (150 rpm) por 120 min. Após, os frascos foram colocados novamente em um banho de gelo para interrupção da reação enzimática. A solução contida na membrana (dialisada) foi transferida e pesada para um frasco de PP de 15 mL e, em seguida foram coletadas alíquotas para a análise de especiação de As e para a decomposição com HNO₃. Brancos da digestão gastrointestinal também foram processados para o controle de possíveis contaminações. O esquema do método de digestão gastrointestinal *in vitro* é mostrado na Figura 6.

²⁰ Sartal, C. G., *et al.*, Arsenic in Seaweed: Presence, Bioavailability and Speciation, Taylor & Francis Group, 2015, pp. 276-351.

⁶² Sartal, C. G., *et al.*, *Microchem. J.* 105 (2012) 65-71.

⁶³ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Food Chem.* 124 (2011) 1747-1752.

⁶⁴ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Food Chem.* 130 (2012) 552-560.

⁶⁵ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Food Chem.* 139 (2013) 872-877.

⁶⁶ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Microchem. J.* 108 (2013) 174-179.

⁶⁷ García-Sartal, C., *et al.*, *Microchem. J.* 108 (2013) 92-99.

⁶⁸ Romarís-Hortas, V., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 24-32.

⁶⁹ Domínguez-González, R., *et al.*, *Talanta* 82 (2010) 1668-1673.

⁷⁰ García-Sartal, C., *et al.*, *Microchem. J.* 98 (2011) 91-96.

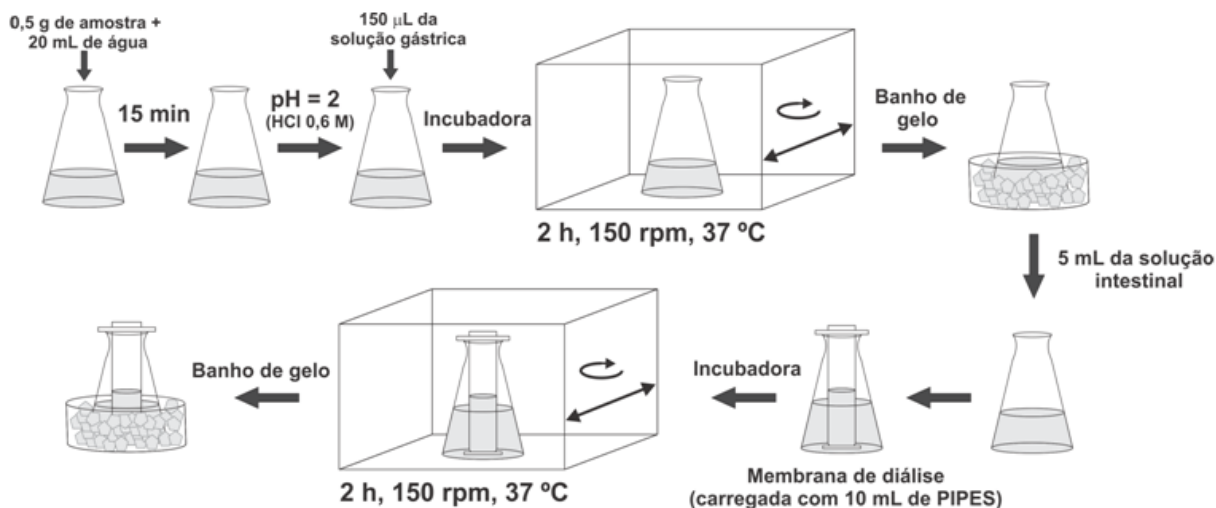


Figura 6. Esquema do método de simulação gastrointestinal utilizado neste trabalho.

3.9 Decomposição da amostra para determinação elementar total de metais e não-metals

Para a decomposição das amostras de frutos de mar (previamente liofilizadas e moídas) e o material de referência certificado DORM-3, foram pesados cerca de 90 mg de amostra diretamente nos frascos de digestão e adicionados 2 mL de HNO_3 15 mol L^{-1} e 120 μL da solução PI 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a decomposição das amostras com alto teor de gordura, como a manteiga (antes e após o processo *sautéing*) e o óleo de soja (antes e após o processo de fritura), foram pesados cerca de 90 mg de amostra nos frascos de digestão e adicionados 3 mL de HNO_3 15 mol L^{-1} e 120 μL da solução de PI 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a decomposição das amostras aquosas, como a água de cozimento e as amostras dialisadas (solução aquosa contida dentro da membrana da diálise), foram pesados cerca de 4,00 g de amostra nos frascos de digestão e adicionados 2 mL de HNO_3 15 mol L^{-1} e 120 μL da solução de PI 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a decomposição dos extratos aquosos da análise de especiação de As, foram pesados cerca de 2,00 g do extrato nos frascos de digestão e adicionados 1 mL de HNO_3 15 mol L^{-1} e 120 μL da solução de PI 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em seguida, os frascos foram tampados e submetidos ao programa de aquecimento. As amostras foram aquecidas primeiramente, em bloco digestor: 60 °C por 5 min, 80 °C por 5 min, 100 °C por 20 min e 121 °C por 120 min. Em seguida, os frascos foram transferidos e submetidos ao seguinte programa de aquecimento por micro-ondas em sistema fechado: (i) 4 min de rampa a 200 °C por 3 min ($P_{\text{max}} = 21$

bar), (ii) 60 °C por 10 min ($P_{\max} = 21$ bar). Após o arrefecimento e despressurização dos frascos, a solução digerida foi transferida para frascos de PP de 15 mL e aferidas a 15 mL com água, obtendo-se uma concentração final de PI de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Todas as decomposições foram efetuadas em, pelo menos, duplicata ($n \geq 2$) e a cada batelada de digestão, brancos foram processados como controle. As condições operacionais do ICP-MS para a determinação de metais e não-metais estão mostradas nas Tabelas 2 e 3.

3.10 Determinação de Hg por ICP-MS utilizando um sistema de introdução de amostra integrado

Baseando-se em trabalhos anteriores⁷⁶⁻⁷⁸, a determinação de Hg foi feita utilizando um sistema de introdução de amostra integrado (ISIS) a partir do autoamostrador ASX-500 acoplado ao ICP-MS. Para minimizar efeitos de memória do Hg foi utilizado um programa de lavagem composto por 4 lavagens sequenciais (incluindo água, HNO_3 5% e Au 5 mg L^{-1}) a cada introdução de amostra. Além disso, os digeridos (e já analisados, conforme o item 3.9) foram enriquecidos com 5 mg L^{-1} de Au antes da etapa de determinação. O programa do ISIS e as condições operacionais do ICP-MS estão mostrados nas Tabelas 5 e 3, respectivamente.

Tabela 5. Programa do sistema de introdução de amostra integrado utilizado para minimizar efeitos de memória na determinação de Hg.

| Parâmetros | Tempo, s | Velocidade*, rps |
|--|----------|------------------|
| Pré-aquisição de dados | | |
| Sucção da amostra | 40 | 0,5 |
| Estabilização | 150 | 0,1 |
| Pós-aquisição de dados | | |
| Frasco lavador da agulha (H_2O) | 10 | 0,5 |
| Frasco 1 (H_2O) | 15 | 0,5 |
| Frasco 2 (HNO_3 5%) | 15 | 0,5 |
| Frasco 3 (Au 5 mg L^{-1} em HNO_3 10%) | 75 | 0,5 |

*Velocidade da bomba peristáltica do ICP-MS.

⁷⁶ Entwisle, J., *Am. Lab.* 36 (2004) 11-14.

⁷⁷ Chen, J., *Application Note, PerkinElmer* (2009) 3.

⁷⁸ Zhu, X., Alexandratos, S. D., *Microchem. J.* 86 (2007) 37-41.

3.11 Análise de especiação de As

3.11.1 Otimização da fase móvel

A fase móvel selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi baseada em trabalhos anteriores⁷⁹⁻⁸² que obtiveram resultados positivos com a utilização de fase móvel composta de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Além disso, a fase móvel composta de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ apresentou desde o primeiro ensaio uma resolução adequada de separação entre os picos cromatográficos em um tempo relativamente curto e no modo isocrático. Desta forma, a partir da fase móvel de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L⁻¹ (pH 8,25) foi efetuado apenas uma otimização com pequenos ajustes de pH (8,25 a 8,72) e adição de metanol para o melhoramento da intensidade do sinal de As. Estes parâmetros foram estudados de forma univariada com a utilização de soluções de referência contendo 2 µg L⁻¹ de As para cada espécie (As(III), As(V), AsB, DMA e MMA).

3.11.2 Otimização do método de extração

Baseando-se em trabalhos anteriores⁸²⁻⁸⁵, algumas soluções extratoras foram selecionadas e avaliadas para a extração das espécies de As em frutos do mar. Dentre estas, foram avaliadas: água, fase móvel (10 mmol L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 8,65), HNO_3 15 mmol L⁻¹ e HNO_3 30 mmol L⁻¹, mantendo-se fixa a massa de amostra, temperatura de extração e tempo de extração. A avaliação das soluções extratoras foi realizada para todas as amostras de frutos do mar (tubarão, camarão, lula, ostra e viera), além do CRM DORM-3.

Para os procedimentos de extração das espécies de As, cerca de 80 mg de amostra (previamente liofilizadas e moídas) foram transferidos para frascos de vidro de 10 mL (Discover, CEM), e adicionaram-se 5 mL da solução extratora à amostra. Em seguida, a mistura foi agitada em um vortex (Genie2, Fisher Scientific, EUA) por

⁷⁹ Guo, P., *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 1754-1759.

⁸⁰ Pizarro, I., *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 85-98.

⁸¹ Saadawi, R., *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2146-2158.

⁸² Kubachka, K. M., *et al.*, FDA - Elemental Analysis Manual: Section 4.11, 2012.

⁸³ Batista, B. L., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2011) 780-788.

⁸⁴ Pétursdóttir, Á. H., *et al.*, *Food Chem.* 150 (2014) 353-359.

⁸⁵ Leufroy, A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 770-779.

1 min e mantidas sob aquecimento a 100 °C em bloco digestor por 30 min. Após o arrefecimento dos frascos, os extratos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e 1 mL do sobrenadante e 4 mL de fase móvel (10 mmol L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄, pH 8,65) foram transferidos para um frasco de PP. Os frascos de PP contendo os extratos foram agitados em vortex e 1,5 mL do sobrenadante foi transferido para frascos de HPLC de 2 mL com septo de PTFE/silicone (Clear vial, Agilent Technologies). Os extratos que apresentaram turbidez visível a olho nu foram filtrados em tubo de centrifuga de PP com filtro de 0,45 µm (acetato de celulose, Corning® Spin-X®) antes de serem transferidas para os frascos de HPLC. Em seguida, os frascos foram colocados no autoamostrador do sistema de HPLC-ICP-QQQ para a análise de especificação de As.

A partir da solução extratora que resultou na extração mais eficiente das espécies de As, esta foi aplicada para todas as amostras e ainda foi avaliada a faixa de massa (40 a 200 mg) capaz de ser empregada de maneira robusta para uma extração eficiente. Extrações controle (brancos) foram preparadas de maneira idêntica e todas as extrações foram efetuadas em pelo menos duplicata ($n \geq 2$).

3.11.3 Avaliação do método de extração

A eficiência do método de extração foi avaliada através da comparação entre o As total na amostra digerida e o As total no extrato. Além disso, foi avaliado também, testes de recuperação das espécies de As em todas as amostras, que foram enriquecidas (*spiked sample*) com AsB, As(III), As(V), DMA e MMA. Para o enriquecimento das amostras, as espécies de As foram adicionadas às amostras (previamente liofilizada e moída) antes da adição da solução extratora, com a finalidade de avaliar o método de extração envolvendo todas as etapas do procedimento de extração. As concentrações de cada espécie de As adicionadas foram selecionadas de acordo com as concentrações das espécies originalmente presentes na amostra e da diluição adotada para cada amostra. Adicionalmente, foi avaliada a eficiência de extração de As baseada na concentração certificada de As total no CRM DORM-3, além da comparação dos resultados da análise de especificação de As neste CRM com os obtidos em outros trabalhos na literatura.

3.12 Cálculos e expressão dos resultados

Para assegurar uma comparação adequada entre os resultados das amostras que sofreram os diferentes tratamentos culinários, neste trabalho, todos os resultados relacionados à concentração elementar (metais e não-metais) e das espécies de As obtida das amostras processadas (após o tratamento culinário) e liofilizadas foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra fresca (crua e úmida), conforme a Equação 1.

$$[A]_{fresca} = [A]_{tr} \cdot (m_{tr}/m_{fresca}) \cdot \left(\frac{100 - U_{tr}}{100}\right) \quad \text{Eq. 1}$$

Sendo que, $[A]_{fresca}$ é a concentração do analito expressa em massa de amostra fresca ($\mu\text{g g}^{-1}$); $[A]_{tr}$ é a concentração do analito obtida na amostra liofilizada após o tratamento culinário ($\mu\text{g g}^{-1}$); m_{tr} é a massa de amostra de fruto do mar após o tratamento culinário (g); m_{fresca} é a massa de amostra de fruto do mar antes do tratamento culinário (g); U_{tr} é o teor de umidade (água) da amostra após o tratamento culinário (%).

Adicionalmente, o cálculo do balanço de massas relacionado à transferência do analito para o meio de cocção (água de cozimento, óleo de fritura, e a manteiga) foi realizado considerando a massa de analito perdida por massa de amostra fresca, calculado conforme a Equação 2.

$$[A]_{perdida} = \left(\frac{[A]_{coc} \cdot m_{coc}}{m_{fresca}}\right) \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo que, $[A]_{perdida}$ é a massa de analito perdida por massa de amostra fresca após o processo de cocção ($\mu\text{g g}^{-1}$); $[A]_{coc}$ é a concentração do analito ($\mu\text{g g}^{-1}$) no respectivo meio de cocção (água, óleo, ou manteiga); m_{coc} é a massa (g) do meio de cocção (água, óleo, ou manteiga) remanescente após o processo de cocção; m_{fresca} é a massa de amostra fresca (g) usada no tratamento culinário.

Este tipo de cálculo é importante para avaliar as possíveis perdas e diferenças na concentração do analito após os diferentes tratamentos culinários. Caso contrário, os resultados poderiam ser subestimados ou até mesmo superestimados devido à absorção (como o óleo de fritura e a manteiga) ou perda (como água, gordura, proteína, carboidratos, etc.) de massa durante os tratamentos culinários, respectivamente. Além disso, os resultados obtidos das amostras que sofreram

tratamento culinário foram comparados estatisticamente com aqueles obtidos a partir da respectiva amostra crua (sem tratamento culinário) através do teste-*t* para a comparação de duas médias experimentais.⁸⁶

⁸⁶ Miller, J. N., Miller, J. C., Significance tests, Pearson, 2005, pp. 41-44.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os tópicos relacionados à amostragem, otimização do preparo de amostras e análise de especiação de As. Em seguida, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para avaliação da influência do tratamento culinário na concentração e biodisponibilidade de metais, não-metals e espécies de As em frutos do mar.

4.1 Avaliação do método de decomposição para a determinação de metais e não-metals

O método de digestão das amostras utilizando dois sistemas de decomposição (bloco digestor e sistema de digestão assistida por micro-ondas), de modo sequencial, foi baseado em experimentos de digestão prévios realizados com a amostra liofilizada de tubarão. O sistema de digestão-assistida por micro-ondas (MAD) utilizado neste trabalho (Discover SP-D, CEM) apresenta um limite de pressão máximo (P_{max}) de 21 bar, o que é relativamente baixo para o uso de massas de amostras de 90 mg usando frascos de digestão de 10 mL.

Apesar do sistema de digestão utilizado (Discover SP-D) possuir a tecnologia Activent®, a qual garante o alívio da pressão do frasco durante a digestão sem que ocorra perda de analitos, neste trabalho, alguns testes resultaram em digestão incompleta, e amostras não decompostas foram projetadas na tampa e na lateral do frasco. Isso pode ser devido à ausência do uso da barra magnética no frasco, a qual o fabricante recomenda e que não foi utilizada. A utilização de barra magnética e de massas menores de amostra foram evitadas com o objetivo de minimizar fontes de contaminação e garantir uma maior representatividade da amostra, respectivamente. Desta maneira, já que o frasco de digestão utilizado foi compatível tanto no bloco digestor quanto no sistema MAD, optou-se por um método de digestão prévio em bloco digestor (121 °C) seguido da digestão assistida por micro-ondas em sistema fechado (sem a liberação de pressão durante a digestão, sistema Activent® desativada). O método de decomposição baseado no uso destes dois sistemas sequenciais resultou em digeridos adequados para a determinação de metais e não-metals por ICP-MS. Na Figura 7, está mostrado o perfil de pressão e temperatura alcançados durante a decomposição de uma amostra de tubarão liofilizada.

Utilizando uma etapa de pré-digestão em sistema aberto, antes da digestão em sistema fechado, é possível alcançar temperaturas de decomposição de cerca de 195 °C, condição que resultou em digeridos límpidos e adequados (Figura A3, no Apêndice A) para a determinação por ICP-MS.

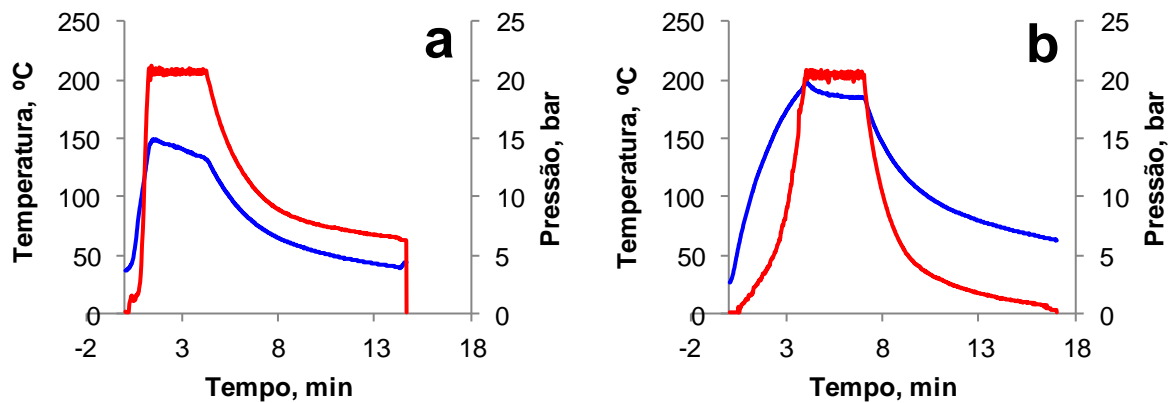


Figura 7. Perfil de (—) pressão e (—) temperatura alcançados durante a decomposição de 90 mg de amostra liofilizada de tubarão por (a) MAD (em sistema fechado) e por (b) MAD (em sistema fechado) com a amostra pré-digerida em bloco digestor (121 °C).

Adicionalmente, o material de referência certificado DORM-3 foi decomposto utilizando este método e os resultados mostraram-se concordantes com os valores certificados do CRM para um intervalo de confiança de 95% (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração de As, Cd, Cr, Cu, Hg e Pb no CRM DORM-3 ($n = 5$).

| Analito | Valor obtido ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|---------|---------------------------------------|--|
| As | $6,78 \pm 0,21$ | $6,88 \pm 0,3$ |
| Cd | $0,283 \pm 0,006$ | $0,29 \pm 0,02$ |
| Cr | $1,69 \pm 0,09$ | $1,89 \pm 0,17$ |
| Cu | $15,0 \pm 0,4$ | $15,50 \pm 0,63$ |
| Hg | $0,403 \pm 0,012$ | $0,382 \pm 0,06$ |
| Pb | $0,364 \pm 0,020$ | $0,395 \pm 0,05$ |

Cabe ressaltar, ainda, que o método de determinação de Hg mostrou-se bastante robusto, pois, mesmo após 24 h de determinações consecutivas, os padrões de verificação apresentavam resultados exatos e precisos, mostrando que o sistema ISIS (descrito no item 3.10) garantiu a minimização (eliminação) do efeito memória no sistema de introdução.

4.2 Avaliação do método de análise de especiação de As

4.2.1 Separação cromatográfica

A composição da fase móvel composta de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ mostrou-se adequada para a separação das espécies de As por HPLC-ICP-MS. Desta forma, foi feita apenas uma otimização com pequenos ajustes no pH da fase móvel (8,25 a 8,72) e, finalmente, pela adição de metanol para o melhoramento da intensidade do sinal dos analitos. De acordo com a Figura 8, pode-se observar que o pH da fase móvel tem uma influência significativa na separação cromatográfica das espécies de As.

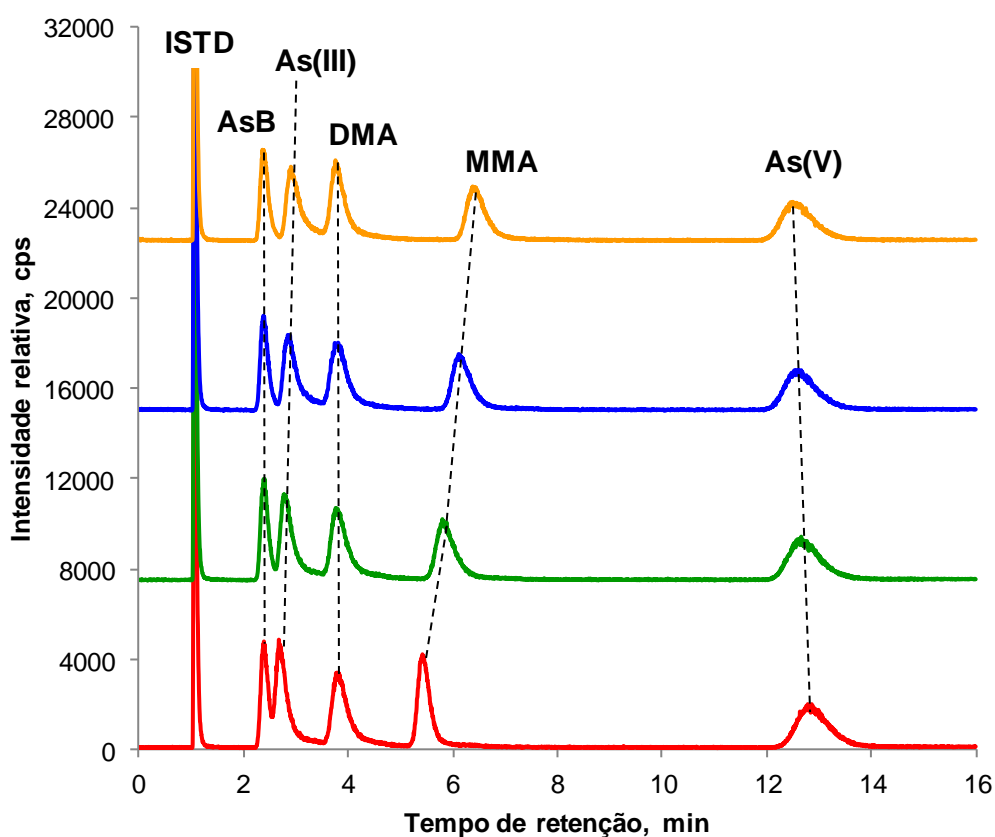


Figura 8. Influência do pH da fase móvel na separação das espécies de As. Injeção de 50 μL de uma solução contendo 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, MMA e As(V) usando fase móvel composta de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L^{-1} com (—) pH = 8,72; (—) pH = 8,65; (—) pH = 8,55; (—) pH = 8,25.

A utilização de fase móvel com pH mais elevado favoreceu a separação entre AsB e As(III). Com a fase móvel em pH baixo ocorre a protonação parcial do As(III), formando ácido arsenoso ($\text{pK}_{\text{a}1}$ 9,2). Uma vez protonado, sua interação com a fase

estacionária é reduzida, sendo eluído, praticamente, no mesmo tempo que a AsB. No entanto, a fase móvel com pH mais elevado prejudica a razão sinal/ruído da espécie MMA, tornando o pico mais largo, o que, conseqüentemente, prejudica o LD. Isso ocorre devido à segunda desprotonação do MMA ($pK_{a1} = 3,6$ e $pK_{a2} = 8,2$), o qual interage mais fortemente com a fase estacionária. Além disso, em pH mais elevado o As(III) também interage mais com a fase estacionária devido ao maior deslocamento do equilíbrio para a sua forma desprotonada que, conseqüentemente, começa a prejudicar a resolução com o próximo pico adjacente (DMA). Desta forma, optou-se pela fase móvel com pH 8,65, na qual apresentou o melhor custo benefício em relação a resolução de AsB e As(III) e o alargamento das demais espécies.

Pode ser observado na Figura 9, que a adição de 1% de metanol na fase móvel aumentou significativamente a intensidade do sinal analítico. Isso ocorre devido a transferência de elétrons de íons de As para íons de carbono, o que aumenta a ionização das espécies de As.⁸⁷⁻⁸⁹ Desta forma, a sensibilidade aumentou em cerca de 2 vezes para todos os analitos.

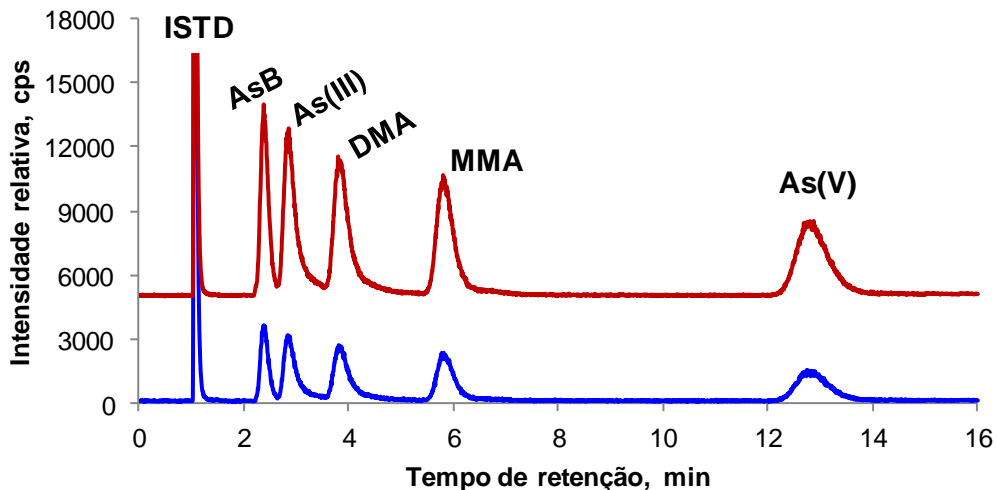


Figura 9. Influência do metanol na intensidade do sinal das espécies de As. Injeção de 50 μL de uma solução contendo 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como As) de AsB, As(III), DMA, MMA e As(V) usando fase móvel composta de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L^{-1} (pH = 8,65) com (—) 1% de metanol e (—) sem metanol.

⁸⁷ Nam, S.-H., *et al.*, *Microchem. J.* 95 (2010) 20-24.

⁸⁸ Rabieh, S., *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 544-549.

⁸⁹ Ritsema, R., *et al.*, *Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 591-599.

De acordo com os resultados apresentados, a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mmol L^{-1} com 1% de metanol (pH 8,65) foi a fase móvel que apresentou a composição mais adequada, e portanto, foi selecionada como fase móvel para o desenvolvimento deste trabalho. Cabe ressaltar, que apesar do pH da fase móvel apresentar uma influência bastante pronunciada na separação das espécies de As, o método em geral mostrou-se bastante robusto, pois, mesmo após 24 horas de injeções consecutivas, os resultados apresentaram uma boa precisão ($\text{RSD} < 5\%$) e a pressão do sistema cromatográfico continuava estável (50 a 51 bar). Além disso, a possibilidade de interferências poliatômicas pela presença de cloro ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $m/z = 75$) na determinação de ^{75}As foi completamente eliminada utilizando o sistema ICP-QQQ no modo O_2 como gás de reação ($^{75}\text{As} \rightarrow ^{75}\text{As}^{16}\text{O}$). Cabe ressaltar que o modo MS/MS ($m/z 75 \rightarrow m/z 91$) do ICP-QQQ também elimina possíveis íons interferentes com $m/z 91$, visto que eles são rejeitados no Q1 que está configurado para a $m/z 75$.

4.2.2 Método de extração

Baseando-se em trabalhos anteriores⁸²⁻⁸⁵, que obtiveram boa eficiência de extração sem prejudicar a integridade das espécies de As, neste trabalho foram avaliadas 3 soluções extratoras comumente citadas na literatura⁸²⁻⁸⁵, como água, HNO_3 15 mmol L^{-1} e HNO_3 30 mmol L^{-1} . Além disso, também foi avaliado o uso da fase móvel (10 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com 1% de metanol a pH 8,65) como solução extratora. Para a realização dos testes, mantiveram-se fixas todas as condições das etapas de extração (item 3.11.2), variando apenas a solução extratora.

Na Tabela 7 está mostrada a eficiência de extração de As usando as diferentes soluções extratoras para as 5 amostras de frutos do mar e o DORM-3.

Cabe ressaltar que, com intuito de facilitar a apresentação e a interpretação dos resultados das amostras de ostras e vieiras (as quais foram avaliadas utilizando um único molusco (fração "A" e "B") para cada tratamento culinário), as mesmas serão simbolizadas com numeração indo-arábico precedido do símbolo #, sendo que, cada número indica um respectivo molusco (ostra ou vieira) individual.

⁸² Kubachka, K. M., *et al.*, FDA - Elemental Analysis Manual: Section 4.11, 2012.

⁸³ Batista, B. L., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2011) 780-788.

⁸⁴ Pétursdóttir, Á. H., *et al.*, *Food Chem.* 150 (2014) 353-359.

⁸⁵ Leufroy, A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 770-779.

Tabela 7. Eficiência da extração de As total em frutos do mar usando diferentes soluções extratoras.

| Amostra | Eficiência de extração de As, % | | | |
|-----------|---------------------------------|------------|--|--|
| | H ₂ O | Fase móvel | HNO ₃ 15 mmol L ⁻¹ | HNO ₃ 30 mmol L ⁻¹ |
| Tubarão | 101 | 100 | 101 | 102 (101 ^a) |
| Camarão | 98 | 102 | 98 | 96 (99 ^a) |
| Lula | 42 | 44 | 67 | 98 (101 ^a) |
| Ostra #1 | 45 | 49 | 72 | 86 (82 ^a) |
| Vieira #1 | 44 | 43 | 75 | 103 (96 ^a) |
| DORM-3 | 101 | 100 | 97 | 102 (98 ^a) |

^a Recuperação cromatográfica (%)

De maneira geral, todas as soluções extratoras apresentaram eficiência de extração satisfatória para as amostras de tubarão, camarão e DORM-3. No entanto, somente a solução extratora de HNO₃ 30 mmol L⁻¹ foi adequada para todas as amostras. A avaliação de diferentes matrizes durante a otimização do método de extração prova a importância desta avaliação para a seleção da solução extratora mais adequada. Desta maneira, a solução de HNO₃ 30 mmol L⁻¹ foi selecionada como a solução extratora mais adequada para a extração das espécies de As nas amostras estudadas neste trabalho. Além disso, a recuperação cromatográfica sugere que outras espécies de As, tais como as espécies de As catiônicas (ex.: AsC e TMA⁺) encontram-se inexistentes ou em concentrações insignificantes nas amostras estudadas neste trabalho.

A eficiência de extração das espécies de As foi avaliada, também, com a utilização de diferentes massas de amostra. Para este estudo, foi utilizada uma amostra liofilizada de tubarão e as condições previamente otimizadas foram mantidas para este estudo. Foram avaliadas massas de amostra na faixa de 40 a 200 mg.

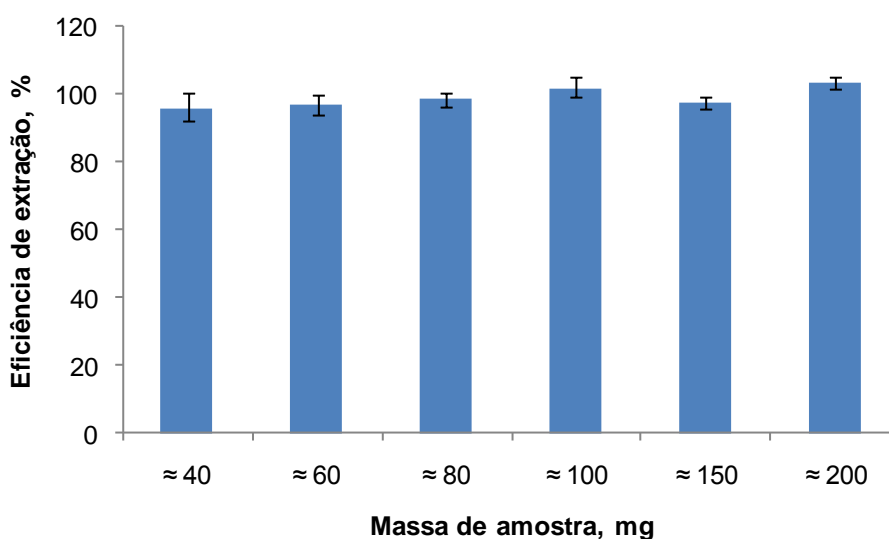


Figura 10. Eficiência de extração de As usando diferentes massas de amostra ($n = 3$).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, observa-se que a solução extratora foi adequada para a extração quantitativa de As em todas as faixas de massas avaliadas, inclusive na faixa de 200 mg. Os resultados mostraram-se concordantes entre si ($p > 0,05$), comprovando que o método de extração apresenta uma boa robustez em relação a variação de massa de amostra. Além disso, a precisão do método mostrou-se adequado para toda a faixa de massa avaliada, apresentando um RSD entre 1,6 a 4,2%.

Adicionalmente, foi efetuada uma avaliação da estabilidade das espécies de As (extraídas com HNO_3 30 mmol L^{-1}) nos extratos das amostras de tubarão e DORM-3 que permaneceram em solução até o momento da análise. Para esta avaliação, cada extrato (tubarão e DORM-3) foi fracionado em 5 porções que foram armazenadas em frascos de HPLC (2 mL) sob condições ambientes (≈ 20 °C), sob refrigeração (4 °C) e congelados (- 20 °C) por um período de até 3 semanas, e conforme pode ser observado na Tabela 8, não foram observadas perdas e nem conversões entre as espécies de As para nenhuma das amostras (tubarão e DORM-3). Estes resultados estão de acordo com um trabalho realizado por Feldmann *et al.*⁹⁰ em que os autores observaram que a estabilidade de espécies de As em soluções aquosas (amostras de urina) que foram armazenadas (4 e - 20 °C) por um período de até 8 semanas não sofreram perdas e nem interconversões de espécies.

⁹⁰ Feldmann, J., *et al.*, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1988-1997.

Desta maneira, o método de extração mostrou-se bastante robusto para o propósito do presente trabalho. Cabe ressaltar que tanto a avaliação de massa quanto a de estabilidade foram realizadas unicamente com o propósito de qualificar a robustez do método de extração em relação à análise de especificação de As. De maneira geral, as extrações foram feitas com massas de amostra de cerca de 80 mg e analisadas dentro de um período de até 18 h após a etapa de extração (considerando o tempo de espera no autoamostrador).

Tabela 8. Avaliação da estabilidade das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$, como As) nos extratos aquosos das amostras de tubarão e DORM-3 armazenados sob refrigeração e congelados ($n = 3$).

| Período | Espécies de As | Condição de armazenamento dos extratos | | | | | |
|----------|-------------------|--|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | Temp. Ambiente | | Resfriado, 4 °C | | Congelado, - 20 °C | |
| | | Tubarão | DORM-3 | Tubarão | DORM-3 | Tubarão | DORM-3 |
| 0 - 12 h | AsB | 3,57 | 6,23 | - | - | - | - |
| | As(III) | < 0,021 ^a | < 0,07 ^a | - | - | - | - |
| | DMA | < 0,004 ^a | 0,51 | - | - | - | - |
| | MMA | < 0,009 ^a | 0,05 | - | - | - | - |
| | As(V) | < 0,02 ^a | 0,21 | - | - | - | - |
| | Σ espécies | 3,57 | 6,99 | - | - | - | - |
| 14 dias | AsB | - | - | 3,73 | 6,17 | 3,71 | 6,06 |
| | As(III) | - | - | < 0,021 ^a | < 0,07 ^a | < 0,021 ^a | < 0,07 ^a |
| | DMA | - | - | < 0,004 ^a | 0,49 | < 0,004 ^a | 0,48 |
| | MMA | - | - | < 0,009 ^a | 0,03 | < 0,009 ^a | 0,03 |
| | As(V) | - | - | < 0,02 ^a | 0,21 | < 0,02 ^a | 0,20 |
| | Σ espécies | - | - | 3,73 | 6,97 | 3,71 | 6,77 |
| 21 dias | AsB | - | - | 3,52 | 6,18 | 3,56 | 6,32 |
| | As(III) | - | - | < 0,021 ^a | < 0,07 ^a | < 0,021 ^a | < 0,07 ^a |
| | DMA | - | - | < 0,004 ^a | 0,50 | < 0,004 ^a | 0,53 |
| | MMA | - | - | < 0,009 ^a | 0,05 | < 0,009 ^a | 0,04 |
| | As(V) | - | - | < 0,02 ^a | 0,22 | < 0,02 ^a | 0,22 |
| | Σ espécies | - | - | 3,52 | 6,94 | 3,56 | 7,11 |

^a Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

4.2.3 Ensaios de recuperação e exatidão

Para avaliar a recuperação das espécies de As nas diferentes amostras de frutos do mar, foram adicionadas diferentes concentrações das espécies de As (AsB, As(III), As(V), DMA e MMA) sobre cada amostra liofilizada. A concentração adicionada foi efetuada na mesma ordem de grandeza da concentração original de As já presente em cada amostra, e no caso das espécies de As que se encontravam originalmente abaixo do LQ, a respectiva espécie foi adicionada na quantidade correspondente à concentração de cerca de 3 vezes o LQ da respectiva espécie na solução de determinação (considerando a etapa de extração e diluição do extrato). Conforme mostrado na Tabela 9, a recuperação das espécies de As foram consideradas como quantitativas para todas as amostras, visto que em análise de especiação, recuperações de 70 a 120% podem ser consideradas satisfatórias.⁹¹

Tabela 9. Resultados dos ensaios de recuperação das espécies de As ($n = 3$).

| Amostra | Recuperação, % | | | | |
|-----------|----------------|---------|--------|--------|--------|
| | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) |
| Tubarão | 99-105 | 87-91 | 96-100 | 96-99 | 98-102 |
| Camarão | 95-98 | 97-101 | 97-103 | 95-98 | 99-104 |
| Lula | 93-96 | 98-101 | 98-102 | 97-101 | 99-103 |
| Ostra #1 | 90-94 | 88-93 | 92-96 | 91-95 | 95-99 |
| Vieira #1 | 93-97 | 97-104 | 96-99 | 93-96 | 97-100 |

Adicionalmente, foi avaliada a exatidão do método através da análise do CRM DORM-3. Os resultados mostraram-se concordantes com o valor certificado de As total (valor certificado = $6,80 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$) do CRM para um intervalo de confiança de 95%. Além disso, de acordo com a Tabela 10, o método de análise de especiação empregado neste trabalho mostrou-se preciso e exato (em relação ao valor para As total), e concordante quando comparado aos valores obtidos por outros trabalhos da literatura.^{83,85,92,93}

⁸³ Batista, B. L., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2011) 780-788.

⁸⁵ Leufroy, A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 770-779.

⁹¹ Rosenberg, E., Ariese, F., *Quality Control in Speciation Analysis*, The Royal Society of Chemistry, 2001, pp. 17-50.

⁹² Liu, L., *et al.*, *Anal. Chem.* (2014).

⁹³ Hong, S., *et al.*, *Environ. Pollut.* 192 (2014) 27-35.

Tabela 10. Concentração das espécies de As ($\mu\text{g g}^{-1}$, como As) no material de referência certificado DORM-3 obtida neste e em outros trabalhos da literatura.

| Trabalho | Extração | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | Σ espécies |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|
| Este trabalho ^a | A (H ₂ O, 100 °C) | 6,20 ± 0,08 | < 0,07 ^b | 0,49 ± 0,02 | 0,03 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 6,93 ± 0,07 |
| | B (Fase móvel, 100 °C) | 6,08 ± 0,07 | < 0,07 ^b | 0,49 ± 0,01 | 0,05 ± 0,03 | 0,20 ± 0,02 | 6,84 ± 0,09 |
| | C (1% HNO ₃ , 100 °C) | 6,19 ± 0,09 | < 0,07 ^b | 0,50 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,23 ± 0,02 | 6,99 ± 0,08 |
| | D (2% HNO ₃ , 100 °C) | 6,17 ± 0,07 | < 0,07 ^b | 0,49 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,23 ± 0,02 | 6,94 ± 0,08 |
| Batista <i>et al.</i> ⁸³ | 10% MeOH + 2% HNO ₃ , US | 5 ± 0,7 | - | 0,6 ± 0,07 | 0,3 ± 0,04 | 0,4 ± 0,06 | 6 ± 0,2 |
| Liu <i>et al.</i> ⁹² | 100% H ₂ O, US | 5,11 ± 0,09 | - | 0,43 ± 0,01 | 0,45 ± 0,06 | 0,32 ± 0,02 | 6,31 ± 0,13 |
| Hong <i>et al.</i> ⁹³ | 2% HNO ₃ , US, 60 °C | 4,3 ± 0,32 | 0,13 ± 0,014 | 0,47 ± 0,029 | 0,064 ± 0,013 | 0,31 ± 0,015 | - |
| Leufroy <i>et al.</i> ⁸⁵ | 100% H ₂ O, 80 °C | 4,69 ± 0,16 | 0,085 ± 0,014 | 0,459 ± 0,007 | 0,091 ± 0,028 | 0,243 ± 0,023 | 5,8 ± 0,3 |
| Leufroy <i>et al.</i> ⁸⁵ | 80% MeOH, 80 °C | 5,24 ± 0,26 | 0,129 ± 0,018 | 0,495 ± 0,054 | 0,066 ± 0,010 | 0,276 ± 0,036 | 6,4 ± 0,5 |

^a Média e desvio padrão obtidos de cinco replicatas ($n = 5$);

^b Limite de quantificação.

⁸³ Batista, B. L., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 29 (2011) 780-788.

⁸⁵ Leufroy, A., *et al.*, *Talanta* 83 (2011) 770-779.

⁹² Liu, L., *et al.*, *Anal. Chem.* (2014).

⁹³ Hong, S., *et al.*, *Environ. Pollut.* 192 (2014) 27-35.

É importante salientar que a avaliação de diferentes amostras é muito importante no desenvolvimento de metodologias analíticas, visto que se fossem considerados somente os resultados obtidos para o CRM DORM-3 (Tabelas 7 e 10), possivelmente a solução extratora selecionada seria a solução extratora "A" (composta somente por água). No entanto, de acordo com a Tabela 7, esta solução não foi adequada para as amostras de lula, ostras e vieiras.

4.2.4 Figuras de mérito

As espécies de As foram completamente separadas em 16 min com uma boa resolução. A quantificação das espécies de As foi conduzida por calibração externa (faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (como As)), integrando a área do sinal analítico de cada espécie e correlacionando com a concentração. Para a espécie desconhecida (As?), a mesma foi quantificada usando a equação linear da espécie de As com o tempo de retenção mais próximo (DMA). A curva de calibração apresentou uma boa correlação linear para todas as espécies de As ($R^2 > 0,999$). O LD e o LQ foram obtidos a partir de $LD = 3 \times STEYX / S$ e $LQ = 10 \times STEYX / S$, respectivamente, na qual *STEYX* e *S* correspondem ao erro padrão e a inclinação da regressão linear, respectivamente.⁹⁴⁻⁹⁷ Limites de quantificação de 47, 236, 49, 95, 203 ng L^{-1} (como As) foram obtidos para AsB, As(III), DMA, MMA e As(V), respectivamente. A frequência analítica do método de análise de especiação de As (incluindo extração e determinação) foi de 84 amostras diárias.

4.3 Otimização dos tratamentos culinários

Conforme descrito no item 3.6, a massa, volume, ingredientes e recipientes empregados durante cada tratamento culinário, foram todos padronizados para uma melhor avaliação da influência dos diferentes tratamentos culinários na concentração e biodisponibilidade de metais pesados e especiação de As.

⁹⁴ Ribani, M., *et al.*, *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.

⁹⁵ Ribani, M., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 201-205.

⁹⁶ Miller, J. N., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5 ed., Pearson, 2005, pp. 288.

⁹⁷ Guideline, I. H. T., *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, ICH, 2005.

A escolha do procedimento de cada tratamento culinário foi baseada em receitas culinárias tradicionais para frutos do mar e a determinação do tempo de cocção de cada processo foi baseada em testes prévios com cada espécie de fruto do mar. Observou-se o tempo necessário para que a amostra atingisse as características adequadas de cada processo de cocção (textura e cor). O tempo otimizado para cada amostra foi padronizado e utilizado nas replicatas.

Como pode ser observado nas Figuras 11 a 14, os processos de cocção alteram o aspecto da amostra crua (U1), devido à desidratação do alimento, desnaturação de proteínas, além da absorção de massa (óleo vegetal e manteiga) nas amostras fritas e *sauté*. A coloração da carne processada se deve a outros fatores, como a caramelização de carboidratos e/ou reação de Maillard.⁵⁴ Portanto, com o objetivo de assegurar uma comparação adequada entre os resultados das amostras, todos os resultados relacionados à concentração elementar e das espécies de As foram expressos em massa de amostra fresca, conforme as Equações 1 e 2 (item 3.12). Com intuito de facilitar a apresentação e a interpretação dos resultados, as amostras de frutos do mar cruas, cozidas, fritas e *sauté* serão simbolizadas pelas siglas, “U”, “C”, “F”, e “S”, respectivamente, seguido do número do condimento usado: (1) sem condimentos; (2) com sal e suco de limão; e (3) com alho, sal e suco de limão.

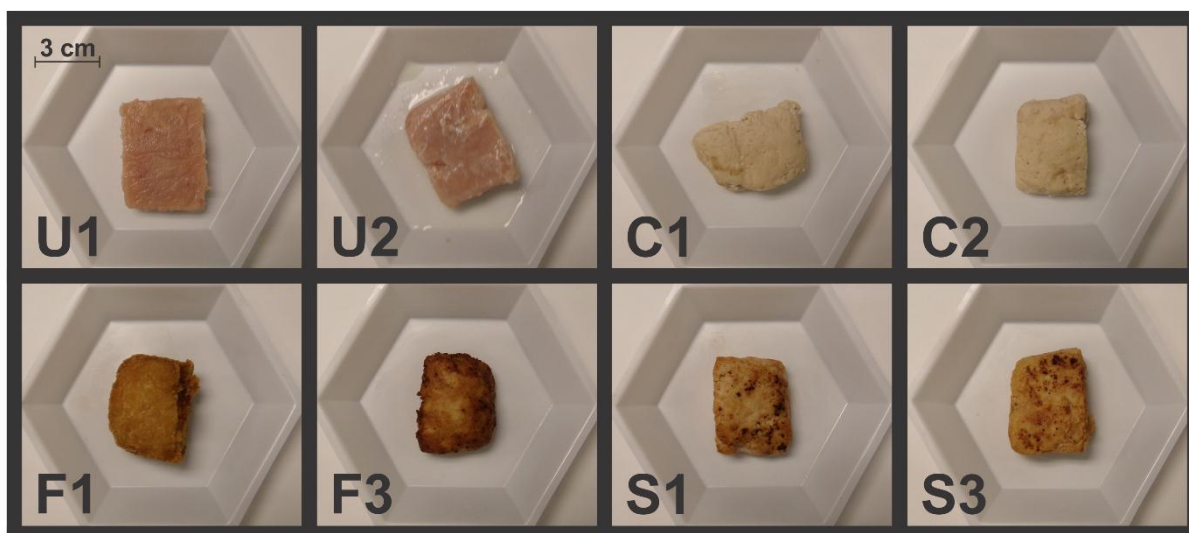


Figura 11. Aspecto das amostras de TUBARÃO que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão.

⁵⁴ Gokoglu, N., et al., *Food Chem.* 84 (2004) 19-22.

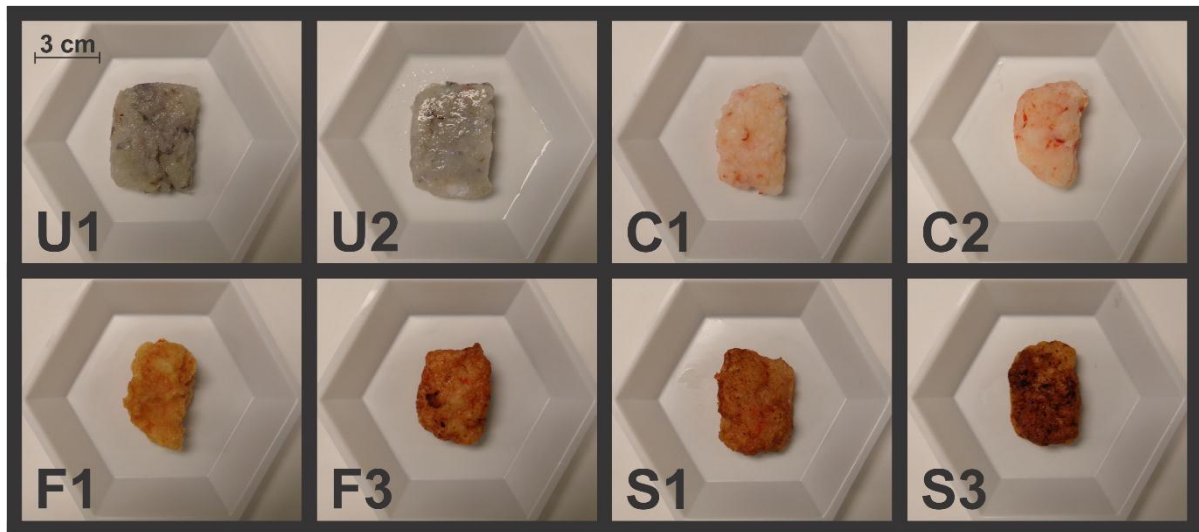


Figura 12. Aspecto das amostras de CAMARÃO que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão.

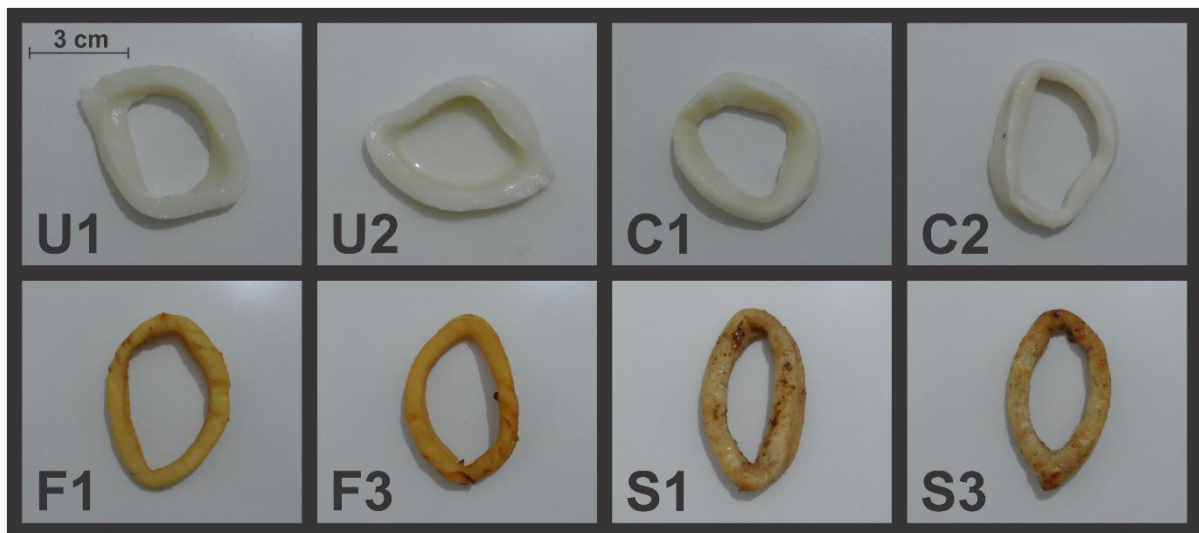


Figura 13. Aspecto das amostras de LULA que sofreram diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão.

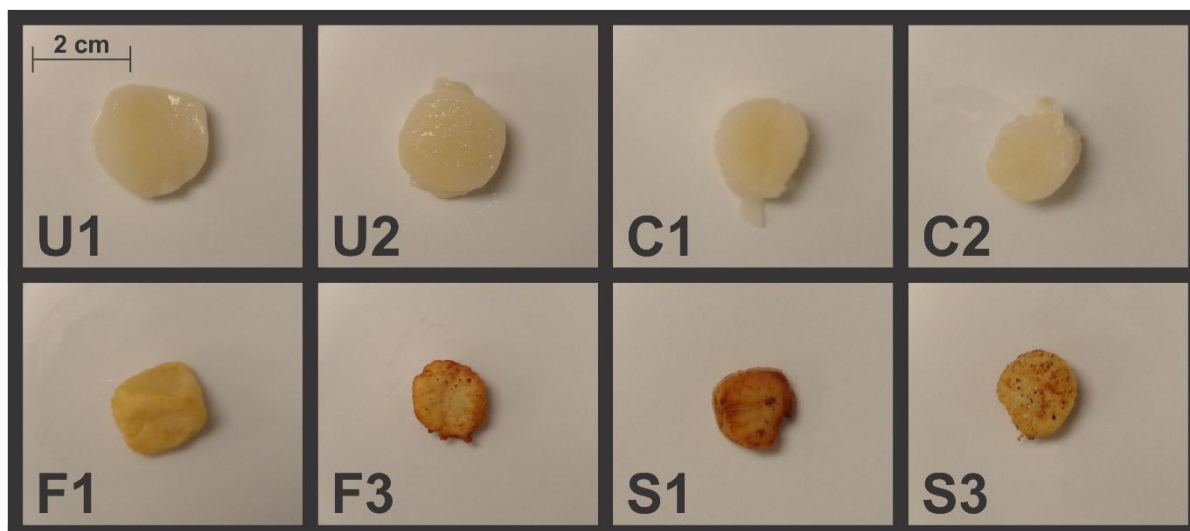


Figura 14. Aspecto das amostras de VIEIRAS que sofreram diferentes tratamentos culinários.

U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão.

4.4 Avaliação da amostragem para avaliação do tratamento culinário

Com o objetivo de avaliar a representatividade da amostragem utilizada previamente ao tratamento culinário, neste trabalho foi feita uma avaliação da distribuição (homogeneidade) de metais e não-metais entre replicatas das porções de amostras (sem tratamento culinário) de tubarão, camarão e lula (Tabela 11). Para as amostras de ostras e vieiras, as quais sofreram uma amostragem diferente (item 3.4) das demais, a avaliação da homogeneidade foi realizada através da concordância das concentrações elementares entre as frações “A” e “B” das respectivas amostras (Tabela 12).

Tabela 11. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) de metais e não-metais nas amostras *in natura* de tubarão, camarão e lula ($n = 3$).

| Analito | Tubarão | Camarão | Lula |
|---------|---------------------|---------------------|---------------------|
| As | $3,80 \pm 0,14$ | $0,378 \pm 0,007$ | $0,204 \pm 0,004$ |
| Cd | $0,0057 \pm 0,0003$ | $0,0031 \pm 0,0002$ | $0,030 \pm 0,002$ |
| Cr | $0,022 \pm 0,004$ | $0,014 \pm 0,003$ | $0,010 \pm 0,004$ |
| Cu | $0,371 \pm 0,014$ | $2,46 \pm 0,06$ | $0,846 \pm 0,067$ |
| Hg | $3,45 \pm 0,13$ | $0,0151 \pm 0,0005$ | $0,0085 \pm 0,0003$ |
| Pb | $0,020 \pm 0,001$ | $< 0,004^a$ | $< 0,003^a$ |
| Se | $0,551 \pm 0,018$ | $0,273 \pm 0,021$ | $0,207 \pm 0,004$ |

^a Limite de quantificação (mais informações na Tabela A11).

Tabela 12. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) de metais e não-metais nas frações das amostras *in natura* de ostras e vieiras ($n = 5$).

| Amostra | Fração | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Pb | Se |
|-----------|----------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Ostra #2 | Fração A | 1,09 ± 0,03 | <u>0,209 ± 0,003^a</u> | <u>0,028 ± 0,002^a</u> | 8,48 ± 0,45 | <u>0,027 ± 0,001^a</u> | 0,041 ± 0,006 | 0,325 ± 0,027 |
| | Fração B | 1,01 ± 0,02 | <u>0,272 ± 0,006^a</u> | <u>0,035 ± 0,001^a</u> | 7,80 ± 0,14 | <u>0,014 ± 0,001^a</u> | 0,032 ± 0,002 | 0,341 ± 0,012 |
| Ostra #3 | Fração A | <u>1,27 ± 0,01^a</u> | <u>0,241 ± 0,005^a</u> | 0,031 ± 0,003 | 8,63 ± 0,57 | <u>0,019 ± 0,001^a</u> | 0,035 ± 0,003 | <u>0,320 ± 0,014^a</u> |
| | Fração B | <u>1,01 ± 0,01^a</u> | <u>0,289 ± 0,006^a</u> | 0,024 ± 0,001 | 7,91 ± 0,69 | <u>0,038 ± 0,002^a</u> | 0,044 ± 0,006 | <u>0,427 ± 0,032^a</u> |
| Ostra #4 | Fração A | 0,91 ± 0,01 | <u>0,173 ± 0,004^a</u> | 0,024 ± 0,001 | <u>7,36 ± 0,47^a</u> | <u>0,024 ± 0,001^a</u> | 0,038 ± 0,002 | 0,389 ± 0,018 |
| | Fração B | 0,84 ± 0,03 | <u>0,338 ± 0,003^a</u> | 0,019 ± 0,005 | <u>5,61 ± 0,14^a</u> | <u>0,033 ± 0,001^a</u> | 0,044 ± 0,005 | 0,349 ± 0,012 |
| Ostra #5 | Fração A | <u>1,02 ± 0,04^a</u> | <u>0,336 ± 0,006^a</u> | 0,027 ± 0,006 | 7,15 ± 0,63 | <u>0,042 ± 0,002^a</u> | <u>0,025 ± 0,002^a</u> | 0,363 ± 0,022 ^a |
| | Fração B | <u>1,18 ± 0,02^a</u> | <u>0,281 ± 0,007^a</u> | 0,036 ± 0,011 | 6,24 ± 0,41 | <u>0,030 ± 0,001^a</u> | <u>0,040 ± 0,004^a</u> | 0,395 ± 0,012 ^a |
| Ostra #6 | Fração A | <u>1,04 ± 0,02^a</u> | 0,226 ± 0,003 | 0,028 ± 0,004 | 7,77 ± 0,72 | 0,037 ± 0,001 | 0,032 ± 0,004 | 0,424 ± 0,034 |
| | Fração B | <u>1,16 ± 0,02^a</u> | 0,241 ± 0,007 | 0,025 ± 0,001 | 6,59 ± 0,45 | 0,034 ± 0,001 | 0,040 ± 0,003 | 0,374 ± 0,021 |
| Vieira #2 | Fração A | 0,104 ± 0,002 | 0,083 ± 0,010 | 0,017 ± 0,003 | 0,093 ± 0,006 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,061 ± 0,023 |
| | Fração B | 0,101 ± 0,002 | 0,086 ± 0,009 | 0,019 ± 0,003 | 0,094 ± 0,003 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,066 ± 0,008 |
| Vieira #3 | Fração A | 0,101 ± 0,004 | 0,069 ± 0,003 | 0,018 ± 0,002 | 0,093 ± 0,001 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,054 ± 0,010 |
| | Fração B | 0,104 ± 0,002 | 0,064 ± 0,004 | 0,016 ± 0,002 | 0,088 ± 0,005 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,055 ± 0,019 |
| Vieira #4 | Fração A | 0,121 ± 0,005 | 0,077 ± 0,002 | 0,016 ± 0,001 | 0,093 ± 0,006 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,042 ± 0,006 |
| | Fração B | 0,128 ± 0,003 | 0,074 ± 0,007 | 0,017 ± 0,002 | 0,091 ± 0,003 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,044 ± 0,020 |
| Vieira #5 | Fração A | 0,099 ± 0,001 | 0,059 ± 0,001 | 0,015 ± 0,002 | 0,104 ± 0,007 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,067 ± 0,032 |
| | Fração B | 0,104 ± 0,003 | 0,06 ± 0,005 | 0,018 ± 0,002 | 0,106 ± 0,005 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,072 ± 0,018 |
| Vieira #6 | Fração A | 0,126 ± 0,001 | 0,057 ± 0,002 | 0,016 ± 0,003 | 0,102 ± 0,004 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,065 ± 0,021 |
| | Fração B | 0,124 ± 0,003 | 0,057 ± 0,005 | 0,015 ± 0,002 | 0,101 ± 0,001 | < 0,001 ^b | < 0,002 ^b | 0,061 ± 0,020 |

^a Valores sublinhados apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) na distribuição elementar presente entre as duas frações.

^b Limite de quantificação (mais informações na Tabela A11).

Conforme pode ser observado nas Tabelas 11 e 12, a amostragem das amostras de tubarão, camarão, lula e vieiras, utilizada previamente ao tratamento culinário foi adequada para a avaliação da influência do tratamento culinário na concentração e biodisponibilidade de metais e não-metals nas respectivas amostras. No entanto, para as amostras de ostras, o tipo de amostragem empregado mostrou-se inadequado, visto que foram observados resultados não concordantes entre as frações “A” e “B” das cinco replicatas avaliadas. A variação da concentração elementar entre as duas frações (“A” e “B”) deve-se, provavelmente, ao fato da amostra de ostra ser constituída por diversas partes, como o músculo adutor, manto, coração, estômago, intestino, etc; as quais geralmente apresentam diferentes distribuições de metais e não-metals.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Contrariamente, a vieira, a qual somente o músculo adutor foi utilizado como amostra (e que geralmente é consumida desta maneira), apresentou resultados satisfatórios em relação à amostragem utilizada. Segundo estudos realizados por Cheung *et al.*⁹⁹ e Katano *et al.*⁹⁸, a distribuição e acumulação de metais pesados no tecido de ostras é distinta e dependente de cada parte (músculo adutor, manto, vísceras, etc.) do tecido. Portanto, a amostragem de um músculo adutor fracionado de um molusco, como a vieira, será mais homogênea que o fracionamento de uma amostra íntegra de molusco (contendo o músculo adutor, manto, coração, estômago, etc.), como a ostra. Assim, neste trabalho, os resultados relacionados ao comportamento dos metais pesados em ostras após o tratamento culinário não serão discutidos, visto que a amostragem não foi representativa o suficiente para esta avaliação. No entanto, serão apresentados os dados relacionados à biodisponibilidade de metais e não-metals de amostras de ostras após os diferentes tratamentos culinários, sendo que esta avaliação independe da concentração inicial da fração “B” (amostra controle).

Cabe ressaltar, que a avaliação e escolha da amostragem são de suma importância para este tipo de estudo. Visto que, a avaliação da influência dos tratamentos culinários nos frutos do mar é baseada nos resultados comparativos de uma dada amostra que sofreu os diferentes tratamentos culinários e a que não sofreu (amostra crua, que neste caso é a amostra controle).

⁹⁸ Katano, S., *et al.*, *Chemosphere* 53 (2003) 245-251.

⁹⁹ Cheung, Y. H., Wong, M. H., *Environ. Manage.* 16 (1992) 753-761.

¹⁰⁰ Saavedra, Y., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 25 (2008) 1339-1344.

4.4.1 Concentração versus Legislação vigente

O órgão regulamentador nacional, ANVISA²⁷, e os internacionais, MERCOSUL²⁷ e Comissão Europeia (EU)¹⁰¹, estabelecem níveis máximos de contaminantes inorgânicos em frutos do mar de acordo com cada espécie. Na Tabela 13 estão mostrados os níveis máximos de contaminantes estabelecidos pelos órgãos regulamentadores.

Tabela 13. Níveis máximos de contaminantes inorgânicos em frutos do mar ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa úmida) estabelecidos pelos órgãos regulamentadores.

| Fruto do mar | As | Cd | Hg | Pb |
|--|------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| Peixe (<i>tubarão</i>) | 1 ^{a,b} | 0,05 ^{a,b,c} | 1 ^{a,b,c} | 0,3 ^{a,b,c} |
| Moluscos cefalópodes (<i>lula</i>) | 1 ^{a,b} | 2 ^{a,b} ; 1 ^c | 0,5 ^{a,b,c} | 1 ^{a,b,c} |
| Moluscos bivalves (<i>ostras e vieiras</i>) | 1 ^{a,b} | 2 ^{a,b} ; 1 ^c | 0,5 ^{a,b,c} | 1,5 ^{a,b,c} |
| Crustáceos (<i>camarão</i>) | 1 ^{a,b} | 0,5 ^{a,b,c} | 0,5 ^{a,b,c} | 0,5 ^{a,b,c} |

^a ANVISA; ^b MERCOSUL; ^c EU.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12, somente as amostras de tubarão e ostras encontram-se impróprias para o consumo humano. As amostras de ostras #2, #3, #5 e #6 apresentaram teor de As cerca de 5 a 14% acima do limite máximo recomendado (considerando a ostra íntegra, como a média ponderada das frações “A” e “B”). Já a amostra de tubarão apresentou o teor de As e Hg cerca de 280 e 245% acima do limite máximo recomendado pelos órgãos regulamentadores, respectivamente.^{27,101}

Sabe-se que peixes de nível trófico alto, como o tubarão, acumulam maiores concentrações de Hg devido à biomagnificação na sua dieta, por isso os órgãos regulamentadores^{27,101} estabelecem um limite máximo de Hg maior para peixes predadores ($1 \mu\text{g g}^{-1}$) que para peixes não-predadores ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$). Mesmo assim, a amostra de tubarão galha-preta estudada neste trabalho mostrou-se muito acima dos limites máximos recomendados. Recentemente (2014), Rumbold *et al.*¹⁰² investigaram a acumulação de Hg em 7 espécies de tubarão da costa sudoeste da Flórida nos EUA,

²⁷ ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013, 2013.

¹⁰¹ EC, No 1881/2006, Official Journal of the European Union L 364, 20 December 2006, pp. 5-24, 2006.

¹⁰² Rumbold, D., *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 402-412.

dentre as 7 espécies estudadas, o tubarão galha-preta foi a espécie que apresentou os maiores teores deste contaminante, chegando a concentrações de Hg tão altas quanto $4,52 \mu\text{g g}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos na literatura.^{103,104} De acordo com estes estudos, o consumo do tubarão galha-preta como fonte de alimento apresenta maiores riscos à saúde do que outras espécies de tubarão.

Apesar das amostras de tubarão e ostras apresentarem teores de As acima do limite máximo recomendado pelas legislações vigentes,^{27,101} existem controvérsias em relação ao limite máximo de As em frutos do mar. Em 2010, o comitê internacional de especialistas, administrado juntamente pela Organização Mundial da Saúde (WHO) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO)¹⁰⁵ concluiu que o valor de tolerância provisória de ingestão semanal (PTWI) de As inorgânico de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo por semana (equivalente a $2,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia), previamente estabelecido pela EFSA (*European Food Safety Authority*), apresentava riscos e foi considerado inapropriado. O comitê revogou a PTWI de As e, atualmente, não há nenhum novo valor estabelecido para a PTWI de As e nem para níveis máximos de As em frutos do mar.¹⁰⁵

Além disso, é importante salientar que as amostras de ostras (molusco bivalve) apresentaram os maiores teores de Cd, Cr, Cu e Pb, e o segundo maior teor de As e Hg dentre as amostras estudadas. No entanto, as amostras de vieiras, as quais também são uma classe de molusco bivalve, apresentaram os menores teores de As, Cu, Hg e Pb dentre todas as amostras. Isso se deve ao fato que o músculo adutor apresenta relativamente menores concentrações destes contaminantes quando comparado ao tecido integral do molusco. De acordo com trabalhos anteriores,^{100,106,107} as vieiras somente apresentam riscos à saúde quando consumidas de forma integral, ou seja, as vieiras geralmente não apresentam riscos de contaminação por metais pesados, visto que, comumente a maioria dos consumidores consomem somente o músculo adutor de vieiras como alimento.

²⁷ ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013, 2013.

¹⁰⁰ Saavedra, Y., *et al.*, *Food Addit. Contam. A* 25 (2008) 1339-1344.

¹⁰¹ EC, No 1881/2006, Official Journal of the European Union L 364, 20 December 2006, pp. 5-24, 2006.

¹⁰³ Hueter, R. E., *et al.*, *Water, Air, Soil Pollut.* 80 (1995) 893-899.

¹⁰⁴ Evers, D. C., *et al.*, Mercury levels in Florida sharks: interim Report BioDiversity Research institute, Gorham, Maine., 2008, pp. 16.

¹⁰⁵ FAO/WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2010, pp. 1-16.

¹⁰⁶ Kruzynski, G. M., *Toxicol. Lett.* 148 (2004) 159-169.

¹⁰⁷ Metian, M., *et al.*, *Environ. Pollut.* 152 (2008) 543-552.

4.5 Influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metals em frutos do mar

Para uma melhor avaliação do comportamento da concentração elementar nas amostras de frutos do mar após os diferentes tratamentos culinários, os resultados foram apresentados de duas maneiras. Os resultados das amostras de tubarão, camarão, lula e vieiras foram apresentados em concentração de massa de analito por massa de amostra fresca (crua e úmida). Para as amostras de vieiras, as quais sofreram uma amostragem diferente (item 3.4) das demais amostras, os resultados da fração “A” (após o tratamento culinário) foram apresentados, também, em concentração relativa (%) à fração “B” (amostra controle, U1) da respectiva amostra, sem tratamento culinário.

As concentrações dos metais e não-metals, após os diferentes tratamentos culinários das amostras de tubarão, camarão, lula e vieiras, estão apresentados em forma de gráfico nas Figuras 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Adicionalmente, estes resultados, juntamente com o balanço de massas de cada tratamento culinário, estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabelas A3 a A6).

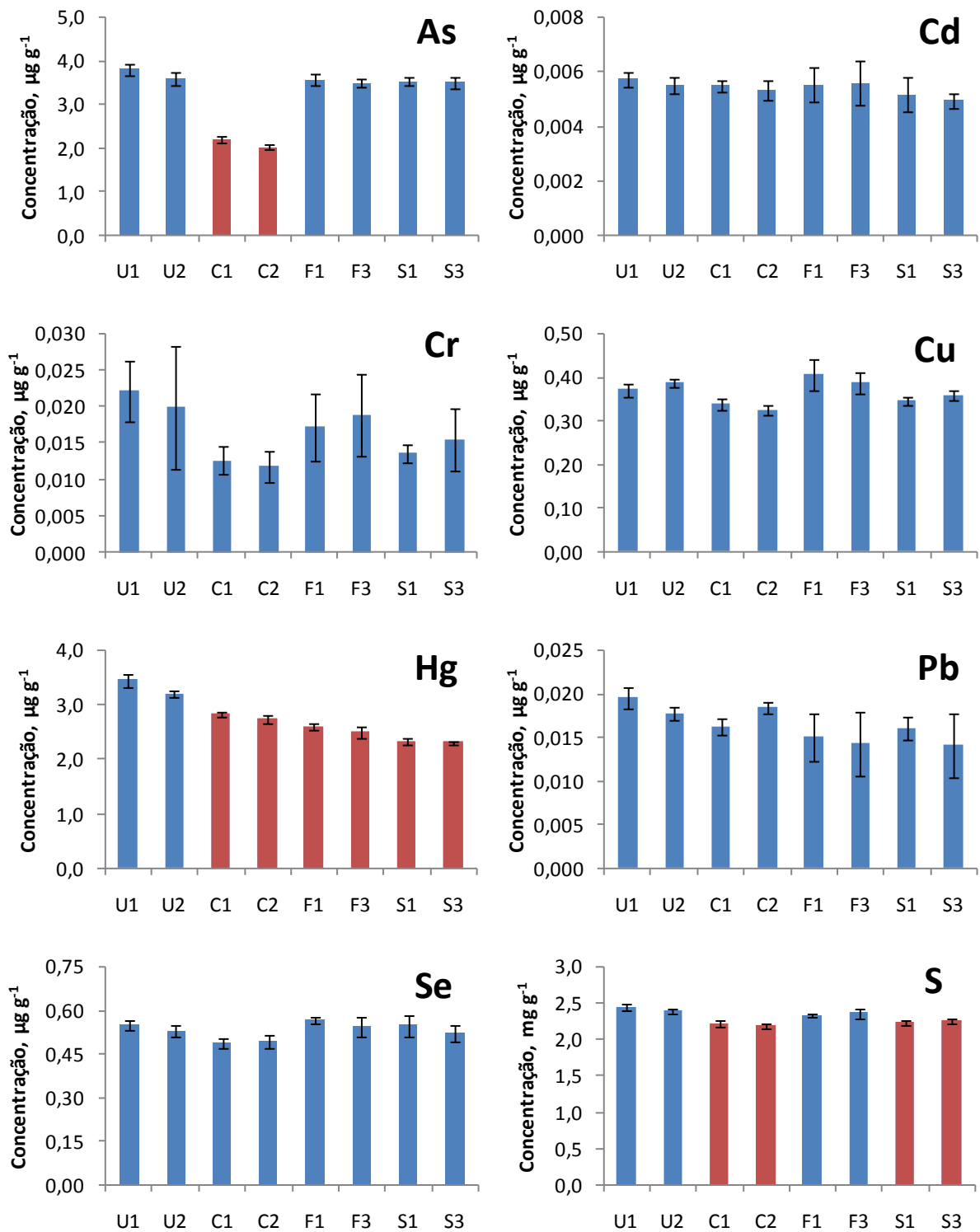


Figura 15. Concentração de metais e não-metais em amostra de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$).

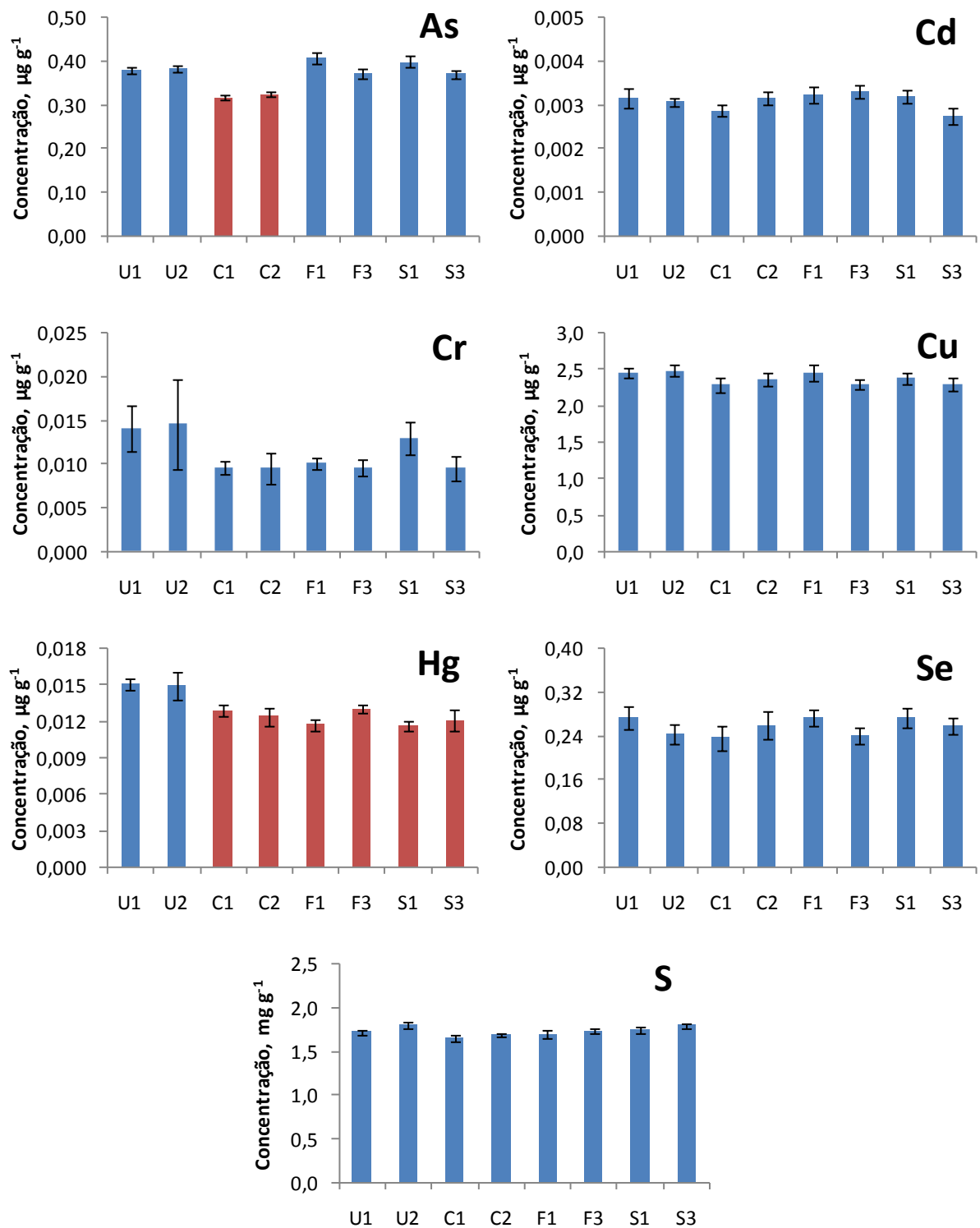


Figura 16. Concentração de metais e não-metais em amostra de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Pb < LQ.

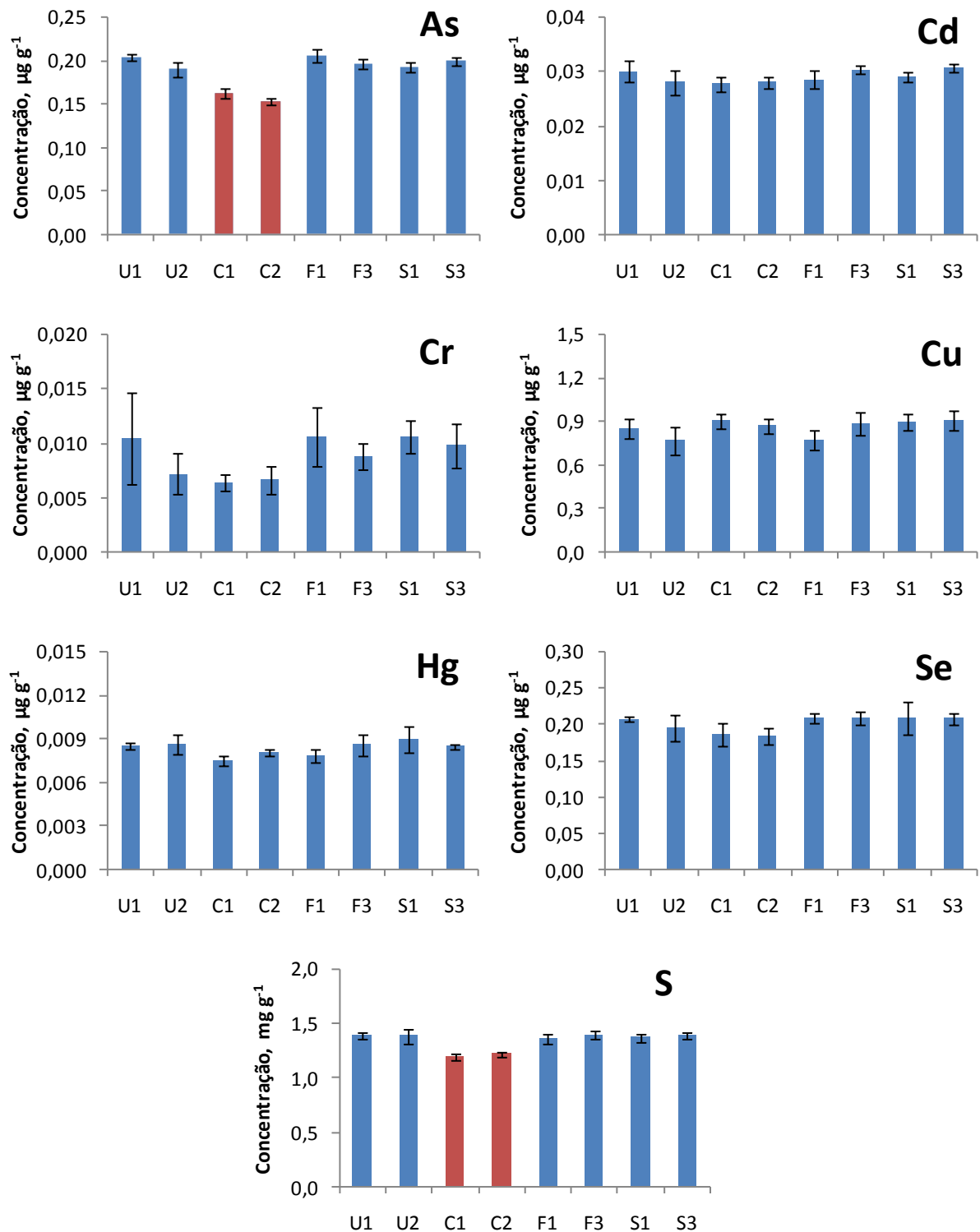
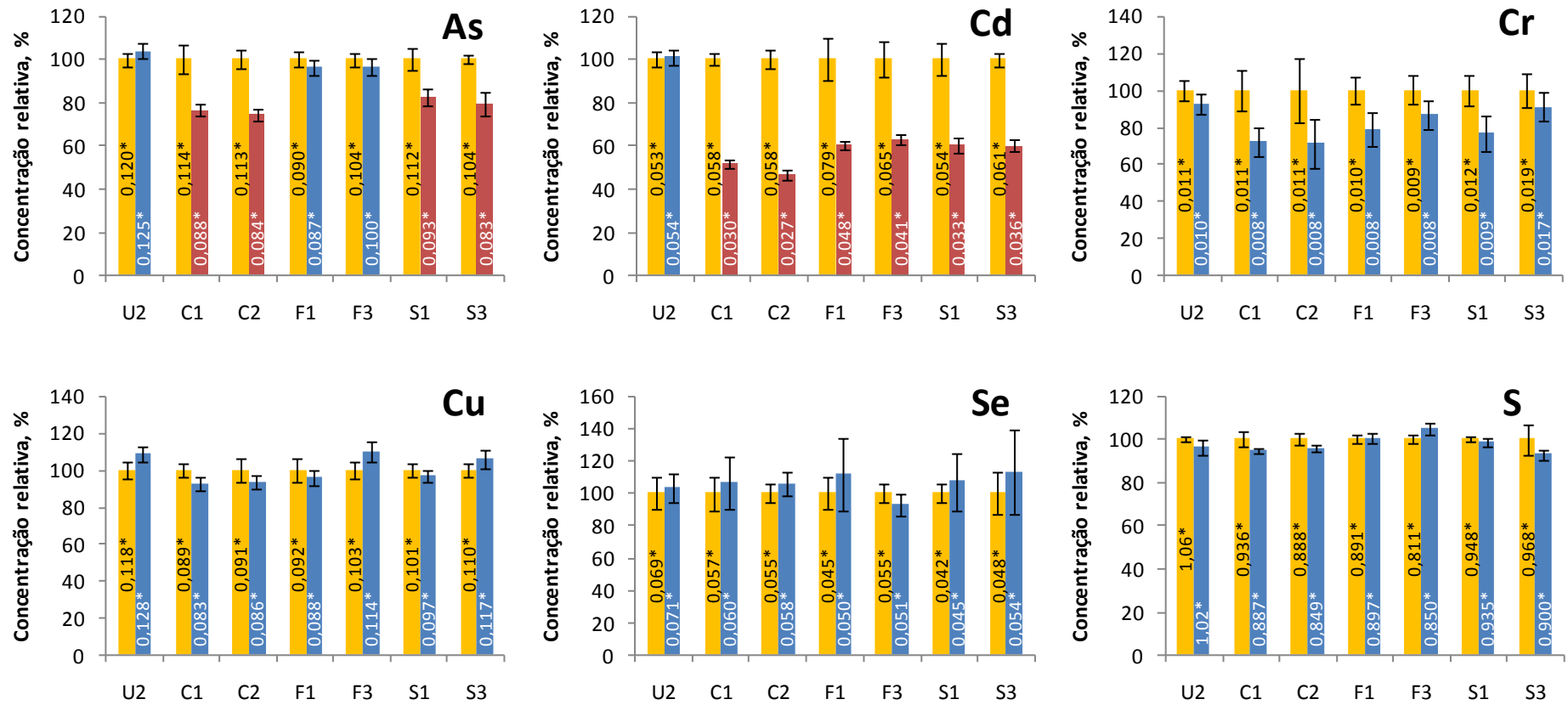


Figura 17. Concentração de metais e não-metais em amostra de LULA após diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$). U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Pb < LQ.



*Concentração média em $\mu\text{g g}^{-1}$

Figura 18. Concentração relativa de metais e não-metais na fração A das amostras de VIEIRAS após diferentes tratamentos culinários. U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*. 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão. ■ Fração B (amostra controle, U1); ■ Fração A sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ Fração A com diferença significativa da amostra U1 ($p < 0,05$). Hg e Pb < LQ.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 15 a 18, não foi observada nenhuma influência entre os tratamentos que utilizaram e não utilizaram condimentos no tratamento culinário. Portanto, se a extração de metais e não-metais das amostras sofre alguma influência devido à diminuição do pH proveniente do uso de suco de limão ou pelo aumento da força iônica no meio de cocção (como a água de cozimento) proveniente do uso de sal (NaCl), ou ainda, pela forte interação e/ou extração do analito por compostos organosulfurados provenientes do alho¹⁰⁸⁻¹¹¹, isto não foi observado neste trabalho. Desta maneira, a influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metais pode ser atribuída, principalmente, ao processo de cocção e não ao condimento utilizado.

Todas as amostras apresentaram uma influência significativa ($p < 0,05$) do tratamento culinário C1 e C2 sobre a concentração de As originalmente presente na amostra crua (U1). Foram observadas reduções nas concentrações de As de cerca de 45, 15, 23 e 25% nas amostras de tubarão, camarão, lula e vieiras, respectivamente, que sofreram o processo de cozimento em água (C1 e C2). De acordo com o balanço de massas dos tratamentos culinários (Tabelas A3 a A6 no Apêndice A), essas perdas foram ocasionadas, principalmente, devido à transferência do As para a água de cozimento (recuperações de 58 a 102%). Os meios de cocção (água de cozimento, óleo de fritura e manteiga) foram analisados a fim de comprovar a extração do metal-pesado da amostra para o meio de cocção.

Para as amostras de vieiras, foram observadas reduções na concentração de As de cerca de 19% após os tratamentos culinários S1 e S3. No entanto, não é possível afirmar que a perda ocorreu devido à transferência de massa de As para a manteiga visto que, para perdas menores que 20%, as concentrações de As não seriam (considerando a taxa de perda e LQ do analito no meio de cocção), e não foram (comprovação empírica através da etapa de determinação) suficientes para serem quantificadas ($< LQ$) na manteiga remanescente do processo *sautéing* (Tabela A6 no Apêndice A).

¹⁰⁸ Suru, S., *BioMetals* 21 (2008) 623-633.

¹⁰⁹ Senapati, S. K., *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 229-232.

¹¹⁰ Abdalla, F. H., *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 417-421.

¹¹¹ Cha, C. W., *J. Korean Med. Sci.* 2 (1987) 213-223.

Cabe ressaltar, que resultados e discussões adicionais sobre as espécies de As serão abordados no item 4.7 (*Avaliação do efeito do tratamento culinário na concentração das espécies de As em frutos do mar*).

Em relação à concentração de Cd, perdas de 48, 53, 40, 37, 40 e 40% de Cd foram observadas nas amostras de vieiras após os tratamentos culinários C1, C2, F1, F3, S1 e S3, respectivamente. De acordo com o balanço de massas dos tratamentos culinários (Tabela A6, no Apêndice A), o Cd perdido das amostras de vieiras cozidas (C1 e C2) foi transferido à água de cozimento. No entanto, as perdas de Cd não seriam e não foram suficientes (< LQ) para serem quantificadas no óleo e na manteiga remanescente após os tratamentos culinários F1, F3, S1 e S3.

Adicionalmente, perdas significativas de Hg foram observadas nas amostras de tubarão e camarão que sofreram os tratamentos culinários C1, C2, F1, F3, S1 e S3. Para a amostra de tubarão foram observadas perdas de 18, 21, 25, 28, 32 e 33% após os processos de cocção C1, C2, F1, F3, S1 e S3, respectivamente. Para a amostra de camarão foram observadas perdas de 14, 18, 22, 14, 23 e 20% após os processos de cocção C1, C2, F1, F3, S1 e S3, respectivamente. No entanto, não foram observadas transferências significativas do Hg perdido das amostras para os meios de cocção (água de cozimento, óleo de fritura e a manteiga). De acordo com o balanço de massas (Tabela A4, no Apêndice A), as perdas de Hg observadas nas amostras de camarão não seriam, e não foram, suficientes para serem quantificadas nos meios de cocção. Já as perdas de Hg observadas nas amostras de tubarão seriam suficientes para serem quantificadas nos meios de cocção, mas o único meio de cocção que apresentou resultados quantitativos de Hg foi a água de cozimento, e a mesma apresentou recuperações de Hg (na água de cozimento) relativamente baixas (< 5%). Ou seja, se a perda de Hg se deu por extração, o Hg pode ter sido adsorvido na superfície do vidro do béquer, ou ter precipitado na forma ligada ou adsorvida à espécies insolúveis (ex.: através da precipitação de proteínas), ou ainda, o que pode ser considerado o mais provável, o Hg pode ter sido volatilizado para a atmosfera.

Considerando a influência dos diferentes tratamentos culinários, é possível observar que as perdas de Hg mais significantes ocorreram nas amostras de tubarão e camarão que sofreram o processo *sautéing* (S1 e S3). Percebe-se que a influência do tratamento culinário na concentração de Hg é maior nas amostras *sauté*, fritas e cozidas (S1; S3 > F1; F3 > C1; C2), respectivamente.

Recentemente, Schmidt *et al.*⁵⁸ avaliaram a influência de 3 processos de cocção (cozimento, fritura e assagem) sobre o comportamento das espécies de Hg (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) presentes em 6 espécies de peixes. Dentre estes, o processo de fritura foi o que apresentou a maior influência na redução de Hg (perdas de até 33%), sendo que não foi avaliado o processo *sautéing*. Ou seja, os resultados obtidos por Schmidt *et al.* estão concordantes com os observados no presente trabalho, visto que a influência do processo de fritura sobre a concentração de Hg é maior que o cozimento em água.

Outro fator que deve ser considerado em relação às perdas de Hg observadas neste trabalho, são as reações que podem ocorrer durante os processos de cocção entre a matriz, analito e meio de cocção.¹¹²⁻¹¹⁴ Essas reações poderiam converter e/ou apenas alterar o complexante da espécie de Hg (majoritariamente como CH_3Hg^+) para uma espécie mais volátil (ex.: $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{CH}_3$, p.e. = 92 °C). Desta maneira, as perdas de Hg possivelmente ocorreriam devido a sua volatilização, que poderia ocorrer de forma direta (considerando a integridade da espécie de Hg presente originalmente na amostra) ou de forma indireta, através da alteração do contra-íon (ex.: OH^- , Cl^- , etc.) ou complexante ligado à espécie de Hg (ex.: proteínas, amino ácido, grupo alquil, etc.), a qual poderia resultar em uma espécie de Hg mais volátil (volatilizando da amostra e/ou meio de cocção) ou insolúvel (precipitando no meio de cocção). Essa conversão de espécies de Hg foi previamente reportada por Li *et al.*¹¹⁴

Li *et al.*¹¹⁴ avaliaram a influência do tratamento culinário no comportamento de espécies de CH_3Hg^+ presentes em grão de arroz. Os autores constataram que o processo de cozimento do arroz em água em ebulição pode converter parcialmente o complexo de $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{Cys}$ (espécie de CH_3Hg^+ majoritária encontrada no grão de arroz; Cys = cisteína) presente como contaminante em grãos de arroz à $\text{CH}_3\text{Hg}-\text{X}$ (X = ligantes inorgânicos pequenos, tais como Cl^- e OH^-) e outras espécies de Hg não caracterizadas (pelo menos 3 espécies). Porém, eles não explicaram os motivos para esta conversão.

Para o restante das amostras e tratamentos culinários (barras azuis dos gráficos das Figuras 15, 16, 17 e 18) não foram observadas influências significativas

⁵⁸ Schmidt, L., *et al.*, *Food Control* 47 (2015) 413-419.

¹¹² Roldan, M., *et al.*, *Food Chem.* 149 (2014) 129-136.

¹¹³ Dobarganes, C., *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102 (2000) 521-528.

¹¹⁴ Li, L., *et al.*, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3103-3107.

($p > 0,05$) na concentração de metais e não-metals presentes originalmente nas amostras. Além disso, não foi possível fazer uma relação entre o teor de S e as perdas observadas de As e Hg. Apesar de ter sido observada uma redução do teor de S (8 a 14%) para alguns tratamentos culinários das amostras de tubarão (C1, C2, S1 e S3) e lula (C1 e C2), não foi observada nenhuma redução do teor de S para as amostras cozidas de camarão e vieiras, as quais também apresentaram perdas de As e Hg, e As e Cd, respectivamente.

O fato de uma amostra apresentar uma maior perda de contaminante (As, Cd e Hg) que outra deve-se, possivelmente, aos seguintes fatores: (i) forma (orgânica ou inorgânica, oxidado ou reduzido) que o contaminante se encontra na matriz (livre ou complexado) durante o processo de cocção; (ii) solubilidade no meio de cocção do contaminante livre (iônico) ou complexado; e (iii) permeação do meio de cocção (água, óleo ou manteiga) através da amostra, uma vez que esses poderiam extrair (lixiviar) o contaminante da matriz. No entanto, este último fator, às vezes, pode ser dificultado, pois quando a carne sofre um tratamento térmico (como cozimento, fritura e *sautéing*), forma-se uma superfície (capa) de proteína coagulada em torno da carne, impedindo a perda de líquido^{115,116}. Deste modo, essa proteção pode impedir também, a perda de minerais e contaminantes, como os metais pesados. Este efeito é mais pronunciado quanto maior for o choque térmico (ΔT) entre a amostra e o meio de cocção. Ou seja, quanto mais rápida for a formação dessa capa protéica, menos óleo ou manteiga será absorvido, e conseqüentemente, menos massa a amostra perderá.¹¹⁵ O efeito de formação dessa capa (proteína coagulada) na superfície da amostra foi observado em todos os processos de cocção deste trabalho (Figuras 11 a 14), sendo que a formação desta capa foi, aparentemente, mais pronunciada nas amostras fritas, *sauté*, e cozidas ($F1 \approx F3 > S1 \approx S3 \gg C1 \approx C2$), respectivamente. Além disso, a coloração marrom-dourada das amostras processadas se deve a outros fatores, como a reação de caramelização e/ou reação de Maillard.¹¹³

¹¹³ Dobarganes, C., et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102 (2000) 521-528.

¹¹⁵ Feijó, G. L. D., *Embrapa Gado de Corte* (1999) 25.

¹¹⁶ Leander, R. C., et al., *J. Food Sci.* 45 (1980) 1-6.

4.6 Razão molar Se/Hg e riscos associados à saúde

A habilidade do Se reduzir a toxicidade do Hg no organismo é bem conhecida na literatura. Esta habilidade está associada com a forte interação Se – Hg.¹¹⁷⁻¹²² Pesquisas recentes demonstram que o Se encontrado em frutos do mar, geralmente na forma de selenoproteínas, têm um papel importante na redução da toxicidade do Hg no organismo.¹²³⁻¹²⁵

Ralston *et al.*^{117,122,126-128} e outros pesquisadores^{118-121,129,130} sugerem que frutos do mar que possuem uma razão molar Se/Hg acima de 1 oferecem um grau de proteção aos efeitos tóxicos do Hg no organismo. Além disso, Ralston *et al.*¹¹⁷ sugerem que, para a avaliação dos riscos de toxicidade, a determinação da razão molar Se/Hg é mais importante que a determinação do teor de CH₃Hg⁺, visto que é conhecido que a espécie de CH₃Hg⁺ presente em frutos do mar é a espécie de Hg majoritária, principalmente em peixes de nível trófico elevado (os quais apresentam os maiores teores de Hg), representam mais de 90% do Hg total.

Desta maneira, a razão molar de Se/Hg foi avaliada para as amostras de frutos do mar (tubarão, camarão, lula, ostras e vieiras), antes e após os diferentes tratamentos culinários. Na Tabela 14 está mostrada a razão molar de Se/Hg das amostras estudadas neste trabalho.

¹¹⁷ Ralston, N. C., *et al.*, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 255-268.

¹¹⁸ Burger, J., Gochfeld, M., *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 1418-1429.

¹¹⁹ Peterson, S. A., *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3919-3925.

¹²⁰ Sørmo, E. G., *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6561-6566.

¹²¹ Burger, J., Gochfeld, M., *Food Chem. Toxicol.* 57 (2013) 235-245.

¹²² Kaneko, J. J., Ralston, N. C., *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 242-254.

¹²³ Falnoga, I., *et al.*, *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 25-33.

¹²⁴ Park, K., Mozaffarian, D., *Curr. Atheroscler. Rep.* 12 (2010) 414-422.

¹²⁵ Mozaffarian, D., *Int. J. Env. Res. Public Health* 6 (2009) 1894-1916.

¹²⁶ Ralston, N. V. C., *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 2133-2134.

¹²⁷ Ralston, N. V. C., *et al.*, *Neurotoxicology* 29 (2008) 802-811.

¹²⁸ Ralston, N. V. C., Raymond, L. J., *Toxicology* 278 (2010) 112-123.

¹²⁹ Burger, J., *et al.*, *J. Toxicol. Environ. Health, A* 74 (2011) 863-874.

¹³⁰ Cabañero, A., *et al.*, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 195-211.

Tabela 14. Razão molar de Se/Hg em frutos do mar antes e após os tratamentos culinários.

| Tratamento culinário | Razão molar Se/Hg | | | | |
|----------------------|-------------------|---------|------|-----------------------|-------------------|
| | Tubarão | Camarão | Lula | Ostras | Vieiras |
| U1 | 0,41 | 46 | 62 | 29 – 101 ^a | < LQ ^b |
| U2 | 0,44 | 46 | 61 | - | < LQ ^b |
| C1 | 0,49 | 54 | 70 | - | < LQ ^b |
| C2 | 0,51 | 56 | 65 | - | < LQ ^b |
| F1 | 0,54 | 59 | 67 | - | < LQ ^b |
| F3 | 0,56 | 53 | 61 | - | < LQ ^b |
| S1 | 0,60 | 60 | 59 | - | < LQ ^b |
| S3 | 0,61 | 57 | 62 | - | < LQ ^b |

^a Referente às frações B (amostra controle, U1) das amostras;

^b Concentração de Hg < LQ.

Dentre as amostras estudadas, o tubarão foi a única que apresentou a razão molar de Se/Hg < 1 (Se/Hg = 0,41 – 0,61), apresentando maiores riscos à saúde dos consumidores. Estes resultados (Se/Hg < 1) estão de acordo com os observados por outros pesquisadores que determinaram a razão molar em peixes predadores.^{122,129}

Já as demais amostras (camarão, lula, e ostras) apresentaram uma razão molar de Se/Hg relativamente alta (Se/Hg > 29) o que, representam menores riscos à saúde. Em um estudo realizado por Burger e Gochfeld¹²¹, a razão molar de Se/Hg encontrada em camarão e vieiras também foram relativamente altas.

Como já era esperado, não foi observada nenhuma alteração adicional na razão molar de Se/Hg nas amostras após os tratamentos culinários, sendo que não haviam sido constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração de Se nas amostras que sofreram os tratamentos culinários. A única relação entre a diferença da razão molar Se/Hg nas amostras que sofreram os tratamentos culinários é devido a influência observada dos tratamentos C1, C2, F1, F3, S1 e S3 na concentração de Hg presente originalmente nas amostras de tubarão e camarão.

Apesar de estudos demonstrarem que a interação de Se com outros metais pesados, como As¹³¹⁻¹³³, Cd¹³⁴⁻¹³⁶ e Pb^{137,138} também poder alterar a toxicidade dos

¹²¹ Burger, J., Gochfeld, M., *Food Chem. Toxicol.* 57 (2013) 235-245.

¹²² Kaneko, J. J., Ralston, N. C., *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 242-254.

¹²⁹ Burger, J., *et al.*, *J. Toxicol. Environ. Health, A* 74 (2011) 863-874.

¹³¹ Yang, L., *et al.*, *Environ. Geochem. Health* 24 (2002) 359-374.

¹³² Chen, Y., *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (2007) 207-213.

¹³³ Xue, W., *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 1312-1318.

¹³⁴ Chen, R. W., *et al.*, *Bioinorg. Chem.* 4 (1975) 125-133.

¹³⁵ El-Sharaky, A. S., *et al.*, *Toxicology* 235 (2007) 185-193.

¹³⁶ Messaoudi, I., *et al.*, *Biol. Trace Elem. Res.* 130 (2009) 152-161.

¹³⁷ Chuang, H.-Y., *et al.*, *Sci. Total Environ.* 387 (2007) 79-85.

¹³⁸ Cerklewski, F. L., Forbes, R. M., *The Journal of Nutrition* 106 (1976) 778-783.

mesmos no organismo não existem ainda, dados na literatura que forneçam uma relação entre a razão molar de Se/As, Se/Cd ou Se/Pb em frutos do mar e a diminuição dos riscos associados por estes contaminantes no organismo.

4.7 Avaliação do efeito do tratamento culinário na concentração das espécies de As em frutos do mar

A concentração das espécies de As após os diferentes tratamentos culinários das amostras de tubarão, camarão, lula, ostras e vieiras está apresentada nas Tabelas 15 a 19. Adicionalmente, o perfil cromatográfico das espécies de As presentes nas amostras cruas (U1) pode ser visto na Figura A2 no Apêndice A.

Cabe ressaltar, que a influência do tratamento culinário no comportamento das espécies de As nas amostras de ostras não será avaliada, visto que a amostragem das ostras não foi homogênea o suficiente para tal estudo (conforme já discutido no item 4.4). Desta maneira, os resultados das amostras de ostras serão somente apresentados e discutidos em relação à análise de especiação de As, e não em relação à avaliação da influência do tratamento culinário.

Tabela 15. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de TUBARÃO antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Trat. Cul. ^a | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | Σ espécies | As total ^b |
|-------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| U1 | 3,65 \pm 0,14 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,65 \pm 0,14 | 3,80 \pm 0,14 |
| U2 | 3,44 \pm 0,06 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,44 \pm 0,06 | 3,59 \pm 0,14 |
| C1 | 2,36 \pm 0,02 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 2,36 \pm 0,02 | 2,20 \pm 0,06 |
| C2 | 2,00 \pm 0,01 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 2,00 \pm 0,01 | 2,02 \pm 0,06 |
| F1 | 3,43 \pm 0,29 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,43 \pm 0,29 | 3,56 \pm 0,13 |
| F3 | 3,67 \pm 0,04 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,67 \pm 0,04 | 3,49 \pm 0,09 |
| S1 | 3,56 \pm 0,13 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,56 \pm 0,13 | 3,53 \pm 0,09 |
| S3 | 3,33 \pm 0,05 | < 0,021 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | < 0,02 ^c | 3,33 \pm 0,05 | 3,49 \pm 0,12 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b As total obtido das amostras digeridas;

^c Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

Tabela 16. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de CAMARÃO antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Trat. Cul. ^a | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | Σ espécies | As total ^b |
|-------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| U1 | 0,368 \pm 0,020 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,368 \pm 0,020 | 0,378 \pm 0,007 |
| U2 | 0,385 \pm 0,004 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,385 \pm 0,004 | 0,384 \pm 0,008 |
| C1 | 0,331 \pm 0,016 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,331 \pm 0,016 | 0,317 \pm 0,007 |
| C2 | 0,302 \pm 0,014 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,304 \pm 0,011 | 0,325 \pm 0,007 |
| F1 | 0,408 \pm 0,010 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,411 \pm 0,014 | 0,408 \pm 0,013 |
| F3 | 0,352 \pm 0,004 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,356 \pm 0,004 | 0,372 \pm 0,011 |
| S1 | 0,383 \pm 0,007 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,386 \pm 0,006 | 0,400 \pm 0,015 |
| S3 | 0,337 \pm 0,010 | < 0,016 ^c | < 0,003 ^c | < 0,007 ^c | < 0,01 ^c | 0,340 \pm 0,013 | 0,371 \pm 0,010 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b As total obtido das amostras digeridas;

^c Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

Tabela 17. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de LULA antes e após os tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Trat. Cul. ^a | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | Σ espécies | As total ^b |
|-------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------|
| U1 | 0,180 \pm 0,001 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,019 \pm 0,004 | 0,199 \pm 0,003 | 0,204 \pm 0,004 |
| U2 | 0,178 \pm 0,001 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,013 \pm 0,007 ^d | 0,191 \pm 0,005 | 0,190 \pm 0,009 |
| C1 | 0,135 \pm 0,007 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,018 \pm 0,009 ^d | 0,153 \pm 0,006 | 0,162 \pm 0,006 |
| C2 | 0,132 \pm 0,001 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,016 \pm 0,022 ^d | 0,148 \pm 0,022 | 0,152 \pm 0,004 |
| F1 | 0,194 \pm 0,006 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,017 \pm 0,005 | 0,211 \pm 0,008 | 0,205 \pm 0,007 |
| F3 | 0,166 \pm 0,008 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,021 \pm 0,007 | 0,187 \pm 0,012 | 0,196 \pm 0,006 |
| S1 | 0,170 \pm 0,006 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,023 \pm 0,011 ^d | 0,193 \pm 0,004 | 0,193 \pm 0,005 |
| S3 | 0,178 \pm 0,005 | < 0,012 ^c | < 0,003 ^c | < 0,005 ^c | 0,020 \pm 0,003 | 0,198 \pm 0,003 | 0,199 \pm 0,005 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b As total obtido das amostras digeridas;

^c Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12);

^d Valor > LD e < LQ.

Tabela 18. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de OSTRAS antes e após os tratamentos culinários ($n = 2$).

| Ostra | Trat. Cul. ^a | AsB | As(III) | DMA | As? (4,45') | MMA | As(V) | Σ espécies | As total ^b |
|-------|-------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| #7 | U1 (Fração B) | 0,534 \pm 0,008 | 0,024 \pm 0,009 | 0,048 \pm 0,015 | 0,070 \pm 0,015 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,676 \pm 0,007 | 0,81 \pm 0,034 |
| | U2 (Fração A) | 0,617 \pm 0,014 | 0,059 \pm 0,027 | 0,036 \pm 0,004 | 0,081 \pm 0,005 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,792 \pm 0,008 | 0,944 \pm 0,04 |
| #8 | U1 (Fração B) | 0,583 \pm 0,019 | 0,062 \pm 0,013 | 0,172 \pm 0,040 | 0,091 \pm 0,015 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,908 \pm 0,012 | 1,09 \pm 0,08 |
| | C1 (Fração A) | 0,308 \pm 0,005 | 0,072 \pm 0,008 | 0,296 \pm 0,024 | 0,064 \pm 0,005 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,740 \pm 0,006 | 0,929 \pm 0,014 |
| #9 | U1 (Fração B) | 0,456 \pm 0,016 | < 0,012 ^c | 0,138 \pm 0,016 | 0,050 \pm 0,011 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,644 \pm 0,008 | 0,826 \pm 0,025 |
| | C2 (Fração A) | 0,548 \pm 0,005 | 0,042 \pm 0,007 | 0,387 \pm 0,013 | 0,147 \pm 0,016 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 1,13 \pm 0,004 | 1,35 \pm 0,02 |
| #10 | U1 (Fração B) | 0,484 \pm 0,009 | 0,022 \pm 0,004 | 0,124 \pm 0,012 | 0,062 \pm 0,009 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,692 \pm 0,016 | 0,771 \pm 0,034 |
| | F1 (Fração A) | 0,494 \pm 0,008 | 0,050 \pm 0,005 | 0,198 \pm 0,012 | 0,111 \pm 0,02 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,852 \pm 0,01 | 1,06 \pm 0,03 |
| #11 | U1 (Fração B) | 0,442 \pm 0,014 | 0,090 \pm 0,004 | 0,113 \pm 0,011 | 0,054 \pm 0,013 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,711 \pm 0,007 | 0,778 \pm 0,034 |
| | F3 (Fração A) | 0,457 \pm 0,005 | 0,075 \pm 0,007 | 0,154 \pm 0,017 | 0,085 \pm 0,011 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,775 \pm 0,013 | 1,08 \pm 0,02 |
| #12 | U1 (Fração B) | 0,654 \pm 0,012 | 0,062 \pm 0,003 | 0,179 \pm 0,017 | 0,085 \pm 0,013 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,979 \pm 0,017 | 1,13 \pm 0,06 |
| | S1 (Fração A) | 0,478 \pm 0,009 | 0,034 \pm 0,010 | 0,179 \pm 0,027 | 0,101 \pm 0,010 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,791 \pm 0,016 | 0,944 \pm 0,041 |
| #13 | U1 (Fração B) | 0,588 \pm 0,019 | 0,035 \pm 0,014 | 0,181 \pm 0,031 | 0,072 \pm 0,012 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,876 \pm 0,007 | 1,04 \pm 0,03 |
| | S3 (Fração A) | 0,701 \pm 0,011 | 0,050 \pm 0,014 | 0,312 \pm 0,018 | 0,086 \pm 0,017 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 1,15 \pm 0,02 | 1,38 \pm 0,01 |
| #14 | U1 (integral) | 0,625 \pm 0,033 | 0,032 \pm 0,001 | 0,087 \pm 0,016 | 0,051 \pm 0,006 | < 0,005 ^c | < 0,01 ^c | 0,796 \pm 0,012 | 0,866 \pm 0,036 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b As total obtido das amostras digeridas;

^c Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

Tabela 19. Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$, massa fresca) das espécies de As presente nas amostras de VIEIRAS antes e após os tratamentos culinários ($n = 2$).

| Vieira | Trat. Cul. ^a | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | Σ espécies | As total ^b |
|--------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| #7 | U1 (Fração B) | 0,099 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,025 \pm 0,003 | 0,124 \pm 0,002 | 0,120 \pm 0,004 |
| | U2 (Fração A) | 0,100 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,027 \pm 0,006 | 0,127 \pm 0,004 | 0,125 \pm 0,004 |
| #8 | U1 (Fração B) | 0,086 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,028 \pm 0,005 | 0,113 \pm 0,005 | 0,114 \pm 0,008 |
| | C1 (Fração A) | 0,086 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | 0,086 \pm 0,004 | 0,088 \pm 0,003 |
| #9 | U1 (Fração B) | 0,084 \pm 0,005 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,024 \pm 0,004 | 0,108 \pm 0,002 | 0,113 \pm 0,005 |
| | C2 (Fração A) | 0,078 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | < 0,009 ^c | 0,078 \pm 0,003 | 0,084 \pm 0,003 |
| #10 | U1 (Fração B) | 0,071 \pm 0,003 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,018 \pm 0,004 | 0,088 \pm 0,003 | 0,090 \pm 0,003 |
| | F1 (Fração A) | 0,067 \pm 0,004 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,017 \pm 0,003 | 0,084 \pm 0,004 | 0,087 \pm 0,003 |
| #11 | U1 (Fração B) | 0,093 \pm 0,005 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,021 \pm 0,003 | 0,113 \pm 0,003 | 0,104 \pm 0,003 |
| | F3 (Fração A) | 0,080 \pm 0,003 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,022 \pm 0,002 | 0,102 \pm 0,003 | 0,100 \pm 0,004 |
| #12 | U1 (Fração B) | 0,097 \pm 0,003 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,026 \pm 0,004 | 0,123 \pm 0,005 | 0,112 \pm 0,006 |
| | S1 (Fração A) | 0,073 \pm 0,003 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,027 \pm 0,003 | 0,101 \pm 0,004 | 0,093 \pm 0,004 |
| #13 | U1 (Fração B) | 0,078 \pm 0,003 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,024 \pm 0,004 | 0,102 \pm 0,005 | 0,104 \pm 0,002 |
| | S3 (Fração A) | 0,060 \pm 0,002 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,019 \pm 0,004 | 0,079 \pm 0,003 | 0,083 \pm 0,006 |
| #14 | U1 (integral) | 0,091 \pm 0,004 | < 0,01 ^c | < 0,002 ^c | < 0,004 ^c | 0,023 \pm 0,005 | 0,113 \pm 0,004 | 0,116 \pm 0,002 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b As total obtido das amostras digeridas;

^c Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

De acordo com os resultados das Tabelas 15 a 19, não foi observada nenhuma influência do tratamento culinário em relação à modificação ou interconversão das espécies de As presentes originalmente na amostra crua (tubarão, camarão, lula e vieiras). Esta não observância de interconversões das espécies de As foi, também, citada em outro trabalho.⁶²

Sartal *et al.*⁶² investigaram o comportamento das espécies de As em algas que sofreram o processo de cozimento, e também não verificaram interconversões de espécies de As dentre as quatro amostras estudadas. Porém, em um trabalho realizado por Devesa *et al.*,¹³⁹ os autores constataram uma decomposição parcial de AsB à TMA⁺ em frutos do mar que sofreram processos de cocção em que a temperatura interna da amostra atingiu temperaturas acima de 150 °C. No entanto, o respectivo trabalho não menciona como a amostragem foi efetuada, e nem expressa os resultados em massa fresca (como massa úmida de amostra crua), o que pode gerar interpretações equivocadas em relação ao efeito do processo de cocção. Além disso, processos de cocção (em condições normais de pressão, $P \approx 1\text{atm}$) em que a temperatura interna do alimento alcance temperaturas acima de 150 °C não são comuns, a menos que o alimento seja bem desidratado durante o processo de cocção.

Dentre as espécies de As identificadas neste trabalho, a AsB foi a espécie majoritária presente em todas as amostras de frutos do mar. Além disso, os tecidos de ostras apresentaram pelo menos 4 espécies de As, sendo que uma das 4 não foi caracterizada (TR = 4,45 min). Embora seja meramente especulativo, essa espécie de As não identificada (As?), possivelmente seja a espécie reduzida de MMA(V), visto que, a identificação dessa espécie reduzida (MMA(III)) em uma ordem de eluição similar por coluna de troca aniônica são reportadas em outros trabalhos.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Para as demais amostras, apenas AsB (no tubarão, camarão, lula e vieiras) e As(V) (na lula e vieiras) foram encontradas acima do LQ. É importante salientar que a AsB é uma das espécies de As que é considerada não-tóxica aos seres humanos e, portanto, dentre as amostras estudadas neste trabalho todas estariam apropriadas para o consumo. Atualmente, alguns países juntamente com seus órgãos regulamentadores,^{144,145}

⁶² Sartal, C. G., *et al.*, *Microchem. J.* 105 (2012) 65-71.

¹³⁹ Devesa, V., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2272-2276.

¹⁴⁰ Wang, Z., *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2003) 95-103.

¹⁴¹ Chen, B., *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1903-1911.

¹⁴² Mandal, B. K., *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 (2003) 73-83.

¹⁴³ Alava, P., *et al.*, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 524-533.

¹⁴⁴ Standard, National Food Safety Standard Maximum Levels of Contaminants in Food, China GB Standard, 2012.

¹⁴⁵ FSANZ, Australia New Zealand Food Standards Code, FSANZ, 2013.

estabelecem os níveis máximos de As em frutos do mar baseado somente na concentração de As inorgânico, que são as espécies de As consideradas mais tóxicas. Neste caso, até mesmo a amostra de tubarão, se não fosse pelo excesso de Hg, estaria própria para o consumo conforme essas considerações.

Conforme já discutido no item 4.5, uma influência significativa ($p < 0,05$) do tratamento culinário C1 e C2 na redução do teor de As originalmente presente na amostra foi observada para as amostras de tubarão, camarão, lula e vieiras que sofreram o processo de cozimento em água. Perdas de As também foram observadas para as amostras de vieiras que sofreram o processo *sautéing*. Além disso, visto que não foram observadas transformações entre as espécies de As e que a única espécie detectada na água de cozimento foi a AsB, pode-se afirmar que as perdas de As ocorreram principalmente pela transferência da AsB diretamente para a água de cozimento. Em relação às amostras de lula e vieiras, as quais apresentaram também a espécie de As(V), as perdas de As ocorreram também como As(V). No entanto, não foi observada uma redução significativa de As(V) para as porções de vieiras que sofreram o processo *sautéing*, os resultados indicam que as perdas de As ocorreram principalmente como AsB, porém, não foi possível comprovar se a AsB foi transferida à manteiga ($As\ total < LQ$) ou se foi convertida à outra espécie de As que permaneceu na manteiga e/ou volatilizou para a atmosfera (Tabela A6).

Cabe ressaltar, que resultados adicionais sobre a biodisponibilidade das espécies de As nas amostras de frutos do mar serão apresentados e discutidos no item 4.9 (*Biodisponibilidade das espécies de As de frutos do mar após diferentes tratamentos culinários*).

4.8 Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de frutos do mar antes e após os tratamentos culinários

A biodisponibilidade dos metais e não-metais após os diferentes tratamentos culinários das amostras de tubarão, camarão e lula estão apresentados em forma de gráfico nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente. A biodisponibilidade dos metais e não-metais das amostras de ostra, vieira e adicionalmente o material de referência certificado DORM-3, foram apresentados na Tabela 20.

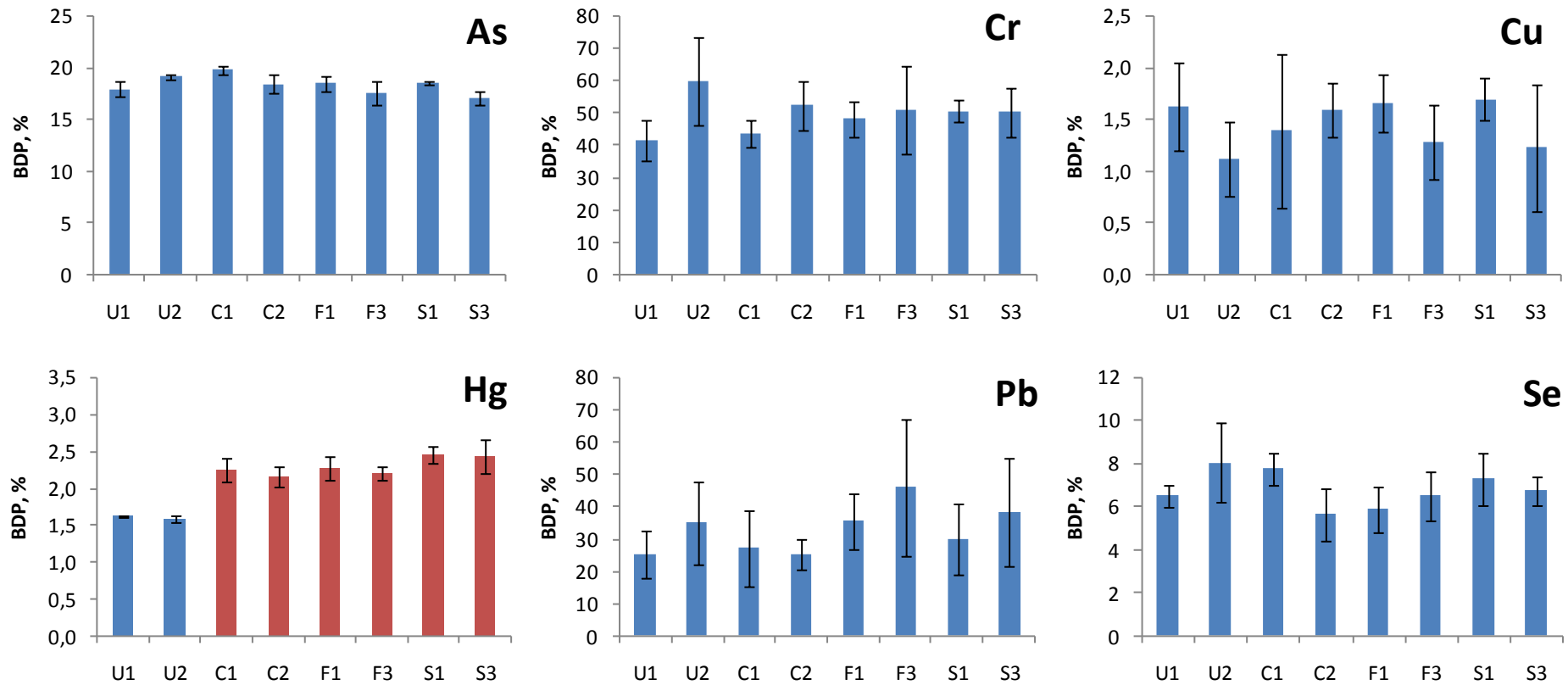


Figura 19. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metais nas amostras de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários. Cd < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A8).

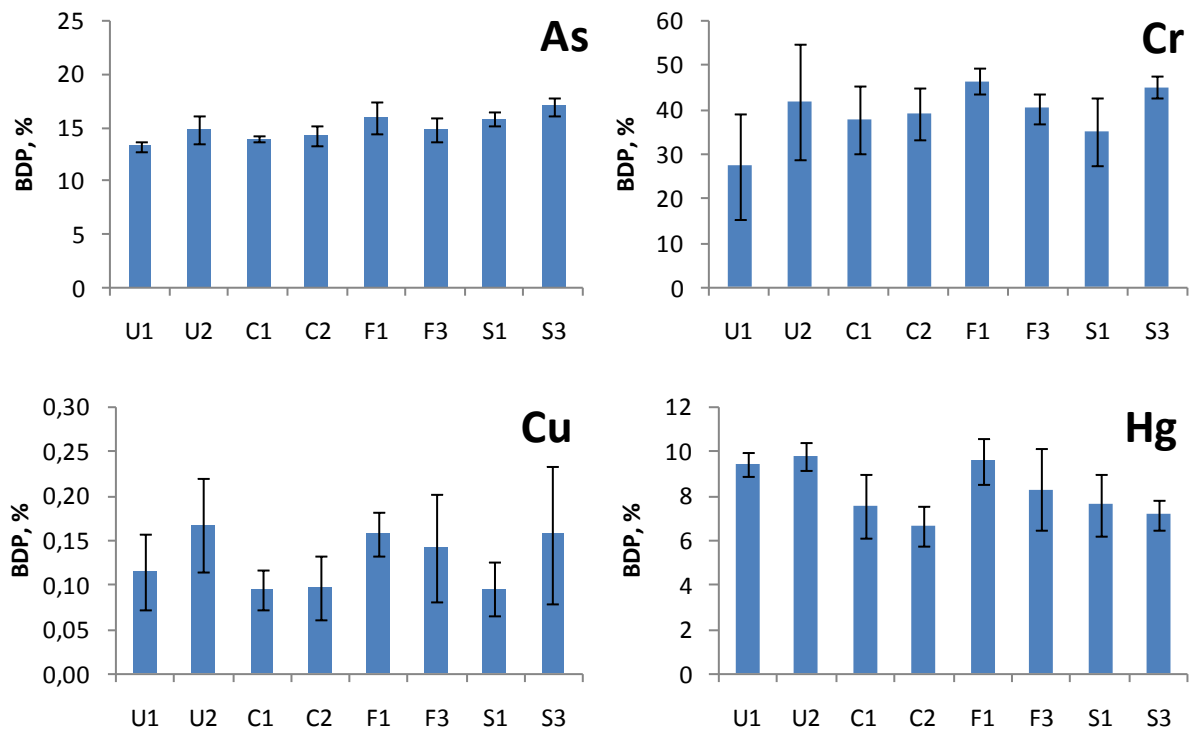


Figura 20. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metais nas amostras de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários. Cd, Pb e Se < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A9).

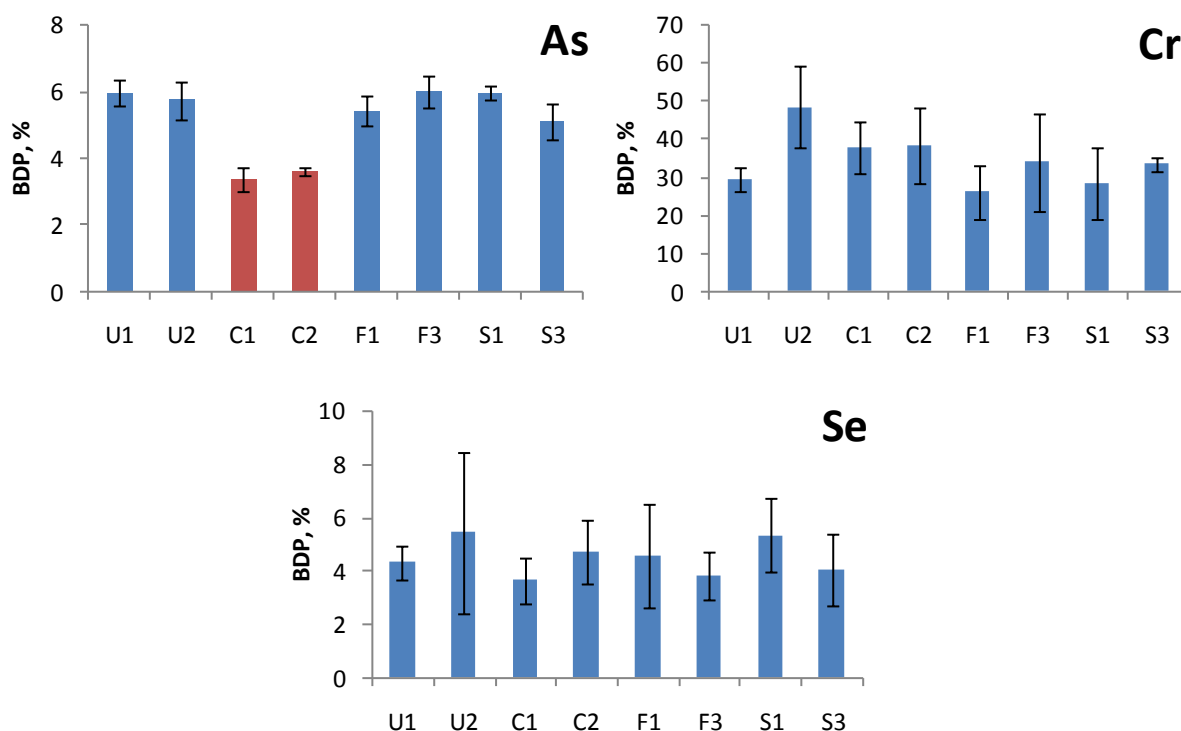


Figura 21. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metais nas amostras de LULA após diferentes tratamentos culinários. Cd, Cu, Hg e Pb < LQ; ■ sem diferença significativa ($p > 0,05$); ■ a biodisponibilidade difere significativamente da amostra U1 ($p < 0,05$). Adicionalmente, estes resultados estão apresentados na forma de tabela no apêndice A (Tabela A10).

Tabela 20. Biodisponibilidade (BDP) de metais e não-metais nas amostras *in natura* de OSTRA, VIEIRA e DORM-3 após o ensaio de biodisponibilidade.

| Analito | Ostra #14 | | Vieira #14 | | DORM-3 | |
|---------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | ng g ⁻¹ | BDP, % | ng g ⁻¹ | BDP, % | ng g ⁻¹ | BDP, % |
| As | 69 ± 3 | 8 ± 0,4 | 9,4 ± 0,9 | 8,1 ± 0,8 | 883 ± 8 | 12,8 ± 0,1 |
| Cd | 37 ± 1 | 11,5 ± 0,4 | 1,9 ± 0,1 | 3,65 ± 0,23 | 28,3 ± 0,2 | 9,74 ± 0,07 |
| Cr | 3,3 ± 0,2 | 18 ± 1 | 2,6 ± 0,2 | 20 ± 1 | 24 ± 1 | 1,29 ± 0,03 |
| Cu | 480 ± 10 | 9,01 ± 0,19 | < 1 ^a | - | 205 ± 1 | 1,32 ± 0,01 |
| Hg | < 0,7 ^a | - | < 0,5 ^a | - | < 4 ^a | - |
| Pb | 2,7 ± 0,1 | 7,64 ± 0,42 | < 1 ^a | - | < 8 ^a | - |
| Se | 22 ± 5 | 5 ± 1 | < 6 ^a | - | < 44 ^a | - |

^a LQ dependente da amostra e tratamento culinário (mais informações na Tabela A11).

É possível notar que apenas a biodisponibilidade de As em lula, e Hg em tubarão sofreram uma alteração significativa ($p < 0,05$) após o tratamento culinário, nos demais casos, não foram constatadas nenhuma alteração estatisticamente

significativa da biodisponibilidade devido à influência do tratamento culinário. O aumento da biodisponibilidade do Hg das amostras de tubarão possivelmente deve-se à desnaturação das proteínas na qual o Hg geralmente está ligado e que, conseqüentemente, poderia alterar a biodisponibilidade das espécies de Hg durante a simulação gastrointestinal. No entanto, é difícil sugerir a causa dessas diferenças observadas na biodisponibilidade de As e Hg, visto que a redução (As nas amostras cozidas de lula) e aumento (Hg nas amostras cozidas, fritas e *sauté*) da biodisponibilidade ocorreram em casos isolados (tubarão e lula) nas amostras estudadas. Além disso, a maioria dos trabalhos na literatura não discute as causas da influência do tratamento culinário no comportamento da biodisponibilidade de metais pesados em alimentos.

Para os demais analitos, como Cd, Cr, Cu, Pb e Se não foi observada nenhuma influência significativa do tratamento culinário na alteração da biodisponibilidade destes elementos. Sendo que, em alguns casos, não foi possível avaliar a biodisponibilidade visto que a concentração do analito na fração dialisável encontrou-se abaixo do LQ. Em relação à biodisponibilidade (BDP, %) de Se nas amostras estudadas, os resultados mostraram-se concordantes com os resultados obtidos por Moreda-Piñeiro *et al.*⁶⁵. Eles avaliaram a biodisponibilidade de Se após a digestão gastrointestinal *in vitro* de frutos do mar (peixes e moluscos), e a biodisponibilidade de Se total variou de $6,69 \pm 3,39$ e $5,45 \pm 2,44\%$ para peixes e moluscos, respectivamente. Valores os quais estão concordantes com os obtidos no presente trabalho ($6,8 \pm 0,8$ e $5,1 \pm 1,6\%$ para peixe e moluscos, respectivamente).

Cabe ressaltar que os resultados de biodisponibilidade (BDP) independem da concentração do analito presente originalmente na amostra crua (U1), ele depende somente da concentração do analito na amostra antes e após a biodigestão, de acordo com a Equação 3.

$$BDP = ([A]_{total}/[A]_{dial}) \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Sendo que, *BDP* é a biodisponibilidade do analito (%) após o ensaio de biodigestão *in vitro*; $[A]_{total}$ é a concentração do analito total na amostra (decomposta) antes da biodigestão ($\mu\text{g g}^{-1}$); $[A]_{dial}$ é a concentração do analito biodisponível (dialisável) por massa de amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$).

⁶⁵ Moreda-Piñeiro, J., *et al.*, *Food Chem.* 139 (2013) 872-877.

Portanto, a biodisponibilidade de As e Hg pode ser considerada ainda menor do que o apresentado nas Figuras 19, 20 e 21. Se forem consideradas as perdas de As e Hg que ocorreram nas amostras de frutos do mar que sofreram os processos de cocção (Figuras 15, 16 e 17), a biodisponibilidade de As e Hg da amostra tratada (que sofreu o processo de cocção) será ainda relativamente menor à respectiva amostra crua.

Adicionalmente, neste estudo foi utilizado um material de referência certificado (DORM-3) com o objetivo de disponibilizar dados na literatura a respeito da biodisponibilidade de metais e não-metais para a avaliação da reprodutibilidade e/ou para a comparação dos resultados com outros métodos que visam avaliar a biodisponibilidade através de testes *in vitro*, ou até mesmo *in vivo*. Até o momento, o presente trabalho desconhece a existência de dados na literatura que informam a biodisponibilidade de metais e/ou não-metais do CRM DORM-3 (*fish protein*).

Cabe ressaltar ainda os resultados dos testes de recuperação de *spike* (enriquecimento dos digeridos com a solução multielementar CL-ICV-1, SPEX CertiPrep®) na análise destas amostras (solução dialisada), a qual apresentam alto teor de sódio (proveniente da solução PIPES), mostraram-se robustos e exatos.

4.9 Biodisponibilidade das espécies de As de frutos do mar após diferentes tratamentos culinários

Neste trabalho foi feito, também, a determinação da biodisponibilidade das espécies de As das amostras de frutos do mar com o objetivo de investigar se as espécies de As podem sofrer interconversões na digestão gastrointestinal ou apresentar uma biodisponibilidade mais acentuada para uma determinada espécie. A biodisponibilidade das espécies de As após os diferentes tratamentos culinários das amostras de tubarão, camarão e lula estão apresentadas nas Tabelas 21 a 23, e a biodisponibilidade das amostras de ostra, vieira e DORM-3, está apresentada na Tabela 24.

Tabela 21. Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de TUBARÃO após os diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Biodisponibilidade, $\mu\text{g g}^{-1}$ (BDP, %) ^b | | | | | Σ espécies |
|-------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | |
| U1 | 0,676 \pm 0,016 (18%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,676 \pm 0,016 (18%) |
| U2 | 0,711 \pm 0,036 (20%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,711 \pm 0,036 (20%) |
| C1 | 0,438 \pm 0,030 (20%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,438 \pm 0,030 (20%) |
| C2 | 0,354 \pm 0,001 (18%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,354 \pm 0,001 (18%) |
| F1 | 0,685 \pm 0,009 (19%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,685 \pm 0,009 (19%) |
| F3 | 0,585 \pm 0,012 (17%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,585 \pm 0,012 (17%) |
| S1 | 0,599 \pm 0,043 (17%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,599 \pm 0,043 (17%) |
| S3 | 0,625 \pm 0,005 (18%) | < 0,003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,625 \pm 0,005 (18%) |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Calculado de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Limite de quantificação dependente da amostra e tratamento culinário (mais informações na Tabela A12).

Tabela 22. Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de CAMARÃO após os diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Biodisponibilidade, $\mu\text{g g}^{-1}$ (BDP, %) ^b | | | | | Σ espécies |
|-------------------------|--|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | |
| U1 | 0,049 \pm 0,004 (13%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,049 \pm 0,004 (13%) |
| U2 | 0,053 \pm 0,002 (14%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,053 \pm 0,002 (14%) |
| C1 | 0,042 \pm 0,002 (13%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,042 \pm 0,002 (13%) |
| C2 | 0,042 \pm 0,005 (13%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,042 \pm 0,005 (13%) |
| F1 | 0,061 \pm 0,002 (15%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,061 \pm 0,002 (15%) |
| F3 | 0,051 \pm 0,002 (14%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,051 \pm 0,002 (14%) |
| S1 | 0,062 \pm 0,002 (15%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,062 \pm 0,002 (15%) |
| S3 | 0,061 \pm 0,004 (16%) | < 0,002 ^c | < 0,0004 ^c | < 0,001 ^c | < 0,002 ^c | 0,061 \pm 0,004 (16%) |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Calculado de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Limite de quantificação dependente da amostra e tratamento culinário (mais informações na Tabela A12).

Tabela 23. Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de LULA após os diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Biodisponibilidade, $\mu\text{g g}^{-1}$ (BDP, %) ^b | | | | | Σ espécies |
|-------------------------|--|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| | AsB | As(III) | DMA | MMA | As(V) | |
| U1 | 0,011 \pm 0,002 (5%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,011 \pm 0,002 (5%) |
| U2 | 0,010 \pm 0,001 (5%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,010 \pm 0,001 (5%) |
| C1 | 0,005 \pm 0,001 (3%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,005 \pm 0,001 (3%) |
| C2 | 0,004 \pm 0,0004 (3%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,004 \pm 0,0004 (3%) |
| F1 | 0,010 \pm 0,002 (5%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,010 \pm 0,002 (5%) |
| F3 | 0,011 \pm 0,002 (6%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,011 \pm 0,002 (6%) |
| S1 | 0,011 \pm 0,002 (6%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,011 \pm 0,002 (6%) |
| S3 | 0,010 \pm 0,002 (5%) | < 0,002 ^c | < 0,0003 ^c | < 0,001 ^c | < 0,001 ^c | 0,010 \pm 0,002 (5%) |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Calculado de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Limite de quantificação dependente da amostra e tratamento culinário (mais informações na Tabela A12).

Tabela 24. Biodisponibilidade das espécies de As das amostras de ostra, vieira e DORM-3.

| Espécies de As | Biodisponibilidade, $\mu\text{g g}^{-1}$ (BDP, %) ^a | | |
|-------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| | Ostra #14 | Vieira #14 | DORM-3 |
| AsB | 0,053 \pm 0,006 (6%) | 0,008 \pm 0,001 (7%) | 0,799 \pm 0,02 (12%) |
| As(III) | 0,002 \pm 0,001 (0,22%) | < 0,001 ^b | < 0,009 ^b |
| DMA | 0,008 \pm 0,002 (0,93%) | < 0,0002 ^b | 0,075 \pm 0,007 (1%) |
| As? (TR= 4,45') | 0,004 \pm 0,001 (0,43%) | < 0,0005 ^b | < 0,004 ^b |
| MMA | < 0,001 ^b | < 0,0005 ^b | 0,005 \pm 0 (0,07%) |
| As(V) | < 0,001 ^b | 0,002 \pm 0,001 (1,5%) | 0,022 \pm 0,01 (0,32%) |
| Σ espécies | 0,069 \pm 0,003 | 0,009 \pm 0,001 | 0,883 \pm 0,008 |

^a Calculado de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^b Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

Conforme pode ser observado, as amostras de tubarão, camarão e lula apresentaram somente AsB como espécie de As biodisponível, o que demonstra que não houve uma interconversão da AsB para outra espécie de As biodisponível, visto que a AsB é a espécie de As majoritária (> 79%) encontrada no tecido das amostras de lula, e a única espécie encontrada no tecido das amostras de tubarão e camarão. Além disso, considerando a concentração original das espécies de As presente nas amostras de ostra, vieira e DORM-3, não foram observados indícios que poderia indicar a transformação das espécies de As durante a simulação gastrointestinal. Desta maneira os resultados sugerem que o tratamento térmico (37 °C) e as enzimas

usadas na simulação da digestão gastrointestinal não são suficientes para ocasionar mudanças entre as espécies de As nas amostras estudadas. Estas observações também foram constatadas em um trabalho realizado por Sartal *et al.*⁶², onde os autores também não constataram nenhuma conversão entre as espécies de As em algas que foram submetidas à simulação gastrointestinal (*in vitro*).

Além disso, outro fator que deve ser levado em consideração é o fato das espécies de As apresentarem uma biodisponibilidade similar em relação à concentração da respectiva espécie presente na amostra. Ou seja, se a concentração das espécies de As biodisponível for relacionada com a concentração da respectiva espécie originalmente presente na amostra (Equação 4), os resultados apresentarão a biodisponibilidade de As total independente da influência da espécie de As, conforme mostrado na Tabela 25.

$$BDP = ([A]_{esp}/[A]_{dial}) \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo que, *BDP* é a biodisponibilidade do analito (%) após o ensaio de biodigestão *in vitro*; $[A]_{esp}$ é a concentração da espécie de As na amostra antes da biodigestão ($\mu\text{g g}^{-1}$); $[A]_{dial}$ é a concentração da espécie de As biodisponível (dialisável) por massa de amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Tabela 25. Biodisponibilidade das espécies de As relativa à concentração da respectiva espécie presente na amostra de fruto do mar crua.

| Amostra | BDP, % ^a | | | | | |
|------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | AsB | As(III) | DMA | As? (4,45') | MMA | As(V) |
| Tubarão | 18,5 ± 0,4 | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b |
| Camarão | 13,3 ± 1 | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b |
| Lula | 5,9 ± 0,9 | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b |
| Ostra #14 | 8,5 ± 1 | 6 ± 2 | 9 ± 2 | 7 ± 3 | < LQ ^b | < LQ ^b |
| Vieira #14 | 9,2 ± 0,8 | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | < LQ ^b | 8 ± 3 |
| DORM-3 | 12,9 ± 0,3 | < LQ ^b | 15 ± 2 | < LQ ^b | 10,6 ± 0,5 | 9 ± 4 |

^a Calculado de acordo com a Equação 4;

^b Limite de quantificação (mais informações na Tabela A12).

Isto indica que a biodisponibilidade das espécies de As nas amostras estudadas no presente trabalho apresentam uma taxa de biodisponibilidade relativa

⁶² Sartal, C. G., *et al.*, *Microchem. J.* 105 (2012) 65-71.

similar entre as espécies AsB, As(III), DMA, MMA, As? (espécie de As não identificada, TR = 4,45 min) e As(V). Os resultados sugerem que a biodisponibilidade de As depende mais da matriz do que da identidade da espécie de As presente na amostra. No entanto, isso é apenas uma afirmação hipotética, visto que o teste de biodisponibilidade do presente trabalho é realizado *in vitro*, o qual não apresenta todas as variáveis e efeitos de um teste de biodisponibilidade *in vivo*. Contudo, a Tabela 26 mostra que a solubilidade e a permeação das espécies de As pela membrana de diálise (fração biodisponível) apresentam similaridades nas condições utilizadas para o ensaio de biodisponibilidade (pH, tempo, enzimas, etc) do presente trabalho.

4.10 Considerações relacionadas aos estudos recentes de riscos e benefícios do consumo de frutos do mar

É sabido que, os frutos do mar são uma importante fonte de proteína, minerais essenciais, vitamina D e ácidos graxos poliinsaturados, como os ômega-3 (ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)), que são ácidos graxos essenciais que devem ser ingeridos na dieta. Os ômega-3 auxiliam na diminuição dos níveis de triglicerídeos e LDL (lipoproteína de baixa densidade, conhecido como o mau colesterol), conseqüentemente diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares.^{1,2,124} No entanto, os frutos do mar também são uma das principais fontes de metais pesados na dieta do ser humano.^{2,124,125}

Baseado nessas considerações, nas últimas décadas, diversos trabalhos têm abordado questões envolvendo os riscos e benefícios associados com o consumo de frutos do mar.^{124,146-148} Este debate tem gerado muita confusão entre os consumidores e até mesma na comunidade científica.^{1,2,42,105,124,149}

¹ EFSA, Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (Fish and Shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury, European Food Safety Authority, 2014.

² Olmedo, P., *et al.*, *Environ. Int.* 59 (2013) 63-72.

⁴² EPA, Mercury Update: Impact on Fish Advisories, Environmental Protection Agency, 2001.

¹⁰⁵ FAO/WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2010, pp. 1-16.

¹²⁴ Park, K., Mozaffarian, D., *Curr. Atheroscler. Rep.* 12 (2010) 414-422.

¹²⁵ Mozaffarian, D., *Int. J. Env. Res. Public Health* 6 (2009) 1894-1916.

¹⁴⁶ Burger, J., *et al.*, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 266-271.

¹⁴⁷ Dorea, J. G., Barbosa, A. C., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42 (2005) 249-250.

¹⁴⁸ Passos, C. J., *et al.*, *Environ. Res.* 93 (2003) 123-130.

¹⁴⁹ FAO/WHO, Report of the Joint Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption, FAO Fishery and Aquaculture Report, 2011, pp. 50.

Até recentemente (junho de 2014), o FDA e o USEPA recomendavam para consumidores de frutos do mar que evitassem o consumo de certos frutos do mar e estipulavam quantidades máximas que deveriam ser consumidos para gestantes e lactantes (350 g por semana), porém, não recomendavam nenhuma quantidade mínima de frutos do mar que deveria ser ingerida na dieta.¹⁵⁰ Por muitos anos, mulheres limitaram ou evitaram consumir frutos do mar durante a gravidez e/ou alimentar seus filhos durante a infância. Entretanto, na última década, pesquisas emergentes têm mostrado que limitar ou evitar o consumo de frutos do mar durante a gravidez e durante a infância pode gerar perdas nutricionais importantes durante o crescimento e desenvolvimento, bem como a saúde em geral da criança. Baseado nisso, em junho de 2014, o FDA e o USEPA atualizaram suas recomendações e concluíram que gestantes, lactantes e crianças deveriam comer de 226 a 340 g de variedades de frutos do mar por semana, porém, selecionando os frutos do mar que, geralmente, apresentam baixas concentrações de Hg, como salmão, camarão, polaca, etc, e evitar consumir peixes predadores, tais como, tubarão, peixe-espada e cavala.¹⁵¹

Adicionalmente, a Autoridade Européia de Segurança Alimentar (EFSA) também efetuou uma avaliação recente dos riscos associados ao CH_3Hg^+ e os benefícios associados ao consumo de frutos do mar. Eles concluíram que o consumo de cerca de 170 a 340 g de frutos do mar por semana e até 510 a 680 g de frutos do mar por semana durante a gravidez tem sido associado com melhoras significativas no desenvolvimento neurológico de crianças quando comparado aos filhos das mulheres que não haviam consumido frutos do mar durante a gestação. Além disso, eles ressaltam que nenhum benefício adicional no desenvolvimento neurológico e nem na redução de doenças cardiovasculares deve ser esperado para consumos de frutos do mar superiores aos recomendados (> 680 g por semana).¹

¹ EFSA, Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (Fish and Shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury, European Food Safety Authority, 2014.

¹⁵⁰ FDA/EPA, What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Environmental Protection Agency, 2004.

¹⁵¹ FDA/EPA, Fish: What Pregnant Women and Parents Should Know - Draft Updated Advice by FDA and EPA / June 2014, 2014.

5 CONCLUSÕES

É importante considerar que a maioria dos estudos avaliando a quantificação de metais e não-metals em frutos do mar tem sido desenvolvida para amostras cruas e as poucas pesquisas envolvendo a avaliação do tratamento culinário não consideram na apresentação dos resultados as perdas e ganhos de massas durante o tratamento culinário gerando, muitas vezes, interpretações inexatas em relação ao comportamento do analito após o respectivo tratamento culinário. Além disso, poucos trabalhos utilizam e discutem uma amostragem que seja representativa para a avaliação do efeito do tratamento culinário na concentração e biodisponibilidade de metais e não-metals em frutos do mar, o que foi feito no presente trabalho.

Adicionalmente, a expressão dos resultados neste trabalho, como massa fresca de amostra mostrou ser uma boa maneira de apresentar e discutir os resultados relacionados à avaliação da influência do tratamento culinário. Caso contrário, os resultados poderiam ser subestimados ou até mesmo superestimados devido à absorção (como o óleo de fritura e a manteiga) e/ou perda (como água, gordura, proteína, carboidratos, etc.) de massa que a amostra sofre durante os tratamentos culinários.

Considerando as amostras de frutos do mar que sofreram tratamento culinário, todas as amostras apresentaram perdas significativas de As (15 a 45%) após o processo de cozimento (C1 e C2). Além disso, foram observadas perdas significativas de Cd (37 a 53%) nas amostras de vieiras que sofreram o processo de cozimento, fritura e *sautéing*; e de Hg (14 a 33%) nas amostras de tubarão e camarão que sofreram os processos de cozimento, fritura e *sautéing*. De acordo com o estudo de balanço de massas, a maior parte de As e Cd perdida durante o processo de cozimento (C1 e C2) ocorreu através da transferência destes para a água de cozimento. No entanto, para as perdas observadas de Hg, não foram constadas transferências significativas para nenhum meio de cocção (água de cozimento, óleo de fritura e manteiga). Possivelmente essas perdas ocorreram por volatilização do Hg para a atmosfera.

Cabe ressaltar que não foi observada influência entre os tratamentos que utilizaram e não utilizaram condimentos (alho, sal e suco de limão), mostrando que a influência do tratamento culinário na concentração de metais e não-metais deve-se, principalmente, ao processo de cocção em si (temperatura e meio de cocção) e não ao condimento utilizado.

Entre as amostras estudadas neste trabalho, a amostra de tubarão galha-preta foi a que apresentou as maiores concentrações de As e Hg, sendo que tanto As quanto Hg apresentaram concentrações de 280 e 245%, respectivamente, acima do limite máximo recomendado pela ANVISA, MERCOSUL e União Europeia. Além disso, essa amostra apresentou uma razão molar de Se/Hg < 1. Ou seja, de acordo com os resultados apresentados neste e em outros trabalhos, o tubarão galha-preta é um dos frutos do mar que apresenta os maiores riscos à saúde dos consumidores.

Em relação à análise de especiação de As, o método empregado apresentou uma boa robustez em relação à estabilidade da solução extratora, massa de amostra e uso de diferentes matrizes. As espécies de arsênio puderam ser identificadas e quantificadas em diferentes frutos do mar com e sem tratamento culinário em um tempo relativamente curto e com uma resolução adequada. Além disso, o procedimento de extração mostrou-se simples e rápido, envolvendo poucas etapas que, por sua vez, acabou minimizando as incertezas de medição do método analítico utilizado. Os resultados mostraram que as espécies de As apresentam uma alta estabilidade frente ao tratamento culinário. A espécie de As majoritária encontrada em todas as amostras foi a AsB, espécie considerada não-tóxica. Além disso, não foi observada nenhuma interconversão entre as espécies de As nas amostras que sofreram tratamento culinário. Ainda, os resultados sugerem que o tratamento térmico (37 °C) e as enzimas usadas na simulação da digestão gastrointestinal não são suficientes para ocasionar mudanças entre as espécies de As nas amostras estudadas. Inclusive a taxa biodisponível (%) das espécies de As relativa à espécie de As da amostra crua mostrou um comportamento similar.

Adicionalmente, o Hg e o As foram os principais elementos dentre os avaliados que apresentaram uma alteração da biodisponibilidade devido à influência do tratamento culinário da amostra. A biodisponibilidade dos demais analitos mostraram-se independentes do tratamento culinário que amostra sofreu.

De um modo geral, a metodologia empregada neste estudo mostrou-se adequada para o propósito deste estudo, que foi avaliar a influência de diferentes

tratamentos culinários na alteração da concentração e biodisponibilidade de metais e não-metals em frutos do mar. Como pôde ser observado, a avaliação e seleção do tipo de amostragem foram de suma importância para este tipo de estudo, visto que a avaliação da influência dos tratamentos culinários nos frutos do mar é baseada nos resultados comparativos de uma dada amostra que sofreu os diferentes tratamentos culinários e a que não sofreu (amostra crua). Desta maneira, com exceção das amostras de ostras, todas apresentaram uma amostragem satisfatória.

Finalmente, pode-se concluir, que omitindo a probabilidade de perdas nutricionais significantes, o consumo de frutos do mar após certos tratamentos culinários pode apresentar um menor risco a saúde dos consumidores. No entanto, não necessariamente, os tratamentos culinários que apresentam as maiores influências de perdas de contaminantes são os mais benéficos, visto que, os mesmos poderiam apresentar conseqüentemente, perdas nutricionais significantes também, o qual não foi investigada neste trabalho.

APÊNDICE A – RESULTADOS COMPLEMENTARES

Tabela A1. Composição centesimal das amostras *in natura* de frutos do mar ($n = 3$).

| Amostra | Umidade, % | Proteína, % | Lipídeo, % | Cinzas, % |
|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Tubarão | 73,8 ± 0,1 | 24,4 ± 0,2 | 1,55 ± 0,05 | 1,34 ± 0,03 |
| Camarão | 82,1 ± 0,2 | 13,8 ± 0,3 | 1,16 ± 0,02 | 1,20 ± 0,01 |
| Lula | 86,3 ± 0,2 | 13,1 ± 0,1 | 0,78 ± 0,03 | 1,15 ± 0,09 |
| Ostra #1 | 87,5 ± 0,1 | 6,6 ± 0,2 | 1,01 ± 0,05 | 1,41 ± 0,09 |
| Vieira #1 | 84,3 ± 0,2 | 11,2 ± 0,4 | 0,61 ± 0,09 | 1,51 ± 0,10 |

Tabela A2. Valores de pH da água de cozimento após o tratamento culinário C1 e C2.

| Amostra | pH | |
|---------|-------------|-------------|
| | C1 | C2 |
| Tubarão | 6,46 – 6,50 | 4,81 – 4,84 |
| Camarão | 7,99 – 8,01 | 4,62 – 4,60 |
| Lula | 9,14 – 9,16 | 7,01 – 7,00 |
| Ostras | 5,48 | 4,15 |
| Vieiras | 7,35 | 6,01 |

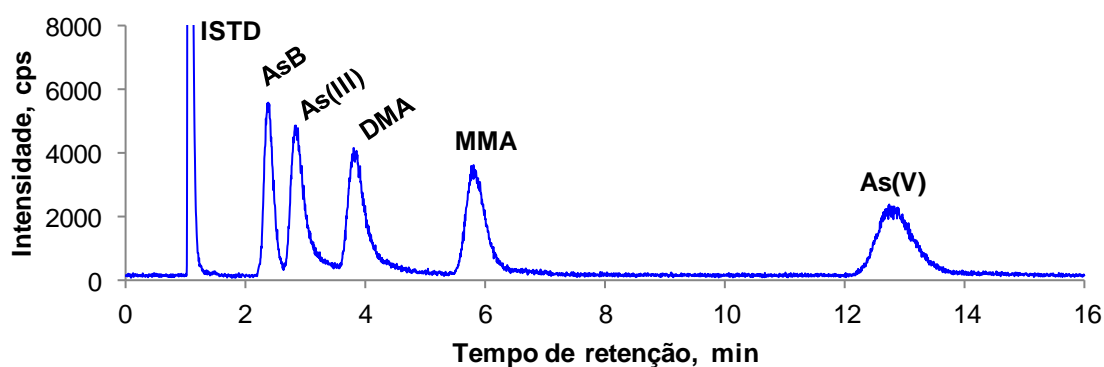


Figura A1. Perfil cromatográfico da solução de calibração 2 µg L⁻¹ das espécies de As.

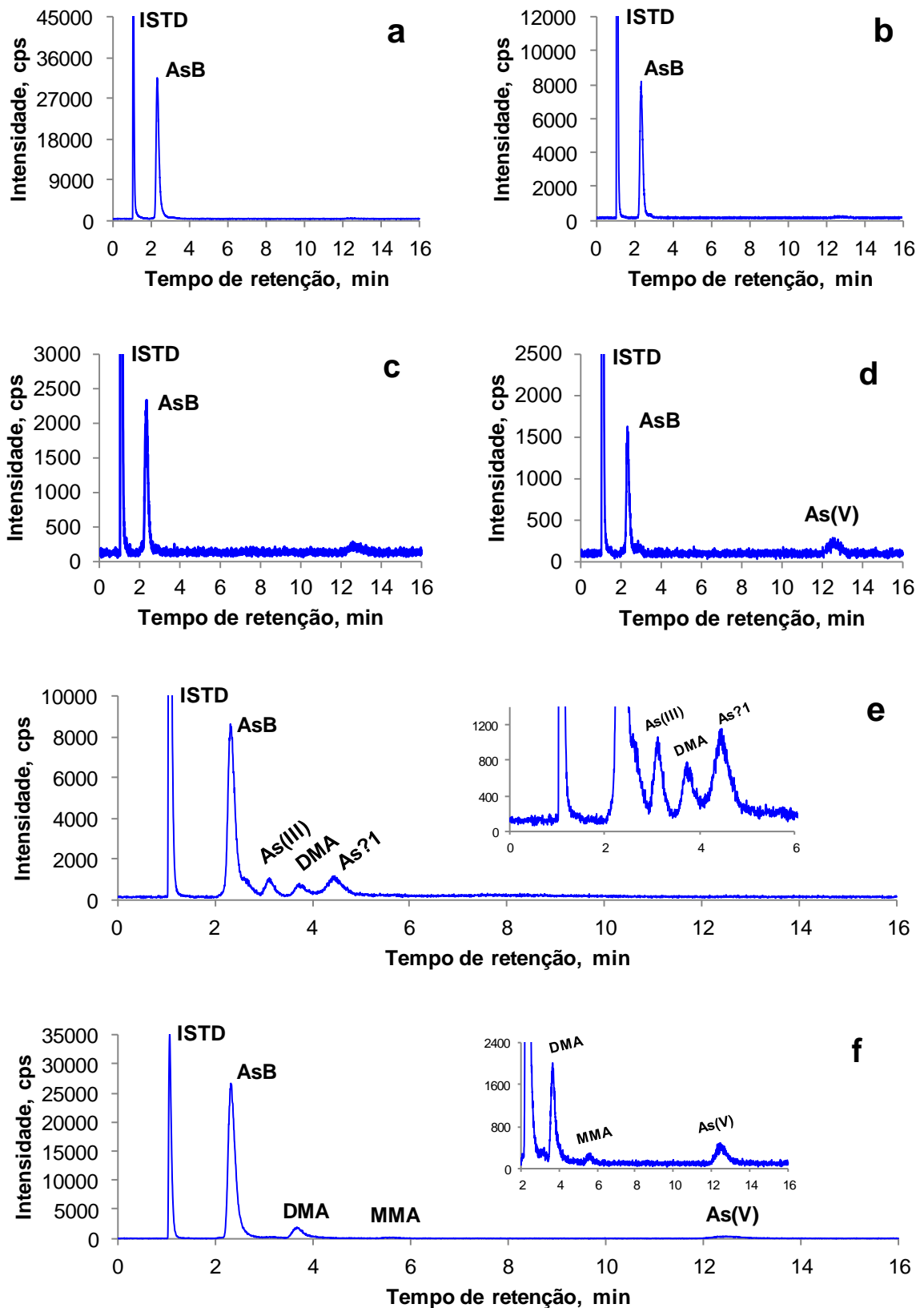


Figura A2. Perfil cromatográfico das espécies de As presentes nas amostras *in natura* (sem tratamento culinário, U1) de (a) tubarão, (b) camarão, (c) lula, (d) vieira, (e) ostra e (f) DORM-3.

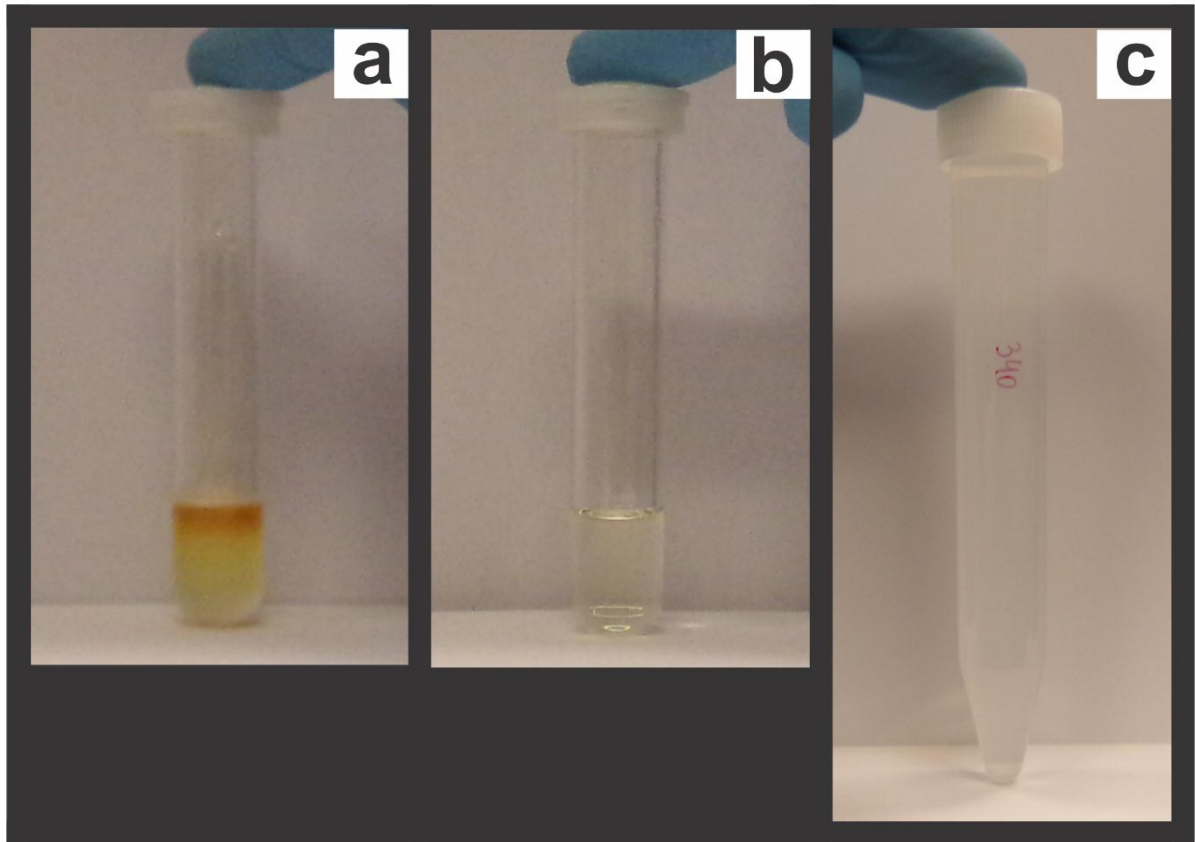


Figura A3. Aspecto da digestão de 90 mg de amostra liofilizada de tubarão (a) antes da pré-digestão no bloco digestor, (b) após digestão por MAD com amostra pré-digerida em bloco digestor e, (c) após transferência e diluição com água ultra pura do digerido no frasco de PP de 15 mL.

Tabela A3. Balanço de massas de metais e não-metals na amostra de TUBARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Tubarão ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|
| [As], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 3,80 ± 0,14 | - | 3,80 ± 0,14 |
| | U2 | 3,59 ± 0,14 | - | 3,59 ± 0,14 |
| | C1 | 2,20 ± 0,06 | 1,16 ± 0,03 | 3,35 ± 0,1 |
| | C2 | 2,02 ± 0,06 | 1,25 ± 0,04 | 3,27 ± 0,1 |
| | F1 | 3,56 ± 0,13 | < LQ ^d | 3,56 ± 0,13 |
| | F3 | 3,49 ± 0,09 | < LQ ^d | 3,49 ± 0,09 |
| | S1 | 3,53 ± 0,09 | < LQ ^d | 3,53 ± 0,09 |
| | S3 | 3,49 ± 0,12 | < LQ ^d | 3,49 ± 0,12 |
| [Cd], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,0057 ± 0,0003 | - | 0,0057 ± 0,0003 |
| | U2 | 0,0055 ± 0,0003 | - | 0,0055 ± 0,0003 |
| | C1 | 0,0055 ± 0,0002 | < LQ ^d | 0,0055 ± 0,0002 |
| | C2 | 0,0053 ± 0,0004 | < LQ ^d | 0,0053 ± 0,0004 |
| | F1 | 0,0055 ± 0,0006 | < LQ ^d | 0,0055 ± 0,0006 |
| | F3 | 0,0056 ± 0,0008 | < LQ ^d | 0,0056 ± 0,0008 |
| | S1 | 0,0051 ± 0,0006 | < LQ ^d | 0,0051 ± 0,0006 |
| | S3 | 0,0049 ± 0,0003 | < LQ ^d | 0,0049 ± 0,0003 |
| [Cr], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,022 ± 0,004 | - | 0,022 ± 0,004 |
| | U2 | 0,020 ± 0,008 | - | 0,020 ± 0,008 |
| | C1 | 0,013 ± 0,002 | < LQ [*] | 0,013 ± 0,002 |
| | C2 | 0,012 ± 0,002 | < LQ [*] | 0,012 ± 0,002 |
| | F1 | 0,017 ± 0,005 | < LQ [*] | 0,017 ± 0,005 |
| | F3 | 0,019 ± 0,006 | < LQ [*] | 0,019 ± 0,006 |
| | S1 | 0,014 ± 0,001 | < LQ [*] | 0,014 ± 0,001 |
| | S3 | 0,015 ± 0,004 | < LQ [*] | 0,015 ± 0,004 |
| [Cu], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,371 ± 0,014 | - | 0,371 ± 0,014 |
| | U2 | 0,386 ± 0,008 | - | 0,386 ± 0,008 |
| | C1 | 0,337 ± 0,013 | 0,017 ± 0,004 | 0,354 ± 0,014 |
| | C2 | 0,325 ± 0,010 | 0,029 ± 0,002 | 0,354 ± 0,011 |
| | F1 | 0,405 ± 0,036 | < LQ ^d | 0,405 ± 0,036 |
| | F3 | 0,387 ± 0,026 | < LQ ^d | 0,387 ± 0,026 |
| | S1 | 0,346 ± 0,010 | < LQ ^d | 0,346 ± 0,010 |
| | S3 | 0,358 ± 0,010 | < LQ ^d | 0,358 ± 0,010 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A3 (Continuação). Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de TUBARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Tubarão ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| [Hg], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 3,45 ± 0,13 | - | 3,45 ± 0,13 |
| | U2 | 3,20 ± 0,07 | - | 3,20 ± 0,07 |
| | C1 | 2,83 ± 0,04 | 0,028 ± 0,01 | 2,86 ± 0,04 |
| | C2 | 2,73 ± 0,08 | 0,032 ± 0,007 | 2,76 ± 0,08 |
| | F1 | 2,60 ± 0,05 | < LQ ^d | 2,60 ± 0,05 |
| | F3 | 2,50 ± 0,1 | < LQ ^d | 2,50 ± 0,1 |
| | S1 | 2,33 ± 0,05 | < LQ ^d | 2,33 ± 0,05 |
| | S3 | 2,30 ± 0,04 | < LQ ^d | 2,30 ± 0,04 |
| [Pb], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,020 ± 0,001 | - | 0,020 ± 0,001 |
| | U2 | 0,018 ± 0,001 | - | 0,018 ± 0,001 |
| | C1 | 0,016 ± 0,001 | < LQ ^d | 0,016 ± 0,001 |
| | C2 | 0,018 ± 0,001 | < LQ ^d | 0,018 ± 0,001 |
| | F1 | 0,015 ± 0,003 | < LQ ^d | 0,015 ± 0,003 |
| | F3 | 0,014 ± 0,004 | < LQ ^d | 0,014 ± 0,004 |
| | S1 | 0,016 ± 0,001 | < LQ ^d | 0,016 ± 0,001 |
| | S3 | 0,014 ± 0,004 | < LQ ^d | 0,014 ± 0,004 |
| [Se], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,551 ± 0,018 | - | 0,551 ± 0,018 |
| | U2 | 0,529 ± 0,018 | - | 0,529 ± 0,018 |
| | C1 | 0,487 ± 0,019 | 0,042 ± 0,012 | 0,529 ± 0,020 |
| | C2 | 0,493 ± 0,021 | 0,040 ± 0,003 | 0,533 ± 0,023 |
| | F1 | 0,566 ± 0,013 | < LQ ^d | 0,566 ± 0,013 |
| | F3 | 0,544 ± 0,033 | < LQ ^d | 0,544 ± 0,033 |
| | S1 | 0,547 ± 0,039 | < LQ ^d | 0,547 ± 0,039 |
| | S3 | 0,523 ± 0,028 | < LQ ^d | 0,523 ± 0,028 |
| [S], mg g^{-1} | U1 | 2,44 ± 0,04 | - | 2,44 ± 0,04 |
| | U2 | 2,39 ± 0,04 | - | 2,39 ± 0,04 |
| | C1 | 2,22 ± 0,05 | 0,136 ± 0,003 | 2,35 ± 0,06 |
| | C2 | 2,19 ± 0,03 | 0,148 ± 0,004 | 2,34 ± 0,04 |
| | F1 | 2,33 ± 0,03 | < LQ ^d | 2,33 ± 0,03 |
| | F3 | 2,36 ± 0,06 | < LQ ^d | 2,36 ± 0,06 |
| | S1 | 2,24 ± 0,04 | < LQ ^d | 2,24 ± 0,04 |
| | S3 | 2,25 ± 0,03 | < LQ ^d | 2,25 ± 0,03 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A4. Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de CAMARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Camarão ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|
| [As], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,378 \pm 0,007 | - | 0,378 \pm 0,007 |
| | U2 | 0,384 \pm 0,008 | - | 0,384 \pm 0,008 |
| | C1 | 0,317 \pm 0,007 | 0,059 \pm 0,002 | 0,376 \pm 0,008 |
| | C2 | 0,325 \pm 0,007 | 0,054 \pm 0,003 | 0,379 \pm 0,008 |
| | F1 | 0,408 \pm 0,013 | < LQ ^d | 0,408 \pm 0,013 |
| | F3 | 0,372 \pm 0,011 | < LQ ^d | 0,372 \pm 0,011 |
| | S1 | 0,400 \pm 0,015 | < LQ ^d | 0,400 \pm 0,015 |
| | S3 | 0,371 \pm 0,010 | < LQ ^d | 0,373 \pm 0,010 |
| [Cd], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,0031 \pm 0,0002 | - | 0,0031 \pm 0,0002 |
| | U2 | 0,0031 \pm 0,0001 | - | 0,0031 \pm 0,0001 |
| | C1 | 0,0029 \pm 0,0001 | < LQ ^d | 0,0029 \pm 0,0001 |
| | C2 | 0,0031 \pm 0,0002 | < LQ ^d | 0,0031 \pm 0,0002 |
| | F1 | 0,0032 \pm 0,0002 | < LQ ^d | 0,0032 \pm 0,0002 |
| | F3 | 0,0033 \pm 0,0001 | < LQ ^d | 0,0033 \pm 0,0001 |
| | S1 | 0,0032 \pm 0,0002 | < LQ ^d | 0,0032 \pm 0,0002 |
| | S3 | 0,0027 \pm 0,0002 | < LQ ^d | 0,0027 \pm 0,0002 |
| [Cr], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,014 \pm 0,003 | - | 0,014 \pm 0,003 |
| | U2 | 0,015 \pm 0,005 | - | 0,015 \pm 0,005 |
| | C1 | 0,010 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,001 |
| | C2 | 0,010 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,002 |
| | F1 | 0,010 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,001 |
| | F3 | 0,010 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,001 |
| | S1 | 0,013 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,013 \pm 0,002 |
| | S3 | 0,010 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,001 |
| [Cu], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 2,46 \pm 0,06 | - | 2,46 \pm 0,06 |
| | U2 | 2,49 \pm 0,07 | - | 2,49 \pm 0,07 |
| | C1 | 2,29 \pm 0,10 | 0,124 \pm 0,005 | 2,42 \pm 0,11 |
| | C2 | 2,37 \pm 0,09 | 0,074 \pm 0,001 | 2,44 \pm 0,09 |
| | F1 | 2,46 \pm 0,12 | < LQ ^d | 2,46 \pm 0,12 |
| | F3 | 2,30 \pm 0,07 | < LQ ^d | 2,30 \pm 0,07 |
| | S1 | 2,38 \pm 0,07 | < LQ ^d | 2,38 \pm 0,07 |
| | S3 | 2,31 \pm 0,09 | < LQ ^d | 2,31 \pm 0,09 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A4 (Continuação). Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de CAMARÃO após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Camarão ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| [Hg], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,015 \pm 0,0005 | - | 0,015 \pm 0,0005 |
| | U2 | 0,015 \pm 0,001 | - | 0,015 \pm 0,001 |
| | C1 | 0,013 \pm 0,0005 | < LQ ^d | 0,013 \pm 0,0005 |
| | C2 | 0,012 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,012 \pm 0,001 |
| | F1 | 0,012 \pm 0,0005 | < LQ ^d | 0,012 \pm 0,0005 |
| | F3 | 0,013 \pm 0,0003 | < LQ ^d | 0,013 \pm 0,0003 |
| | S1 | 0,012 \pm 0,0004 | < LQ ^d | 0,012 \pm 0,0004 |
| | S3 | 0,012 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,012 \pm 0,001 |
| [Pb], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | < LQ ^d | - | < LQ ^d |
| | U2 | < LQ ^d | - | < LQ ^d |
| | C1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C2 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F3 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S3 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| [Se], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,273 \pm 0,021 | - | 0,273 \pm 0,021 |
| | U2 | 0,243 \pm 0,017 | - | 0,243 \pm 0,017 |
| | C1 | 0,236 \pm 0,023 | < LQ ^d | 0,236 \pm 0,023 |
| | C2 | 0,259 \pm 0,025 | < LQ ^d | 0,259 \pm 0,025 |
| | F1 | 0,273 \pm 0,014 | < LQ ^d | 0,273 \pm 0,014 |
| | F3 | 0,241 \pm 0,015 | < LQ ^d | 0,241 \pm 0,015 |
| | S1 | 0,273 \pm 0,019 | < LQ ^d | 0,273 \pm 0,019 |
| | S3 | 0,258 \pm 0,014 | < LQ ^d | 0,258 \pm 0,014 |
| [S], mg g^{-1} | U1 | 1,72 \pm 0,03 | - | 1,72 \pm 0,03 |
| | U2 | 1,80 \pm 0,03 | - | 1,80 \pm 0,03 |
| | C1 | 1,66 \pm 0,04 | 0,074 \pm 0,001 | 1,73 \pm 0,04 |
| | C2 | 1,70 \pm 0,02 | 0,050 \pm 0,002 | 1,74 \pm 0,02 |
| | F1 | 1,70 \pm 0,04 | < LQ ^d | 1,70 \pm 0,04 |
| | F3 | 1,74 \pm 0,02 | < LQ ^d | 1,74 \pm 0,02 |
| | S1 | 1,74 \pm 0,03 | < LQ ^d | 1,74 \pm 0,03 |
| | S3 | 1,80 \pm 0,03 | < LQ ^d | 1,80 \pm 0,03 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A5. Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de LULA após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Lula ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| [As], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,204 \pm 0,004 | - | 0,204 \pm 0,004 |
| | U2 | 0,190 \pm 0,009 | - | 0,190 \pm 0,009 |
| | C1 | 0,162 \pm 0,006 | 0,025 \pm 0,001 | 0,187 \pm 0,006 |
| | C2 | 0,152 \pm 0,004 | 0,030 \pm 0,001 | 0,182 \pm 0,005 |
| | F1 | 0,205 \pm 0,007 | < LQ ^d | 0,205 \pm 0,007 |
| | F3 | 0,196 \pm 0,006 | < LQ ^d | 0,196 \pm 0,006 |
| | S1 | 0,193 \pm 0,005 | < LQ ^d | 0,193 \pm 0,005 |
| | S3 | 0,199 \pm 0,005 | < LQ ^d | 0,199 \pm 0,005 |
| [Cd], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,030 \pm 0,002 | - | 0,030 \pm 0,002 |
| | U2 | 0,028 \pm 0,002 | - | 0,028 \pm 0,002 |
| | C1 | 0,028 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,028 \pm 0,001 |
| | C2 | 0,028 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,028 \pm 0,001 |
| | F1 | 0,028 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,028 \pm 0,002 |
| | F3 | 0,030 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,030 \pm 0,001 |
| | S1 | 0,029 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,029 \pm 0,001 |
| | S3 | 0,031 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,031 \pm 0,001 |
| [Cr], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,010 \pm 0,004 | - | 0,010 \pm 0,004 |
| | U2 | 0,007 \pm 0,002 | - | 0,007 \pm 0,002 |
| | C1 | 0,006 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,006 \pm 0,001 |
| | C2 | 0,007 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,007 \pm 0,001 |
| | F1 | 0,011 \pm 0,003 | < LQ ^d | 0,011 \pm 0,003 |
| | F3 | 0,009 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,009 \pm 0,001 |
| | S1 | 0,011 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,011 \pm 0,001 |
| | S3 | 0,010 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,010 \pm 0,002 |
| [Cu], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,85 \pm 0,07 | - | 0,85 \pm 0,07 |
| | U2 | 0,77 \pm 0,10 | - | 0,77 \pm 0,10 |
| | C1 | 0,90 \pm 0,05 | < LQ ^d | 0,90 \pm 0,05 |
| | C2 | 0,87 \pm 0,05 | < LQ ^d | 0,87 \pm 0,05 |
| | F1 | 0,77 \pm 0,06 | < LQ ^d | 0,77 \pm 0,06 |
| | F3 | 0,88 \pm 0,08 | < LQ ^d | 0,88 \pm 0,08 |
| | S1 | 0,90 \pm 0,06 | < LQ ^d | 0,90 \pm 0,06 |
| | S3 | 0,90 \pm 0,07 | < LQ ^d | 0,90 \pm 0,07 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A5 (Continuação). Balanço de massas de metais e não-metais na amostra de LULA após os diferentes tratamentos culinários ($n \geq 2$).

| Analito | Trat. Culinário ^a | Lula ^b | Meio de cocção ^c | Total |
|----------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| [Hg], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,0085 \pm 0,0003 | - | 0,0085 \pm 0,0003 |
| | U2 | 0,0086 \pm 0,0007 | - | 0,0086 \pm 0,0007 |
| | C1 | 0,0075 \pm 0,0004 | < LQ ^d | 0,0075 \pm 0,0004 |
| | C2 | 0,0080 \pm 0,0003 | < LQ ^d | 0,0080 \pm 0,0003 |
| | F1 | 0,0078 \pm 0,0004 | < LQ ^d | 0,0078 \pm 0,0004 |
| | F3 | 0,0086 \pm 0,0007 | < LQ ^d | 0,0086 \pm 0,0007 |
| | S1 | 0,0090 \pm 0,0009 | < LQ ^d | 0,0090 \pm 0,0009 |
| | S3 | 0,0085 \pm 0,0002 | < LQ ^d | 0,0085 \pm 0,0002 |
| [Pb], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | < LQ ^d | - | < LQ ^d |
| | U2 | < LQ ^d | - | < LQ ^d |
| | C1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C2 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F3 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S1 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S3 | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| [Se], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U1 | 0,207 \pm 0,004 | - | 0,207 \pm 0,004 |
| | U2 | 0,196 \pm 0,018 | - | 0,196 \pm 0,018 |
| | C1 | 0,185 \pm 0,016 | < LQ ^d | 0,185 \pm 0,016 |
| | C2 | 0,183 \pm 0,011 | < LQ ^d | 0,183 \pm 0,011 |
| | F1 | 0,209 \pm 0,006 | < LQ ^d | 0,209 \pm 0,006 |
| | F3 | 0,208 \pm 0,008 | < LQ ^d | 0,208 \pm 0,008 |
| | S1 | 0,208 \pm 0,023 | < LQ ^d | 0,208 \pm 0,023 |
| | S3 | 0,207 \pm 0,008 | < LQ ^d | 0,207 \pm 0,008 |
| [S], mg g^{-1} | U1 | 1,38 \pm 0,03 | - | 1,38 \pm 0,03 |
| | U2 | 1,38 \pm 0,07 | - | 1,38 \pm 0,07 |
| | C1 | 1,19 \pm 0,03 | 0,133 \pm 0,004 | 1,33 \pm 0,03 |
| | C2 | 1,22 \pm 0,02 | 0,147 \pm 0,004 | 1,37 \pm 0,03 |
| | F1 | 1,36 \pm 0,04 | < LQ ^d | 1,36 \pm 0,04 |
| | F3 | 1,40 \pm 0,03 | < LQ ^d | 1,40 \pm 0,03 |
| | S1 | 1,37 \pm 0,03 | < LQ ^d | 1,37 \pm 0,03 |
| | S3 | 1,39 \pm 0,03 | < LQ ^d | 1,39 \pm 0,03 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A6. Balanço de massas de metais e não-metais nas amostras de VIEIRAS (#7 a #13) após os diferentes tratamentos culinários ($n = 2$).

| Analito | Trat. Cul. ^a | Fração “B” (U1) | Fração “A” (após o tratamento culinário) | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|--|-----------------------------|-------------------|
| | | Vieira ^b | Vieira ^b | Meio de cocção ^c | Total |
| [As], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | 0,120 \pm 0,004 | 0,125 \pm 0,004 | - | 0,125 \pm 0,004 |
| | C1 (#8) | 0,114 \pm 0,008 | 0,088 \pm 0,003 | 0,033 \pm 0,001 | 0,121 \pm 0,004 |
| | C2 (#9) | 0,113 \pm 0,005 | 0,084 \pm 0,003 | 0,035 \pm 0,001 | 0,119 \pm 0,004 |
| | F1 (#10) | 0,090 \pm 0,003 | 0,087 \pm 0,003 | < LQ ^d | 0,087 \pm 0,003 |
| | F3 (#11) | 0,104 \pm 0,003 | 0,100 \pm 0,004 | < LQ ^d | 0,100 \pm 0,004 |
| | S1 (#12) | 0,112 \pm 0,006 | 0,093 \pm 0,004 | < LQ ^d | 0,093 \pm 0,004 |
| | S3 (#13) | 0,104 \pm 0,002 | 0,083 \pm 0,006 | < LQ ^d | 0,083 \pm 0,006 |
| [Cd], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | 0,053 \pm 0,002 | 0,054 \pm 0,002 | - | 0,054 \pm 0,002 |
| | C1 (#8) | 0,058 \pm 0,001 | 0,030 \pm 0,001 | 0,031 \pm 0,003 | 0,061 \pm 0,002 |
| | C2 (#9) | 0,058 \pm 0,002 | 0,027 \pm 0,001 | 0,038 \pm 0,005 | 0,063 \pm 0,003 |
| | F1 (#10) | 0,079 \pm 0,008 | 0,048 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,048 \pm 0,001 |
| | F3 (#11) | 0,065 \pm 0,005 | 0,041 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,041 \pm 0,002 |
| | S1 (#12) | 0,054 \pm 0,004 | 0,033 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,033 \pm 0,002 |
| | S3 (#13) | 0,061 \pm 0,002 | 0,036 \pm 0,002 | < LQ ^d | 0,036 \pm 0,002 |
| [Cr], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | 0,011 \pm 0,001 | 0,010 \pm 0,001 | - | 0,010 \pm 0,001 |
| | C1 (#8) | 0,011 \pm 0,001 | 0,008 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,008 \pm 0,001 |
| | C2 (#9) | 0,011 \pm 0,002 | 0,008 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,008 \pm 0,001 |
| | F1 (#10) | 0,010 \pm 0,001 | 0,008 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,008 \pm 0,001 |
| | F3 (#11) | 0,009 \pm 0,001 | 0,008 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,008 \pm 0,001 |
| | S1 (#12) | 0,012 \pm 0,001 | 0,009 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,009 \pm 0,001 |
| | S3 (#13) | 0,019 \pm 0,002 | 0,017 \pm 0,001 | < LQ ^d | 0,017 \pm 0,001 |
| [Cu], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | 0,118 \pm 0,005 | 0,128 \pm 0,005 | - | 0,128 \pm 0,005 |
| | C1 (#8) | 0,089 \pm 0,003 | 0,083 \pm 0,003 | < LQ ^d | 0,083 \pm 0,004 |
| | C2 (#9) | 0,091 \pm 0,006 | 0,086 \pm 0,003 | < LQ ^d | 0,086 \pm 0,004 |
| | F1 (#10) | 0,092 \pm 0,006 | 0,088 \pm 0,004 | < LQ ^d | 0,088 \pm 0,004 |
| | F3 (#11) | 0,103 \pm 0,005 | 0,114 \pm 0,006 | < LQ ^d | 0,114 \pm 0,006 |
| | S1 (#12) | 0,101 \pm 0,004 | 0,097 \pm 0,003 | < LQ ^d | 0,097 \pm 0,003 |
| | S3 (#13) | 0,110 \pm 0,004 | 0,117 \pm 0,005 | < LQ ^d | 0,117 \pm 0,005 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A6 (Continuação). Balanço de massas de metais e não-metais nas amostras de VIEIRAS (#7 a #13) após os diferentes tratamentos culinários ($n = 2$).

| Analito | Trat. Cul. ^a | Fração “B” (U1) | Fração “A” (após o tratamento culinário) | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|--|-----------------------------|-------------------|
| | | Vieira ^b | Vieira ^b | Meio de cocção ^c | Total |
| [Hg], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C1 (#8) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C2 (#9) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F1 (#10) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F3 (#11) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S1 (#12) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S3 (#13) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| [Pb], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C1 (#8) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | C2 (#9) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F1 (#10) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | F3 (#11) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S1 (#12) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| | S3 (#13) | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d | < LQ ^d |
| [Se], $\mu\text{g g}^{-1}$ | U2 (#7) | 0,069 ± 0,007 | 0,071 ± 0,006 | - | 0,071 ± 0,006 |
| | C1 (#8) | 0,057 ± 0,006 | 0,060 ± 0,009 | < LQ ^d | 0,060 ± 0,009 |
| | C2 (#9) | 0,055 ± 0,003 | 0,058 ± 0,004 | < LQ ^d | 0,058 ± 0,004 |
| | F1 (#10) | 0,045 ± 0,004 | 0,050 ± 0,010 | < LQ ^d | 0,050 ± 0,010 |
| | F3 (#11) | 0,055 ± 0,003 | 0,051 ± 0,004 | < LQ ^d | 0,051 ± 0,004 |
| | S1 (#12) | 0,042 ± 0,002 | 0,045 ± 0,007 | < LQ ^d | 0,045 ± 0,007 |
| | S3 (#13) | 0,048 ± 0,006 | 0,054 ± 0,012 | < LQ ^d | 0,054 ± 0,012 |
| [S], mg g^{-1} | U2 (#7) | 1,06 ± 0,01 | 1,02 ± 0,04 | - | 1,02 ± 0,04 |
| | C1 (#8) | 0,94 ± 0,03 | 0,89 ± 0,01 | 0,072 ± 0,003 | 0,96 ± 0,01 |
| | C2 (#9) | 0,89 ± 0,02 | 0,85 ± 0,01 | 0,080 ± 0,004 | 0,93 ± 0,02 |
| | F1 (#10) | 0,89 ± 0,02 | 0,90 ± 0,02 | < LQ ^d | 0,90 ± 0,02 |
| | F3 (#11) | 0,81 ± 0,02 | 0,85 ± 0,02 | < LQ ^d | 0,85 ± 0,02 |
| | S1 (#12) | 0,95 ± 0,01 | 0,93 ± 0,02 | < LQ ^d | 0,93 ± 0,02 |
| | S3 (#13) | 0,97 ± 0,07 | 0,90 ± 0,02 | < LQ ^d | 0,90 ± 0,02 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12);

^c Concentração de analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12);

^d Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A7. Concentração de metais e não-metais nas frações “A” (após o tratamento culinário) e “B” (sem tratamento culinário, U1) das amostras de OSTRAS (#7 a #13).

| Analito | Fração | Distribuição elementar nas frações “A” e “B” das amostras de ostras ^{a,b} | | | | | | |
|-------------------------|------------|--|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | U2 (#7) | C1 (#8) | C2 (#9) | F1 (#10) | F3 (#11) | S1 (#12) | S3 (#13) |
| [As] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,810 ± 0,034 | 1,09 ± 0,08 | 0,826 ± 0,025 | 0,771 ± 0,034 | 0,778 ± 0,034 | 1,13 ± 0,06 | 1,04 ± 0,03 |
| | Fração "A" | 0,944 ± 0,040 | 0,929 ± 0,014 | 1,35 ± 0,02 | 1,06 ± 0,03 | 1,08 ± 0,02 | 0,944 ± 0,041 | 1,38 ± 0,01 |
| [Cd] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,214 ± 0,013 | 0,327 ± 0,022 | 0,240 ± 0,017 | 0,150 ± 0,004 | 0,151 ± 0,004 | 0,334 ± 0,010 | 0,330 ± 0,026 |
| | Fração "A" | 0,262 ± 0,004 | 0,246 ± 0,007 | 0,382 ± 0,007 | 0,185 ± 0,004 | 0,189 ± 0,004 | 0,295 ± 0,006 | 0,292 ± 0,005 |
| [Cr] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,022 ± 0,001 | 0,039 ± 0,003 | 0,013 ± 0,002 | 0,012 ± 0,002 | 0,012 ± 0,002 | 0,034 ± 0,013 | 0,015 ± 0,002 |
| | Fração "A" | 0,009 ± 0,001 | 0,034 ± 0,001 | 0,008 ± 0,002 | 0,013 ± 0,001 | 0,013 ± 0,002 | 0,019 ± 0,007 | 0,012 ± 0,001 |
| [Cu] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 5,50 ± 0,11 | 7,53 ± 0,76 | 7,70 ± 0,69 | 4,5 ± 0,52 | 4,54 ± 0,53 | 12,1 ± 0,9 | 9,44 ± 0,79 |
| | Fração "A" | 4,77 ± 0,61 | 4,89 ± 0,19 | 9,16 ± 0,19 | 3,74 ± 0,10 | 3,82 ± 0,09 | 5,29 ± 0,10 | 7,84 ± 0,11 |
| [Hg] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,012 ± 0,001 | 0,012 ± 0,001 | 0,011 ± 0,002 | 0,009 ± 0,002 | 0,009 ± 0,002 | 0,032 ± 0,016 | 0,022 ± 0,005 |
| | Fração "A" | 0,0062 ± 0,0005 | 0,0099 ± 0,0004 | 0,007 ± 0,001 | 0,007 ± 0,001 | 0,007 ± 0,001 | 0,006 ± 0,001 | 0,011 ± 0,001 |
| [Pb] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,031 ± 0,003 | 0,034 ± 0,003 | 0,027 ± 0,002 | 0,022 ± 0,001 | 0,022 ± 0,001 | 0,055 ± 0,003 | 0,043 ± 0,002 |
| | Fração "A" | 0,033 ± 0,002 | 0,043 ± 0,001 | 0,029 ± 0,003 | 0,023 ± 0,001 | 0,032 ± 0,001 | 0,038 ± 0,001 | 0,039 ± 0,001 |
| [Se] µg g ⁻¹ | Fração "B" | 0,279 ± 0,010 | 0,388 ± 0,028 | 0,327 ± 0,008 | 0,356 ± 0,015 | 0,359 ± 0,015 | 0,361 ± 0,026 | 0,450 ± 0,014 |
| | Fração "A" | 0,273 ± 0,007 | 0,356 ± 0,005 | 0,324 ± 0,009 | 0,338 ± 0,007 | 0,346 ± 0,010 | 0,337 ± 0,031 | 0,437 ± 0,034 |
| [S] mg g ⁻¹ | Fração "B" | 1,39 ± 0,01 | 1,49 ± 0,02 | 1,50 ± 0,01 | 1,39 ± 0,03 | 1,40 ± 0,03 | 1,41 ± 0,06 | 1,69 ± 0,05 |
| | Fração "A" | 0,878 ± 0,068 | 0,701 ± 0,003 | 0,684 ± 0,003 | 0,686 ± 0,006 | 0,701 ± 0,006 | 0,923 ± 0,031 | 0,986 ± 0,007 |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12).

Tabela A8. Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de TUBARÃO após diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Conc. ^b | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Pb | Se |
|-------------------------|--------------------|-------------|-------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|------------|
| U1 | ng g ⁻¹ | 679 ± 26 | < LQ ^c | 9 ± 1 | 6 ± 2 | 55,8 ± 0,2 | 5 ± 1 | 36 ± 3 |
| | BDP, % | 17,9 ± 0,7% | - | 41 ± 6% | 1,64 ± 0,42% | 1,62 ± 0,01% | 25 ± 7% | 6,5 ± 0,5% |
| U2 | ng g ⁻¹ | 683 ± 9 | < LQ ^c | 12 ± 3 | 4,4 ± 0,2 | 51 ± 1 | 6 ± 2 | 42 ± 10 |
| | BDP, % | 19 ± 0,2% | - | 60 ± 14% | 1,13 ± 0,05% | 1,59 ± 0,04% | 35 ± 13% | 8 ± 2% |
| C1 | ng g ⁻¹ | 432 ± 10 | < LQ ^c | 5,5 ± 0,5 | 5 ± 3 | 64 ± 4 | 4 ± 2 | 38 ± 4 |
| | BDP, % | 19,7 ± 0,4% | - | 44 ± 4% | 1,4 ± 0,75% | 2,25 ± 0,16% | 27 ± 12% | 7,8 ± 0,8% |
| C2 | ng g ⁻¹ | 371 ± 17 | < LQ ^c | 6,1 ± 0,9 | 5,2 ± 0,9 | 59 ± 4 | 4,6 ± 0,8 | 28 ± 6 |
| | BDP, % | 18,4 ± 0,9% | - | 52 ± 8% | 1,6 ± 0,26% | 2,16 ± 0,14% | 25 ± 5% | 5,6 ± 1,2% |
| F1 | ng g ⁻¹ | 656 ± 25 | < LQ ^c | 8,2 ± 0,9 | 7 ± 1 | 59 ± 4 | 5 ± 1 | 33 ± 6 |
| | BDP, % | 18,4 ± 0,7% | - | 48 ± 6% | 1,67 ± 0,28% | 2,27 ± 0,15% | 36 ± 9% | 5,9 ± 1,1% |
| F2 | ng g ⁻¹ | 610 ± 40 | < LQ ^c | 9,5 ± 3 | 5 ± 1 | 55 ± 2 | 7 ± 3 | 35 ± 6 |
| | BDP, % | 17,5 ± 1% | - | 51 ± 14% | 1,29 ± 0,37% | 2,19 ± 0,09% | 46 ± 21% | 6,5 ± 1% |
| S1 | ng g ⁻¹ | 652 ± 8 | < LQ ^c | 6,8 ± 0,4 | 5,9 ± 0,1 | 57 ± 3 | 5 ± 2 | 40 ± 7 |
| | BDP, % | 18,5 ± 0,2% | - | 50 ± 3% | 1,71 ± 0,04% | 2,45 ± 0,12% | 30 ± 11% | 7,3 ± 1% |
| S3 | ng g ⁻¹ | 595 ± 24 | < LQ ^c | 7,8 ± 1 | 4,4 ± 2 | 56 ± 5 | 5 ± 2 | 35 ± 4 |
| | BDP, % | 17,0 ± 0,7% | - | 50 ± 8% | 1,24 ± 0,6% | 2,43 ± 0,23% | 38 ± 17% | 6,7 ± 0,7% |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração em ng g⁻¹ expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12) e BDP expresso de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A9. Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de CAMARÃO após diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Conc. ^b | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Pb | Se |
|-------------------------|--------------------|-------------|-------------------|-------------|----------------|--------------|-------------------|-------------------|
| U1 | ng g ⁻¹ | 50 ± 2 | < LQ ^c | 3,82 ± 1,65 | 2,4 ± 0,04 | 1,4 ± 0,1 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 13,2 ± 0,5% | - | 27 ± 12% | 0,098 ± 0,002% | 9,41 ± 0,51% | - | - |
| U2 | ng g ⁻¹ | 57 ± 5 | < LQ ^c | 6,07 ± 1,9 | 4,2 ± 1,3 | 1,5 ± 0,1 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 14,7 ± 1,2% | - | 42 ± 13% | 0,167 ± 0,053% | 9,8 ± 0,61% | - | - |
| C1 | ng g ⁻¹ | 44 ± 1 | < LQ ^c | 3,57 ± 0,73 | 2,14 ± 0,51 | 1 ± 0,2 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 13,9 ± 0,3% | - | 38 ± 8% | 0,093 ± 0,022% | 7,55 ± 1,44% | - | - |
| C2 | ng g ⁻¹ | 46 ± 3 | < LQ ^c | 3,72 ± 0,54 | 2,3 ± 0,86 | 0,8 ± 0,1 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 14,1 ± 1% | - | 39 ± 6% | 0,097 ± 0,036% | 6,63 ± 0,92% | - | - |
| F1 | ng g ⁻¹ | 65 ± 6 | < LQ ^c | 4,67 ± 0,28 | 3,86 ± 0,61 | 1,1 ± 0,1 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 15,9 ± 1,4% | - | 46 ± 3% | 0,157 ± 0,025% | 9,5 ± 1% | - | - |
| F2 | ng g ⁻¹ | 55 ± 4 | < LQ ^c | 3,88 ± 0,33 | 3,3 ± 1,4 | 1,1 ± 0,2 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 14,8 ± 1% | - | 40 ± 3% | 0,142 ± 0,062% | 8,27 ± 1,82% | - | - |
| S1 | ng g ⁻¹ | 63 ± 3 | < LQ ^c | 4,52 ± 0,97 | 2,27 ± 0,71 | 0,9 ± 0,2 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 15,7 ± 0,7% | - | 35 ± 8% | 0,095 ± 0,03% | 7,58 ± 1,38% | - | - |
| S3 | ng g ⁻¹ | 63 ± 3 | < LQ ^c | 4,28 ± 0,25 | 3,6 ± 1,8 | 0,9 ± 0,1 | < LQ ^c | < LQ ^c |
| | BDP, % | 16,9 ± 0,9% | - | 45 ± 3% | 0,157 ± 0,078% | 7,13 ± 0,64% | - | - |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração em ng g⁻¹ expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12) e BDP expresso de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A10. Biodisponibilidade de metais e não-metais nas amostras de LULA após diferentes tratamentos culinários.

| Trat. Cul. ^a | Conc. ^b | As | Cd | Cr | Cu | Hg | Pb | Se |
|-------------------------|--------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| U1 | ng g ⁻¹ | 12 ± 1 | < LQ ^c | 3,06 ± 0,33 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 9 ± 1 |
| | BDP, % | 5,9 ± 0,4% | - | 29 ± 3% | - | - | - | 4,3 ± 0,6% |
| U2 | ng g ⁻¹ | 11 ± 1 | < LQ ^c | 3,47 ± 0,77 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 11 ± 6 |
| | BDP, % | 5,7 ± 0,6% | - | 48 ± 11% | - | - | - | 5 ± 3% |
| C1 | ng g ⁻¹ | 5,46 ± 0,58 | < LQ ^c | 2,4 ± 0,43 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 7 ± 2 |
| | BDP, % | 3,4 ± 0,4% | - | 38 ± 7% | - | - | - | 3,6 ± 0,8% |
| C2 | ng g ⁻¹ | 5,48 ± 0,2 | < LQ ^c | 2,52 ± 0,66 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 9 ± 2 |
| | BDP, % | 3,6 ± 0,1% | - | 38 ± 10% | - | - | - | 4,7 ± 1,2% |
| F1 | ng g ⁻¹ | 11,1 ± 0,9 | < LQ ^c | 2,74 ± 0,73 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 10 ± 4 |
| | BDP, % | 5,4 ± 0,5% | - | 26 ± 7% | - | - | - | 4,6 ± 2% |
| F2 | ng g ⁻¹ | 11,7 ± 0,9 | < LQ ^c | 2,99 ± 1,12 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 8 ± 2 |
| | BDP, % | 6 ± 0,5% | - | 34 ± 13% | - | - | - | 3,8 ± 0,9% |
| S1 | ng g ⁻¹ | 11,4 ± 0,4 | < LQ ^c | 3 ± 1 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 11 ± 3 |
| | BDP, % | 5,9 ± 0,2% | - | 28 ± 9% | - | - | - | 5,3 ± 1,4% |
| S3 | ng g ⁻¹ | 10 ± 1 | < LQ ^c | 3,26 ± 0,18 | < LQ ^c | < LQ ^c | < LQ ^c | 8 ± 3 |
| | BDP, % | 5,1 ± 0,6% | - | 33 ± 2% | - | - | - | 4 ± 1,4% |

^a U = crua; C = cozida; F = frita; S = *sauté*; 1 = sem condimentos; 2 = com sal e suco de limão; 3 = com alho, sal e suco de limão;

^b Concentração em ng g⁻¹ expressa em massa de amostra fresca (Equação 1, item 3.12) e BDP expresso de acordo com a Equação 3 (item 4.8);

^c Dependente da amostra e tratamento culinário (ver Tabela A11).

Tabela A11. Limite de quantificação de metais e não-metais nas amostras de frutos do mar, meios de cocção e na fração biodisponível.

| Analito | LQ nos frutos do mar e meios de cocção | | | | | LQ expresso de acordo com as Equações 1 e 2 | | | | |
|--------------------------|--|-------------------|-----------------|------------------------------|-------------------|---|--------------------------------|------------------------------|---|---------------------|
| | Frutos do mar (massa seca) | Água de cozimento | Óleo de fritura | Manteiga (<i>sautéing</i>) | FBDP ^a | Frutos do mar (massa fresca) ^b | Água de cozimento ^c | Óleo de fritura ^c | Manteiga (<i>sautéing</i>) ^c | FBDP ^{a,b} |
| As (ng g ⁻¹) | 15 | 1 | 15 | 15 | 6 | 1 - 4 | 2 - 15 | 40 - 304 | 2 - 15 | 0,7 - 2 |
| Cd (ng g ⁻¹) | 9 | 0,4 | 9 | 9 | 4 | 1 - 3 | 1 - 9 | 24 - 180 | 1 - 9 | 0,4 - 1 |
| Cr (ng g ⁻¹) | 20 | 1 | 20 | 20 | 8 | 2 - 6 | 3 - 20 | 52 - 392 | 3 - 20 | 1 - 2 |
| Cu (ng g ⁻¹) | 19 | 1 | 19 | 19 | 8 | 2 - 6 | 3 - 19 | 51 - 388 | 3 - 19 | 1 - 2 |
| Hg (ng g ⁻¹) | 9 | 0,4 | 9 | 9 | 4 | 1 - 3 | 1 - 9 | 25 - 188 | 1 - 9 | 0,4 - 1 |
| Pb (ng g ⁻¹) | 19 | 1 | 19 | 19 | 8 | 2 - 5 | 2 - 19 | 50 - 379 | 2 - 19 | 1 - 2 |
| Se (ng g ⁻¹) | 109 | 4 | 109 | 109 | 44 | 9 - 32 | 14 - 109 | 286 - 2175 | 14 - 109 | 5 - 13 |
| S (µg g ⁻¹) | 38 | 2 | 38 | 38 | - | 3 - 11 | 5 - 38 | 99 - 750 | 5 - 38 | - |

^a FBDP = LQ na fração biodisponível (fração dialisada) do teste de biodisponibilidade;

^b LQ expresso de acordo com a Equação 1 do item 3.12;

^c LQ do analito transferido da amostra para o meio de cocção (Equação 2, item 3.12).

Tabela A12. Limite de quantificação (ng g⁻¹, como As), das espécies de As nas amostras de frutos do mar e na fração biodisponível.

| Analito | LQ nos frutos do mar (massa seca) | | LQ de acordo com as Equações 1 e 2 | |
|-------------|-----------------------------------|-------------------|---|---------------------|
| | Frutos do mar | FBDP ^a | Frutos do mar (massa fresca) ^b | FBDP ^{a,b} |
| AsB | 15 | 2 | 1 - 4 | 0,2 - 0,5 |
| As(III) | 74 | 9 | 6 - 21 | 1,1 - 2,7 |
| DMA | 15 | 2 | 1 - 4 | 0,2 - 0,6 |
| As? (4,45') | 30 | 4 | 2 - 9 | 0,4 - 1,1 |
| MMA | 30 | 4 | 2 - 9 | 0,4 - 1,1 |
| As(V) | 64 | 8 | 5 - 18 | 0,9 - 2,4 |

^a FBDP = LQ na fração biodisponível (fração dialisada) do teste de biodisponibilidade;

^b LQ expresso de acordo com a Equação 1 do item 3.12.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EFSA, Scientific Opinion on Health Benefits of Seafood (Fish and Shellfish) Consumption in Relation to Health Risks Associated with Exposure to Methylmercury, European Food Safety Authority, Parma, Italy, 2014.
2. Olmedo, P., Pla, A., Hernández, A. F., Barbier, F., Ayouni, L., Gil, F., Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers, *Environ. Int.* 59 (2013) 63-72.
3. FAO, FISH TO 2030 - Prospects for Fisheries and Aquaculture, FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2013.
4. Ersoy, B., Özeren, A., The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish, *Food Chem.* 115 (2009) 419-422.
5. Tornberg, E., Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products, *Meat Sci.* 70 (2005) 493-508.
6. Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M., Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 31-40.
7. Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P., Prada-Rodríguez, D., In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 324-345.
8. Duffus, J. H., "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 793-807.
9. Hajeb, P., Sloth, J. J., Shakibazadeh, S., Mahyudin, N. A., Afsah-Hejri, L., Toxic Elements in Food: Occurrence, Binding, and Reduction Approaches, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 457-472.
10. Järup, L., Hazards of heavy metal contamination, *Br. Med. Bull.* 68 (2003) 167-182.
11. Amirah, M. N., Afiza, A. S., Faizal, W. I. W., Nurliyana, M. H., Laili, S., Human Health Risk Assessment of Metal Contamination through Consumption of Fish, *J. Environ. Pollut. Human Health* 1 (2013) 1-5.
12. Mitra, A., Ghosh, R., Bioaccumulation Pattern of Heavy Metals in Commercially Important Fishes in and Around Indian Sundarbans, *Global J. Anim. Sci. Res.* 2 (2014) 33-45.
13. El-Moselhy, K. M., Othman, A. I., Abd El-Azem, H., El-Metwally, M. E. A., Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt, *Egypt. J. Basic Appl. Sci. Res.* 1 (2014) 97-105.

14. Andreae, M. O., Distribution and speciation of arsenic in natural waters and some marine algae, *Deep Sea Res.* 25 (1978) 391-402.
15. Borak, J., Hosgood, H. D., Seafood arsenic: Implications for human risk assessment, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47 (2007) 204-212.
16. Francesconi, K. A., Arsenic species in seafood: Origin and human health implications, *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 373-381.
17. Edmonds, J. S., Francesconi, K. A., Cannon, J. R., Raston, C. L., Skelton, B. W., White, A. H., Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *panulirus longipes cygnus* George, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 1543-1546.
18. Edmonds, J. S., Francesconi, K. A., Arsenic in seafoods: Human health aspects and regulations, *Mar. Pollut. Bull.* 26 (1993) 665-674.
19. EFSA, Scientific Opinion on Arsenic in Food, *EFSA Journal* 7 (2009) 1351.
20. Sartal, C. G., Alonso, M. C. B., Barrera, P. B., Arsenic in Seaweed: Presence, Bioavailability and Speciation, S.-K. Kim (Ed.) *Seafood Science Advances in Chemistry, Technology and Applications*, Taylor & Francis Group, 2015, pp. 276-351.
21. Leermakers, M., Baeyens, W., De Gieter, M., Smedts, B., Meert, C., De Bisschop, H. C., Morabito, R., Quevauviller, P., Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 1-10.
22. Liebl, B., Mückter, H., Nguyen, P. T., Doklea, E., Islambouli, S., Fichtl, B., Forth, W., Differential effects of various trivalent and pentavalent organic and inorganic arsenic species on glucose metabolism in isolated kidney cells, *Appl. Organomet. Chem.* 9 (1995) 531-540.
23. Oberoi, S., Barchowsky, A., Wu, F., The global burden of disease for skin, lung, and bladder cancer caused by arsenic in food, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23 (2014) 1187-1194.
24. UNEP, Final Review of Scientific Information on Cadmium United Nations Environment Programme, 2010.
25. Ruangsomboon, S., Wongrat, L., Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*, *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) 15-20.
26. EFSA, Cadmium in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, European Food Safety Authority, 2009, pp. 1-139.
27. ANVISA/MERCOSUL, RDC nº 42, de 29/08/2013 - Regulamento Técnico Mercosul sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos, 2013.
28. Stern, B. R., Solioz, M., Krewski, D., Aggett, P., Aw, T.-C., Baker, S., Crump, K., Dourson, M., Haber, L., Hertzberg, R., Keen, C., Meek, B., Rudenko, L., Schoeny, R., Slob, W., Starr, T., Copper and Human Health: Biochemistry, Genetics, and Strategies for Modeling Dose-response Relationships, *J. Toxicol. Environ. Health, B* 10 (2007) 157-222.

29. Bielicka, A., Bojanowska, I., Wisniewski, A., Two faces of chromium - pollutant and bioelement, *Pol. J. Environ. Stud.* 14 (2005) 5-10.
30. EFSA, Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water, *EFSA Journal* 12 (2014) 3595.
31. Neff, J. M., Chapter 7 - Chromium in the Ocean, J. M. Neff (Ed.) Bioaccumulation in Marine Organisms, Elsevier, Oxford, 2002, pp. 131-143.
32. Pastorelli, A. A., Baldini, M., Stacchini, P., Baldini, G., Morelli, S., Sagratella, E., Zaza, S., Ciardullo, S., Human exposure to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption in Italy: a pilot evaluation, *Food Addit. Contam. A* 29 (2012) 1913-1921.
33. Chen, Y., Huang, L., Wu, W., Ruan, Y., Wu, Z., Xue, Z., Fu, F., Speciation analysis of lead in marine animals by using capillary electrophoresis couple online with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Electrophoresis* 35 (2014) 1346-1352.
34. Hintelmann, H., Falter, R., Ilgen, G., Evans, R. D., Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH_3Hg^+) in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 363-370.
35. Huber, K., Mercury Use: Industry, Wisconsin Mercury SourceBook: A guide to help yours community identify and reduce releases of elemental mercury, 1997, pp. 407 - 435.
36. Kuiken, T., Mercury products guide: The hidden dangers of mercury, National Wildlife Federation, Ann Arbor, Michigan, USA, 2002, pp. 17-34.
37. Micaroni, R. C. d. C. M., Bueno, M. I. M. S., Jardim, W. d. F., Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte, *Quim. Nova* 23 (2000) 487-495.
38. Hintelmann, H., Sample preparation for mercury speciation, Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) Sample preparation for trace element analysis, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 1063-1080.
39. Chen, D., Jing, M., Wang, X., Determination of methyl mercury in water and soil by HPLC-ICP-MS, application, *Application Note, Agilent Technologies* (2005) 8.
40. WHO, Mercury in Health Care: Policy Paper, World Health Organization, 2005.
41. Bisinoti, M. C., Jardim, W. F., O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente, *Quim. Nova* 27 (2004) 593-600.
42. EPA, Mercury Update: Impact on Fish Advisories, Environmental Protection Agency, 2001.
43. Hacon, S., Rochedo, E. R. R., Campos, R. R. R., Lacerda, L. D., Mercury exposure through fish consumption in the urban area of Alta Floresta in the Amazon Basin, *J. Geochem. Explor.* 58 (1997) 209-216.
44. Horvat, M., Gibičar, D., Speciation of Mercury: Environment, Food, Clinical, and Occupational Health, Handbook of elemental speciation II – species in the environment,

- food, medicine and occupational health, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, England, 2005, pp. 281-304.
45. Counter, S. A., Buchanan, L. H., Mercury exposure in children: a review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 209-230.
 46. JECFA, Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organization, Geneva, 2004, pp. 132-139.
 47. Leong, C. C. W., Syed, N. I., Lorscheider, F. L., Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury, *Neuroreport* 12 (2001) 733-737.
 48. Harada, M., Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution, *Crit. Rev. Toxicol.* 25 (1995) 1-24.
 49. Miranda, M. R., Coelho-Souza, S. A., Guimarães, J. R. D., Correia, R. R. S., Oliveira, D., Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores ambientais que afetam a metilação, *Oecol. Bras.* 11 (2007) 240-251.
 50. Schrier, R. W., Diseases of the kidney & urinary tract, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2006, pp. 1153-1159.
 51. Dabeka, R. W., McKenzie, A. D., Lacroix, G. M., Cleroux, C., Bowe, S., Graham, R. A., Conacher, H. B., Verdier, P., Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary intake of arsenic by Canadian adults and children., *J AOAC Int.* 76 (1993) 14-25.
 52. Morgan, J. N., M.R., B., R.L., G., Effects of commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessments, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 7 (1997).
 53. Ersoy, B., Yanar, Y., Küçükgülmez, A., Çelik, M., Effects of four cooking methods on the heavy metal concentrations of sea bass fillets (*Dicentrarchus labrax* Linne, 1785), *Food Chem.* 99 (2006) 748-751.
 54. Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Cengiz, E., Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Food Chem.* 84 (2004) 19-22.
 55. Marimuthu, K., Thilaga, M., Kathiresan, S., Xavier, R., Mas, R. H. M. H., Effect of different cooking methods on proximate and mineral composition of striped snakehead fish (*Channa striatus*, Bloch), *J. Food Sci. Technol.* 49 (2012) 373-377.
 56. Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J. M., Domingo, J. L., Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11262-11269.
 57. Devesa, V., Macho, M. L., Jalón, M., Urieta, I., Muñoz, O., Súnier, M. A., López, F., Vélez, D., Montoro, R., Arsenic in cooked seafood products: study on the effect of cooking on total and inorganic arsenic contents, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4132-4140.

58. Schmidt, L., Bizzi, C. A., Duarte, F. A., Muller, E. I., Krupp, E., Feldmann, J., Flores, E. M. M., Evaluation of Hg species after culinary treatments of fish, *Food Control* 47 (2015) 413-419.
59. Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., Pérez-Gálvez, A., In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutr. Res.* 29 (2009) 751-760.
60. Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A., Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review, *Compr. Rev. Food. Sci. F.* 13 (2014) 155-171.
61. Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Vélez, D., Montoro, R., Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 981-986.
62. Sartal, C. G., Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, P., Effect of the cooking procedure on the arsenic speciation in the bioavailable (dialyzable) fraction from seaweed, *Microchem. J.* 105 (2012) 65-71.
63. Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C., Barciela-Alonso, M. C., Domínguez-González, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., Bioavailability study using an in-vitro method of iodine and bromine in edible seaweed, *Food Chem.* 124 (2011) 1747-1752.
64. Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., Romarís-Hortas, V., Moreda-Piñeiro, A., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P., Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples, *Food Chem.* 130 (2012) 552-560.
65. Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P., In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood, *Food Chem.* 139 (2013) 872-877.
66. Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P., ICP-MS for the determination of selenium bioavailability from seafood and effect of major food constituents, *Microchem. J.* 108 (2013) 174-179.
67. García-Sartal, C., Barciela-Alonso, M. d. C., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., Study of cooking on the bioavailability of As, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Se and Zn from edible seaweed, *Microchem. J.* 108 (2013) 92-99.
68. Romarís-Hortas, V., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Speciation of the bio-available iodine and bromine forms in edible seaweed by high performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 24-32.
69. Domínguez-González, R., Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C., Moreda-Piñeiro, A., Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, P., Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds, *Talanta* 82 (2010) 1668-1673.
70. García-Sartal, C., Romarís-Hortas, V., Barciela-Alonso, M. d. C., Moreda-Piñeiro, A., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, P., Use of an in vitro digestion method to

- evaluate the bioaccessibility of arsenic in edible seaweed by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Microchem. J.* 98 (2011) 91-96.
71. Laird, B. D., Shade, C., Gantner, N., Chan, H. M., Siciliano, S. D., Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 6003-6008.
 72. Bligh, E. G., Dyer, W. J., A Rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Phys.* 37 (1959) 911-917.
 73. AOAC, Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Gaithersburg, Md., 2006.
 74. Kollipara, U. K., Brittin, H. C., Increased iron content of some Indian foods due to cookware, *J. Am. Diet. Assoc.* 96 (1996) 508-510.
 75. Kuligowski, J., Halperin, K. M., Stainless-steel cookware as a significant source of nickel, chromium, and iron, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (1992) 211-215.
 76. Entwisle, J., The determination of mercury in microwave digests of foodstuffs by ICP-MS, Application, *Am. Lab.* 36 (2004) 11-14.
 77. Chen, J., Determination of mercury in wastewater by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Application Note, PerkinElmer* (2009) 3.
 78. Zhu, X., Alexandratos, S. D., Determination of trace levels of mercury in aqueous solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Elimination of the 'memory effect', *Microchem. J.* 86 (2007) 37-41.
 79. Guo, P., Gong, Y., Wang, C., Liu, X., Liu, J., Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 1754-1759.
 80. Pizarro, I., Gómez, M., Cámara, C., Palacios, M. A., Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 85-98.
 81. Saadawi, R., Hachmoeller, O., Winfough, M., Hanley, T., Caruso, J. A., Landero Figueroa, J. A., The hookah series part 2: elemental analysis and arsenic speciation in hookah charcoals, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2146-2158.
 82. Kubachka, K. M., Shockey, N. V., Hanley, T. A., Conklin, S. D., Heitkemper, D. T., FDA - Elemental Analysis Manual: Section 4.11: Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination, 2012.
 83. Batista, B. L., Nacano, L. R., De Souza, S. S., Barbosa, F., Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS, *Food Addit. Contam. A* 29 (2011) 780-788.
 84. Pétursdóttir, Á. H., Gunnlaugsdóttir, H., Krupp, E. M., Feldmann, J., Inorganic arsenic in seafood: Does the extraction method matter?, *Food Chem.* 150 (2014) 353-359.
 85. Leufroy, A., Noël, L., Dufailly, V., Beauchemin, D., Guérin, T., Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively

- coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data, *Talanta* 83 (2011) 770-779.
86. Miller, J. N., Miller, J. C., Significance tests, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson, England, 2005, pp. 41-44.
 87. Nam, S.-H., Oh, H.-J., Min, H.-S., Lee, J.-H., A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC–ICP-MS, *Microchem. J.* 95 (2010) 20-24.
 88. Rabieh, S., Hirner, A. V., Matschullat, J., Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 544-549.
 89. Ritsema, R., Dukan, L., Navarro, T. R. i., van Leeuwen, W., Oliveira, N., Wolfs, P., Leuret, E., Speciation of arsenic compounds in urine by LC–ICP MS, *Appl. Organomet. Chem.* 12 (1998) 591-599.
 90. Feldmann, J., Lai, V. W.-M., Cullen, W. R., Ma, M., Lu, X., Le, X. C., Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1988-1997.
 91. Rosenberg, E., Ariese, F., Quality Control in Speciation Analysis, Trace element speciation for environment, food and health, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, pp. 17-50.
 92. Liu, L., Yun, Z., He, B., Jiang, G., Efficient interface for online coupling of capillary electrophoresis with inductively coupled plasma–mass spectrometry and its application in simultaneous speciation analysis of arsenic and selenium, *Anal. Chem.* (2014).
 93. Hong, S., Khim, J. S., Park, J., Son, H.-S., Choi, S.-D., Choi, K., Ryu, J., Kim, C.-Y., Chang, G. S., Giesy, J. P., Species- and tissue-specific bioaccumulation of arsenicals in various aquatic organisms from a highly industrialized area in the Pohang City, Korea, *Environ. Pollut.* 192 (2014) 27-35.
 94. Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova* 27 (2004) 771-780.
 95. Ribani, M., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G., Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 201-205.
 96. Miller, J. N., Miller, J. C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5 ed., Pearson, England, 2005, pp. 288.
 97. Guideline, I. H. T., Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH, Geneva, Switzerland, 2005.
 98. Katano, S., Matsuo, Y., Hanaoka, K. i., Arsenic compounds accumulated in pearl oyster *Pinctada fucata*, *Chemosphere* 53 (2003) 245-251.
 99. Cheung, Y. H., Wong, M. H., Trace metal contents of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) purchased from markets in Hong Kong, *Environ. Manage.* 16 (1992) 753-761.

100. Saavedra, Y., González, A., Blanco, J., Anatomical distribution of heavy metals in the scallop *Pecten maximus*, *Food Addit. Contam. A* 25 (2008) 1339-1344.
101. EC, No 1881/2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, Official Journal of the European Union L 364, 20 December 2006, pp. 5-24, 2006.
102. Rumbold, D., Wasno, R., Hammerschlag, N., Volety, A., Mercury Accumulation in Sharks From the Coastal Waters of Southwest Florida, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67 (2014) 402-412.
103. Hueter, R. E., Fong, W. G., Henderson, G., French, M. F., Manire, C. A., Methylmercury concentration in shark muscle by species, size and distribution of sharks in Florida coastal waters, *Water, Air, Soil Pollut.* 80 (1995) 893-899.
104. Evers, D. C., Hammerschlag, N., Die., D., Mercury levels in Florida sharks: interim Report BioDiversity Research institute, Gorham, Maine., 2008, pp. 16.
105. FAO/WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Seventy-second meeting, Rome, 2010, pp. 1-16.
106. Kruzynski, G. M., Cadmium in oysters and scallops: the BC experience, *Toxicol. Lett.* 148 (2004) 159-169.
107. Metian, M., Bustamante, P., Hédouin, L., Warnau, M., Accumulation of nine metals and one metalloid in the tropical scallop *Comptopallium radula* from coral reefs in New Caledonia, *Environ. Pollut.* 152 (2008) 543-552.
108. Suru, S., Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats, *BioMetals* 21 (2008) 623-633.
109. Senapati, S. K., Dey, S., Dwivedi, S. K., Swarup, D., Effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract on tissue lead level in rats, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 229-232.
110. Abdalla, F. H., Bellé, L. P., De Bona, K. S., Bitencourt, P. E. R., Pigatto, A. S., Moretto, M. B., *Allium sativum* L. extract prevents methyl mercury-induced cytotoxicity in peripheral blood leukocytes (LS), *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 417-421.
111. Cha, C. W., A study on the effect of garlic to the heavy metal poisoning of rat, *J. Korean Med. Sci.* 2 (1987) 213-223.
112. Roldan, M., Antequera, T., Armenteros, M., Ruiz, J., Effect of different temperature-time combinations on lipid and protein oxidation of sous-vide cooked lamb loins, *Food Chem.* 149 (2014) 129-136.
113. Dobarganes, C., Márquez-Ruiz, G., Velasco, J., Interactions between fat and food during deep-frying, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102 (2000) 521-528.
114. Li, L., Wang, F., Meng, B., Lemes, M., Feng, X., Jiang, G., Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3103-3107.
115. Feijó, G. L. D., Conhecendo a carne que você consome, *Embrapa Gado de Corte* (1999) 25.
116. Leander, R. C., Hedrick, H. B., Brown, M. F., White, J. A., Comparison of structural changes in bovine long and semitendinosus muscles during cooking, *J. Food Sci.* 45 (1980) 1-6.

117. Ralston, N. C., Blackwell, J. L., III, Raymond, L., Importance of Molar Ratios in Selenium-Dependent Protection Against Methylmercury Toxicity, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 255-268.
118. Burger, J., Gochfeld, M., Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 1418-1429.
119. Peterson, S. A., Ralston, N. V. C., Peck, D. V., Sickle, J. V., Robertson, J. D., Spate, V. L., Morris, J. S., How Might Selenium Moderate the Toxic Effects of Mercury in Stream Fish of the Western U.S.?, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3919-3925.
120. Sørmo, E. G., Ciesielski, T. M., Øverjordet, I. B., Lierhagen, S., Eggen, G. S., Berg, T., Jenssen, B. M., Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6561-6566.
121. Burger, J., Gochfeld, M., Selenium and mercury molar ratios in commercial fish from New Jersey and Illinois: Variation within species and relevance to risk communication, *Food Chem. Toxicol.* 57 (2013) 235-245.
122. Kaneko, J. J., Ralston, N. C., Selenium and Mercury in Pelagic Fish in the Central North Pacific Near Hawaii, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 242-254.
123. Falnoga, I., Kobal, A., Stibilj, V., Horvat, M., Selenoprotein P in subjects exposed to mercury and other stress situations such as physical load or metal chelation treatment, *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 25-33.
124. Park, K., Mozaffarian, D., Omega-3 fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases, *Curr. Atheroscler. Rep.* 12 (2010) 414-422.
125. Mozaffarian, D., Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: Current evidence and unanswered questions, *Int. J. Env. Res. Public Health* 6 (2009) 1894-1916.
126. Ralston, N. V. C., Mercury in canned tuna: The importance of selenium, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 2133-2134.
127. Ralston, N. V. C., Ralston, C. R., Blackwell Iii, J. L., Raymond, L. J., Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity, *Neurotoxicology* 29 (2008) 802-811.
128. Ralston, N. V. C., Raymond, L. J., Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity, *Toxicology* 278 (2010) 112-123.
129. Burger, J., Jeitner, C., Gochfeld, M., Locational differences in mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey, *J. Toxicol. Environ. Health, A* 74 (2011) 863-874.
130. Cabañero, A., Madrid, Y., Cámara, C., Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an *in vitro* digestion method, *Biol. Trace Elem. Res.* 119 (2007) 195-211.
131. Yang, L., Wang, W., Hou, S., Peterson, P., Williams, W. P., Effects of selenium supplementation on arsenism: an intervention trial in inner Mongolia, *Environ. Geochem. Health* 24 (2002) 359-374.

132. Chen, Y., Hall, M., Graziano, J. H., Slavkovich, V., van Geen, A., Parvez, F., Ahsan, H., A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic related premalignant skin lesions, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (2007) 207-213.
133. Xue, W., Wang, Z., Chen, Q., Chen, J., Yang, H., Xue, S., High selenium status in individuals exposed to arsenic through coal-burning in Shaanxi (PR of China) modulates antioxidant enzymes, heme oxygenase-1 and DNA damage, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 1312-1318.
134. Chen, R. W., Whanger, P. D., Weswig, P. H., Selenium - induced redistribution of cadmium binding to tissue proteins: a possible mechanism of protection against cadmium toxicity, *Bioinorg. Chem.* 4 (1975) 125-133.
135. El-Sharaky, A. S., Newairy, A. A., Badreldeen, M. M., Eweda, S. M., Sheweita, S. A., Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats, *Toxicology* 235 (2007) 185-193.
136. Messaoudi, I., El Heni, J., Hammouda, F., Saïd, K., Kerkeni, A., Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney, *Biol. Trace Elem. Res.* 130 (2009) 152-161.
137. Chuang, H.-Y., Kuo, C.-H., Chiu, Y.-W., Ho, C.-K., Chen, C.-J., Wu, T.-N., A case-control study on the relationship of hearing function and blood concentrations of lead, manganese, arsenic, and selenium, *Sci. Total Environ.* 387 (2007) 79-85.
138. Cerklewski, F. L., Forbes, R. M., Influence of dietary selenium on lead toxicity in the rat, *The Journal of Nutrition* 106 (1976) 778-783.
139. Devesa, V., Martínez, A., Súnier, M. A., Vélez, D., Almela, C., Montoro, R., Effect of cooking temperatures on chemical changes in species of organic arsenic in seafood, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2272-2276.
140. Wang, Z., Zhou, J., Lu, X., Gong, Z., Le, X. C., Arsenic speciation in urine from acute promyelocytic leukemia patients undergoing arsenic trioxide treatment, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2003) 95-103.
141. Chen, B., Cao, F., Yuan, C., Lu, X., Shen, S., Zhou, J., Le, X. C., Arsenic speciation in saliva of acute promyelocytic leukemia patients undergoing arsenic trioxide treatment, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1903-1911.
142. Mandal, B. K., Ogra, Y., Suzuki, K. T., Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 (2003) 73-83.
143. Alava, P., Tack, F., Laing, G. D., de Wiele, T. V., HPLC-ICP-MS method development to monitor arsenic speciation changes by human gut microbiota, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 524-533.
144. Standard, C. G., National Food Safety Standard Maximum Levels of Contaminants in Food, GB 2762/2005, China GB Standard, 2012.
145. FSANZ, Australia New Zealand Food Standards Code, Standard 1.4.1 - Contaminants and Natural Toxicants, FSANZ, 2013.
146. Burger, J., Stern, A. H., Gochfeld, M., Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 266-271.

-
147. Dorea, J. G., Barbosa, A. C., Fish consumption and blood mercury: Proven health benefits or probable neurotoxic risk?, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42 (2005) 249-250.
 148. Passos, C. J., Mergler, D., Gaspar, E., Morais, S., Lucotte, M., Larribe, F., Davidson, R., Grosbois, S. d., Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon, *Environ. Res.* 93 (2003) 123-130.
 149. FAO/WHO, Report of the Joint Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption, FAO Fishery and Aquaculture Report, Rome, 2011, pp. 50.
 150. FDA/EPA, What You Need to Know About Mercury in Fish and Shellfish, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Environmental Protection Agency, 2004.
 151. FDA/EPA, Fish: What Pregnant Women and Parents Should Know - Draft Updated Advice by FDA and EPA / June 2014, 2014.