



ESTUDO DE MERCÚRIO TOTAL E ORGÂNICO EM PESCADOS

Bárbara Sia **Boer**¹; Raquel Fernanda **Milani**²; Esther Lima de **Paiva**³;

Ana Lúcia Matheus e **Silva**²; Marcelo Antonio **Morgano**⁴

Nº16201

RESUMO – O consumo de pescados é frequente para pessoas que buscam fontes alternativas de bem estar e saúde por ser um alimento saudável e fonte ômega 3. Na exposição ao meio ambiente, o peixe está sujeito à contaminação por mercúrio (Hg) que ocorre através da respiração branquial ou pela alimentação. Devido à baixa taxa de eliminação, o Hg é acumulado à medida que os níveis tróficos aumentam na cadeia alimentar. A principal forma de mercúrio orgânico encontrada em peixes é representada pelo metilmercúrio (MeHg), considerada a mais tóxica, sendo de extrema importância métodos analíticos capazes de identificar e quantificar mercúrio em alimentos. O projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia rápida, simples e de menor custo, usando a técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) para a determinação de mercúrio orgânico e total em amostras de 12 espécies de pescados comercializadas em restaurante da cidade de Campinas, SP. Os maiores níveis de mercúrio orgânico (oHg) e mercúrio total (tHg) foram encontrados nas espécies de agulhão, atum e bicuda: oHg ($856 \mu\text{g kg}^{-1}$, $683 \mu\text{g kg}^{-1}$, $476 \mu\text{g kg}^{-1}$) e tHg ($1011 \mu\text{g kg}^{-1}$, $902 \mu\text{g kg}^{-1}$, $743 \mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente. O cálculo da razão oHg/tHg mostrou que as espécies de peixe nas quais mais predominou a forma orgânica de Hg foram: namorado (93%), polvo (87%) e agulhão (85%). Com relação ao limite máximo estabelecido para tHg pela legislação brasileira as espécies agulhão, bicuda e anchova apresentaram valores superiores.

Palavras-chaves: Metilmercúrio, mercúrio total, pescado, TDA AAS, peixe agulhão.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP; barbarasiaboer@hotmail.com

2 Colaborador: Assistente de Pesquisa, ITAL, Campinas-SP.

3 Colaborador: Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas-SP.

4 Orientador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP; morgano@ital.sp.gov.br



ABSTRACT– *Fish consumption is often an option for those who search for healthy alternatives foods, once it is a good source of essential fatty acids of the ω 3 series. While exposed to the environment, fish is subject to mercury (Hg) contamination which can occur through gill breathing or by feeding. Due to low elimination rate, the higher a trophic level is, more Hg is accumulated in the food chain. The main form of organic mercury found in fish is represented by methylmercury (MeHg), which is considered the most toxic form; therefore the development of analytical methods to identify and quantify mercury in food is extremely important. The present project aimed to develop a quick, simple and low cost methodology, using thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS) to determine total and organic mercury levels in 12 different fish samples collected in restaurants in the city of Campinas, SP. The highest organic mercury levels (oHg) and total mercury (tHg) were found in needlefish, tuna and bicuda species: oHg ($856 \mu\text{g kg}^{-1}$, $683 \mu\text{g kg}^{-1}$, $476 \mu\text{g kg}^{-1}$) and tHg ($1011 \mu\text{g kg}^{-1}$, $902 \mu\text{g kg}^{-1}$, $743 \mu\text{g kg}^{-1}$). The oHg-tHg ratio showed that organic mercury form predominated in all species, with higher ratios for sandperch (93%), octopus (87%) and needlefish (85%). Regarding the national regulation limit, the species needlefish, bicuda and anchovy surpassed the limit value for tHg.*

Keywords: Methylmercury, total mercury, fish, TDA AAS, needlefish.

1 INTRODUÇÃO

A busca por hábitos mais saudáveis de alimentação é uma tendência de mercado e o consumo de frutos do mar e peixes vem crescendo muito nos últimos anos (EL MOSELHY *et al.*, 2014) devido à sua saudabilidade, sendo que o consumo de pescado pode ser considerado uma importante fonte de proteína, de vitaminas, de minerais e de ácido graxo ômega 3 (BURGER *et al.*, 2013).

Contraopondo-se a esses benefícios, a crescente atividade industrial tem provocado contaminação do meio ambiente, onde alguns compostos químicos são descartados na natureza poluindo o solo, a água e conseqüentemente os animais, como os peixes (DURAN, TUZEN & SOYLAK, 2014). O mercúrio (Hg) pode estar presente na natureza nas formas de mercúrio elementar, mercúrio orgânico e mercúrio inorgânico (AZEVEDO, NASCIMENTO & CHASIN, 2001). Essas diferentes formas de Hg podem ocorrer no pescado devido às suas características de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar. A espécie orgânica de Hg é formada através de reações do mercúrio inorgânico, por um mecanismo de metilação bacteriana



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

sendo que esse composto se acumula no organismo em maior grau que as outras formas (JINADASA *et al.*, 2014) e é facilmente absorvido e transportado pelos tecidos (BERNARDI, TIRLONI & CATTANEO, 2015) podendo ser convertido em metilmercúrio (MeHg) que é a sua forma química mais tóxica existente.

O consumo de peixes tem sido considerado como principal via de contaminação do homem por compostos de mercúrio, caracterizando-se como fonte de diversos problemas à saúde humana (BURGER *et al.*, 2013).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras e reagentes

Foram adquiridas 49 amostras de pescados, de 12 espécies diferentes, em restaurantes de Campinas, SP. Dentre elas estão presentes as espécies: Salmão (*Salmo salar*), (n=5), Robalo (*Centropomus sp.*)(n=3), Atum (*Thunnus thynnus*) (n=4), Espada (*Trichiurus lepturus*) (n=4), Bicuda (*Cynoscion microlepidotus*) (n=4), Buri (*Seriola lalandi*) (n=2) Polvo (*Octopus vulgaris*) (n=4), Anchova (*Ruvettus pretiosus*) (n=3), Dourada (*Brachyplathystoma flavicans*) (n=3), Tainha (*Mugil platanus*) (n=4), Agulhão (*Xiphias gladius*) (n=3) e Namorado (*Pseudopercis numida*) (n=3). Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico. A água foi purificada (18,2 mohms/cm) utilizando um sistema de osmose reversa (Gekara, São Paulo, Brasil). Para a extração do MeHg (oHg) foi usado tolueno (Synth, Diadema, Brasil); solução de HCl a 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e solução de L-cisteína a 2,5% (Sigma, Steinheim, Alemanha).

Com relação à origem das 12 espécies de pescado comercializadas nos restaurantes, informações foram obtidas através da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), que é uma empresa pública vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A localização mais provável de pesca das amostras de pescado utilizadas neste estudo foram: espécies de Agulhão, Anchova, Dourada, Espada, Tainha, Namorado e Buri procedentes da costa Sul e Sudeste do Brasil; Robalo proveniente do litoral Nordeste; o Salmão do Chile (Oceano Pacífico); o Atum e o Polvo provém principalmente de regiões costeiras do Sudeste e Sul; e a Bicuda da região Norte do Brasil.



2.2 Instrumentação

Para a determinação das espécies orgânicas de Hg as amostras de peixe foram submetidas a um procedimento de extração em sistema fechado assistido por micro-ondas (Start D, Milestone, Sorisole, Itália) e para a determinação do oHg e tHg foi usado um espectrômetro de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) (DMA-80, Milestone srl, Itália).

2.3 Curvas analíticas

As curvas analíticas para a determinação do Hg foram preparadas a partir de solução padrão certificada de mercúrio contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemanha) em solução 0,5% (v/v) de HNO₃ purificado em sistema sub-boiling (Distillacid, Berghof, Alemanha). As curvas analíticas foram construídas em duas células de detecção do analisador de Hg DMA-80 nas seguintes faixas de concentração conforme a sensibilidade das celas: faixa baixa: 0,5 a 50 µg kg⁻¹ e faixa alta: de 100 a 1000 µg kg⁻¹.

2.4 Validação dos métodos analíticos

A validação dos métodos analíticos foi realizada com base nas recomendações do INMETRO (2011) e consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: precisão, linearidade das curvas analíticas, exatidão (usando materiais de referência certificados e testes de recuperação) e sensibilidade (limites de detecção e quantificação).

2.5 Determinação do tHg

As amostras de pescado foram homogeneizadas em processador doméstico até obtenção de uma massa uniforme. Na sequência foram pesadas no analisador de mercúrio (TDA AAS) em barquinhas de níquel. A massa pesada, variou de 60 a 100 mg em função do tipo de amostra de pescado. As condições analíticas otimizadas do analisador de Hg DMA-80 foram: temperatura de secagem à 200°C por 60s; temperatura de decomposição à 600°C por 180s, temperatura de dessorção à 850°C e detecção a 253,7 nm.

2.6 Determinação do oHg

Para a análise do oHg as amostras de peixe foram submetidas a um procedimento de extração em sistema fechado assistido por micro-ondas, usando o solvente orgânico tolueno em meio ácido. Nos vasos de extração de teflon PFA foi pesado, em balança analítica, 1 g do pescado



homogeneizado, sendo em seguida adicionados: 8 mL de tolueno, 1 mL de água desmineralizada e 0,75 mL de solução de HCl 30% (v/v). Os vasos foram fechados e transferidos para o extrator de micro-ondas usando o seguinte programa, com aplicação de potência de 1000 W: (a) temperatura ambiente a 110°C por 10 min; (b) mantido a temperatura constante de 110°C por 5 min. Após resfriamento, os vasos foram abertos, sendo retirada uma alíquota de 4 mL da fase orgânica e transferido este volume para um tubo falcon contendo 2 mL de uma solução 2,5% de L-cisteína. Após agitação manual, a solução foi centrifugada durante 6 min a 3500 rpm. Para a determinação da fração do oHg no analisador DMA, pesou-se, em balança analítica, 100 µg da fase aquosa contendo L-cisteína-oHg em uma barquinha de quartzo. As condições otimizadas de leitura no analisador de Hg foram: temperatura de secagem da amostra 120°C por 60s; temperatura de decomposição 300°C por 180s; temperatura de dessorção 850°C por 12s; medida da absorbância em 253,7 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na validação do método para oHg e tHg foram: LOD (3s) = 2,0 µg kg⁻¹ e 0,4 µg kg⁻¹ e LOQ (10s) = 6,6 µg kg⁻¹ e 1,4 µg kg⁻¹, respectivamente; sendo “s” o valor de desvio-padrão obtido para 7 repetições analíticas de uma amostra de pescado com baixa concentração de Hg. As curvas analíticas apresentaram linearidade ($r^2 > 0,999$) nas faixas de concentração utilizadas. A exatidão foi avaliada usando um material de referência certificado de proteína de peixe (NCR DORM-4) com valores certificados de 354 ± 31 µg kg⁻¹ para metilmercúrio e 412 ± 31 µg kg⁻¹ para mercúrio total. Os valores obtidos experimentalmente foram 333 ± 22 µg kg⁻¹ para o metilmercúrio e 406 ± 15 µg kg⁻¹ para mercúrio total. Ensaio de recuperação para MeHg em três níveis de fortificação (10, 100 e 1000 µg kg⁻¹) apresentaram recuperação do método entre 94 e 111% e não foi observado interconversão entre as espécies de Hg. A precisão do método avaliada em dois dias distintos com um total de 16 repetições analíticas foi de 9% e 5,5% para metilmercúrio e mercúrio total, respectivamente.

Os resultados obtidos nas análises de mercúrio orgânico e total presentes nas amostras de pescado, coletados em restaurantes da cidade de Campinas-SP estão apresentados na Tabela 1, onde se pode verificar as médias e intervalos para os valores de mercúrio total e orgânico, além da proporção entre a forma orgânica e a total do mercúrio presente em cada uma das espécies de pescado estudada. Neste estudo foram avaliadas entre 2 a 5 amostras para cada espécie de peixe conforme a disponibilidade para aquisição das amostras em restaurantes.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

As espécies de peixe que apresentaram os maiores níveis da forma química mais tóxica do Hg, ou seja, o mercúrio orgânico, foram o agulhão com um intervalo de 601 a 1336 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o atum com resultados que variam de 265 a 1339 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a Bicuda 200 a 687 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os menores teores foram encontrados nas amostras de tainha onde o valor não foi detectado (ND) e no salmão com resultados no intervalo de 6,1 a 10,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para oHg. As maiores razões entre mercúrio orgânico e mercúrio total (oHg/tHg) foram observadas para as espécies: namorado 93%; agulhão 85% e polvo com 87%.

Tabela 1. Número de amostras (N), valores médios e desvio padrão ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e intervalo de concentração obtidos para mercúrio total (tHg, em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e orgânico (oHg, em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e proporção oHg/tHg para as 12 espécies de pescado estudadas.

Peixe	N	tHg		oHg		oHg/tHg
		Média \pm DP	Intervalo	Média \pm DP	Intervalo	
Salmão	5	12,1 \pm 2,3	9,3 - 14,7	7,5 \pm 1,6	6,1 - 10,1	62%
Robalo	5	36 \pm 20	05 - 60	24 \pm 14	6,6 - 30	67%
Atum	5	902 \pm 704	312 - 1768	683 \pm 523	265 - 1379	76%
Espada	4	189 \pm 144	109 - 406	145 \pm 116	79 - 319	77%
Bicuda	5	743 \pm 286	308 - 1035	476 \pm 181	200 - 687	64%
Polvo	5	130 \pm 96	69 - 301	113 \pm 83	59 - 260	87%
Anchova	5	516 \pm 156	334 - 732	332 \pm 104	191 - 355	64%
Dourada	3	124 \pm 39	88 - 165	67 \pm 29	48 - 101	54%
Tainha	4	4,4 \pm 2,3	2,2 - 7,5	ND	ND	ND
Buri	2	322 \pm 260	138 - 506	230 \pm 175	105 - 353	71%
Namorado	3	477 \pm 44	426 - 505	442 \pm 20	419 - 458	93%
Agulhão	3	1011 \pm 481	677 - 1562	856 \pm 416	601-1336	85%

N= número de amostras analisadas de cada espécie. ND=não detectado, menor que 6,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Segundo a Legislação Internacional (Codex Alimentarius) (WHO, 2015) os valores máximos permitidos de metilmercúrio que podem estar presentes em peixes, sem causar danos à saúde do consumidor é de 1 mg kg^{-1} para peixes considerados predadores (agulhão, atum e peixe espada) e 0,5 mg kg^{-1} para peixes não predadores, que não estão situados no topo da cadeia (salmão, polvo, bicuda, anchova, robalo, tainha, buri e namorado).



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Através da análise das médias dos resultados obtidos de oHg verificou-se que os peixes considerados predadores desse estudo, o agulhão, o atum e o peixe espada, apresentaram teores médios inferiores ao limite máximo permitido pela legislação internacional (WHO, 2015), no entanto esperava-se níveis superiores deste contaminante uma vez que estes são encontrados em níveis tróficos mais altos e, geralmente, estas espécies permitem maior bioacumulação do contaminante Hg. Este fato provavelmente está relacionado a idade do peixe no momento de sua coleta e ao ambiente aquático onde o peixe se desenvolveu.

A Legislação Brasileira, RDC 42/2013 (Brasil, 2013) estabelece limites máximos de mercúrio somente para tHg (0,5 mg kg⁻¹ para peixes não predadores e 1,0 mg kg⁻¹ para peixes predadores). Foram obtidos valores de tHg acima do máximo estabelecido pela legislação brasileira em 3 espécies de peixe: Agulhão apresentando teor médio de tHg = 1011 µg kg⁻¹ (predador), Bicuda com média de 743 µg kg⁻¹ e Anchova com tHg = 516 µg kg⁻¹ (não predadores).

Os resultados obtidos mostraram que a média da proporção entre oHg/tHg variou de ND a 93% para as 12 espécies de peixe avaliadas neste trabalho, indicando que existe a predominância da forma mais tóxica do Hg. No estudo de KUBALLA *et al.* (2011) sobre a presença de oHg e tHg foram obtidos valores próximos a este trabalho para a espécie anchova, sendo a razão oHg/tHg encontrada de 53%, enquanto para o atum e o salmão foi verificada proporção de 76%. No estudo de KEHRIG *et al.*, (2008), realizado na região da Amazônia, com *Cichla spp* (Tucunaré), a proporção de oHg para tHg encontrada foi superior a 70%, indicando que a forma orgânica é predominante no músculo dos peixes.

No estudo sobre o acúmulo de Hg em amostras de atum (*Thunnus albacares*), BOSCH *et al.* (2016) encontraram concentrações de tHg compreendidas num intervalo de 0,45 a 1,52 mg kg⁻¹. Já para o MeHg os valores variaram entre 0,23 a 1,24 mg kg⁻¹, que são próximos aos intervalos que foram encontrados no presente trabalho.

4 CONCLUSÃO

O método analítico usado para a extração do mercúrio orgânico nas amostras de pescado utilizando o sistema fechado assistido por micro-ondas e quantificação por espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação permitiu o uso de reduzido volume de reagentes químicos, concordando com princípios de “química verde”; apresentou alta eficiência de extração do oHg; redução do risco de contaminação e do tempo de análise. O estudo revelou que o peixe agulhão foi a espécie que apresentou os maiores teores para oHg e tHg, com valores



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

acima do máximo estabelecido pela legislação nacional. Outras amostras que apresentaram níveis relevantes de oHg foram: atum, bicuda e namorado. Esse estudo indicou que quando há ocorrência de mercúrio no peixe, a forma orgânica, que é considerada a mais tóxica, é a predominante.

5 AGRADECIMENTOS

À FAPESP (2012/19142-7) e ao CNPq (442025/2014) pelo apoio financeiro. B.S. Boer agradece ao CNPQ pela bolsa de IC e E.L. de Paiva agradece a CAPES pela bolsa de mestrado.

6 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, F.A.; NASCIMENTO, E.S.; CHASIN, A. (Caderno de Meio Ambiente) Aspectos Atualizados dos Riscos Toxicológicos do Mercúrio. **Tecbahia Revista Baiana de Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 87-104, 2001.

BERNARDI, C.; TIRLONI, E.; CATTANEO, P. Contenuto di metilmercurio in pesce spada, tonni e selacei: stima dell'esposizione sul consumatore italiano. **Industrie Alimentari**, v. 54, p. 5-12, 2015.

BOSCH, A. C.; O'NEILL, B.; SIGGE, G. O.; KERWATH, S. E.; HOFFMAN, L. C. Mercury accumulation in Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) with regards to muscle type, muscle position and fish size. **FoodChemistry**, v.190, p.351-356, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2013). **Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. (Resolução RDC 42, de 29 de agosto de 2013). Diário Oficial da União.

BURGER, J.; GOCHFELD, M.; JEITNER, C.; DONIO, M.; PITTFIELD, T. Sushi consumption rates and mercury levels in sushi: ethnic and demographic differences in exposure. **Journal of Risk Research**, v.16, n. 8, 1057-1075, 2013.

DURAN, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Assessment of trace metal concentrations in muscle tissue of certain commercially available fish species from Kayseri, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 4619-4628, 2014.

EL-MOSELHY, Kh.M.; OTHMAN, A.I.; EL-AZEM, H. Abd.; EL-METWALLY, M.E.A. Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 30, p. 1-9, 2014.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev.: 04, 1-20, jul. 2011.

JINADASA, B. K. K. K.; AHMAD, S. B. N.; EDIRISINGHE, E. M. R. K. B.; WICRAMASINGHE, I. Mercury content in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and swordfish (*Xiphias gladius*) and estimation of mercury intake. **Journal of Food Security**, v. 2, p. 23-36, 2014.

KEHRIG, DO A.H.; HOWARD, B.M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 68-76, 2008.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

KUBALLA, T.; MOELLERS, M.; SCHOEBERL, K.; LACHENMEIER D. W. Survey of methylmercury in fish and seafood from the southwestern German market. **European Food Research and Technology**, v. 232, p. 737–742, 2011.

WHO - World Health Organization. 2015. Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9 th Session New Delhi, India, 16 e 20 March. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf (Acessado em: 20.06.16).