



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CCQA**

TAINÁ ELISA DE MELLO LAZARINI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ELEMENTOS TRAÇO EM SARDINHA
ENLATADA**

**CAMPINAS
2018**

TAINÁ ELISA DE MELLO LAZARINI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ELEMENTOS TRAÇO EM SARDINHA
ENLATADA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Tainá Elisa de Mello Lazarini

Orientador: Marcelo Antônio Morgano

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Tainá
Elisa de Mello Lazarini e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano.

CAMPINAS

2018

Agência(s): Bolsa de mestrado - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

L431a Lazarini, Tainá Elisa de Mello.

Avaliação da presença de elementos traço em sardinha enlatada. Tainá Elisa de Mello Lazarini. / Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

78 f.

Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano. (orientador)

1. Contaminantes Inorgânicos. 2. Sardinha. 3. Mercúrio. 4. Cádmio. I. ITAL / CCQA - Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. II. Lazarini, Tainá Elisa de Mello. III. Título.

Key-words: Inorganic contaminants; sardine; mercury; cadmium.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marcelo A. Morgano; Adriana P.A. Bragotto; Elisabete S. Saron; Mateus H. Petrarca.

Data da Defesa: 29/06/2018

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Tainá Elisa de Mello Lazarini, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de junho de 2018.

Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano
ITAL (Presidente)

Profa. Dra. Adriana P.A. Bragotto
FEA-UNICAMP – titular

Dra. Elisabete S.Saron
ITAL – titular

Dr. Mateus H. Petrarca
FEA-UNICAMP – suplente

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ariane e Roberto, por me apoiarem em todas as minhas decisões, me darem todo o suporte e me incentivarem em busca dos meus sonhos.

À Ellen, minha irmã, que sempre me ajudou em tudo o que eu preciso e me incentivou sempre em todas as minhas decisões, o meu muito obrigada.

Ao meu orientador, Dr Marcelo Antônio Morgano, pela oportunidade, por confiar no meu trabalho, pela ajuda, paciência, compreensão, dedicação e por me orientar ao longo de toda a etapa do mestrado.

Ao time do laboratório de inorgânicos por todo apoio e ajuda sempre.

Aos amigos do mestrado pela amizade, companheirismo e incentivo.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela formação profissional. E aos pesquisadores e funcionários do CCQA por toda ajuda e colaboração.

Ao time do CETEA, por todo apoio nas análises das embalagens.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Recentemente observou-se um aumento no consumo de peixes e frutos do mar, devido a sua importância na dieta humana por serem considerados fonte de proteína, nutrientes, antioxidantes e ácidos graxos essenciais, como o ômega 3. Entre estes alimentos podemos citar a sardinha, que frequentemente é comercializada na forma enlatada e apresenta um menor custo quando comparada com os outros pescados enlatados. Neste alimento, os principais elementos e contaminantes inorgânicos que podem estar presentes na sua composição são: alumínio, arsênio, cádmio, chumbo, estanho, ferro, selênio e mercúrio (total e orgânico). Assim, este projeto teve como objetivos: i) desenvolver um método simples, rápido e de menor custo para a determinação de mercúrio orgânico e mercúrio total utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS); ii) determinar os teores de chumbo, cádmio, arsênio, alumínio, selênio, estanho, ferro e cromo usando um método analítico baseado na digestão ácida assistida por micro-ondas e quantificação por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES); iii) avaliar possíveis alterações no material utilizado nas embalagens das sardinhas enlatadas, tais como as reações de sulfuração negra e de corrosão e seus efeitos no alimento enlatado. Como resultados os teores de mercúrio e metilmercúrio em todas as amostras de sardinha enlatada brasileiras e internacionais apresentaram níveis inferiores ao máximo permitido pela legislação nacional. O Se apareceu em altos níveis em todas as amostras analisadas, podendo assim classificar a sardinha como fonte desse micronutriente essencial. Foram encontrados teores acima do limite máximo estabelecido pela legislação nacional para As, Cd e Cr, em 72%, 12% e 8% das amostras, respectivamente.

Palavras-chave: Contaminantes inorgânicos; sardinha; mercúrio, cádmio.

ABSTRACT

Recently, an increase in fish and seafood intake was observed by reason of its importance in the human diet as source of protein, nutrients, antioxidants and essential fatty acids, such as omega 3. Amongst these foods we can mention the sardine, which is often marketed in canned form and presents a low cost alternative to other canned fishes. In this food, the main elements and inorganic contaminants that may be present in its composition are: aluminum, arsenic, cadmium, lead, tin, iron, selenium and mercury (total and organic). Thus, this project aimed to: i) develop a simple, fast and low cost method for the determination of organic and total mercury by thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS); ii) determine lead, cadmium, arsenic, aluminum, selenium, tin, iron and chromium levels using an analytical method based on microwave assisted digestion and quantification by Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP OES); iii) evaluate possible modifications in the packaging material of canned sardines, such as black sulphuration and corrosion reactions and their effects in the canned food. As results, mercury and methylmercury contents in all Brazilian and international canned sardine samples were lower than the maximum permitted by national legislation. The Se at high levels in all analyzed samples, thus allowing the classification of sardine as a source of this essential micronutrient. Levels above the maximum limit established by national legislation for As, Cd and Cr were found in 72%, 12% and 8% of the samples, respectively.

Key words: Inorganic contaminants; sardine; mercury, cadmium.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	vii
INTRODUÇÃO	1
Referências Bibliográficas	2
Objetivo Geral	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 1	5
Revisão Bibliográfica	5
Sardinha	5
Contaminantes inorgânicos.....	7
Métodos analíticos para determinação de contaminantes inorgânicos.....	11
Estudos sobre a presença de contaminantes inorgânicos em sardinha.....	13
Embalagem	15
Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2	25
Metilmercúrio e selênio em sardinha: avaliação da razão molar e do efeito protetor na dieta	25
Resumo	25
1. Introdução	26
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Amostras, Reagentes e Soluções.....	27
2.2. Instrumentação.....	28
2.3. Determinação de Hg total e de MeHg.....	28
2.4. Determinação do Se.....	29
2.4.1. Curvas analíticas.....	30
2.4.2. Análises estatísticas.....	30
2.4.3. Cálculo da relação Se-HBV.....	30
2.5. Controle de qualidade analítico.....	30
3. Resultados e discussão.....	31
3.1. Mercúrio total (Hg), Mercúrio orgânico (MeHg) e Selênio (Se)	31

3.2. Razão molar Hg:Se, Se:Hg, relação Se-HBV.....	36
3.3. Cálculo da estimativa de ingestão de Se e exposição de Hg total e MeHg em sardinha.....	38
4. Conclusões.....	39
5. Referências.....	40
CAPÍTULO 3	46
Sardinhas enlatadas comercializadas no Brasil: caracterização da embalagem e níveis de Al, As, Cd, Pb, Cr, Sn e Fe.....	46
Resumo.....	46
1. Introdução.....	47
2. Materiais e Métodos.....	48
2.1. Amostras.....	48
2.2. Reagentes e padrões.....	49
2.3. Caracterização das embalagens.....	49
2.4. Instrumentação para determinação dos contaminantes inorgânicos.....	51
2.5. Digestão ácida usando um sistema fechado assistido por micro-ondas e quantificação dos contaminantes inorgânicos por ICP OES.....	51
2.6. Validação do método para determinação dos contaminantes inorgânicos usando um ICP OES.....	52
3. Resultados e discussão.....	52
3.1. Validação.....	52
3.2. Caracterização das embalagens metálicas.....	53
3.3. Alumínio, arsênio, cádmio, cromo, chumbo, estanho e ferro nas conservas de sardinha.....	56
3.4. Avaliação da estimativa de exposição a Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn pelo consumo de sardinha enlatada.....	60
4. Conclusões.....	62
5. Referências.....	63
CONCLUSÃO GERAL	68

INTRODUÇÃO

Os peixes são alimentos importantes na dieta humana e são considerados como fonte de proteínas, nutrientes, antioxidantes e ácidos graxos essenciais (ômega 3). Para que este alimento seja preservado, diferentes métodos de conservação podem ser aplicados, como: o congelamento, a salga, a decapagem ou a secagem. Uma maneira alternativa e mais comumente utilizada para sua preservação é através de conservas. Algumas espécies de peixes, como as sardinhas, têm sido amplamente comercializados para o consumo na forma enlatada. Este tipo de alimento pode conter em sua composição alguns elementos traço, como os contaminantes inorgânicos, que podem levar a exposição humana devido à presença destes componentes (Demirayak, 2011).

Segundo Suhaimi (2005) os contaminantes inorgânicos são considerados os que mais contribuem para a poluição do ambiente aquático devido a toxicidade e acumulação em organismos marinhos, sendo que não são facilmente biodegradáveis na natureza. A poluição por metais no mar é menos visível e direta do que outros tipos de poluição marinha, mas os seus efeitos sobre os ecossistemas e os seres humanos são intensos e muito extensos. São causados principalmente por descargas de efluentes por parte das indústrias, deposição atmosférica e derrames acidentais ocasionados por produtos químicos tóxicos.

De acordo com a Resolução 42/13 (Brasil, 2013) do Ministério da Saúde são estabelecidos limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, sendo que para pescados, os limites especificados são: 0,3 mg kg⁻¹ (chumbo); 0,1 mg kg⁻¹ (cádmio); 1,0 mg kg⁻¹ (arsênio); 0,5 mg kg⁻¹ (mercúrio total, pescado não predador) e 250 mg kg⁻¹ (estanho). Para os elementos selênio, cromo, cobre e zinco os limites máximos de tolerância são estabelecidos pelo Decreto 55871/65 da Anvisa, sendo 0,3 mg kg⁻¹; 0,1 mg kg⁻¹; 30,00 mg kg⁻¹ e 50,00 mg kg⁻¹, respectivamente (Brasil, 1965).

As embalagens metálicas também podem ser consideradas fontes de contaminação por metais aos alimentos pois podem promover a migração de alguns elementos, sendo o ferro, o cromo, o estanho e o alumínio os principais. Dessa forma, para que tenha um controle dos contaminantes inorgânicos, a Resolução 20/07 da Anvisa estabelece que os materiais metálicos utilizados nas embalagens não devem conter mais de 1% de impurezas constituídas por chumbo, arsênio,

cádmio, mercúrio, antimônio e cobre, considerados em conjunto. Sendo que o limite individual de arsênio, mercúrio e chumbo não deve ser maior do que 0,01% (Brasil, 2007).

Dentre os contaminantes inorgânicos, o arsênio, o cádmio e o chumbo, são prejudiciais para os rins, causando sintomas de toxicidade crônica e prejudicando a função do órgão, além de enfraquecerem a capacidade reprodutiva, favorecer a hipertensão, tumores e disfunção hepática. Em relação ao mercúrio, quando se tem exposição a níveis elevados do mesmo, pode afetar o cérebro, o coração, os rins e os pulmões e o sistema imune dos seres humanos. A toxicidade do mercúrio varia de acordo com a sua forma química, concentração, via de exposição e vulnerabilidade do indivíduo exposto. O mercúrio existe em três formas: metálico ou elementar; mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico, possuindo como principal representante o metilmercúrio. Dentre estas formas, o metilmercúrio é a forma mais preocupante, pois possui a capacidade de atravessar as barreiras placentárias e hematoencefálica, representando uma neurotoxina poderosa que pode afetar negativamente o cérebro em desenvolvimento (Yılmaz e Yılmaz, 2007).

Esses efeitos são muito preocupantes, bem como a maneira que esses contaminantes inorgânicos se acumulam e são transferidos através da cadeia alimentar para os seres humanos. Além disso, existem poucos estudos realizados no Brasil sobre a presença de contaminantes inorgânicos em sardinha enlatada, assumindo ser de extrema importância o estabelecimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar essas formas de contaminantes inorgânicos altamente tóxicas ao homem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (1965). Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691/1962. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

Brasil. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2007). Resolução RDC nº 20, de 22 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre disposições

gerais para embalagens, revestimentos, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

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, Brasília, DF.

Demirayak, A.; Kutbay, H. G.; kilic, D.; Bilgin, A.; Huseyinova, R. Heavy metal accumulation in some natural and exotic plants in Samsun city. *Ekoloji*, 20 (79), 1-11, 2011.

Suhaimi, F.; Wong, S. P.; Lee, V. L. L.; Low, L. K. Heavy metals in fish and shellfish found in local wet markets. *Singapore Journal of Primary Industries*, 32, 1-18, 2005.

Yilmaz, A. B.; Yilmaz, L. Influences of sex and seasons on levels heavy metals in tissues of green tiger shrimp. *Food Chemistry*, 101, 1664-1669, 2007.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivos o desenvolvimento de um método adequado, simples, rápido, de menor custo e suficientemente capaz para a determinação do teor de alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), estanho (Sn), ferro (Fe), selênio (Se), zinco (Zn) e mercúrio (total e orgânico) presentes em amostras de sardinha enlatada. Para a determinação do mercúrio (total e orgânico) será utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) e para a determinação do alumínio, arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, estanho, ferro, selênio e zinco a técnica de espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES). Além disso, este trabalho tem o objetivo de avaliar e verificar as possíveis alterações que podem ocorrer nas embalagens das sardinhas enlatadas e estocadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método simples, eficaz, de baixo custo e com menor consumo de reagentes para estudo de espécies de Hg (total e orgânico).
- Validar os métodos analíticos para o estudo de elementos traço como: linearidade, limites de detecção e de quantificação; precisão e exatidão.
- Determinar e quantificar níveis de alumínio, arsênio, cádmio, chumbo, cromo, estanho, ferro, selênio e mercúrio (total e orgânico) presentes em amostras de sardinha enlatada do comércio local e do exterior.
- Verificar por meio das razões molares entre selênio e mercúrio e da relação Se-HBV (*Health benefit value*) se existe efeito protetor do teor de selênio em relação à presença de mercúrio nas amostras de sardinha enlatada.
- Calcular a estimativa de exposição de alumínio, arsênio, cádmio, chumbo, cromo, estanho, ferro, selênio e mercúrio (total e orgânico) pelo consumo da sardinha enlatada.
- Caracterizar possíveis alterações da embalagem utilizada para conserva das sardinhas.
- Avaliar os resultados de acordo com os limites máximos permitidos pelas legislações.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sardinha

Com relação a nomenclatura dos seres vivos importantes para a pesca, destaca-se a família Clupeidae (clupeídeos), a qual inclui espécies do gênero *Sardina*, *Sardinops* e *Sardinella*, encontradas na Europa, nos oceanos Pacífico e Índico e nos mares tropicais e subtropicais, respectivamente. Por serem gêneros semelhantes, são considerados genericamente como sardinhas, as quais são peixes de pequeno porte, com corpo lateralmente comprimido e prateado, formam cardumes, habitam águas costeiras e entram em baías e estuários (Cergole e Neto, 2011).

No Brasil, predomina a espécie *Sardinella brasiliensi*, considerada por Figueiredo e Menezes (1978) como a sardinha verdadeira, que se distribui na costa sudeste, desde o Cabo de São Tomé, no Rio de Janeiro até o Cabo de Santa Marta Grande, em Santa Catarina. A *Sardinella brasiliensi* é uma espécie que possui vida curta e crescimento rápido, apresenta altas taxas de fecundidade e de mortalidade naturais (Cergole e Neto, 2011).

A sardinha verdadeira possui hábito alimentar predominantemente planctofágico, sendo composto de fitoplâncton, copépodos e ovos de invertebrados (Kurtz, 1999). De acordo com Cergole e Valentini (1994), o ciclo de vida da mesma não ultrapassa quatro anos e possui indivíduos com tamanho máximo de 270 mm. Conforme foi observado por Saccardo e Rossi-Wongtschowski (1991) seu ciclo está associado ao pelagial, ou seja, é sensível às mudanças oceanográficas, sendo constatado que um aumento de temperatura, pode ocasionar a diminuição do habitat apropriado para a desova.

Segundo Matsuura (1998), as desovas ocorrem durante a primavera e o verão, principalmente entre dezembro e janeiro, período no qual são encontrados maiores quantidades de ovos e larvas. As mesmas ocorrem durante a noite, com tempo médio de eclosão de aproximadamente 19 horas e temperatura do oceano próxima de 24°C. O tamanho médio dos ovos é de aproximadamente 1,20 mm

(Saccardo e Rossi-Wongtschowski, 1991). Este ciclo de vida da sardinha verdadeira está representado na Figura 1.



Figura 1. Ciclo de vida da Sardinha Verdadeira

Fonte: Soares (2009)

Devido à falta de hábito, preço elevado de algumas espécies de peixes e a falta de praticidade na elaboração do mesmo, muitos brasileiros ainda resistem em escolher os pescados para sua dieta, quando comparados com países como China e Japão, que devido a sua cultura possuem o hábito de comer grande quantidade de pescados. No entanto, o interesse dos brasileiros por peixes de água doce e salgada tem apresentado um aumento significativo, devido aos seus benefícios nutricionais, como alto teor de ácidos graxos essenciais, proteínas de boa qualidade e baixo teor de colesterol, além da crescente popularização da culinária japonesa nos quais os pescados estão presentes em diversos pratos, como sashimis, sushis, temakis (Widjaja *et al.*, 2009).

Dessa forma, o consumo de pescado por brasileiros está crescendo cada vez mais, de acordo com os dados do Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014). Em 2001 a média do consumo de peixes no Brasil era 6,79 kg por habitante ao ano, no entanto, em 2014, o consumo alcançou 11 kg por habitante ao ano, valor muito próximo do recomendado pela FAO (2016), que indica o mínimo de consumo de pescado de 12 kg por habitante ao ano. Esse crescimento é de extrema importância,

pois além de favorecer à saúde da população, incrementa o desenvolvimento da atividade pesqueira no Brasil.

De acordo com um levantamento realizado pelo Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014), em 2006, a produção mundial de pescado e da aquicultura atingiu aproximadamente 144 milhões de toneladas, sendo que 110 milhões deles foram destinados ao consumo humano. Desse total, 5,2 milhões de toneladas foram destinados ao enlatamento. Sendo assim, a sardinha representa 10% do total, com 0,5 milhões de toneladas. Com relação ao mercado brasileiro, observa-se um perfil diferente do mundial, no qual a sardinha representa 78% do total dos produtos enlatados. Em 2010, o mercado nacional de sardinha enlatada foi de 60.000 toneladas, o que é equivalente a 480 milhões de latas de 125 g (Gonçalves, 2011).

Contaminantes inorgânicos

Os contaminantes inorgânicos são substâncias que estão em constante investigação e discussão científica, devido a sua ocorrência em alimentos e pela importância para a saúde humana. Dependendo da concentração em que são ingeridos podem ser altamente tóxicos, implicando que sejam estabelecidas avaliações de risco para evitar seus efeitos indesejáveis a saúde. Uma dessas medidas é denominada de PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake), a qual corresponde a ingestão semanal tolerável provisória para contaminantes que podem acumular-se no corpo humano ao longo de um período de tempo. O uso do termo "provisório" expressa a natureza experimental da avaliação, tendo em vista a escassez de dados confiáveis sobre as consequências da exposição humana à esses contaminantes. O termo PMTDI (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake) é equivalente a máxima dose diária tolerável provisória para o consumo dos contaminantes. Já o termo PTMI (Provisional Tolerable Monthly Intake) corresponde a exposição mensal permitida a um contaminante que está inevitavelmente associado a alimentos que são saudáveis e nutritivos. Esta é uma medida indicada para quantificar os contaminantes alimentares com propriedades cumulativas e que tenham uma meia-vida muito longa no corpo humano, como exemplo desta categoria de contaminante, pode-se citar o cádmio. Para alguns contaminantes inorgânicos, como o arsênio, foi estabelecida a medida BMDL₀₅ (Benchmark Dose

Lower Limit), a qual refere-se a dose de referência para um contaminante com uma incidência de 5 ou 10% de um efeito indesejado causado pelo mesmo. Dentre os contaminantes inorgânicos existentes, os prováveis que se destacam por poderem estar presentes na sardinha enlatada são o alumínio, o selênio, o arsênio, o cádmio, o chumbo, o estanho, o ferro, o cromo e o mercúrio (FAO-WHO, 2017).

O alumínio ocorre no ambiente na forma de silicatos, óxidos e hidróxidos, combinados com outros elementos, tais como os de sódio e de flúor, e na forma de complexos com a matéria orgânica (FAO-WHO, 2017). Seu excesso no organismo pode causar danos à saúde, possuindo relação com algumas doenças como a osteomalácia, a anemia microcítica, a esclerose amiotrófica lateral e o Mal de Alzheimer. A ligação do Al com a doença de Alzheimer ainda não foi totalmente comprovada (Chao, 2014). O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA (FAO-WHO, 2017) confirmou na 74ª reunião o valor de PTWI para o alumínio de 2 mg/kg peso corpóreo (pc), sendo que este valor aplica-se a todos os compostos de alumínio nos alimentos, incluindo os aditivos alimentares.

O selênio é um metal essencial para a nutrição humana. A função mais conhecida do mesmo é a de antioxidante, podendo ser associado com a enzima glutathione peroxidase, e assim atuar na detoxificação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos. É também conhecido como um agente protetor contra elementos tóxicos, doenças cardiovasculares e câncer. A deficiência do mesmo pode causar várias condições patológicas, no entanto, dependendo da sua concentração, este elemento também pode ser tóxico e acumulativo ao organismo (Ferreira *et al.*, 2002). A ingestão diária recomendada para o Se é de 55 µg/dia (Institute of Medicine, 2001).

O arsênio é um metalóide que ocorre normalmente na forma ligada a um mineral, sendo encontrado na crosta terrestre e pode estar disponível através de fontes naturais, como atividade vulcânica. Especialmente no ambiente marinho, o arsênio é frequentemente encontrado em altas concentrações em sua forma orgânica, estando presente em frutos do mar, incluindo algas, peixes, mariscos e crustáceos (FAO-WHO, 2017). Nos seres humanos, uma longa exposição ao arsênio pode causar câncer de pele, fígado, bexiga e rins. Além disso, pode causar o aparecimento de feridas na pele que não cicatrizam (Reilly, 2002). Foi estabelecido

pela FAO-WHO (2017) que a dose de referência $BMDL_{05}$ (Benchmark Dose Lower Limit) para o arsênio é de $3,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo.

O cádmio é lançado para o ar, terra e água pelas atividades humanas. No ambiente marinho, organismos como moluscos e crustáceos são acumuladores naturais de cádmio. Nos seres humanos, a absorção pulmonar do cádmio é maior do que a absorção gastrointestinal, estando relacionada com a forma de dieta e estado nutricional. Embora o cádmio se acumule na placenta, a transferência para o feto é baixa. A acumulação de cádmio no rim leva à disfunção renal, e se o mesmo for inalado em excesso, pode causar obstrução crônica das vias respiratórias. Foi estabelecido que a PTMI para o cádmio é de $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo (FAO-WHO, 2017).

O chumbo quando inalado por seres humanos tem cerca de 50% de absorção, resultando em uma ampla variedade de efeitos biológicos, dependendo do nível e duração da exposição. Sendo assim, pode ser responsável por efeitos hematológicos, neurológicos, comportamentais, renais, cardiovasculares e efeitos sobre o sistema reprodutivo. Vale ressaltar que a retenção do chumbo no corpo é maior em crianças do que em adultos, tornando-as mais vulneráveis a este contaminante (FAO-WHO, 2017).

Segundo a avaliação de risco do JECFA, da World Health Organization (FAO-WHO), em 2010, foi retirada a PTWI para o chumbo devido a estudos que demonstraram que o valor antes estabelecido ($25 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo) permitia a perda de 3 pontos no QI em crianças e um aumento de pressão arterial em adultos quando expostos ao Pb. Até o momento ainda não foi estabelecido um novo valor de PTWI, no entanto, o comitê de contaminantes do Codex revisou os limites máximos permitidos em diversos alimentos e foi estabelecido que o limite máximo para chumbo em peixes é de $0,3 \text{ mg}/\text{kg}$ (FAO-WHO, 2017).

O estanho pode existir nos estados de oxidação II e IV, no qual o estado II é mais instável e mais tóxico. Em geral, a contaminação do ambiente por estanho é rara. O alimento é a principal fonte de estanho para o homem, sendo que pode ser encontrado principalmente em alimentos enlatados. Os compostos de estanho de natureza orgânica podem ocorrer através da metilação do estanho inorgânico por microrganismos, convertendo estes compostos não tóxicos a compostos orgânicos tóxicos. Embora o estanho inorgânico seja pouco absorvido pelo trato

gastrointestinal, ele pode ser acumulado nos tecidos, e o tempo de meia-vida no organismo é considerado longo. Dessa forma, a espécie pode provocar problemas agudos no trato digestivo. Um longo tempo de exposição ao estanho pode causar dores abdominais, insuficiência renal, problemas no fígado, anemia e distúrbios gastrointestinais. Foi estabelecido que a PTWI para o estanho é de 14 mg/kg de peso corpóreo (FAO-WHO, 2017).

O cromo é um mineral traço essencial presente em pequenas proporções em alimentos como carne, cereais integrais, oleaginosas e leguminosas (Gomes; Rogero; Tirapegui, 2005). No entanto, seus efeitos nos seres humanos variam de acordo com a sua forma química presente no alimento. O cromo (III) atua em conjunto com a insulina, melhorando a tolerância à glicose. Além de ser funcional para o metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas. Porém, o cromo (VI), proveniente principalmente de processos industriais é altamente tóxico e de caráter cancerígeno (Khaniki; Zazoli, 2005). A Organização Mundial de Saúde (1998) sugere, dentro de um limite de segurança, que a ingestão média de cromo da população não deva exceder a 250 µg/dia.

O ferro é um elemento essencial para os seres humanos e utilizado na síntese de proteínas. É um constituinte natural dos alimentos de origem vegetal e animal, podendo também ser encontrado na água potável. Em muitos alimentos, pode ocorrer a presença dos óxidos de ferro, sais orgânicos, inorgânicos ou complexos orgânicos, como o ferro heme. Nos seres humanos, a ingestão de ferro em excesso pode resultar em cirrose no fígado, pâncreas, supra-renais, tireoide e no coração, dependendo da forma química. A PMTDI de ferro é de 0,8 mg/kg de peso corpóreo, sendo que esta medida aplica-se ao ferro proveniente de todas as fontes, exceto para os óxidos de ferro utilizados como corantes, ferro suplementar indicado para grávidas, lactantes e para necessidades clínicas específicas (FAO-WHO, 2017).

O mercúrio é um elemento metálico que ocorre naturalmente e pode estar presente em produtos alimentares por meio de causas naturais ou por contaminações industriais (FAO-WHO, 2017). É encontrado em três estados de oxidação, sendo eles o mercúrio elementar ou metálico, mercúrio inorgânico e diversas espécies orgânicas. Em relação aos compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico entre as formas metálicas, o qual é responsável pelos

danos mais severos à saúde, além de apresentar uma lenta eliminação. É um composto altamente tóxico, pois possui fácil penetração das membranas biológicas, eficiente bioacumulação e é altamente estável, sendo de difícil eliminação dos tecidos. A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais também facilita a sua passagem em quase 100% dos tecidos do corpo humano permitindo aumentar ainda mais o seu potencial tóxico (Vettori *et al.*, 2003). Foi estabelecido pela FAO-WHO (2017) que a PTWI para o mercúrio inorgânico é de 4 µg/kg de peso corpóreo e para o metilmercúrio é 0,0016 mg/kg de peso corpóreo.

Métodos analíticos para determinação de contaminantes inorgânicos

Para a determinação de contaminantes inorgânicos em alimentos existem diversos métodos analíticos disponíveis na literatura. Popovic *et al.* (2018), realizaram um estudo utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP MS) para a determinação de arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio em amostras de atum, sardinha e cavalinha. Para o preparo das amostras foi utilizada a técnica de digestão ácida assistida por micro-ondas.

Novakov *et al.* (2017) realizaram um estudo em pescados enlatados provenientes de supermercados da Sérvia, o qual foi utilizada a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP MS) para a determinação de chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio.

De acordo com a literatura, uma das técnicas que vem sendo muito usada para quantificar o teor de mercúrio total e orgânico é a espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) (Paiva *et al.*, 2016; Al-Mughairi *et al.*, 2013; Hosseini *et al.*, 2013; Shiber, 2011 e Ikem e Egiebor, 2005).

Senila *et al.* (2017) utilizaram um sistema de análise direta de mercúrio por espectrometria de absorção atômica por dessorção térmica para quantificação de Hg total e Hg orgânico em amostras de pescados. Para a determinação do mercúrio orgânico foi realizada uma extração líquido-líquido em duas etapas usando HBr, tolueno e L-cisteína. O método permitiu obter coeficientes de correlação superior a 0,999 para a curva analítica de Hg; limites de detecção de 0,2 µg kg⁻¹ para Hg total

e $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para metil-mercúrio. A exatidão do método foi de $100 \pm 9 \%$ para Hg total e $101 \pm 13 \%$ para metil-mercúrio.

No trabalho de Paiva *et al.* (2016) foi estudado Hg orgânico em amostras de sushi e os autores realizaram a extração do Hg orgânico em uma única etapa usando um sistema fechado assistido por micro-ondas, usando como solvente o tolueno em meio ácido e a quantificação do Hg orgânico foi realizada pela técnica de TDA AAS. O método permitiu obter para Hg orgânico e Hg total limites de detecção de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de quantificação de $6,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente; a linearidade das curvas analíticas apresentou coeficientes de correlação superiores a 0,999 e exatidão do método foi de $94 \pm 6 \%$ para Hg orgânico e de $95 \pm 4 \%$ para Hg total. Este método possui diversas vantagens, pois realiza a extração em uma única etapa e sem o uso de HBr, possuindo alta eficiência de extração, menor geração de resíduos, menor tempo de extração e redução no risco de contaminação e perda, quando comparado aos métodos convencionais em sistemas abertos.

Andayesh *et al.* (2015) determinaram o teor de mercúrio total em atum enlatado usando um analisador direto de mercúrio (DMA) com um simples preparo de amostra. Neste mesmo estudo, o autor também determinou os teores de chumbo, cádmio e arsênio nas amostras de atum, utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFA AAS) para determinação do chumbo e do cádmio e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS) para o arsênio.

Fonseca *et al.* (2009) e Suppin (2005) realizaram a determinação da concentração de mercúrio total em pescados utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS). Joiris, Holsbeek e Moatemri (1999) determinaram o teor de mercúrio total em amostras de sardinha enlatada por espectrometria de absorção atômica e o teor de mercúrio orgânico por cromatografia gás-líquido, usando uma coluna capilar e um detector por captura de elétrons.

Para o estudo dos contaminantes inorgânicos selênio, arsênio, cádmio, chumbo e estanho, a técnica de análise baseada na espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) foi utilizada por Ikem e Egiebor (2005). Para o preparo da amostra tem sido usada a digestão ácida

com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em sistemas empregando energia de micro-ondas (Yabanli, 2013). Essa mesma técnica também foi avaliada por Medeiros *et al.* (2012) e por Hosseini *et al.* (2013), os quais realizaram o estudo de elementos traço em peixes enlatados.

Yabanli (2013), Mol (2011) e Llobet *et al.* (2003) utilizaram a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP MS) para estudo de diversos contaminantes inorgânicos, como arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio e estanho em sardinha, atum e bonito enlatados.

Suppin (2005) e Shiber (2011) determinaram os teores de elementos traço, como mercúrio, cádmio, chumbo e arsênio utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFA AAS) em amostras de peixes frescos e peixes enlatados, como sardinha e atum.

Estudos sobre a presença de contaminantes inorgânicos em sardinha

Em um estudo realizado com sardinhas enlatadas provenientes dos mercados da Sérvia, foram analisadas 45 amostras das mesmas, sendo encontradas as concentrações médias, em mg kg^{-1} de: 1,70 para o As; 0,026 para o Cd; 0,048 para o Pb e 0,043 para o Hg. Os autores realizaram o cálculo para a avaliação de risco relacionado ao consumo da sardinha sendo encontrados valores de % de PTWI para os contaminantes inorgânicos correspondentes a 3,44% para o As; 0,06% para o Pb e 1,00% para o Hg e o valor de PTMI correspondente a 0,32% para o Cd (Popovic *et al.*, 2018).

Novakov *et al.* (2017) realizaram um estudo com 25 amostras de sardinha enlatada provenientes do Marrocos, da Croácia e da Rússia, sendo encontradas as concentrações média de $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Pb; $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Cd; $0,13 \text{ mg kg}^{-1}$ para o Hg e $1,20 \text{ mg kg}^{-1}$ para o As.

Yabanli (2013) determinou os teores de contaminantes inorgânicos no tecido muscular de Sardinhas (*Sardina pilchardus*) comercializadas em 4 mercados na Turquia. As médias dos valores encontrados, em mg kg^{-1} (base úmida) foram: 1,49 (As); 0,46 (Cd); 0,03 (Hg) e 0,14 (Pb). Com esses resultados o autor constatou que em apenas um dos mercados havia amostras em que o teor de Cd excedeu o teor máximo permitido ($0,05 \text{ mg/kg}$) pela legislação da Turquia. Já para o nível de

arsênio, pelo menos uma amostra de sardinha de cada mercado apresentou teor maior que o limite permitido (1,0 mg/kg) conforme estabelecido pela FSANZ (2003).

Amostras de sardinhas em conserva de 13 marcas procedentes do Canadá, Marrocos, Noruega, Polônia, Tailândia e Estados Unidos foram estudadas por Shiber (2011). Foram avaliados os contaminantes inorgânicos arsênio, cádmio e chumbo e os teores médios encontrados para as amostras, em $\mu\text{g g}^{-1}$ (base úmida) foram: 1,06 para o As; 0,03 para o Cd; 0,11 para o chumbo e entre não detectado e até 0,09 para o Hg.

Mol (2011) determinou teores de contaminantes inorgânicos em amostras de sardinha procedentes da Turquia, obtendo os valores mínimo e máximo, representados em mg kg^{-1} de: 0-0,113 (Cd); 0-0,158 (Sn); 0-0,223 (Hg); 0-2,875 (Pb) 0-89,015 (Fe). Os autores constataram que 15 de suas amostras de sardinha analisadas apresentaram concentrações de Fe mais elevadas do que o limite máximo permitido (15 mg kg^{-1}); para o Cd uma amostra excedeu o limite correspondente ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e para o Pb algumas amostras também excederam em relação ao valor máximo permitido ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Destacando a importância do controle de conservas de sardinha em relação a elementos tóxicos.

Em amostras de sardinha (*Sprattus sprattus*) procedentes da Áustria, Suppin (2005) avaliou a quantidade dos contaminantes inorgânicos Hg, Pb e Cd obtendo os seguintes resultados, em mg kg^{-1} (base úmida): de 0,014 para o Hg; 0,041 para o Pb; 0,012 para o Cd. Os autores realizaram uma comparação entre o valor de Hg encontrado na sardinha em seu estudo com o realizado por Sanzo *et al.* (2001), os quais avaliaram sardinhas (*Sardina pilchardus*) provenientes da Espanha encontrando o valor de $0,076 \text{ mg kg}^{-1}$, mostrando que os valores de concentrações apresentaram variações, porém nenhum deles excedeu o limite máximo permitido.

O teor de mercúrio total e metilmercúrio em duas espécies distintas de sardinha, a *Sardinella aurita* e a *Sardina pilchardus* oriundas de diversas regiões da Tunísia foram estudadas por Joiris; Holsbeek e Moatemri (1999). Os autores constataram que as médias dos teores de mercúrio da zona norte e da zona leste da Tunísia foram similares, representando $0,32 \mu\text{g g}^{-1}$ no músculo da *Sardinella aurita* e $0,41 \mu\text{g g}^{-1}$ no músculo da *Sardina pilchardus*, porém os teores encontrados na zona sul são significativamente menores, sendo $0,19$ e $0,26 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Além

disso, os autores observaram que o metilmercúrio está localizado principalmente no músculo, já o mercúrio inorgânico predomina no fígado das sardinhas.

Dados de ocorrência de contaminantes inorgânicos ainda são escassos para amostras de sardinha enlatada comercializadas no Brasil, sendo que nos últimos 10 anos foram encontrados dois estudos. No trabalho de Medeiros *et al.* (2012) foram avaliados os elementos traço alumínio, arsênio, cádmio, chumbo e selênio em amostras de sardinha e outros pescados procedentes do Rio de Janeiro, Brasil. Os autores encontraram nas amostras de sardinhas (*Sardinella brasiliensi*) valores médios, expressos em mg kg⁻¹ (base úmida) de: 0,05 (Se); 78,8 (Al); 1,0 (As); 0,01 (Cd) e 0,2 (Pb). Os autores constataram que em todas as amostras a concentração de alumínio foi significativamente alta.

Tarley *et al.* (2001) avaliaram a presença dos elementos traço cobre, ferro, manganês, zinco, estanho, cádmio, cromo e chumbo em sardinhas (*Sardinella brasiliensi*) comercializadas no Brasil. Neste estudo foram analisadas sardinhas de distintas marcas e conservas (óleo de soja e molho de tomate), sendo que os contaminantes que apresentaram maiores concentrações foram o Fe e Zn, variando de 20,96 - 88,83 µg g⁻¹ e 16,16-36,09 µg g⁻¹, respectivamente. Para os outros contaminantes analisados as concentrações variaram de: 1,31 - 2,25 µg g⁻¹ (Cu); 1,53 - 17,55 µg g⁻¹ (Mn); 2,07 - 4,57 µg g⁻¹ (Sn); de 0,19 - 0,38 µg g⁻¹ (Cd), 0,46 - 1,18 µg g⁻¹ (Cr) e 0,77 - 2,15 µg g⁻¹ (Pb). Os autores constataram que o conteúdo médio de Cd e Pb não apresentaram valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira, no entanto as concentrações de Pb observadas em uma das marcas analisadas estavam acima do limite permitido. Em relação as conservas, os autores constataram que todas as marcas de sardinhas enlatadas em molho de tomate apresentaram níveis comparativamente mais altos dos metais: cobre, zinco, ferro, manganês e estanho do que as respectivas marcas de conservas de sardinha em óleo de soja.

Embalagem

As embalagens dos alimentos são consideradas como fundamentais na conservação dos mesmos durante toda sua vida útil, garantindo que todo o esforço durante o processamento do alimento seja mantido até a chegada ao consumidor, resultando em um produto adequado ao consumo. Tem a função de proteger os

alimentos de fatores externos como oxigênio, radiação, umidade relativa, absorção de odores ou perda de aroma, perda de valor nutricional e contaminação microbiológica de forma a permitir que eles atinjam a vida útil declarada no rótulo (Gonçalves, 2011).

Quando se trata dos pescados, uma característica importante é a rapidez em que ocorre o processo de deterioração e conseqüente surgimento de odor característico não agradável dos mesmos *in natura* armazenados em geladeiras. Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias que gerem alternativas e praticidade no consumo dos peixes, sendo o produto enlatado uma das soluções mais utilizadas (Widjaja *et al.*, 2009).

O enlatamento é uma ótima alternativa no ramo da tecnologia de preservação do pescado para o consumo humano. De acordo com Gonçalves (2011), este processo abrange um intenso tratamento térmico, envolvendo etapas de cozimento e esterilização, modificando as características sensoriais do produto em questão. As principais espécies marinhas que têm sido comercializadas como produtos enlatados são: sardinhas, atuns, cavalinhas, arenques, mexilhões e salmões.

Um dos objetivos do enlatamento dos pescados se baseia no fornecimento de um produto de boa qualidade e que seja capaz de ser armazenado durante um tempo considerável, sendo uma ótima forma para transportar o produto pelas boas propriedades mecânicas da lata. Além disso, o tratamento térmico realizado nos produtos enlatados confere ao produto estabilidade sem que seja necessário a estocagem sob refrigeração (Gonçalves, 2011).

No Brasil, as indústrias oferecem esses produtos em diferentes formas de conserva, sendo a principal comercializada com a denominação de “ao natural” que é caracterizada por ser conservada em uma salmoura fraca; em óleo comestível e em molho de tomate. Dentre os diversos produtos enlatados produzidos, a sardinha destaca-se devido ao seu menor custo (Brasil, 2007).

Para o acondicionamento de sardinha em conserva são utilizadas, de modo geral, latas de duas peças, formadas apenas pelo corpo e tampa, podendo ser produzidas em folha de flandres, folha cromada ou alumínio (Dantas e Dantas, 2016; Dantas; Gatti; Saron, 1999).

A folha de flandres é caracterizada como um produto laminado plano, o qual é composto por aço de baixo teor de carbono, com um revestimento de estanho

comercialmente puro em ambas as faces por eletrodeposição. É um material formado por distintas camadas. Sobre o aço-base tem-se a camada da liga ferro/estanho e sobre a mesma está o revestimento de estanho livre, o qual é recoberto por uma camada de passivação, formada a partir de compostos de cromo. Este tipo de material possui boa resistência mecânica, capacidade de conformação do aço, resistência à corrosão e soldabilidade (Robertson, 2013; Dantas; Gatti; Saron, 1999).

A folha cromada é composta por aço de baixo teor de carbono, a qual é revestida em ambas as faces com camadas de cromo metálico e óxidos de cromo, aplicados por eletrodeposição, sendo protegida por uma película de óleo lubrificante. Com relação as suas vantagens, a mesma possui ótima aderência de vernizes e tintas, boa resistência à corrosão, resistência à ocorrência de marmorização, boas propriedades mecânicas para conformações diversas, mínima porosidade do revestimento (Robertson, 2013; Saron; Gatti, 1999).

As chapas de alumínio são compostas por uma camada de óxidos, os quais são formados naturalmente durante a produção. O alumínio apresenta ductilidade superior à folha de flandres e menor densidade em relação ao aço (Robertson, 2013).

Alguns recursos são utilizados com o objetivo de evitar o contato direto do metal com o produto alimentício, um deles é o envernizamento, que consiste na aplicação de um verniz orgânico por toda a superfície do metal. Este recurso permite o uso de folhas metálicas com menor revestimento de estanho ou mesmo de folhas não revestidas, reduzindo o custo da embalagem (Dantas; Gatti; Saron, 1999).

Sendo assim, para que o verniz aplicado na embalagem do alimento possua um bom desempenho, o mesmo depende da camada de revestimento, da aderência sobre a folha, do grau de cura, da porosidade e da flexibilidade. A camada e o tipo de verniz necessitam ser especificados em função do produto que será enlatado e em função dos processos de transformação mecânica que o material metálico envernizado passará. A aderência do verniz e o grau de cura estão diretamente relacionados com o tratamento térmico aplicado no processo de cura do revestimento. A porosidade do verniz pode estar relacionada ao tamanho da camada aplicada, a qual pode apresentar porosidade maior para camadas de revestimentos menores (Gatti, 1999).

De acordo com Gatti (1999), dentre os vernizes utilizados para embalagens que possuam contato com alimentos, são necessários alguns requisitos, tais como inércia química, resistência à esterilização ou à pasteurização (produtos termo processados), resistência aos ácidos orgânicos e resistência à sulfuração (produtos que contenham enxofre na sua composição).

Além disso, o processo de envernizamento minimiza as reações de interação da lata com o alimento, sendo elas as reações de sulfuração negra ou marmorização e corrosão. A sulfuração pode ocorrer internamente nas latas, devido a reação de produtos sulfurosos com o estanho ou ferro da folha metálica. É considerada um tipo de corrosão do material e ocorre, normalmente, durante o tratamento térmico do alimento, podendo estender até o armazenamento; não está relacionada à inadequação da embalagem, no entanto, é indesejada devido à aparência negativa, pois forma sulfetos coloridos (marrons, arroxeados ou negros) podendo levar a reação adversa do consumidor (Saron; Gatti, 1999).

A corrosão é conhecida como a deterioração do material, seja por ação física, química ou eletroquímica do meio, estando relacionada ou não a esforços mecânicos. Incluindo todos os processos químicos e eletroquímicos pelos quais um material metálico passa do estado elementar para o oxidado, causando alterações indesejáveis à substância, podendo torná-la inadequada ao uso (Gentil, 2007).

Dessa forma, a corrosão representa a tendência dos metais puros e ligas, se transformarem em compostos termodinamicamente mais estáveis, sendo que, em muitos casos, a deterioração se manifesta fisicamente nas embalagens, evidenciada por estufamento e perfuração. A corrosão pode ser acelerada pela presença de oxigênio e outros compostos, como o nitrato e o dióxido de enxofre (Mannheim; Passy, 1982).

O maior problema relacionado a corrosão das embalagens metálicas para conservação e fornecimento dos alimentos é a interação dos metais presentes nas embalagens com os alimentos, sendo que os elementos de maior importância e possibilidade de migração para os alimentos são o alumínio, o ferro, o estanho e o cromo, os quais são os principais constituintes dos materiais metálicos utilizados neste tipo de embalagem (Saron; Gatti, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Mughairi, S.; Yesudhasan, P.; Al-Busaidi, M.; Al-Waili, A.; Al-Rahbi, W. A. K.; Al-Mazrooei, N.; Al-Habsi, S. H. Concentration and exposure assessment of mercury in commercial fish and other seafood marketed in Oman. *Journal of Food Science*, 78 (7), T1082-T1090, 2013.

Andayesh, S.; Hadiani, M. R.; Mousavi, Z.; Shoeibi, S. Lead, cadmium, arsenic and mercury in canned tuna fish marketed in Tehran, Iran. *Food additives and Contaminants, Part B*, 8 (2), 93-98, 2015.

Anuário brasileiro da pesca e aquicultura. 1, 6-133, 2014.

Brasil. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2007). Resolução RDC nº 20, de 22 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre disposições gerais para embalagens, revestimentos, tampas e equipamentos metálicos em contato com alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.

Cergole, M. C.; Neto, J. D. Plano de gestão para o uso sustentável da sardinha-verdadeira do Brasil. *Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais Renováveis*, 2, 180, 2011.

Cergole, M. C.; Valentini, H. Growth and mortality of *Sardinella brasiliensis* in the southeast Brazilian Bight. *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 42 (1/2), 113-127, 1994.

Chao, H.; Guo, C.; Huang, C.; Chou, Y. Arsenic , Cadmium , Lead , and Aluminium Concentrations in Human Milk at Early Stages of Lactation. *Pediatrics and Neonatology*, 55 (2), 127–134, 2014.

Dantas, F.B.H.; Dantas, S.T. Canned food and packaging parameters. Reference Module in Food Sciences, First Edition, 1-5, 2016.

Dantas, S.T. Tipos de embalagens metálicas para alimentos e bebidas. In: Embalagens metálicas e a sua interação com alimentos e bebidas. Campinas: CETEA/ITAL. 2, 35-57, 1999.

Dantas, S. T.; Gatti, J. A. B.; Saron, E. S. Embalagens metálicas e sua interação com alimentos e bebidas. Campinas: CETEA/ITAL. 1, 1-33, 1999.

FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Program. CF/11 INF/1, 1-162, 2017.

FAO (2016). Fisheries and aquaculture topics. Statistics – Introduction. Topics fact sheets. In: FAO Fisheries and aquaculture department.

Ferreira, K. S.; Gomes, J. C.; Bellato, C. R.; Jordão, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. Revista Panamericana de Salud Pública, 11 (3), 172-177, 2002.

Figueiredo, J. L. de; Menezes, N. A. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia, 1, 110, 1978.

Fonseca, B. C.; Farias, L. A.; Curcho, M. R. M.; Braga, E. S.; Fávaro, D. I. T. Avaliação da concentração de elementos traço e de mercúrio total em pescados comercializados na cidade de Cubatão, estado de São Paulo. In: International Nuclear Atlantic Conference. Rio de Janeiro, 2009, p. 1-9.

FSANZ (2003). Food standards Australia New Zealand. The 20th Australian Total Diet Survey, 20, 1-47.

Gatti, J. A. B. Vernizes de vedantes. In: Embalagens metálicas e a sua interação com alimentos e bebidas. Campinas: CETEA/ITAL. 3, 61-75, 1999.

Gentil, V. Corrosão. LTC: Livros Técnicos e Científicos. Editora S. A. 5, 353, 2007.

Gomes, M. R.; Rogero, M. M.; Tirapegui, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 11 (5), 262-266, 2005.

Gonçalves, A. A. Tecnologia do pescado: Ciência e tecnologia, inovação e legislação. 1, 2-593, 2011.

Hosseini, S. V.; Aflaki, G.; Sobhanardakani, S.; Tayebi, L.; Lashkan, A. B.; Regenstein, J.M. Analysis of mercury, selenium, and tin concentrations in canned fish marketed in Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (8), 6407-6412, 2013.

Ikem, A.; Egiebor, N. O. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 771-787, 2005.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Food and Nutrition Board. Washington, DC: The National Academies Press, 2001.

Joiris, C. R.; Holsbeek, L.; Moatemri, N. L. Total and methylmercury in sardines *Sardinella aurita* and *Sardina pilchardus* from Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (3), 188-192, 1999.

Khaniki, G. R. J.; Zazoli, M. A. Cadmium and lead contents in rice (*Oryza sativa*) in the north of Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6, 1026-1029, 2005.

Kurtz, F. W. Dinâmica larval de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) (Teleostei, *Clupeidae*) na região sudeste do Brasil e implicações no recrutamento. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo. Instituto Oceanográfico. 169, 1999.

Llobet, J. M.; Falcó, G.; Casas, C.; Teixidó, A.; Domingo, J. L. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 838-842, 2003.

Mannheim, C.; Passy, N. Internal corrosion and shelf-life of food cans and methods of evaluation. *Food Science and nutrition*, 17 (4), 371-407, 1982.

Matsuura, Y. Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) spawning in the southeast Brazilian Bight over the period. *Revista Brasileira de Oceanografia*, 46, 33-43, 1998.

Medeiros, R. J.; Santos, L. M. G.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Braga, A. M.C. B.; Krauss, T. M.; Jacob, S. C. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control*, 23, 535-541, 2012.

Mol, S. Levels of heavy metals in canned bonito, sardines, and mackerel produced in Turkey. *Biological Trace Element Research*, 143, 974-982, 2011.

Novakov, N. J.; Mihaljev, Z. A.; Kartalovic, B. D.; Blagojevic, B. J.; Petrovic, J. M.; Cirkovic, M. A. Heavy metals and PAHs in canned fish supplies on the Serbian market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10, 208-215, 2017.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Cromo. In: *Elementos traço na nutrição e saúde humanas*. Roca. 135-138, 1998.

Paiva, E. L.; Milani, R. F.; Boer, B. S.; Alves, J. C. Quintaes, K. D.; Morgano, M.A. Sushi commercialized in Brazil: organic Hg levels and exposure intake evaluation. *Food Control*, 69, 115-123, 2016.

Popovic, A. R.; Dijnovic-Stojanovic, M. J.; Djordjevic, D. S.; Relic, D. J.; Vranic, D. V.; Milijasevic, M. P.; Pezo, L. L. Levels of toxic elements in canned fish from the Serbian markets and their health risks assessment. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 70-76, 2018.

Reilly, C. Metal Contamination of Food. Blackwell Science, 3, 1-259, 2002.

Robertson, G. L. Food Packaging Principles and Practice. CRC Press - Taylor & Francis Group, 686p., 2013.

Saccardo, S. A.; Rossi-Wongtschowky, C. L. D. B. Biologia e avaliação do estoque da sardinha *Sardinella brasiliensis*: uma compilação. Atlântica, 13 (1), 29-43, 1991.

Sanzo, J. M.; Dorronsoro, M.; Amiano, P.; Amurrio, A.; Aguinagalde, F. X.; Azpiri, M. A. EPIC group of Spain. Estimation and validation of mercury intake associated with fish consumption in an EPIC cohort of Spain. Public Health Nutrition, 4 (5), 981-988, 2001.

Saron, E. S.; Gatti, J.A.B. Materiais metálicos utilizados na fabricação de embalagens para alimentos e bebidas. In: Embalagens metálicas e a sua interação com alimentos e bebidas. Campinas: CETEA/ITAL. 1, 3-31, 1999.

Senila, M.; Covaci, E.; Cadar, O.; Ponta, M.; Frentiu, M. Frentiu, T. Mercury speciation in fish tissue by eco-scale thermal decomposition atomic absorption spectrometry: method validation and risk exposure to methylmercury. Chemical Papers, 72, 441-448, 2017.

Shiber, J. G. Arsenic, cadmium, lead and mercury in canned sardines commercially available in eastern Kentucky, USA. Marine Pollution Bulletin, 62, 66-72, 2011.

Soares, H.C. Estudo das condições atmosféricas e oceânicas do Atlântico Sudoeste e suas associações com extremos de captura da sardinha-verdadeira. Meteorologia, INPE. 147, 2009.

Suppin, D.; Zahlbruckner, R.; Krapfenbauer-Cermak, CH.; Hassan-Hauser, CH.; Smulders, F.J.M. Mercury, lead and cadmium content of fresh and canned fish collected from Austrian retail operations. Nutrition, 29 (11), 456-460, 2005.

Tarley, C. R. T.; Coltro, W. K. T.; Matsushita, M.; Souza, N. E. Characteristic Levels of Some Heavy Metals from Brazilian Canned Sardines (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 611-617, 2001.

Vettori, M. V.; Alinovi, R.; Belletti, S.; Goldoni, M.; Franchini, I.; Mutti, A. In vitro models for the evaluation of the neurotoxicity of methylmercury. Current State of knowledge. *Medicina Del Lavoro*, 94, 183-191, 2003.

Widjaja, W. P.; Abdulmir, A. S.; Saari, N. B.; Bakar, F. B. A.; Ishak, Z. B. Fatty Acids Profile of Tropical Bagridae Catfish (*Mystus nemurus*) During Storage. *American Journal of Food Technology*, 4, 90-95, 2009.

Yabanli, M. Assessment of the Heavy metal contents of *Sardina pilchardus* sold in Izmir, Turkey. *Ekoloji*, 22 (87), 10-15, 2013.

CAPÍTULO 2

METILMERCÚRIO E SELÊNIO EM SARDINHA: AVALIAÇÃO DA RAZÃO MOLAR E DO EFEITO PROTETOR NA DIETA

Tainá Elisa de Mello Lazarini^a, Raquel Fernanda Milani^a, Marcelo Antonio Morgano^a

^a Centro de Controle e Qualidade dos Alimentos (CCQA), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178, Brasil

RESUMO

A sardinha enlatada é considerada um peixe de alto consumo no Brasil devido a sua praticidade no preparo de alimentos, baixo custo e por ser fonte de nutrientes como ácidos graxos, ômega-3 e selênio. No entanto, em contrapartida a esses benefícios, este pescado pode ser capaz de acumular mercúrio, um elemento que possui alto nível de toxicidade, principalmente quando se encontra na forma de metilmercúrio. Alguns estudos tem demonstrado que o selênio pode proteger contra os efeitos tóxicos do mercúrio, principalmente do metilmercúrio, e esse balanço é avaliado por meio das razões molares entre selênio e mercúrio juntamente com a relação Se-HBV (*Health benefit value*). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de mercúrio, metilmercúrio e selênio em 50 amostras de sardinha enlatada comercializadas no Brasil, considerando diferentes marcas e conservas de óleo e molho de tomate e em 13 amostras internacionais. Para a determinação de Se foi utilizado o método de digestão ácida assistida por micro-ondas com quantificação por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo; e para o mercúrio e metilmercúrio a técnica de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação. Os resultados médios obtidos variaram entre: 12,6 e 65,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Hg; <3,7 e 45,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para metilmercúrio e 310 e 1370 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Se para as amostras brasileiras e entre: 26,3 e 98,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Hg; <3,7 e 47,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para metilmercúrio e 439 e 887 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Se para as amostras internacionais. Todas as amostras apresentaram níveis de Hg e metilmercúrio inferiores aos limites máximos permitidos pelas legislações vigentes,

sendo a proporção máxima entre metilmercúrio/Hg encontrada de 96%, indicando que a forma mais tóxica de mercúrio, o metilmercúrio, predomina na sardinha enlatada. Em relação ao selênio, o valor médio para as conservas brasileiras foi de $790 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o consumo de aproximadamente metade de uma lata de sardinha, de ambas as conservas, corresponde a 100% da ingestão diária recomendada, podendo classificar a sardinha como fonte desse micronutriente essencial. O índice Se-HBV e as razões molares Hg:Se e Se:Hg para todas as amostras de sardinha estudadas indicam que os níveis de selênio em relação a presença de mercúrio são suficientes para proporcionar um efeito protetor para o consumo de sardinha enlatada.

Palavras-chave: sardinha, mercúrio, selênio, Se-HBV.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são capazes de acumular concentrações significativas de mercúrio (Hg) em seus tecidos, sendo considerados uma das principais fontes deste metal tóxico para os seres humanos^[1]. O Hg é distribuído no meio ambiente por atividades industriais e pelo processo natural, sendo que a intensidade de acúmulo de Hg nos tecidos dos peixes está relacionada principalmente a concentração deste elemento no meio ambiente^[2]. O Hg é encontrado em três estados de oxidação, Hg elementar ou metálico, Hg inorgânico e espécies orgânicas, como metilmercúrio (MeHg), os quais variam de acordo com suas rotas de exposição, metabolismo dentro do corpo e toxicidade^{[3], [4]}.

O MeHg é um neurotóxico facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal e quando distribuído pelo corpo e tecidos^[5] é capaz de ocasionar danos ao sistema nervoso central, principalmente nos fetos de mulheres grávidas^[6]. Baseando-se em estudos epidemiológicos, foi estabelecida uma ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo para o MeHg e de $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo para o Hg^[7].

Em contrapartida, é importante destacar que os peixes são fontes de nutrientes essenciais, como proteínas, ácidos graxos (ômega 3), vitaminas e minerais^[8], sendo que o selênio possui característica antioxidante, protegendo contra os danos causados pelos radicais livres^[4]. Os peixes representam uma das

melhores fontes de Se na dieta humana, pois acumulam quantidades consideráveis deste elemento^[9]. Em estudos realizados com peixes (sardinha, atum e peixe espada), a sardinha foi a espécie que apresentou um teor considerável de Se^{[10],[11],[12],[13]}.

Alguns estudos têm demonstrado que o Se pode atuar como antagonista do Hg, especialmente o MeHg, podendo diminuir ou eliminar sintomas de toxicidade. Raymond *et al.*^[14] avaliaram o conteúdo de Se em 1100 alimentos e constataram que as principais fontes de selênio dietético são provenientes de pescados e, embora o mercúrio também esteja presente nestes alimentos, o selênio é mais abundante na maioria das vezes. Alguns trabalhos mostram que a razão molar Hg:Se e a relação Se-HBV (*Health benefit value*) tem sido uma ferramenta útil para verificar o risco associado à ingestão de peixe^[15]. Squadrone *et al.*^[16] e Ralston *et al.*^[8] sugerem que a razão molar Se:Hg acima de um e um valor positivo para relação Se-HBV tem efeitos protetores contra os efeitos adversos do consumo de Hg, e quando a razão molar Se:Hg é menor que um, o risco da toxicidade aumenta.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo: i) avaliar os riscos e benefícios associados ao consumo de sardinha enlatada, considerando os teores de Se, Hg e MeHg e ii) estudar se o consumo da sardinha é saudável com base nas razões molares Hg:Se, Se:Hg e na relação Se-HBV. Foram estudadas amostras de sardinha comercializada no Brasil, Alemanha, Argentina, Canadá, Espanha, França, Marrocos, Portugal e Tailândia. O Hg e o MeHg foram determinados pela técnica de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) e o Se pela espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras, Reagentes e Soluções

Foram estudadas 50 amostras de sardinha enlatada, adquiridas em supermercados localizados no estado de São Paulo, Brasil, de 5 marcas distintas (A, B, C, D, E), armazenadas em dois tipos de conservas: em óleo (n=25) e em molho de tomate (n=25) e amostras da Alemanha (n=1; conserva em azeite), Argentina

(n=1; conserva em azeite), Canadá (n=1; conserva em óleo de soja), Espanha (n=2; ambas conservas em azeite), França (n=1; conserva em óleo extra virgem), Marrocos (n=3; conserva em óleo de girassol (2) e azeite), Portugal (n=3; conserva em molho de tomate, óleo de soja e azeite) e Tailândia (n=1; conserva em molho de tomate). Todas as amostras foram drenadas, separadas as escamas, espinhas e vísceras e homogeneizadas individualmente usando processador doméstico. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (-18°C) até o momento da análise.

Os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico ou superior. A água (18,2 MΩ cm) foi purificada por um sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil). Para a extração do MeHg foram utilizados: tolueno p.a. (Synth, Diadema, Brasil); solução de HCl 30% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e solução de L-cisteína 2,5% (m/v) (Sigma, Steinheim, Alemanha). Para determinação de Se foram utilizados: ácido nítrico 65 % (m/v) (Synth, Diadema, Brasil) purificado em um destilador sub-boiling (Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha); peróxido de hidrogênio 30% (m/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água purificada.

2.2. Instrumentação

Para a avaliação do teor de Hg total e de MeHg nas amostras de sardinha enlatada foi utilizada a técnica de TDA AAS usando um analisador de mercúrio direto (DMA-80, Dual Cell, Milestone, Sorisole, Itália) após extração por um extrator em sistema fechado assistido por micro-ondas (Start E, Milestone, Sorisole, Itália) em condições adaptadas de Paiva et al.^[17]. O teor de Se foi determinado usando um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES, 5100 VDV, Agilent Technologies, Tóquio, Japão) em condições adaptadas de Paiva et al.^[18].

2.3. Determinação de Hg total e de MeHg

Para a determinação do Hg total as amostras de sardinha homogeneizadas foram pesadas (100 mg) em barquinhas de níquel e transferidas para o analisador de Hg^[19].

Para a determinação do MeHg as amostras de sardinha foram submetidas ao processo de extração em sistema fechado assistido por micro-ondas, usando

tolueno em meio ácido. Foi pesado 1 g da sardinha homogeneizada nos vasos de extração de teflon PTFE, adicionados 8 mL de tolueno, 1 mL de água purificada e 0,75 mL de solução de HCl 30% (v/v). Para a digestão no extrator de micro-ondas foi usado potência de 1000 W e aquecimento até 110°C por 10 min e mantido nesta temperatura por 5 min. Após resfriamento, os vasos foram abertos, e uma alíquota de 4 mL da fase orgânica foi transferida para um tubo graduado contendo 2 mL de uma solução 2,5% (m/v) de L-cisteína. Após agitação, a solução foi centrifugada (Fanem, São Paulo, Brasil) durante 6 min a 3500 rpm. Para a quantificação de MeHg pesaram-se 100 mg da fase aquosa em uma barquinha de quartzo e utilizou-se condições otimizadas de leitura: 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 $\lambda=253,7$ nm. Os ensaios foram realizados em triplicata analítica.

2.4. Determinação do Se

Em frascos de teflon foi pesado 1 g do pescado seguido, adicionados 4 mL de ácido nítrico concentrado e mantido em repouso *overnight*. Para a digestão em sistema de micro-ondas foram adicionados 4 mL de água purificada, 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/v) e programa utilizando 1000W de potência nas seguintes faixas: (a) temperatura ambiente a 70°C por 5 min; (b) temperatura de 70°C a 120°C por 5 min; (c) temperatura de 120°C a 170°C por 5 min; (d) mantido a temperatura de 170°C por 25 min. O digerido foi diluído para 25 mL com água purificada e o teor de Se foi quantificado no ICP OES utilizando as seguintes condições otimizadas: potência da radiofrequência (RF = 1,20 kW); tempo de estabilização e de leitura (17 s); vazão de argônio e Ar auxiliar (12,0 e 1,0 L/min, respectivamente); nebulizador concêntrico (*seaspray*) com vazão de 0,60 L/min; número de leituras (3); visão axial do plasma e comprimento de onda $\lambda=196,026$ nm.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram realizados brancos analíticos.

2.4.1. Curvas analíticas

Para a determinação do Hg, as curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição de soluções padrão certificadas de mercúrio (1000 mg L⁻¹, Fluka, Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemanha) e selênio (1000 mg L⁻¹, Specsol, Quimlab, Jacareí, Brasil) em solução 0,5% (v/v) de HNO₃ purificado, nas seguintes faixas de concentração: 0,5 a 1000 µg L⁻¹ e 2,5 a 1000 µg L⁻¹, respectivamente.

2.4.2. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram avaliados usando a análise de variância (one-way ANOVA) e o teste post-hoc Tukey, com um nível de significância de 95% (p < 0,05), usando o programa XLSTAT (Addinsoft, Paris, França).

2.4.3. Cálculo da relação Se-HBV

Para o cálculo da relação Se-HBV (valor benéfico saudável de selênio) foi utilizado o cálculo proposto por Ralston et al.^[8]:

$$Se - HBV = \frac{([Se] - [Hg] \text{ ou } ([MeHg]))}{[Se] \times ([Se] + [Hg] \text{ ou } (MeHg))}$$

onde: [Se], [Hg] e [MeHg] correspondem às concentrações molares dos analitos.

O efeito protetor do selênio presente nas amostras de sardinha em relação ao mercúrio foi estimado através das razões molares Hg:Se e Se:Hg.

2.5. Controle de qualidade analítico

A validação dos métodos analíticos considerou as figuras de mérito: precisão, limites de detecção e de quantificação, exatidão e linearidade das curvas analíticas, conforme recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO^[20] sendo que os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como 3 e 5 vezes o valor de desvio-padrão obtido para 10 repetições analíticas de uma amostra de sardinha com baixo teor dos analitos e multiplicados pelo fator de

diluição das amostras (25x). A exatidão do método foi avaliada utilizando os materiais de referência certificados: Lobster Hepatopancreas (NRC TORT-2) para o Hg, MeHg e Se; e Oyster Tissue (NIST SRM 1566b) para o Se. Para o MeHg foi realizado ensaio de recuperação nos níveis de fortificação de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e as recuperações obtidas foram 105%, 89% e 100%, respectivamente. Todos os valores de recuperação obtidos satisfazem as condições recomendadas pela AOAC^[21] (80% - 110%). A linearidade das curvas analíticas foi determinada a partir do coeficiente de determinação, obtendo-se valores com $r^2 \geq 0,999$. A precisão do método foi avaliada a partir de repetições analíticas de uma amostra de sardinha, sendo realizadas 8 medidas em dois dias distintos e os resultados para Hg, MeHg e Se ficaram abaixo de 11%, atendendo a recomendação da AOAC^[21].

Tabela 1. Resultados obtidos na validação do método

Analito	Valores Certificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valores obtidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV (%)
Hg total	270 \pm 60 ^a	266 \pm 2	99 \pm 1	1,3	2,2	4,3
MeHg	152 \pm 13 ^a	161 \pm 5	106 \pm 3	2,2	3,7	5,4
Se	5630 \pm 670 ^a	5126 \pm 100	91 \pm 2	0,03	0,04	3,1
	2060 \pm 150 ^b	2028 \pm 21	98 \pm 1			

LOD = limite de detecção do método; **LOQ** = limite de quantificação do método; **CV** = coeficiente de variação. ^aMaterial de referência certificado (*Lobster Hepatopancreas* - NRC TORT-2); ^bMaterial de referência certificado (*Oyster Tissue* - NIST SRM 1566b).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Mercúrio total (Hg), Mercúrio orgânico (MeHg) e Selênio (Se)

Os resultados obtidos para o Hg, MeHg e Se presente nas amostras de sardinha enlatada comercializadas no Brasil estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados médios \pm desvio padrão (intervalo) para Hg total, MeHg, razão MeHg/Hg e Se para as amostras de sardinha enlatada comercializadas no Brasil

Marca	Sardinha conserva de óleo (n=25)				Sardinha conserva de Molho de Tomate (n=25)			
	Hg total ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg/Hg (%)	Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Hg total ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg/Hg (%)	Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
A	32 \pm 9 ^{ab} (24 - 45)	20 \pm 6 ^a (13 - 28)	60 \pm 7 (54 - 71)	958 \pm 13 ^a (920 - 1030)	34 \pm 16 ^a (16 - 58)	24 \pm 13 ^a (9 - 45)	67 \pm 9 (54 - 77)	912 \pm 71 ^a (840 - 1010)
	B	22 \pm 5 ^b (16 - 29)	4 \pm 1 ^a (<3,7 - 5)	22 \pm 9 (13 - 34)	446 \pm 36 ^b (410 - 500)	29 \pm 15 ^a (13 - 48)	18 \pm 9 ^a (7 - 31)	65 \pm 19 (44 - 96)
C		47 \pm 13 ^a (29 - 66)	28 \pm 17 ^a (<3,7 - 45)	52 \pm 27 (14 - 71)	960 \pm 371 ^a (600 - 1370)	32 \pm 14 ^a (21 - 56)	11 \pm 3 ^a (<3,7 - 14)	42 \pm 10 (31 - 53)
	D	29 \pm 6 ^{ab} (22 - 37)	7 \pm 3 ^a (<3,7 - 10)	22 \pm 8 (12 - 30)	644 \pm 220 ^{ab} (470 - 1000)	24 \pm 4 ^a (18 - 30)	10 \pm 4 ^a (4 - 14)	41 \pm 12 (21 - 51)
E		36 \pm 15 ^{ab} (18 - 60)	13 \pm 8 ^a (5 - 25)	33 \pm 12 (17 - 43)	912 \pm 222 ^a (630 - 1120)	48 \pm 10 ^a (34 - 59)	20 \pm 15 ^a (5 - 42)	44 \pm 28 (10 - 70)

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados mostraram diferença significativa, com nível de significância de 95%, para as marcas de um mesmo tipo de conserva. No entanto, considerando os dois tipos de conservas, os resultados não variaram significativamente - indicando que provavelmente a contaminação é própria da espécie e do local em que habita, sem alteração pelo tipo de conserva em que são armazenadas.

As amostras de sardinha enlatada com conserva em óleo apresentaram valores entre 16 e 66 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg); <3,7 e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MeHg) e 410 e 1370 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Se), enquanto que as amostras em molho de tomate de 13 e 59 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg); <3,7 e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MeHg) e 310 e 1070 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Se).

Em relação à proporção MeHg/Hg, os valores variaram entre 12 e 71% e 10 e 96% para as amostras em conservas de óleo e molho, respectivamente. Os valores médios para as conservas de óleo e molho foram de 39% e 52%, respectivamente, indicando que a o MeHg predomina em grande parte das amostras de sardinha enlatada analisadas.

Os resultados obtidos para o teor dos contaminantes inorgânicos Hg e MeHg foram avaliados com relação aos valores máximos estabelecidos pelas legislações do Brasil (Hg) [21] e as recomendações da FAO/WHO (MeHg)[7], respectivamente.

Para as duas espécies químicas estudadas, todas as amostras apresentaram valores inferiores aos limites máximos destes compostos em pescados, correspondendo a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o Hg ^[21] e MeHg ^[7].

Considerando o valor médio de Hg observado neste trabalho, o resultado obtido é similar aos reportados na literatura. O valor médio de Hg para as amostras de sardinhas comercializadas no Brasil foi de $33 \mu\text{g kg}^{-1}$, próximo ao encontrado por Panichev et al.,^[22] os quais analisaram sardinhas (*Sprattus sprattus*) enlatadas conservadas em óleo vegetal provenientes da Letônia e verificaram um valor médio de $27,7 \mu\text{g kg}^{-1}$. Yabanli ^[23] analisou sardinhas (*Sardina pilchardus*) comercializadas na Turquia obtendo um valor médio de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Olmedo et al. ^[24] analisaram sardinhas (*Sardina pilchardus*) comercializadas na Espanha obtendo um valor médio de $34 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Em relação ao MeHg, o valor médio para as amostras de ambas as conservas foi $16 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor inferior ao encontrado por Xu et al.^[25] que estudaram sardinhas comercializadas na China, da espécie *Sardinella jussiu*, encontrando valor médio de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para Se, o valor médio observado foi de $790 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor inferior ao obtido por Farias et al., ^[26] que encontraram um valor de $991 \mu\text{g kg}^{-1}$ em sardinhas da espécie *Triportheus elongatus*, comercializadas no Brasil.

A Tabela 3 apresenta uma comparação de diversos estudos realizados com amostras de sardinhas de 2002 até 2017.

Tabela 3. Teores de Hg total, MeHg e Se encontrados na literatura para amostras de sardinhas de diferentes origens.

Espécie	País	Analito ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Ref.
		Hg total	MeHg	Se	
<i>Sardinella brasiliensis</i> (óleo)	Brasil	33 (16 - 66)	15 (ND - 45)	784 (410 - 1370)	Presente
<i>Sardinella brasiliensis</i> (molho de tomate)		33 (13 - 59)	17 (ND - 45)	790 (310 - 1070)	Estudo
<i>Sardinella jussiu</i>	China	92	25	-	[25]
Sardinha	Portugal	-	59,4	-	[27]
<i>Sardinella sindesis</i>	Nigéria	100 (20 - 310)	-	-	[28]
<i>Sardina pilchardus</i>	Itália	40	-	-	[29]
Sardinha	Coréia	42 (30 - 54)	7 (3 - 15)	-	[30]
<i>Sardina pilchardus</i>	Turquia	490 (180 - 770)	-	-	[31]
<i>Sardina pilchardus</i>	Turquia	490 (180 - 770)	-	-	[31]
<i>Sardina pilchardus</i>	Espanha	40	-	-	[32]
<i>Sprattus sprattus</i>	Letônia	27,7	-	-	
Portuguese Sardine	Portugal	48	-	-	[22]
<i>Sardinops sagax</i>	África do Sul	18	-	-	
<i>Sardina pilchardus</i>	Espanha	-	-	279 (17-812)	[11]
<i>Sardina pilchardus</i>	Turquia	30 (10-50)	-	-	[23]
<i>Sardina pilchardus</i>	Marrocos	84	-	-	[33]
<i>Sardina pilchardus</i>	Espanha	34 (9-67)	-	-	[24]
Sardinha	Gana	(10 - 40)	-	-	[34]
<i>Clupeonella cultriventris</i> Cáspia	Irã	86 (0,3 - 408)	-	1887 (130 - 4500)	[35]
<i>Sardina brasiliensis</i>	Brasil	-	-	50 (4-200)	[36]
<i>Sardina pilchardus</i>	Espanha	10,2	-	268	[12]
Sardinha	Reino Unido	41 (12 - 104)	-	-	[37]
Sardinha	Portugal	18,2 (11,6 - 28)	-	-	[38]
<i>Sardinops melanostictus</i>	Japão	100	-	4100	[13]
<i>Sardina brasiliensis</i>	Brasil	127,8 (53 - 229,7)	49,9 (18 - 126,9)	-	[39]
<i>Tripurtheus elongatus</i>	Brasil	376	-	991	[26]
<i>Sardina pilchardus</i>	Libano	61,2	-	-	[40]
<i>Sardina pilchardus</i>	Valencia	40 (20 - 300)	-	-	[41]
<i>Sardina pilchardus</i>	Madri	250	230	1710	[10]
Sardinha	França	-	52	-	[42]
<i>Sardina pilchardus</i>	Espanha	(70-90)	-	-	[43]
<i>Sardinella longiceps</i>	Irã	3 (3-5)	2 (2-4)	-	[44]

Sardinha	Lisboa	30	-	-	[45]
<i>Sardina pilchardus</i>	Madri	300	280	1580	[46]
<i>Sardina pilchardus</i>	Itália	90	80	-	[47]
<i>Sardinella aurita</i>	Itália	(ND - 300)	(ND - 300)	-	[47]
<i>Sardina pilchardus</i>	Croácia	142	-	-	[48]
<i>Sardina pilchardus</i>	Croácia	208	-	-	[48]

* ND = Não detectado.

Observando a Tabela 3 é possível notar que os teores de Hg, MeHg e Se presentes nas sardinhas variam de acordo com a região e o país no qual são comercializadas, bem como em relação as espécies que pertencem. Para melhor compreensão e comparação dos valores encontrados para Hg, MeHg e Se presentes nas amostras de sardinha enlatada do Brasil foram adquiridas amostras do de 6 países: Alemanha, Argentina, Canadá, Espanha, França e Marrocos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações médias e intervalo de concentração para Hg, MeHg, razão em % de MeHg/Hg e Se em amostras de sardinhas de países distintos.

País (conserva)	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg/Hg (%)	Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Brasil (Óleo)	33 (16 - 66)	15 (<3,7 - 45)	39 (13 - 71)	784 (410 - 1370)
Brasil (Molho)	33 (13 - 59)	17 (<3,7 - 45)	52 (10 - 96)	790 (310 - 1070)
Alemanha (Azeite)	29 (26 - 30)	6 (6 - 6)	21 (21 - 21)	490 (469 - 528)
Argentina (Azeite)	69 (66 - 72)	22 (21 - 23)	32 (30 - 33)	770 (731 - 783)
Canadá (Óleo de soja)	37 (36 - 38)	19 (17 - 36)	52 (46 - 54)	500 (439 - 573)
Espanha (Azeite)	76 (56 - 95)	20 (4 - 39)	27 (5 - 51)	700 (547 - 861)
França (Óleo extra virgem)	43 (40 - 46)	9 (8 - 9)	21 (19 - 21)	670 (656 - 708)
Marrocos (Azeite/ Óleo de girassol)	39 (31 - 41)	4 (<3,7 - 6)	11 (5 - 15)	520 (474 - 566)
Portugal (Azeite/ Molho / Óleo de soja)	64 (42 - 98)	19 (<3,7 - 47)	30 (3 - 73)	550 (474 - 632)
Tailândia (Molho)	58 (56 - 60)	36 (35 - 36)	61 (60 - 62)	880 (874 - 887)

A amostra que apresentou a maior concentração de Hg foi comercializada na Espanha, conservada em azeite com valor médio de $76 \mu\text{g kg}^{-1}$, que vai de encontro com o valor encontrado por Falcó et al., ^[43] os quais analisaram sardinhas da espécie *Sardina pilchardus*, comercializadas também na Espanha, encontrando valores na faixa entre 70 e $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. MeHg e Se apresentaram concentrações

maiores na amostra adquirida da Tailândia, conservada em molho de tomate, com valores de $36 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $880 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Em relação a razão MeHg/Hg, apenas as amostras comercializadas na Tailândia, no Canadá e no Brasil conservadas em molho de tomate apresentaram valores médios maiores que 50%, indicando que a forma mais tóxica do Hg é predominante nas mesmas.

As amostras de sardinhas enlatadas comercializadas no Brasil são predominantemente da espécie *Sardinella brasiliensis*, as quais habitam principalmente as regiões de São Gonçalo do Sapucaí, MG, (Sudeste do Brasil) e de Navegantes, SC, (Sul do Brasil). Porém, em algumas épocas do ano onde existe uma grande demanda e a produção nacional não consegue atender são importadas sardinhas de outros países. Os resultados médios para Hg obtidos para as amostras de sardinha enlatada comercializadas no Brasil e de Marrocos apresentaram valores próximos, sendo $33 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $39 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Alguns estudos tem demonstrado que os níveis dos contaminantes inorgânicos podem variar de acordo com o país e região em que a espécie de peixe habita, devido provavelmente ao grau de poluição ambiental de uma determinada região. Este fato é evidenciado no trabalho de Obeid et al.^[40] que analisaram a presença de Hg em sardinhas de diversos locais do Líbano, verificando que as sardinhas que apresentaram maiores concentrações de Hg foram as provenientes de locais que continham uma das maiores usinas de energia de carvão, que liberam quantidades significativas de mercúrio e de locais que continham fábricas produtoras de cimento, demonstrando que embora a poluição seja generalizada, ela pode variar de acordo com a localização geográfica, afetando os organismos marinhos.

3.2. Razão molar Hg:Se, Se:Hg, relação Se-HBV

Para o cálculo das razões molares Hg:Se, Se:Hg e da relação Se-HBV, os valores médios das concentrações obtidos nas análises das amostras de sardinha enlatada foram divididos pelo peso molecular de cada respectivo elemento (Hg, MeHg e Se) e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5. Para a avaliação da segurança relacionada ao consumo de sardinha foram utilizados os parâmetros da relação Se-HBV e das razões molares Hg:Se e Se:Hg. De acordo com Ralston *et al.*^[8] um perfil geral saudável do alimento é observado nas seguintes

condições: i) razão molar Se:Hg superior a um; ii) razão molar Hg:Se inferior a um e iii) valor positivo para a relação Se-HBV.

Tabela 5. Concentração molar para [Se], [Hg], [MeHg], razão molar [Hg:Se], razão molar [Se:Hg] e relação Se-HBV obtidos para as amostras de sardinha enlatada analisadas.

País	[Se]*	[Hg]*	[MeHg]*	[Hg:Se]**	[Se:Hg]**	Se-HBV (Hg) e Se-HBV (MeHg)***
Brasil (Óleo)	9,9	0,2	0,07	0,02	60	10
Brasil (Molho)	10,0	0,2	0,07	0,02	61	10
Alemanha	6,2	0,1	0,03	0,02	43	6
Argentina	9,8	0,3	0,10	0,04	28	10
Canadá	6,3	0,2	0,08	0,03	34	6
Espanha	8,9	0,4	0,09	0,04	23	9
França	8,5	0,2	0,04	0,03	40	8
Marrocos	6,6	0,2	0,02	0,03	34	7
Portugal	7,0	0,3	0,08	0,05	22	7
Tailândia	11,2	0,3	0,16	0,03	39	11

*Concentrações molares; ** Razões molares; *** Se-HBV (Health Benefit Value) calculado conforme Ralston *et al.*^[8]

Para a avaliação da relação Se-HBV^[8] foram calculadas de duas maneiras, utilizando a razão molar de Hg e a razão molar de MeHg, sendo obtido os mesmos resultados para ambas as equações, comprovando um valor positivo da relação Se-HBV para as duas formas de Hg encontradas.

Avaliando resultados obtidos na Tabela 5 é possível observar que para todas as amostras de sardinha enlatadas os valores da razão Hg:Se são inferiores a um; os valores da razão Se:Hg são superiores a um e os valores da relação Se-HBV, calculada tanto por meio dos conteúdos de Hg quanto para os de MeHg, apresentam valores positivos, indicando um consumo seguro da sardinha com menor risco de ingestão do Hg, pois o teor de Se é alto, em nível suficiente para compensar efeitos tóxicos do MeHg^[8].

A caracterização da sardinha como um peixe de consumo saudável devido ao efeito protetor do Se em relação ao MeHg, também foi avaliada por Olmedo *et al.*^[11], os quais analisaram sardinhas enlatadas da espécie *Sardina pilchardus*,

comercializadas na Espanha. Os autores encontraram valor positivo para a relação Se-HBV (>1000) e valor superior a um (>100) para a razão molar Se:Hg. Calatayud et al.^[12] também avaliaram sardinhas comercializadas na Espanha e encontraram valores de 0,015 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a razão molar Hg:Se e o valor de 227 para a relação Se-HBV, ambos os estudos atendem os parâmetros necessários para classificar o consumo seguro da sardinha.

A relação Se-HBV pode ser considerada uma ferramenta prática e útil para avaliar os riscos relacionados à exposição ao mercúrio presente nas amostras de sardinha^[14]. Os resultados observados neste estudo está concorda com o estabelecido por Raymond et al. ^[14], que concluiu ser essencial que as proporções molares de Se e Hg em peixes marinhos sejam determinadas e integradas nas avaliações de risco relacionadas ao seu consumo. Além disso, o critério de avaliação Se-HBV pode também ser utilizado para estabelecer uma ordem de classificação de alimentos, sendo selecionados os considerados como fontes de selênio e, portanto, nutricionalmente benéficos à saúde.

3.3. Cálculo da estimativa de ingestão de Se e exposição de Hg total e MeHg em sardinha

Para o cálculo da estimativa de ingestão de Se pelo consumo de sardinha enlatada foi determinado o peso médio drenado das amostras de sardinha comercializadas no Brasil (84 g); considerado os valores médios obtidos para Se nas amostras de sardinha em conserva de óleo (784 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e molho (790 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e a ingestão diária de Se (34 $\mu\text{g}^{[49]}$). A partir destas considerações, o cálculo da estimativa de ingestão de Se revelou que o consumo de apenas 43g da sardinha (aproximadamente metade de uma lata) contribui com 100% da ingestão diária recomendada para o Se, indicando que a sardinha pode ser considerada como uma boa fonte deste micronutriente essencial.

Para o cálculo da avaliação da estimativa de exposição ao Hg inorgânico e MeHg presente nas amostras de sardinha foram considerados os valores médios de Hg inorgânico (obtido pela diferença entre os teores de Hg total e MeHg) e MeHg, 33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente; a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo para Hg inorgânico^[7] e de 1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso

corpóreo^[7] para MeHg; o peso médio drenado de uma lata de sardinha enlatada (84 g) e o peso corpóreo de adulto de 60 kg. Os valores mostraram que o consumo de uma lata de sardinha pode contribuir com apenas 0,6% e 1,4% da PTWI para Hg e MeHg, respectivamente - indicando uma pequena contribuição da sardinha na PTWI para Hg e MeHg.

4. CONCLUSÕES

- Foram encontrados altos teores de selênio nas amostras de sardinha do Brasil em níveis que permitem considerar a sardinha como fonte desse micronutriente essencial.
- Foi constatado que a presença de mercúrio nas amostras de sardinhas varia de acordo com a região e país em que habitam, podendo estar relacionado com o grau de poluição ambiental de cada local.
- O índice Se-HBV e as razões molares Hg:Se e Se:Hg determinadas neste trabalho indicam que os níveis de selênio presente nas amostras de sardinha enlatada são suficientes para proporcionar um efeito protetor do Se sobre os níveis das espécies de Hg.
- Todas as amostras de sardinha enlatada analisadas apresentaram valores inferiores ao limite máximo permitido para o Hg e MeHg. No entanto, a relação MeHg/Hg revelou que a forma mais tóxica do Hg, o MeHg, predomina em 52% das amostras brasileiras conservadas em molho de tomate e em 39% das amostras conservadas em óleo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (bolsa de mestrado de TEM Lazarini), ao CNPq (bolsa de produtividade de MA Morgano e auxílio financeiro CNPq 442025/2014-9). Letícia Carvalho de Sousa pelo auxílio nas análises.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Grandjean, P.; Satoh, H.; Murata, K.; Eto, K. Adverse effects of methylmercury: Environmental health research implications. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 1137–1145.
- [2] Kidd, K. A.; Stern, G.; Lemoalle, J. Mercury and other contaminants in fish from Lake Chad, Africa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *73*, 249–256.
- [3] Clarkson, T.W.; Magos, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 609–662.
- [4] Afonso, C.; Costa, S.; Cardoso, C.; Bandarra, N. M.; Batista, I.; Coelho, I.; Castanheira, I.; Nunes, M. L. Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model. *Food Chem.* **2015**, *170*, 249–256.
- [5] Clarkson, T. W.; Vyas, J. B.; Ballatori, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am. J. Ind. Med.* **2007**, *50*, 757–764.
- [6] Silbernagel, S. M.; Carpenter, D. O.; Gilbert, S. G.; Gochfeld, M.; Groth III, E.; Hightower, J. M.; Schiavone, F. M. Recognizing and preventing overexposure to methylmercury from fish and seafood consumption: Information for physicians. *J. Toxicol.* **2011**, *2011*, 1-7.
- [7] FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO Food Standards Program. CF/11 INF/1, 1-162, 2017.
- [8] Ralston, N. V. C.; Raymond, L. J. Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology.* **2010**, *278*, 112–123.
- [9] Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* **2008**, *400*, 115–141.

- [10] Cabañero, A.I.; 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.* **2007**, *119*, 195–211.
- [11] Olmedo, P.; Hernández, A. F.; Pla, A.; Femia, P.; Navas-Acien, A.; Gil, F. Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and mercury-selenium balance. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 299–307.
- [12] Calatayud, M.; Devesa, V.; Virseda, J. R.; Barberá, R.; Montoro, R.; Vélez, D. Mercury and selenium in fish and shellfish: Occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 2696–2702.
- [13] Yamashita, Y.; Amlund, H.; Suzuki, T.; Hara, T.; Hossain, M. A.; Yabu, T.; Touhata, K.; Yamashita, M. Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. *Fish. Sci.* **2011**, *77*, 679–686.
- [14] Raymond, L. J.; Ralston, N. V. C. Selenium's importance in regulatory issues regarding mercury. *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 1333–1338.
- [15] 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.* **2011**, *409*, 1418–1429.
- [16] Squadrone, S.; Benedetto, A.; Brizio, P.; Prearo, M.; Abete, M. C.; Mercury and selenium in European catfish (*Silurus glanis*) from Northern Italian Rivers: Can molar ratio be a predictive factor for mercury toxicity in a top predator? *Chemosphere.* **2015**, *119*, 24–30.
- [17] de Paiva, E. L.; Milani, R. F.; Boer, B. S.; Quintaes, K. D.; Morgano, M.A. Methylmercury in fish species used in preparing sashimi: A case study in Brazil. *Food Control.* **2017**, *8*, 104-112.
- [18] de Paiva, E. L.; Morgano, M. A.; Milani, R. F. Cadmium, lead, tin, total mercury, and methylmercury in canned tuna commercialised in São Paulo, Brazil. *Food Addit. Contam. Part B, Surveill.* **2017**, *10* (3), 185-191.

- [19] Morgano, M. A.; Milani, R. F.; Perrone, A. A. M. Determination of Total Mercury in Sushi Samples Employing Direct Mercury Analyzer. *Food Anal. Method.* **2015**, *8* (9), 2301-2307.
- [20] INMETRO, Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev.: 05, 1-31, 2016.
- [21] AOAC, Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2013.
- [21] Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013.
- [22] Panichev, N. A.; Panicheva, S. E. Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *166*, 432–441.
- [23] Yabanli, M. Assessment of the Heavy Metal Contents of *Sardina pilchardus* Sold in Izmir, Turkey. *Ekoloji.* **2013**, *22* (87), 10–15.
- [24] 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.* **2013**, *59*, 63–72.
- [25] Xu, X.; Wang, W. X. Mercury exposure and source tracking in distinct marine-caged fish farm in southern China. *Environ. Pollut.* **2017**, *220*, 1138–1146.
- [26] Farias, L. A.; Fávaro, D. I.; Santos, J. O.; Vasconcellos, M. B.; Pessoa, A.; Aguiar, J. P. L.; Yuyama, L. Cooking process evaluation on mercury content in fish. *Acta Amazonica.* **2010**, *40* (4), 741–748.
- [27] Jacobs, S.; Sioen, I.; Jacxsens, L.; Domingo, J. L.; Sloth J. J.; Marques, A.; Verbeke, W. Risk assessment of methylmercury in five European countries considering the national seafood consumption patterns. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, 1–9.

- [28] Ekere, N. R.; Ukoha, P. O.; Udeogu, U. V.; Ihedioha, J. N.; Agbazue, V. E. Human exposures and potential health hazard assessment of Hg and Pb in some major imported frozen fish species in Nigeria. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **2016**, *22* (2), 393–400.
- [29] Barone, G.; Storelli, A.; Garofalo, R.; Busco, V. P.; Quagliaa, N. C.; Centronea, G.; Storellia, M. M. Assessment of mercury and cadmium via seafood consumption in Italy: estimated dietary intake (EWI) and target hazard quotient (THQ). *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2015**, *32*, 1277–86.
- [30] Yang, H.R.; Kim, N. Y.; Hwang, L. H.; Park, J. S.; Kim, J. H. Mercury contamination and exposure assessment of fishery products in Korea. *Food Addit. Contam. Part B.* **2015**, *8* (1), 44–9.
- [31] Ozden, O.; Erkan, N. Evaluation of Risk Characterization for Mercury, Cadmium, Lead and Arsenic Associated with Seafood Consumption in Turkey. *Expo Heal.* **2016**, *8*, 43–52.
- [32] Zmozinski, A. V.; Carneado, S.; Ibáñez-Palomino, C.; Sahuquillo, À.; Lopez-Sanchez J. F.; Silva M. M. Method development for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in seafood. *Food Control.* **2014**, *46*, 351–359.
- [33] Chahid, A.; Hilali, M.; Benlhachimi, A.; Bouzid, T. Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *147*, 357–360.
- [34] Okyere, H.; Voegborlo, R. B.; Agorku, S. E. Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine. *Food Chem.* **2015**, *179*, 331–335.
- [35] Hosseini, S. V.; Aflaki, F.; Sobhanardakani, S.; Tayebi, L.; Babakhani Lashkan, A.; Regenstein, J.M. Analysis of mercury, selenium, and tin concentrations in canned fish marketed in Iran. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 6407–6412.

- [36] Medeiros, R. J.; Santos, L. M. G.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Braga, A. M. C. B.; Krauss, T. M.; Jacob, S. C.; Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State. *Food Control*. **2012**, *23*, 535–541.
- [37] Knowles, T. G.; Farrington, D.; Kestin, S. C. Mercury in UK imported fish and shellfish and UK-farmed fish and their products. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20* (9), 813–818.
- [38] Vieira, C.; Morais, S.; Ramos, S.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M. B. P. P. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 923–932.
- [39] Silva, C. A.; Tessier, E.; Kutter, T.; Wasserman, J. C.; Donald, O. F. X.; Filho, E. V. S. Mercury speciation in fish of the cabo frio upwelling, Se – Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* **2011**, *59* (3), 259–266.
- [40] Obeid, P. J.; El-Khoury, B.; Burger, J.; Aouad, S.; Aoun, A.; El-Nakati, J.H. Determination and assessment of total mercury levels in local, frozen and canned fish in Lebanon. *J. Environ. Sci.* **2011**, *23* (9), 1564–1569.
- [41] Yusà, V.; Suelves, T.; Ruiz-Atienza, L.; Cervera, M. L.; Benedito V.; Pastor, A. Monitoring programme on cadmium, lead and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Addit. Contam. Part B, Surveill.* **2008**, *1* (1), 22–31.
- [42] Roosen, J.; Marette, S.; Blanchemanche, S.; Verger, P. The effect of product health information on liking and choice. *Food Qual. Prefer.* **2007**, *18*, 759–770.
- [43] Falcó G.; Llobet J.M.; Bocio A.; Domingo J.L. Daily Intake of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead by Consumption of Edible Marine Species. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6106-6112.
- [44] Al-Reasi H. A.; Ababneh F. A.; Lean D. R. Evaluating mercury biomagnification in fish from a tropical marine environment using stable isotopes. *Environ Toxicol Chem.* **2007**, *26* (8), 1572–158.

[45] Lourenço H. M.; Afonso C.; Martins M. F.; Lino A. R.; Nunes M. L. Levels of Toxic Metals in Canned Seafood. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **2004**, *13* (3), 117-125.

[46] Cabañero A. I.; Madrid Y.; Cámara C. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal Chim Acta.* **2004**, *526*, 51–61.

[47] Storelli, M. M.; Giacomini-stuffler, R.; Storelli, A.; D'Addabbo R.; Palermo C.; Marcotrigiano G. O. Survey of total mercury and methylmercury levels in edible fish from the Adriatic Sea. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20* (12), 1114–1119.

[48] Juresa, D.; Blanusa, M. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20* (3), 241–246.

[49] Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

CAPÍTULO 3

SARDINHAS ENLATADAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO DA EMBALAGEM E NÍVEIS DE Al, As, Cd, Pb, Cr, Sn e Fe

Tainá Elisa de Mello Lazarini^a, Raquel Fernanda Milani^a, Daniela Mary Yamashita^b,
Elisabete Segantini Saron^b, Marcelo Antonio Morgano^a

^a Centro de Controle e Qualidade dos Alimentos (CCQA), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178, Brasil; ^b Centro de Tecnologia de Embalagens (CETEA), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178, Brasil

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos verificar as possíveis alterações que podem ocorrer pelo armazenamento de sardinhas em embalagens metálicas e determinar a presença de contaminantes inorgânicos em amostras comercializadas no Brasil. Os elementos alumínio (Al), arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), ferro (Fe), chumbo (Pb) e estanho (Sn) foram determinados usando um método otimizado por ICP OES. Os teores dos contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de sardinha enlatada variaram entre (mg kg^{-1}): não detectado (ND) - 13,24 para Al; 0,66 - 6,44 para As; ND - 0,43 para Cd; ND - 0,13 para Cr; ND - 0,09 para Pb; ND - 0,26 para Sn; 14,0 – 42,0 para Fe. Algumas amostras apresentaram teores de As (78%); Cd (12%) e Cr (8%) acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. As caracterizações da folha metálica e do envernizamento interno das latas utilizadas para o acondicionamento das sardinhas analisadas atenderam aos parâmetros de qualidade estabelecidos para este tipo de embalagem.

Palavras-chave: Alimento enlatado, contaminantes inorgânicos, folha cromada, produtos de pesca.

1. INTRODUÇÃO

A preservação de peixes na forma de conservas é um dos procedimentos mais adotados no mundo e devido a grande preocupação com a saúde pública, vários estudos vêm sendo realizados com os alimentos enlatados para estimar o teor de possíveis contaminantes. Estes estudos tem demonstrado especial atenção à presença de contaminantes inorgânicos em pescados comercializados na forma de conserva enlatada (atum e sardinha) e avaliaram amostras procedentes da Áustria (Suppin *et al.*, 2005); do Brasil (de Paiva *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2012); da Espanha (Olmedo *et al.*, 2013); dos Estados Unidos (Shiber, 2011); de Gana (Okyere *et al.*, 2015); da Itália (Storelli *et al.*, 2010); do Iran (Hosseini *et al.*, 2013); da Líbia (Abolghait e Garbaj, 2015); da Nigéria (Babalola *et al.*, 2014), de Portugal (Afonso *et al.*, 2015); da República Checa (Kral *et al.*, 2017); da Sérvia (Novakov *et al.*, 2017) e da Turquia (Yabanli, 2013).

Os contaminantes inorgânicos arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e estanho (Sn) apresentam toxicidade mesmo em quantidades no nível de traços e têm sido associados a diversos efeitos carcinógenos e neurotóxicos para o organismo humano (FAO/WHO, 2017). Estes elementos têm como principais fontes a agricultura e a indústria podendo ser acumulados no ambiente marinho e incorporados aos tecidos dos peixes de várias maneiras (Andayesh *et al.*, 2015). As concentrações destes contaminantes nos peixes dependem também da espécie e da área de pesca (Mendil *et al.*, 2010), além de poder sofrer influência do tipo de material metálico usado para a fabricação da embalagem (Mol, 2011).

A sardinha é uma das espécies de peixes amplamente comercializada em embalagens metálicas e pode conter a presença de alguns contaminantes inorgânicos (Demirayak *et al.*, 2011) com efeitos tóxicos conhecidos, como o arsênio inorgânico que apresentam potencial carcinogênico (Khaniki *et al.*, 2005); o Cr hexavalente com elevado potencial tóxico (Stellman, 2011); o estanho pode causar insuficiência renal, problemas no fígado, anemia e distúrbios gastrointestinais quando ingeridos em concentrações elevadas; o ferro, quando ingerido em excesso, pode ocasionar problemas gástricos, e para indivíduos que são portadoras de hemocromatose (depósito de ferro nos tecidos), pode causar cirrose hepática, insuficiência adrenal, insuficiência cardíaca ou diabetes; o chumbo pode ocasionar alterações hematológicas, neurológicas e comportamentais; a exposição crônica ao

cádmio pode levar a danos pulmonares (enfisema) e disfunção renal (FAO/WHO, 2017; Stellman, 2011; Mehri & Marjam, 2013) e o alumínio quando ingerido em excesso pode ser tóxico para a saúde, principalmente em pacientes com disfunção renal aguda, desenvolvendo encefalopatia. O excesso de alumínio também pode afetar o esqueleto reduzindo marcadamente a formação óssea, resultando em osteomalácia (Peto, 2010; Mehri & Marjan, 2013). Devido aos efeitos tóxicos que os contaminantes inorgânicos podem causar ao homem foram estabelecidos limites máximos destes compostos em pescados no Brasil de acordo com a RDC nº 42: 1,0 mg kg⁻¹ para o arsênio; 250 mg kg⁻¹ para o estanho; 0,3 mg kg⁻¹ para o chumbo e 0,1 mg kg⁻¹ para o cádmio (Brasil, 2013) e de acordo com o Decreto nº 55871: 0,1 mg kg⁻¹ para cromo em qualquer alimento (Brasil, 1965).

Embora o consumo de sardinha represente cerca de 78% de todo o pescado comercializado na forma de conserva enlatada no Brasil (Gonçalves, 2011), ainda existem poucos estudos cujo objetivo tenha sido determinar a presença de contaminantes inorgânicos neste tipo de alimento. Assim, este trabalho teve como objetivos: i) verificar e avaliar possíveis alterações da sardinha enlatada decorrente do material de embalagem; ii) validar um método analítico utilizando a técnica de espectrometria de emissão com plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) para determinar os teores de alumínio, arsênio, cádmio, cromo, chumbo, estanho e ferro em amostras de sardinhas enlatadas comercializadas na cidade de Campinas-SP, Brasil; e iii) avaliar a exposição a estes contaminantes pelo consumo de sardinha enlatada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram estudadas 50 amostras de sardinhas enlatadas comercializadas no Brasil, de cinco diferentes marcas (identificadas por A, B, C, D e E) considerando as mais disponíveis à população local, sendo 5 lotes de cada marca para as conservas em óleo (n=25) e em molho de tomate (n=25). Para a caracterização das embalagens foi avaliado apenas uma marca, visto que todas as marcas selecionadas (A, B, C, D e E) utilizam latas de um mesmo fabricante. Para este

estudo foram adquiridas três embalagens de diferentes lotes de cada tipo de conserva (em óleo e em molho de tomate) aos quais foram identificados por 1 a 6.

Para a análise das embalagens, as latas foram abertas e o conteúdo interno analisado igualmente as outras amostras. As embalagens foram então lavadas utilizando detergente e uma esponja macia e água purificada para enxague. A avaliação visual interna das latas foi realizada, seguida da preparação dos corpos de prova extraídos das embalagens. Para a determinação dos contaminantes inorgânicos foi considerado o conteúdo drenado das latas e posterior homogeneização do pescado em processador doméstico. As amostras foram mantidas em freezer à temperatura inferior a -18°C até a realização das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata analítica.

2.2. Reagentes e padrões

A água utilizada neste estudo (resistividade de $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) foi purificada em um sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil). Para a digestão das amostras de sardinhas foi utilizado ácido nítrico 70% (m/v) (Synth, Diadema, Brasil) previamente purificado em um destilador sub-boiling (Berghof, Eningen, Alemanha) e peróxido de hidrogênio 30% (m/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). As curvas analíticas foram preparadas a partir de solução padrão multielementar certificada (1000 mg L^{-1}) (Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo os contaminantes inorgânicos de interesse em solução 2,5% de HNO_3 (v/v). Para a caracterização das embalagens foram usados os reagentes dicromato de potássio p.a. e acetona p.a. (ambos da Synth, Diadema, Brasil). Na validação do método analítico usado para quantificação dos contaminantes inorgânicos foram empregados os materiais de referência certificados: *Lobster Hepatopancreas* (NRC TORT-2) para Al, As e Cd e *Oyster Tissue* (NIST SRM 1566b) para Cr, Pb e Fe.

2.3. Caracterização das embalagens

Para a caracterização das latas de sardinhas os materiais metálicos dos componentes das latas (tampa e caneco) foram avaliados quanto às determinações de espessura, dureza superficial (têmpera) e camada de cromo (óxido e metálico). A espessura das folhas dos canecos (corpo e fundo) e das tampas foi determinada por

leitura direta, utilizando-se um micrometro digital de ponta esférica (Mitutoyo, modelo 395-271, São Paulo, Brasil), de acordo com o método descrito pela ABNT (2008). A têmpera dos materiais metálicos das latas (fundo e tampa) foi determinada em termos de dureza superficial Rockwell em escala 15T, conforme descrito nas normas ABNT NBR 7407 (2010) utilizando-se um equipamento durômetro Wilson/Rockwell, marca Wilson Instruments/Instron, modelo 503S, Norwood, USA. Os resultados foram obtidos em escala Rockwell 15T (recomendada para folhas de espessuras inferiores a 0,21 mm) e os resultados foram convertidos para a escala 30T.

A determinação da camada de revestimento de cromo metálico e cromo óxido foi aplicada na face interna das folhas metálicas dos componentes das latas, empregando os métodos ABNT NBR 15376 (2006) para o cromo metálico e ABNT NBR 8750 (2009) para o óxido de cromo. Para a determinação do óxido de cromo foi feita a construção de uma curva analítica a partir de uma alíquota de 100 mL de uma solução de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ Cr preparada a partir de dicromato de potássio. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 0 (branco); 2,5 mL; 7,5 mL; 10,0 mL; 12,5 mL e 15,0 mL para béqueres de 250 mL e esse mesmo procedimento foi aplicado para as amostras. O cromo metálico foi determinado pelo método coulométrico utilizando-se um sistema potenciostato/galvanostato (Autolab, PGSTAT 302N) operando por meio do software NOVA (versão 2.1 AUT84983).

Para a realização dos ensaios de caracterização das folhas metálicas, o verniz aplicado à amostra foi retirado previamente por meio de acetona. Foram realizadas três medidas em cada corpo de prova retirado de cada componente da lata, para cada ensaio.

Para a caracterização do envernizamento interno, o revestimento orgânico aplicado internamente nas latas foi avaliado pelas determinações da camada seca, porosidade e aderência dos vernizes nos diferentes componentes das latas. A determinação da camada seca foi realizada por gravimetria, através do peso da película seca de verniz em uma determinada área conhecida (Dantas *et al.*, 1996). A porosidade foi determinada pelo método químico descrito por Dantas *et al.* (1996), a qual se baseou no contato dos materiais metálicos envernizados com uma solução ácida de sulfato de cobre por 10 minutos, posteriormente foi observada a incidência de deposição de cobre metálico na superfície do material metálico, revelando os pontos de porosidade no verniz. A aderência foi determinada por meio do ensaio da

fita adesiva, o qual foi realizado após traçado de uma grade com 12 riscos (6 por 6) em ângulo reto e separada de 1mm de acordo com método (ASTM, 2009).

As latas foram avaliadas visualmente e com o auxílio de microscopia óptica utilizando um estereomicroscópio (M165C, Leica, Heerbrugg, Suíça) e classificadas quanto à aparência e intensidade de corrosão interna, no caso de ocorrência, nas posições do corpo, fundo e tampa, de acordo com o método ASTM (2012).

2.4. Instrumentação para determinação dos contaminantes inorgânicos

Para a determinação de Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn foi utilizado um ICP OES, modelo 5100 VDV (Agilent Technology, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera de nebulização de duplo passo e um nebulizador *seaspray*. O argônio líquido com 99,996% de pureza (Air Liquide, São Paulo, Brasil) foi usado para a geração do plasma e como gás de nebulização e gás auxiliar. As condições otimizadas de operação do equipamento foram: potência do gerador de radiofrequência (1200 W); vazão amostra ($0,50 \text{ L min}^{-1}$), vazão de argônio do nebulizador ($0,60 \text{ L min}^{-1}$); vazão auxiliar de argônio ($1,00 \text{ L min}^{-1}$); vazão principal de argônio ($12,0 \text{ L min}^{-1}$); modo de visão axial; número de réplicas ($n=3$) e comprimentos de onda: Al (308,215 nm); As (193,696 nm); Cd (214,439 nm); Cr (267,716 nm); Fe (259,940 nm); Pb (220,353 nm) e Sn (189,925 nm).

2.5. Digestão ácida usando um sistema fechado assistido por micro-ondas e quantificação dos contaminantes inorgânicos por ICP OES

A digestão das amostras de sardinha foi realizada utilizando um digestor por micro-ondas, modelo Start E (Milestone, Sorisole, Itália) nas seguintes condições: 1 g de amostra foi pesada em vaso de PTFE seguido da adição de 4 mL de ácido nítrico concentrado e mantidos em repouso durante a noite. Após esse tempo foram adicionados 4 mL de água desionizada e 2 mL de peróxido de hidrogênio e os vasos foram selados e transferidos para o digestor de micro-ondas onde foram aplicados 1000 W de potência com 4 estágios de digestão: (1) temperatura ambiente a 70° C por 5 min; (2) de 70° C a 120° C em 5 min; (3) de 120° C a 170° C em 5 min e (4) temperatura constante de 170° C por 25 min. Após atingir a temperatura ambiente os vasos foram abertos e o digerido foi transferido para um tubo de 25 mL com solução

de ácido nítrico 5% (v/v). A determinação dos contaminantes inorgânicos foi realizada em um ICP OES a partir da construção de curvas de calibração externa nas seguintes na faixa de concentração de 0,0025 a 1,0 mg L⁻¹.

2.6. Validação do método para determinação dos contaminantes inorgânicos usando um ICP OES

O método analítico utilizando o ICP OES para a determinação dos elementos Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn foi validado baseado nas recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (2016). As figuras de mérito avaliadas foram exatidão, linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e de quantificação e precisão. Para a avaliação da exatidão do método foram usados os materiais de referência certificado *Lobster Hepatopancreas* (NRC TORT-2) e *Oyster Tissue* (NIST SEM, 1566b).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação

Para os ensaios realizados foram encontrados os valores de 89% para o Al; 96% para o As; 100% para o Cd; 97% para o Cr; 98% para o Pb e 100% para o Fe, todos os elementos atendem aos parâmetros aceitáveis de recuperação (80 a 110%) para a faixa de concentração estudada (AOAC, 2013). Os resultados obtidos para o LOD (limite de detecção) e o LOQ (limite de quantificação) foram calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão de 10 brancos, respectivamente, e foram multiplicados pelo fator de diluição (25x) das amostras (Tabela 1). A precisão do método foi avaliada utilizando 16 repetições analíticas (8 repetições/dia) com coeficientes de variação compreendidos entre 1,0% e 11% para todos os contaminantes estudados; os quais satisfazem as recomendações da AOAC (2013) nas condições estudadas, que estabelece valores até 11%. Para a avaliação da linearidade das curvas analíticas foram determinados os coeficientes de correlação obtidos para os metais e todos os valores apresentaram $r^2 \geq 0,999$. Para avaliação de Sn foi realizada fortificação em dois níveis de concentração (25 mg kg⁻¹ e 100 mg kg⁻¹); uma vez que

este elemento não apresenta valor certificado nos materiais de referência utilizados. Os valores de recuperação obtidos foram 82 e 93%, respectivamente, os quais encontram-se dentro dos valores aceitáveis para a recuperação para a faixa de concentração estudada (80 e 110%). Os valores de LOD e LOQ para o Sn foram de 0,07 e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente, e a precisão foi de 4,4, atendendo as recomendações, que aceita valor máximo de 11% (AOAC, 2013).

Tabela 1. Resultados obtidos na validação do método para Al, As, Cd, Cr, Fe e Pb.

Parâmetros da validação	Contaminantes inorgânicos					
	Alumínio*	Arsênio*	Cádmio*	Cromo**	Chumbo**	Ferro**
Valor certificado (mg kg ⁻¹)	197,2 ± 6,0	7,65 ± 0,65	2,48 ± 0,08	0,77 ± 0,15	0,35 ± 0,13	105 ± 13
Valor obtido (mg kg ⁻¹)	175,7 ± 2,8	7,3 ± 0,4	2,5 ± 0,1	0,75 ± 0,02	0,34 ± 0,01	105 ± 4
Recuperação (%)	89 ± 1	96 ± 6	100 ± 3	97 ± 3	98 ± 3	100 ± 3
LOD (mg kg ⁻¹) ^a	0,5	0,05	0,003	0,006	0,01	0,2
LOQ (mg kg ⁻¹) ^b	0,8	0,08	0,005	0,01	0,02	0,3
Precisão (%) ^c	11,0	1,7	1,5	1,0	2,3	9,0

^aLOD (3 s) = limite de detecção (n = 10) e ^bLOQ (10 s) = limite de quantificação, n = 10; LOD e LOQ reportados foram multiplicados pelo fator de diluição (25x). ^cPrecisão = coeficiente de variação (n=16); Materiais de referência certificados: * *Oyster Tissue* (NIST SRM 1566b); ** *Lobster Hepatopancreas* (NRC TORT-2).

3.2. Caracterização das embalagens metálicas

As embalagens foram inicialmente avaliadas por inspeção visual onde não foi observada corrosão aparente, sendo confirmada em microscópio óptico. Para a verificação da espessura e dureza das latas avaliou-se o fundo e a tampa das latas e os resultados estão descritos na Tabela 2.

De acordo com os resultados de espessura obtidos, verificou-se que as folhas cromadas dos canecos (fundo e corpo) e das tampas das duas latas de sardinhas, provavelmente apresentam valores nominais de espessura de 0,19mm e 0,20mm para os fundos e tampas, respectivamente. Folhas de aço de baixo teor de carbono com espessuras entre 0,19 e 0,20mm podem ser produzidas por simples ou dupla redução, sendo que para folhas de simples redução a tolerância é de ± 2,0% (aproximadamente ± 0,004mm) e para folhas de dupla redução é de ± 2,5%

(aproximadamente $\pm 0,005\text{mm}$) em relação ao valor nominal. As folhas dos componentes de ambas as latas atenderam os requisitos da norma ABNT NBR 6665 (2014).

Tabela 2. Resultados obtidos na análise de espessura e dureza das folhas de tampa e fundo das latas de sardinhas em conservas e em molho de tomate.

Lata de Conserva		Espessura (mm)			Dureza (Escala 30T)		
		Média \pm DP	Mínimo	Máximo	Média \pm DP	Mínimo	Máximo
Óleo	Tampa	0,198 \pm 0,002	0,001	0,196	64,5 \pm 0,8	62,5	66,0
	Fundo	0,191 \pm 0,001	0,001	0,188	63,9 \pm 0,6	62,5	65,0
Molho	Tampa	0,198 \pm 0,001	0,001	0,196	66,1 \pm 0,5	65,0	68,0
	Fundo	0,189 \pm 0,002	0,002	0,188	62,9 \pm 0,7	59,5	67,0

DP = Desvio-padrão; Resultados de 12 réplicas

Os resultados obtidos na determinação da dureza da folha cromada dos componentes das latas de duas peças, indicaram que as folhas do fundo e da tampa das duas latas provavelmente apresentaram têmpera T65. A Norma ABNT NBR 6665 (2014) recomenda uma variação máxima de ± 4 unidades Rockwell para folhas de aço com simples redução com valor nominal de T65, sendo que os resultados de todos os componentes das duas latas atenderam a norma ABNT NBR 6665 (2014).

Os resultados obtidos demonstraram que os materiais metálicos componentes das duas latas estudadas tratavam-se da mesma especificação de material metálico quanto à espessura e dureza.

Levando em conta os resultados obtidos para espessura e dureza, os quais apresentaram variação não significativa entre as latas de conservas, a determinação da camada de cromo da folha metálica foi otimizada, sendo analisada uma repetição de cada tipo de lata, considerando que as folhas do caneco e da tampa possuíam a mesma especificação de nominal de camada de cromo. Primeiramente determinaram-se os valores de cromo óxido e posteriormente de cromo metálico, sendo o valor do cromo total a soma do cromo óxido com o cromo metálico. Para a análise foi construída uma curva de calibração a qual apresentou valor de $R^2 = 0,9992$, atendendo aos parâmetros exigidos de acordo com a NR 8750 (ABNT, 2010), os resultados obtidos estão na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de cromo óxido, cromo metálico e cromo total para fundo e tampa de ambas as conservas para 5 réplicas.

Corpo de Prova		Cromo (mg/m ²)		
		Óxido	Metálico	Total
Fundo	Média ± Desvio Padrão	3,3 ± 1,7	93,3 ± 3,8	96,6 ± 4,6
	Mínimo-máximo	1,3 - 5,7	88,9 - 98,8	90,2 - 102,6
Tampa	Média ± Desvio Padrão	3,4 ± 0,7	94,1 ± 6,8	97,5 ± 6,6
	Mínimo-máximo	2,2 - 4,5	81,0 - 100,1	84,6 - 103,5

Através dos dados obtidos é possível observar que os valores para o caneco (fundo) e a tampa para o cromo metálico não apresentaram variação, apresentando-se de acordo com a especificação recomendada pela NBR 6665:2014 para folha cromada adotada, a qual corresponde a uma massa de cromo metálico entre 50 e 140 mg/m². Já para o cromo óxido, o valor recomendado está entre 5 e 15 mg/m², os quais apresentaram-se abaixo do recomendado pela NBR 6665:2014 (ABNT, 2014), o que provavelmente deve-se ao fato de uma parte do óxido de cromo ter sido perdida juntamente na retirada do verniz por ação mecânica de raspagem com osso durante a preparação dos corpos de prova.

Os resultados médios obtidos para camada seca dos vernizes internos das latas de conserva de sardinha são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados médios, mínimo e máximo de 5 réplicas de camada seca de verniz interno.

Componente da lata	Camada seca (g/m ²)		
	Média ± Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Tampa	14,18 ± 0,54	12,70	18,24
Fundo	27,99 ± 3,38	24,31	47,61

Os resultados médios obtidos para a análise de camada seca interna da tampa foi de 14,18 g/m² e para o fundo de 27,99 g/m². O fundo apresentou praticamente o dobro de verniz em relação a tampa, pois possivelmente o caneco

(fundo + corpo) recebeu duas camadas de verniz a qual deve-se à necessidade de maior proteção do material metálico de forma a suportar as várias etapas de embutimento sofridas por este tipo de lata durante o processo de produção.

A determinação de porosidade dos vernizes internos, não apresentou incidência de deposição do cobre metálico e nem exposição de pontos de cobre através do verniz em nenhuma das amostras de latas de sardinha, tanto em molho de tomate quanto em óleo, protegendo assim a folha e minimizando a possibilidade de desenvolvimento dos fenômenos de corrosão. Em relação à análise de aderência dos vernizes internos, todas as amostras apresentaram grau de aderência zero, atendendo a Norma NBR 15660-2 (ABNT, 2008), a qual recomenda que corpos de latas devem ser aceitáveis com aderência até grau 1.

Em relação aos elementos estudados, os que poderiam influenciar no armazenamento das sardinhas enlatadas apresentaram para a conserva em óleo valores médios e intervalos de $0,09 \pm 0,03$ ($0,06 - 0,15$) mg kg^{-1} para o Cr; $23,0 \pm 4,0$ ($19,33 - 31,01$) mg kg^{-1} para o Fe e $0,23 \pm 0,04$ ($0,17 - 0,29$) mg kg^{-1} para o Sn. Para as amostras conservadas em molho de tomate os valores foram de $0,07 \pm 0,02$ ($0,05 - 0,11$) mg kg^{-1} para o Cr; $27,2 \pm 6,3$ ($18,47 - 34,55$) mg kg^{-1} para o Fe e $0,23 \pm 0,05$ ($0,15 - 0,25$) mg kg^{-1} para o Sn. Os valores obtidos não mostraram variação entre as conservas (óleo e molho de tomate).

3.3. Alumínio, arsênio, cádmio, cromo, chumbo, estanho e ferro nas conservas de sardinha

Os resultados obtidos para Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn para as diferentes amostras de sardinhas enlatadas estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados médios obtidos para os contaminantes estudados nas amostras de sardinha em conserva em óleo variaram entre (mg kg^{-1}) ND e 13,24 para Al; 0,77 e 6,44 para As; ND e 0,13 para Cd e Cr; ND e 0,08 para Pb; ND e 0,26 para Sn e 13,30 e 41,40 para Fe. Para as amostras conservadas em molho de tomate os valores médios obtidos variaram entre (mg kg^{-1}) ND e 13,20 para Al; 0,66 e 4,18 para As; ND e 0,43 para Cd; ND e 0,07 para Cr; ND e 0,09 para Pb; ND e 0,26 para Sn; 15,00 e 42,00 para Fe.

Tabela 5. Valores médios (intervalo) obtidos para Al, As, Cd, Cr, Pb, Sn e Fe em sardinhas em conserva em molho de tomate (n=25) e em óleo (n=25).

Marca	Tipo	Elementos (mg kg ⁻¹)						
		Al	As	Cd	Cr	Pb	Sn	Fe
A	Óleo	1,95 (ND-3,70)	1,00 (0,77-1,30)	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (ND-0,03)	0,03 (ND-0,03)	0,18 (0,14 - 0,26)	17,20 (14,00-17,90)
	Molho tomate	5,26 (ND-10,92)	0,90 (0,66-1,55)	0,02 (0,01-0,04)	0,04 (ND-0,04)	0,03 (ND-0,06)	0,20 (0,16 - 0,23)	28,10 (23,0-33,60)
B	Óleo	5,47 (ND-13,24)	1,31 (1,13-1,83)	0,04 (0,01-0,11)	0,08 (0,05-0,11)	0,03 (0,01-0,08)	0,09 (ND - 0,12)	25,14 (17,60-32,20)
	Molho tomate	1,61 (ND-2,24)	1,51 (1,12-1,95)	0,05 (0,04-0,07)	0,04 (0,02-0,07)	ND -	0,11 (0,09 - 0,13)	17,32 (15,0-18,80)
C	Óleo	4,70 (ND-7,70)	3,21 (1,79-6,44)	0,04 (0,01-0,07)	0,05 (0,02-0,11)	0,05 (ND-0,06)	0,15 (ND-0,21)	23,84 (13,50-41,40)
	Molho tomate	5,12 (1,92-13,20)	3,03 (1,69-4,18)	0,22 (ND-0,43)	0,04 (0,01-0,06)	0,05 (0,01-0,09)	0,17 (ND-0,18)	32,88 (17,70-42,00)
D	Óleo	2,00 (ND-2,70)	2,50 (2,01-3,59)	0,07 (ND-0,13)	0,02 (0,01-0,06)	0,02 (0,01-0,03)	0,18 (0,10-0,22)	17,76 (13,30-22,40)
	Molho tomate	1,93 (1,20-2,70)	1,93 (1,09-2,53)	0,08 (ND-0,19)	0,02 (ND-0,05)	0,02 (ND - 0,02)	0,20 (0,17-0,26)	25,70 (20,30-38,60)
E	Óleo	2,68 (ND-3,08)	1,93 (0,84-2,74)	0,05 (ND-0,08)	0,05 (ND-0,13)	0,01 (ND-0,02)	0,16 (0,12-0,21)	18,54 (16,00-22,10)
	Molho tomate	1,41 (ND-2,10)	1,28 (0,66-2,69)	0,03 (ND-0,04)	0,04 (ND-0,05)	0,04 (ND-0,05)	0,21 (0,12 - 0,24)	22,38 (20,50-22,80)
LOD		0,5	0,05	0,003	0,006	0,01	0,07	0,2
Limites máximos								
Resolução RDC nº		-	1,0	0,05	0,1	0,3	250,0	-
42 e Decreto nº								
55871								

n = 5 amostras para cada tipo de conserva em óleo e molho de tomate (A, B, C, D e E). LOD = limite de quantificação. ND = Não detectado

Os maiores teores de Al, As e Cr foram encontrados em amostras conservadas em óleo, sendo correspondentes a 13,24 mg kg⁻¹; 6,44 mg kg⁻¹ e 0,11 mg kg⁻¹, respectivamente. Para o Cd, Pb e Fe os maiores teores foram encontrados em amostras conservadas em molho de tomate, sendo elas correspondentes a 0,43

mg kg⁻¹; 0,09 mg kg⁻¹ e 42,0 mg kg⁻¹, respectivamente. O Sn apresentou baixo teor em ambas as conservas, correspondendo ao valor de 0,26 mg kg⁻¹.

Em relação aos elementos relacionados ao material metálico das embalagens (Cr, Fe e Sn) que poderiam sofrer influência do armazenamento das sardinhas enlatadas, a conserva em óleo apresentou valores médios \pm desvio padrão (intervalos) de $0,09 \pm 0,03$ (0,06 – 0,15) mg kg⁻¹ para o Cr; $23,0 \pm 4,0$ (19,33 – 31,01) mg kg⁻¹ para o Fe e $0,23 \pm 0,04$ (0,17 – 0,29) mg kg⁻¹ para o Sn. Para as amostras de conserva em molho de tomate os valores foram de $0,07 \pm 0,02$ (0,05 – 0,11) mg kg⁻¹ para o Cr; $27,2 \pm 6,3$ (18,47 – 34,55) mg kg⁻¹ para o Fe e $0,23 \pm 0,05$ (0,15 – 0,25) mg kg⁻¹ para o Sn. Os valores encontrados demonstram que não existe variação entre as conservas (óleo e molho de tomate). Os teores de Sn atenderam aos limites estabelecidos pela legislação brasileira, porém para o Cr verificou-se que 3 unidades das latas de sardinha em óleo e 1 unidade das latas de sardinha em molho apresentou teor acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira, o qual corresponde a 0,1 mg kg⁻¹. A camada de cromo da folha cromada tem o objetivo de conferir resistência aos processos de corrosão aos aços base utilizados na fabricação de embalagens metálicas (CONCIL OF EUROPE, 2013)

Quando comparados os tipos de conserva, todos os contaminantes apresentaram valores médios próximos, com exceção do alumínio que apresentou maiores níveis na conserva de molho de tomate, indicando que o tipo de conserva não interfere no teor dos contaminantes inorgânicos.

Em relação às legislações vigentes no país, as amostras de sardinha apresentaram teores superiores aos limites máximos permitidos para o As, Cd e Cr em 78%, 12% e 8%, respectivamente dentre as amostras estudadas.

Os níveis observados para As, Cr e Sn foram similares ao estudo realizado por Ikem (2005) que reportou valores médios similares de 0,0154 mg kg⁻¹ para o Cr e 0,00043 mg kg⁻¹ para o Sn e inferiores para As (0,00022 mg kg⁻¹) em sardinhas enlatadas da Geórgia e Alabama (EUA).

Em um estudo realizado com sardinhas comercializadas na Catalunha (Espanha) os autores encontraram valor próximo a este estudo (1,78 mg kg⁻¹) para As (Cano-Sancho *et al.* 2015). Por outro lado, em um estudo com amostras de sardinhas enlatadas da Nigéria, foram encontrados níveis entre 0,01 a 0,1 mg kg⁻¹ para o Cr, valores superiores a este estudo (Iwegbue *et al.*, 2009).

Okyere *et al.* (2015) analisaram sardinhas provenientes de Gana, avaliando a presença de chumbo e cádmio. Para o chumbo foram encontrados valores entre $<0,01$ e $1,44 \text{ mg kg}^{-1}$ nas 55 amostras analisadas e para o cádmio todos os valores foram $<0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ nas 64 amostras analisadas.

Em um estudo realizado com diferentes sardinhas enlatadas conservadas em: óleo vegetal, provenientes de Marrocos; em óleo de girassol, provenientes de Portugal; em molho de tomate, provenientes de Marrocos; em molho de tomate, provenientes da Argentina; em óleo de girassol, provenientes do Reino Unido e em molho de tomate, provenientes da África do Sul, os autores encontraram concentrações de cádmio correspondentes a $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente (Babalola *et al.*, 2014).

Mol (2011) analisou 30 sardinhas provenientes da Turquia realizando a determinação de metais pela técnica de ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado) encontrando valores entre 0 e 89 mg kg^{-1} para o ferro; 0 e $0,113 \text{ mg kg}^{-1}$ para o cádmio; 0 e $0,158 \text{ mg kg}^{-1}$ para o estanho e 0 e $2,875 \text{ mg kg}^{-1}$ para o chumbo. Neste trabalho foi constatado que em todas as amostras analisadas, o valor de estanho estava dentro do limite máximo permitido e níveis superiores foram encontrados para ferro, cádmio e chumbo.

Vieira *et al.* (2011) avaliaram a presença de cádmio, chumbo e arsênio em sardinhas diferenciando entre fêmeas e machos. Para as fêmeas os valores encontrados variaram entre $0,0019$ e $0,0069 \text{ mg kg}^{-1}$ para o cádmio; $0,0029$ e $0,0560 \text{ mg kg}^{-1}$ para o chumbo e $0,8116$ e $1,3362 \text{ mg kg}^{-1}$ para o arsênio, já os valores encontrados para os machos variaram entre $0,0017$ e $0,0151 \text{ mg kg}^{-1}$ para o cádmio; $0,8211$ e $1,1476 \text{ mg kg}^{-1}$ para o arsênio e para o chumbo foi analisada apenas uma amostra que apresentou o valor de $0,0540 \text{ mg kg}^{-1}$. Os autores constataram que a avaliação do gênero das espécies revelou um pequeno impacto no acúmulo de metais nos músculos das sardinhas fêmeas e machos. Todas as amostras analisadas apresentaram teores de chumbo e cádmio menores do que o limite máximo permitido, com exceção do arsênio.

Galitsopoulou *et al.* (2012) estudaram a presença de chumbo e cádmio em sardinhas dos centros de pesca do mar Mediterrâneo, bem como o nível de influência da produção industrial nas concentrações desses contaminantes e da

maneira como são comercializados. Foram analisadas 50 amostras de sardinha (*Sardina pilchardus*) e o valor médio encontrado para o cádmio foi de $0,008 \pm 0,005$ mg kg⁻¹ e para o chumbo foi de $0,166 \pm 0,057$ mg kg⁻¹. Este trabalho mostrou que a influência do enlatamento depende do tipo de metal e da redução da perda de umidade após o enlatamento.

3.4. Avaliação da estimativa de exposição a Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn pelo consumo de sardinha enlatada

Para a avaliação da estimativa de exposição dos contaminantes Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn presente nas amostras de sardinha enlatada foi determinado o peso médio drenado (84 g) das amostras de sardinha e considerado os valores médios obtidos para os contaminantes nas amostras de sardinha em conserva de óleo e em molho de tomate conforme apresentado na Tabela 5; para Al a PTWI (Ingestão Semanal Tolerável Provisória) de 2 mg kg⁻¹ peso corpóreo, para i-As (arsênio inorgânico) a BMDL₀₅ (Benchmark Dose Lower Limit) de 3 µg kg⁻¹ peso corpóreo, para Cd a PTMI (Ingestão Mensal Tolerável Provisória) de 25 µg kg⁻¹ peso corpóreo, para Fe a PTMDI (Ingestão Diária Tolerável Provisória) de 0,8 mg kg⁻¹ peso corpóreo, para Sn a PTWI (Ingestão Semanal Tolerável Provisória) de 14 mg kg⁻¹ peso corpóreo (FAO/WHO, 2017); para Cr a TDI (Ingestão diária tolerável) de 0,3 mg kg⁻¹ peso corpóreo (EFSA, 2014), para Pb a BMDL₀₁ (Benchmark Dose Lower Limit) de 12 µg kg⁻¹ peso corpóreo (EFSA, 2013) e peso corpóreo de adulto de 60 kg.

De acordo com Schaeffer *et al.* (2005) cerca de 90% do arsênio encontrado em pescados, entre eles a sardinha, estão na forma orgânica (arsenobetaina, arsenocolina, arsenoaçúcares e/ou ácido dimetilarsínico). Como as espécies orgânicas apresentam baixa toxicidade, para o cálculo da estimativa de exposição ao arsênio inorgânico foi considerado que apenas 10% do teor de arsênio total corresponde as espécies inorgânicas com potencial de toxicidade. Na Tabela 6 são apresentados os valores da estimativa de exposição pelo consumo de uma lata de sardinha por dia.

Tabela 6. Cálculo da estimativa de exposição aos contaminantes Al, As, Cd, Cr, Fe, Pb e Sn em sardinhas em conserva em molho de tomate (n=25) e em óleo (n=25).

Elemento	Conserva	Média	Estimativa de Exposição	
		(mg kg ⁻¹)		
Diária				
i-As*	Óleo	0,20	0,28 µg kg ⁻¹ pc	9,3% BMDL ₀₅
	Molho de tomate	0,17	0,24 µg kg ⁻¹ pc	8,1% BMDL ₀₅
Cr	Óleo	0,05	0,0001mg kg ⁻¹ pc	0,02% TDI
	Molho de tomate	0,04	0,0001mg kg ⁻¹ pc	0,02% TDI
Fe	Óleo	20,5	0,029mg kg ⁻¹ pc	3,6% PMTDI
	Molho de tomate	25,3	0,035mg kg ⁻¹ pc	4,4% PMTDI
Pb	Óleo	0,03	0,04µg kg ⁻¹ pc	0,33% BMDL ₀₁
	Molho de tomate	0,03	0,04µg kg ⁻¹ pc	0,33% BMDL ₀₁
Semanal				
Al	Óleo	3,36	0,033 mg kg ⁻¹ pc	1,6% PTWI
	Molho de tomate	3,07	0,030 mg kg ⁻¹ pc	1,5% PTWI
Sn	Óleo	0,15	0,0015mg kg ⁻¹ pc	0,01% PTWI
	Molho de tomate	0,18	0,0017mg kg ⁻¹ pc	0,01% PTWI
Mensal				
Cd	Óleo	0,04	1,85 µg kg ⁻¹ pc	7,4% PTMI
	Molho de tomate	0,08	3,36 µg kg ⁻¹ pc	13% PTMI

***i-As** = arsênio inorgânico (10% do teor de arsênio total); **pc** = peso corpóreo para adulto (60kg) e peso médio drenado de uma lata de sardinha 84 g.

Os resultados obtidos mostram que para as conservas analisadas os elementos que mais contribuem para a exposição aos consumidores de sardinha são o As e o Cd, sendo que para o As a contribuição maior foi nas amostras conservadas em óleo, enquanto que para o cádmio foi nas amostras conservadas em molho de tomate. Em relação aos demais elementos observou-se uma pequena contribuição na estimativa de exposição aos contaminantes inorgânicos pelo consumo de sardinha para os seres humanos.

4. CONCLUSÕES

- A caracterização das folhas metálicas (espessura, dureza e camada de cromo) e do envernizamento interno (camada seca, aderência e porosidade) de corpo e fundo das latas utilizadas para o acondicionamento das sardinhas estudadas atenderam aos parâmetros de qualidade estabelecidos para este tipo de embalagem.
- Foram encontrados teores dos contaminantes As, Cd, Cr, Pb, Sn e Fe próximos para as amostras de sardinha com conserva em óleo e em molho de tomate, enquanto que para o Al maiores teores foram observados nas amostras conservadas em molho de tomate.
- Foram encontrados teores acima do limite máximo estabelecido pela legislação nacional para As, Cd e Cr, em 72%, 12% e 8% das amostras, respectivamente.
- Os níveis de As e Cd apresentaram maior contribuição para o cálculo da estimativa de exposição a estes contaminantes, considerando o consumo diário de uma lata de sardinha por um adulto de 60 kg.

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa de mestrado de TEM Lazarini, ao CNPq pela bolsa de PP de MA Morgano e auxílio financeiro (CNPq 442025/2014-9). A Leticia Carvalho de Sousa pelo auxílio nas análises.

5. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2008. NBR 15660-1 Folhas de aço - Aderência de revestimentos orgânicos. Parte 1: Ensaio de revestimentos orgânicos através de fita adesiva. 8p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2006. NBR 15376: Folhas de aço cromadas – determinação do teor de cromo metálico pelo processo coulométrico – método de ensaio. 5

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2014. NBR 6665: Folhas laminadas de aço-carbono revestidas eletroliticamente com estanho ou cromo ou não revestidas – Especificação. 22.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2009. NBR 8750: Folhas de aço cromadas - determinação do óxido de cromo pelo método colorimétrico. 7.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2009. NBR 7407: Folhas de aço - determinação da dureza Rockwell superficial. 8.

Abolghait SK, Garbaj AM. 2015. Determination of cadmium, lead and mercury residual levels in meat of canned light tuna (*Katsuwonus pelamis* and *Thunnus albacares*) and fresh little tunny (*Euthynnus alletteratus*) in Libya. Open Veterinary J. 5:130-137

Afonso C, Costa S, Cardoso C, Oliveira R, Lourenço HM, Viula A, Batista I, Coelho I, Nunes ML. 2015. Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus* spp.) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. Environm Res: Part B. 143:130-137.

Andayesh S, Hadiani MR, Mousavi Z, Shoeibi S. 2015. Lead, cadmium, arsenic and mercury in canned tuna fish marketed in Tehran, Iran. Food Addit Contam Part B Surveill. 8:93-98.

ASTM. American Society for Testing and Materials. 2017. D3359-2017. Standard test methods for measuring adhesion by tape test.-9.

ASTM. American Society for Testing and Materials. 2012. D610. Standard practice for evaluating degree of rusting on painted steel surfaces. 6.

Babalola AF, Olusola AO, Akande GR, Ezekiel MO, Adeleke TA, Ozor PA. 2014. Mercury, cadmium content and organoleptic quality of some canned seafood sold in Nigerian market. IOSR-JAVS. 7:14-17.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013.

Cano-Sancho G, Perell G, Maulvault AL, Marques A, Nadal M, Domingo JL. 2015. Oral bioaccessibility of arsenic, mercury and methylmercury in marine species commercialized in Catalonia (Spain) and health risks for the consumers. Food Chem. Toxicol. 86:34-40.

Dantas ST, Anjos VDA, Segantini E, Gatti JAB. 1996. Avaliação da qualidade de embalagens metálicas: aço e alumínio. Campinas: ITAL/CETEA. 317.

De Paiva EL, Milani RF, Morgano MA. 2017. Cadmium, lead, tin, total mercury and methylmercury in canned tuna commercialized in São Paulo, Brazil. Food Addit Contamin: Part B. 10:185-191.

Demirayak A, Kutbay HG, Kılıç D, Bilgin A, Huseyinova R. 2011. Heavy metal accumulation in some natural and exotic plants in Samsun city. Ekoloji. 20:1-11.

European Food Safety Authority. 2013. Scientific Opinion on Lead in Food. EFSA J. 8:151.

European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. EFSA J. 12:161.

European Food Safety Authority. 2018. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. EFSA J. 13:202.

FAO/WHO (2017) Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF: Eleventh Session report of Joint

FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee On Contaminants In Foods - CF/11 INF/1.

Faria, EV. Controle de qualidade de embalagens metálicas. 1990. Campinas: CETEA/ITAL.

Galitsopoulou A, Georgantelis D, Kontominas M. 2012. The influence of industrial-scale canning on cadmium and lead levels in sardines and anchovies from commercial fishing centres of the Mediterranean Sea. *Food Addit. Contam.* 5:75–81.

Gonçalves AA. 2011. Tecnologia do pescado: Ciência e tecnologia, inovação e legislação. 1:2-593.

Hosseini SV, Aflaki F, Sobhanardakani S, Tayebi L, Babakhani Lashkan A, Regenstein JM. 2013. Analysis of mercury, selenium, and tin concentrations in canned fish marketed in Iran. *Environ Monit Assess.* 185:6407-6412.

Ikem A, Egiebor NO. 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *J. Food Compos. Anal.* 18:771-787.

INMETRO. 2016. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev. 05:1–31.

Iwegbue CMA, Nwajei GE, Arimoro FO, Eguavoen O. 2009. Characteristic levels of heavy metals in canned sardines consumed in Nigeria. *Environmentalist.* 29:431-435.

Khaniki GRJ, Zazoli MA. 2005. Cadmium and lead contents in rice (*Oryza sativa*) in the north of Iran. *Int. J. Agri. Biol.* 7: 1026-1029.

Kral T, Blahova J, Sedlackova L, Kalina J, Svobodova Z. 2017. Mercury in canned fish from local markets in the Czech Republic. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 10:149-154.

Mehri A, Marjan RF. 2013. Trace elements in human nutrition: a review. *International Journal of Medical Investigation.* 2:15-128.

Medeiros RJ, Santos LMG, Freire AS, Santelli RE, Braga AMCB, Krauss TM, Jacob SC. 2012. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control*. 23:535-541.

Mendil D, Demirci Z, Tuzen M, Soylak M. 2010. Seasonal investigation of trace element contents in commercially valuable fish species from the Black sea, Turkey. *Food Chem Toxicol*. 48:865–870.

Mol S. 2011. Levels of selected trace metals in canned tuna fish produced in Turkey. *J Food Composition Anal*. 24:66–69.

Novakov NJ, Mihaljev ZA, Kartalović BD, Blagojević BJ, Petrović JM, Ćirković MA, Rogan DR. 2017. Heavy metals and PAHs in canned fish supplies on the Serbian Market. *Food Addit Contamin Part B Surveill*. 10:208-2015.

Okyere H, Voegborlo RB, Agorku SE. 2015. Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine. *Food Chemistry*. 179:331-335.

Olmedo P, Pla A, Hernández AF, Barbier F, Ayouni L, Gil F. 2013. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ Int*. 59:63-72.

Peto MV. 2010. Aluminium and iron in humans: bioaccumulation, pathology, and removal. *Rejuvenation Res*. 13: 589-598.

Schaeffer R, Soeroes C, Fodor P, Thomaidis NS. 2005. Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography–(photo-oxidation)–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta*. 547: 109–118.

Shiber JG. 2011. Arsenic, cadmium, lead and mercury in canned sardines commercially available in eastern Kentucky, USA. *Mar Pollut Bull*. 62:66-72.

STELLMAN, J. M. (Ed.). ILO Encyclopaedia of occupational health and safety. Part IX: Chemicals. 63. Metals: chemical properties and toxicity. 4th ed. Geneva: International Labour Office, 2011. Disponível em:

<<http://www.iloencyclopaedia.org/part-ix-21851/metals-chemical-properties-and-toxicity>>. Acesso em: 27 maio. 2018.

Storelli MM, Barone G, Cuttone G, Giungato D, Garofalo R. 2010. Occurrence of toxic metals (Hg, Cd, and Pb) in fresh and canned tuna: Public health implications. *Food Chem Toxicol.* 48:3167-3170.

Suppin D, Zahlbruckner R, Krapfenbauer-Cermak CH, Hassan-Hauser CH 2005. Mercury, lead and cadmium content of fresh and canned fish collected from Austrian retail operations. *Die Ernährung/Nutrition.* 29:456-460.

Vieira C, Morais S, Ramos S, Delerue-Matos, Oliveira MBPP. 2011. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food Chem. Toxicol.* 49:923–932.

Yabanli M. 2013. Assessment of the Heavy Metal Contents of *Sardina pilchardus* Sold in Izmir, Turkey. *Ekoloji.* 22:10-15.

CONCLUSÃO GERAL

- Os teores de mercúrio e metilmercúrio em todas as amostras de sardinha enlatada brasileiras e internacionais apresentaram níveis inferiores ao máximo permitido pela legislação nacional.

- A relação MeHg/Hg mostrou que cerca de 60% das amostras brasileiras conservadas em molho de tomate apresentaram predominância da forma mais tóxica do mercúrio (metilmercúrio), enquanto que para as amostras de sardinha em óleo, este valor corresponde a 40%.

- O Se apareceu em altos níveis em todas as amostras analisadas, podendo assim classificar a sardinha como fonte desse micronutriente essencial. Foi constatado que as concentrações dos elementos nas sardinhas variam de acordo com a região e país em que habitam, podendo estar relacionado com o grau de poluição ambiental de cada local.

- A caracterização da folha metálica (espessura, dureza e camada de cromo) e do envernizamento interno (camada seca, aderência e porosidade) das latas utilizadas para o acondicionamento das sardinhas estudadas atendem aos parâmetros de qualidade estabelecidos para este tipo de embalagem.

- Foram encontrados teores acima do limite máximo estabelecido pela legislação nacional para As, Cd e Cr, em 72%, 12% e 8% das amostras, respectivamente.

- Os níveis de As e Cd apresentaram maior contribuição para o cálculo da estimativa de exposição a estes contaminantes, considerando o consumo diário de uma lata de sardinha por um adulto de 60 kg.

- Os resultados obtidos neste estudo sobre a presença dos contaminantes inorgânicos alumínio, arsênio, cádmio, cromo, ferro, chumbo, estanho, mercúrio e metilmercúrio em amostras de sardinhas enlatadas consumidas pela população brasileira são importantes do ponto de vista toxicológico e podem dar subsídios para os programas de vigilância sanitária garantindo a segurança dos alimentos.