



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos

ESTHER LIMA DE PAIVA

**CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA
E EM ATUM ENLATADO**

CAMPINAS

2017

ESTHER LIMA DE PAIVA

**CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA
E EM ATUM ENLATADO**

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

Aluna: Esther Lima de Paiva

Orientador: Dr. Marcelo Antônio Morgano

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Esther Lima de Paiva e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano.*

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Bolsa CAPES;
CNPq 442025/2014-9 e FAPESP 2014/50667-9

Ficha Catalográfica

Instituto de Tecnologia de Alimentos
Biblioteca Central do ITAL
Adriana Gomes do Nascimento - CRB/8 8853

P124a

Paiva, Esther Lima de.

Contaminantes Inorgânicos em Alimentos da Culinária Japonesa e em Atum Enlatado.

Esther Lima de Paiva / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2017.120f.

Marcelo Antônio Morgano (orientador)

Inclui bibliografia

1. *Sushi*. 2. *Sashimi*. 3. Atum Enlatado I. Morgano, Marcelo Antônio. II. Instituto de Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Inorganic Contaminants in Japanese Food and Canned Tuna

Palavras-chave em inglês: *Sushi*, *Sashimi*, Canned Tuna

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

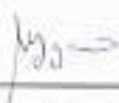
Banca examinadora: Marcelo Antonio Morgano, Adriana Pavesi Ariseto Bragotto, Sílvia Amélia Verdiani Tfouni

Data da defesa: 13 de Fevereiro de 2017

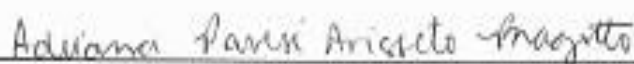
Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna Esther Lima de Paiva, aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de fevereiro de 2017.



Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano
CCQA-ITAL – (Presidente)



Prof. Dra. Adriana Pavesi Ariseto Bragotto
FEA-UNICAMP - (Titular)



Prof. Dra. Sílvia Amélia Verdiani Tfouni
CCQA-ITAL - (Titular)

*Ao meu Senhor Jesus, e aos meus pais, Jocemil e Zilda
por tudo...*

*“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas (...)”
Rm. 11:36a*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder essa oportunidade e me sustentar durante todo o período;

ao Professor Dr. Marcelo Antônio Morgano pela disponibilidade, atenção, paciência, dedicação e profissionalismo dispensados, além do aprendizado obtido ao longo dos últimos anos de parceria;

ao Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL- pela fundamental colaboração na realização deste trabalho, especialmente ao CCQA por toda estrutura concedida. Agradeço em especial aos funcionários e colaboradores vinculados à instituição que me assistiram diretamente, além do âmbito laboratorial, promovendo um ambiente de trabalho agradável, Sueli, Elaine, Vera, e Adriana, sempre muito queridas;

à Raquel F. Milani, em especial, por todo apoio, carinho, atenção, paciência e colaboração em todas as etapas da execução deste trabalho;

à Bárbara S. Boer, pela participação ativa e presente nas etapas de análise contidas no trabalho;

à Professora Dra. Adriana Pavesi e à Professora Dra. Sílvia Tfouni pelas propostas, e correções sugeridas para redação final do presente trabalho;

aos amigos e colegas do programa de mestrado, Thaís, Luana, Diogo, Luís, Marília, Tainá e Karen pelo companheirismo e convivência;

aos meus pais, e toda minha família pelo incentivo e suporte incondicional;

aos meus irmãos da igreja, pelas orações, encorajamento e parceria durante todo o período.

RESUMO

Peixes e frutos do mar presentes em uma dieta básica constituem importante fonte de proteínas, minerais, vitaminas e ácidos graxos essenciais, como o ômega-3. Estes são conhecidos mundialmente por reduzir os níveis de colesterol e manter em condições saudáveis o coração humano, o cérebro, as articulações e o sistema imunológico. Entretanto, os pescados podem ser contaminados por elementos inorgânicos tóxicos provenientes do ambiente aquático ou por ação antropogênica, podendo ser bioacumulados nos tecidos dos peixes. O consumo de pescado é considerado a principal via de exposição dos humanos a contaminantes inorgânicos, como: mercúrio, metilmercúrio, chumbo e cádmio. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de mercúrio (total e orgânico) em amostras de sushi e sashimi comercializadas em restaurantes da cidade de Campinas, SP e em amostras de atum enlatado a presença de cádmio, de chumbo, de estanho e de mercúrio (total e orgânico). As amostras estudadas foram sushis de atum, de salmão e de kani; e para o sashimi foram avaliados os músculos de 12 espécies de peixes mais usadas na sua elaboração, como: peixe espada (*Trichiurus lepturus*), peixe agulha (*Strongylura marina*), namorado (*Pseudopercis numida*), salmão (*Salmo salar*), atum (*Thunnus thynnus*), buri (*Seriola lalandi*), robalo (*Centropomus sp*), tainha (*Mugil platanus*), polvo (*Octopus vulgaris*), dourado (*Coryphaena hippurus*), anchova (*Ruvettus pretiosus*) e bicuda (*Boulengerella maculata*). Para o atum enlatado foram estudados 3 lotes de 5 marcas disponíveis comercialmente. A determinação do mercúrio orgânico foi realizada usando um método de extração líquido-líquido com tolueno e L-cisteína em meio ácido, e a quantificação do teor total e orgânico de mercúrio foi realizada em um sistema de decomposição térmica e espectrometria de absorção atômica (TDA AAS). As concentrações de cádmio, de chumbo e de estanho foram determinadas usando um espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) após prévia digestão ácida das amostras em sistema fechado assistido por micro-ondas. As amostras de sushi apresentaram conteúdo de mercúrio orgânico (MeHg⁺) de: 12 a 583 µg kg⁻¹; 6,6 a 8,2 µg kg⁻¹ e valores não detectados para os sushis de atum, kani e salmão, respectivamente. A proporção média entre Hg orgânico / Hg total para o sushi de atum foi de 88%, indicando que a forma mais tóxica do mercúrio (MeHg⁺) predomina

neste alimento. Dentre as espécies de peixe utilizadas no preparo do sashimi, o peixe agulha e o atum apresentaram maiores níveis de mercúrio, enquanto menores teores foram encontrados para salmão e tainha. A maior proporção média observada entre Hg orgânico / Hg total foi de 93% para o peixe namorado. Os resultados obtidos para os contaminantes inorgânicos nas amostras de atum enlatado indicaram que 20% destas ultrapassaram os limites máximos estabelecidos pela legislação Brasileira para cádmio; para chumbo o maior valor foi $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o estanho não foi detectado em nenhuma amostra. Os teores máximos encontrados para Hg total e MeHg^+ nas amostras analisadas de atum enlatado foram de 261 e $258 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chaves: metilmercúrio, avaliação de ingestão, *sushi*, *sashimi*, atum enlatado

ABSTRACT

In a basic diet fish and seafood are important sources of protein, minerals, vitamins and essential fatty acids such as omega-3. These essential fatty acids are known worldwide for reducing cholesterol levels and maintaining healthy conditions in the human heart, brain, joints and immune system. However, fish may be contaminated by toxic inorganic elements from the aquatic environment or by anthropogenic action, and may be bioaccumulated in fish tissues. Fish consumption is considered the main source of human exposure to inorganic contaminants, such as mercury, methylmercury, lead and cadmium. The objective of this study was to evaluate the presence of mercury (total and organic) in samples of sushi and sashimi commercialized in restaurants in the city of Campinas, SP and the presence of cadmium, lead, tin and mercury (total and organic) in samples of canned tuna. The samples studied were tuna, salmon and kani sushi; and for sashimi, the muscles of 12 species of the most used fish for this dish elaboration, such as: swordfish (*Trichiurus lepturus*), needlefish (*Strongylura marina*), sandperch (*Pseudoperca numida*), salmon (*Salmo salar*), tuna (*Thunnus thynnus*), amberjack (*Seriola lalandi*), sea bass (*Centropomus sp*), mullet (*Mugil platanus*), octopus (*Octopus vulgaris*), golden fish (*Coryphaena hippurus*), anchovy (*Ruvettus pretiosus*) and barancuda (*Boulengerella maculata*). For canned tuna, 3 batches of 5 commercially available brands were studied. The extraction of the organic mercury was carried out using a liquid-liquid extraction method with toluene and L-cysteine in acidic solution, and the quantification of the total and organic content was carried out by a thermal decomposition and atomic absorption spectrometry. The concentrations of cadmium, lead and tin were determined using an atomic emission spectrometer with inductive coupling plasma source (ICP OES) after previous acid digestion of samples in a microwave-assisted system. Sushi samples had organic mercury content (MeHg⁺) of: 12 to 583 µg kg⁻¹; 6.6 to 8.2 µg kg⁻¹ and no detected values for tuna, kani and salmon sushis, respectively. The average ratio of organic Hg / total Hg for tuna sushi was 88%, indicating that the most toxic form of mercury (MeHg⁺) predominates in this food. Among the species of fish used in the preparation of sashimi, needlefish and tuna showed the highest levels of mercury, whilst the lowest levels were found for salmon and mullet. The highest average proportion observed between organic Hg /

total Hg was 93% for sandperch fish. The results obtained for the inorganic contaminants in the samples of canned tuna indicated that 20% of these exceeded the limits established by the Brazilian legislation for cadmium; for lead the highest value was $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ and tin was not detected in any sample. The maximum levels found for total Hg and MeHg^+ in the analyzed samples were 261 and $258 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Keywords: methylmercury, intake evaluation, sushi, sashimi, canned tuna.

ÍNDICE

RESUMO.....	VII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1:	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EM PESCADOS.....	6
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 Benefícios do consumo de pescados	7
1.3.1 Mercúrio no meio ambiente.....	10
1.3.2 Mercúrio no ambiente aquático.....	10
1.3.3 O ciclo do mercúrio no meio ambiente.....	12
1.3.4 Toxicidade do Mercúrio.....	14
1.3.5 Metilmercúrio (MeHg ⁺)	15
1.4 Cádmio.....	16
1.5 Chumbo.....	17
1.6 Estanho.....	17
1.7 Métodos de Determinação dos Contaminantes Inorgânicos.....	18
1.7.1 Determinação de mercúrio	18
1.7.2 Determinação de Cd, Pb e Sn em atum enlatado	20
1.8 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2	30
Sushi commercialized in Brazil: organic Hg levels and exposure intake evaluation ..	30
Abstract.....	31
1. Introduction.....	32
2. Materials and methods	34

2.1 Instrumentation	34
2.2. Reagents and standards.....	34
2.3. Samples.....	34
2.4 Determination of total and organic mercury in the sushi samples.....	35
2.4.1 Determination of total mercury.....	35
2.4.2 Determination of organic mercury	35
2.5 Stability of the organic mercury extracts	36
3. Results and discussion	36
3.1 Validation of the method for the determination of total and organic mercury ..	36
3.2 Assessing the stability of the organic extract	39
3.3 Results obtained for the samples	41
3.4 Estimation of the daily intake of methylmercury from the consumption of sushi and the exposure risk assessment	45
4. Conclusion	48
Acknowledgements.....	49
References	49
CAPÍTULO 3.....	58
Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in Brazil: risk assessment and exposure evaluation.....	58
Abstract.....	59
1. Introduction	60
2. Materials and Methods.....	61
2.1. Samples.....	61
2.2. Reagents and standards.....	63
2.3. Instrumentation	63
2.4. Determination of total mercury and extraction of organic mercury (MeHg)	63
2.4.1. Determination of total mercury.....	63

2.4.2. Extraction of organic mercury (MeHg).....	64
2.5. Estimation of methylmercury exposition.....	64
3. Results and Discussion.....	65
3.1 Analytical characteristics.....	65
3.2. Results obtained for total mercury and methylmercury in sashimi.....	66
3.3 Evaluation of the potential risk related to the ingestion of MeHg ⁺	73
4. Conclusions.....	78
5. References.....	78
CAPÍTULO 4.....	85
Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil.....	85
1. Introdução.....	87
2. Materiais e Métodos.....	89
2.1 Amostras.....	89
2.2 Reagentes e padrões.....	89
2.3 Instrumentação.....	90
2.4 Digestão em sistema fechado assistido por micro-ondas para determinação de Cd, Pb e Sn em ICP OES.....	90
2.5 Determinação de mercúrio total.....	91
2.6 Determinação de metilmercúrio: extração com tolueno em sistema fechado assistido por micro-ondas.....	91
2.7 Análise Estatística.....	92
2.8 Controle de qualidade.....	92
3. Resultados e discussão.....	93
3.1 Contaminantes inorgânicos em atum enlatado.....	93
3.2 Estimativa de ingestão de Cd, Pb e Hg pelo consumo de atum enlatado e avaliação da exposição do risco.....	98
4. Conclusões.....	99

5. Referências Bibliográficas	100
CONCLUSÃO GERAL.....	106

INTRODUÇÃO

O consumo de peixes e frutos do mar tem aumentado progressivamente nos últimos anos por desempenhar papel importante na dieta humana em todo o mundo, por serem fontes de proteína de alto valor biológico, de antioxidantes, de ácidos graxos essenciais e de micronutrientes como o selênio (Pieniak et al., 2010).

Além disso, o hábito de ingerir peixe cru é de introdução recente no cardápio de estabelecimentos de alimentos no Brasil e tem sido bem aceito por grande parte da população. Segundo Canecchio (2003), no estado de São Paulo, tem se observado um crescimento no número de estabelecimentos da culinária Japonesa chegando a ultrapassar as churrascarias já existentes. A quantidade de restaurantes nipônicos cresceu mais de sete vezes desde 1993, quando somavam 80 (Martins, 2006). O aumento da popularização dos pratos da culinária Japonesa pode estar associado ao funcionamento do sistema de rodízio ou bufê, na categoria dos *fast food* em vários restaurantes durante o horário de almoço (Burger et al., 2013).

O sushi refere-se tecnicamente ao arroz com vinagre que recobre recheios cru, cozido ou marinado de frutos do mar, carne, legumes e ovos. Diferentes tipos incluem maki rolls (recobertos por arroz), nigiri (recobertos por peixe); enquanto o sashimi é um termo genérico relacionado á fatias finas ou pedaços de peixe cru fresco, tradicionalmente servido com molho de soja, wasabi, gengibre ou rabanete (Nibble, 2012). O atum enlatado é uma espécie de peixe muito comercializada no Brasil sendo frequentemente consumido em diversos pratos por grande parte da população.

Diversos compostos químicos gerados por atividades humanas são liberados no ambiente, principalmente em corpos d'água e solo, onde podem se acumular em organismos vivos (Burger, Stern, & Gochfeld, 2005). Entre estes compostos, podemos citar o MeHg^+ que é a espécie orgânica de mercúrio predominante nos pescados. Este apresenta alto potencial tóxico, podendo ser transferido pela cadeia alimentar para os seres humanos representando contaminação potencialmente nociva, em particular para alguns grupos da população, como crianças em desenvolvimento e gestantes (Horvat & Gibi_car, 2005).

A gravidade dos efeitos adversos para a saúde está relacionada com o contaminante inorgânico e sua forma química, apresentando dependência entre tempo de exposição e concentração da dose. Por isso, a determinação dos teores de contaminantes presentes em pescados é importante quanto ao estabelecimento de limites de ingestão.

Neste trabalho foram estudados os elementos inorgânicos com alta toxicidade e possibilidade de acumulação pelos organismos marinhos em amostras de sushis, sashimis e atum enlatado. O mercúrio total (Hg) e mercúrio orgânico (MeHg⁺) foram estudados em amostras de sushis e sashimis; e em amostras de atum enlatado, cádmio (Cd), chumbo (Pb), estanho (Sn) e Hg (total e MeHg⁺).

Para a avaliação da estimativa de exposição aos contaminantes inorgânicos podem ser utilizados métodos comparativos baseados na ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) e no limite máximo (LM) estabelecido por órgãos nacionais e internacionais, como o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA (WHO, 2015) e a Resolução Brasileira RDC-42 (ANVISA, 2013).

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto abordado. O artigo apresentado no capítulo 2 foi redigido em conformidade às normas da revista *Food Control*, o artigo do capítulo 3 de acordo com as normas da revista *Food Additives and Contaminants – Part A* e o capítulo 4 de acordo com as normas da revista *Food Additives and Contaminants – Part B*.

Referências Bibliográficas

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.
- Canecchio, O. (2003). Chegamos a 278 sushis por minuto. *Veja São Paulo*, jul 23:14-22.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Donio, M., & Pittfield, T. (2013). Sushi consumption rates and mercury levels in sushi: ethnic and demographic differences in exposure. *Journal of Risk Research*, 16(8), 1057-1075.

- Burger, J., Stern, A. H., & Gochfeld, M. (2005). Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk. *Environmental Health Perspectives*, 113(3), 266-271.
- Horvat, M., & Gibi_car, D. (2005). Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health. In *Handbook of elemental speciation II e Species in the environment, food, medicine and occupational health* (pp. 281-304). Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Martins, F. O. (2006). Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidas em bufês na cidade de São Paulo. Paulo, Brasil: Dissertação de mestrado. Faculdade de Saúde Pública, 142pp.
- Nibble. (2012). Types of sushi & sashimi: And a glossary of sushi & sashimi terms. Disponível em: <http://www.thenibble.com/reviews/main/fish/seafood/sushiglossary.asp>. Acessado em 17.09.15
- Pieniak, Z., Verbeke, W., & Scholderer, J. (2010). Health-related beliefs and consumer knowledge as determinants of fish consumption. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 23, 480–488.
- WHO - World Health Organization. (2015). Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9 th Session New Delhi, India, 16 e 20 March. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf. Acessado em 05.08.16.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a determinação do teor de mercúrio total e orgânico, cádmio, chumbo e estanho presente em alimentos contendo peixe em sua composição (*sushi, sashimi* e atum enlatado), utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) e espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-OES).

Objetivos específicos:

- ✓ Desenvolver um método rápido, simples, de baixo custo e com o menor consumo de reagentes químicos visando os conceitos da “química verde” para estudo de mercúrio;
- ✓ Realizar a validação do método avaliando as figuras de mérito: linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão. Nesta etapa serão utilizados os materiais de referência certificados: NRC TORT-2 *Lobster Hepatopancreas* e NCR DORM-4 *Fish protein*;
- ✓ Definir os parâmetros instrumentais e analíticos relacionados à extração da espécie orgânica de Hg presente nas amostras usando um sistema fechado de extração assistido por micro-ondas, como: temperatura, tempo e concentração dos solventes utilizados durante a etapa de extração; e definir as variáveis instrumentais usadas no analisador de mercúrio, como: tempo e temperatura nas etapas de secagem e de decomposição;
- ✓ Realizar estudo para determinar a estabilidade da fase orgânica obtida na extração do metilmercúrio (Hg orgânico);
- ✓ Determinar níveis de Hg total e orgânico presentes em sushi de atum, kani e salmão;
- ✓ Determinar níveis de Hg total e metilmercúrio presentes em diferentes espécies de peixe mais utilizadas na elaboração de sashimi, como: peixe espada (*Trichiurus lepturus*), peixe agulha (*Strongylura marina*), namorado (*Pseudopercis numida*), salmão (*Salmo salar*), atum (*Thunnus thynnus*), buri

(*Seriola lalandi*), robalo (*Centropomus sp*), tainha (*Mugil platanus*), polvo (*Octopus vulgaris*), dourado (*Coryphaena hippurus*), anchova (*Ruvettus pretiosus*) e bicuda (*Boulengerella maculata*);

- ✓ Determinar e quantificar níveis de Hg total, metilmercúrio, cádmio (Cd), chumbo (Pb) e estanho (Sn) em amostras de atum enlatado, disponíveis comercialmente;
- ✓ Avaliar a estimativa de exposição aos contaminantes pelo consumo de alimentos da culinária japonesa e atuns enlatados;
- ✓ Comparar os valores obtidos dos contaminantes inorgânicos com os limites máximos estabelecidos pela legislação vigente.

CAPÍTULO 1:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EM PESCADOS

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Benefícios do consumo de pescados

O consumo de peixes, de modo geral, tem-se expandido nos últimos anos por ser considerado um alimento saudável alternativo à carne vermelha, sendo uma fonte de proteína tão importante quanto à mesma e com aproximadamente 60% a menos de calorias (Holub & Holub, 2004). Do ponto de vista de benefícios para a saúde, o peixe possui alta qualidade nutricional para o ser humano com algumas das características mais atraentes em recursos alimentares marinhos, como sais minerais, proteínas de alta qualidade, ômega-3 e os ácidos graxos (USEPA, 2016). A diferença básica entre os peixes e outros produtos de origem animal é o conteúdo de ácidos graxos insaturados essenciais que têm efeitos protetores contra doença cardíaca coronária e trombose, além disso, contêm grandes quantidades de vitaminas lipossolúveis A e D, minerais cálcio, fósforo, ferro, cobre, selênio e, no caso dos peixes de água salgada, iodo. A composição da fração lipídica dos peixes contrasta com a de mamíferos por conter elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa com cinco ou seis duplas ligações (mais de 40%), o que impacta tanto na saúde (atividade benéfica antitrombótica), quanto na tecnologia aplicada durante o processamento destes alimentos (rápida deterioração e rancificação) (Hall *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2014; UNEP, 2013).

O valor nutricional do pescado e a divulgação de estudos que associam seu consumo com benefícios a saúde tem promovido um aumento de interesse por esse alimento (Burger *et al.*, 2004). Dentre os possíveis benefícios da ingestão de uma ou duas porções de peixe por semana, que contêm cerca de 2 g de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, estão a redução do risco de acidente vascular cerebral (AVC), de depressão, do Mal de Alzheimer e de morte por doença cardíaca (SanGiovanni *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2014).

O consumo de pescado pode ser influenciado por diversos fatores, dos quais se destacam os socioeconômicos, os padrões de consumo alimentar, características pessoais, estado de saúde e conceitos dos próprios consumidores relacionados a este alimento (Trondsen *et al.*, 2003). Registra-se que o consumo mundial de pescado aumentou de 10 kg/per capita/ano (em 1965) para 17 kg/per capita/ano (em 2007). No território brasileiro, o consumo per capita aumentou de 4 kg/ano para 9

kg/ano nos últimos 8 anos, através de políticas e campanhas para incentivar o consumo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo per capita de 12 kg de peixe por ano (230 g/semana) por habitante (OMS, 2013).

O consumo de alimentos da culinária japonesa vem crescendo e se expandindo em todo o mundo pelo fato de que os consumidores estão cada vez mais exigentes e conscientes na escolha da sua alimentação, buscando selecionar alimentos mais saudáveis e melhorar a qualidade de vida. Pesquisas recentes mostram que pratos à base de peixe cru tem se tornado cada vez mais acessíveis em restaurantes comuns e especializados, buffets e sushi bars (Carvalho, 2013).

O sushi, prato tradicional japonês e adaptado por diversas outras culturas, pode ser classificado em três diferentes categorias: nigiri, maki e temaki. Dos três, o mais simples visualmente é o nigiri, servido com peixe cru, com camarão cozido, arroz e ovo. Talvez o mais consumido fora do Japão seja o maki, um sushi que atrai a atenção de quem não está acostumado com peixe cru. Ele é servido num rolo, envolto de folha de alga (nori) e recheado com arroz, o que disfarça sua aparência de peixe cru. O terceiro e último tipo é o temaki, cujo consumo no Brasil é crescente. É servido em formato de cone, podendo ser recheado com vegetais, além de salmão que geralmente é defumado (Feng, 2012).

O sashimi consiste em peixes e frutos do mar muito frescos, fatiados em pequenos pedaços e servidos com algum tipo de molho no qual ele pode ser mergulhado, geralmente em shoyu, pasta de wasabi, condimentos, como gengibre fresco ralado, e também de guarnições simples como shiso (Feng, 2012). As dimensões variam de acordo com a espécie de peixe utilizado e o Sushiman, porém, costumam ter em torno de 2,5 cm de largura e 4 cm de comprimento, com 0,5 cm de espessura.

Pescado em conserva, como atum enlatado, é uma opção interessante para o consumidor, devido ao tempo reduzido de preparo, caracterizando o crescente mercado de alimentos convenientes e práticos, e que agregam saudabilidade á dieta. (Feng, 2012). Estão disponíveis comercialmente em diversos tipos de conserva, como óleo, água, molhos, entre outros, geralmente na forma sólida ou ralada.

1.2 Consumo de peixes *versus* contaminação por mercúrio

A ingestão de peixes e derivados é considerada a principal via de exposição humana ao mercúrio (Rice et al., 2014), sendo que o consumo de peixe cru, como sashimi, influencia significativamente na concentração final de mercúrio ingerida. Os peixes predadores podem conter quantidades elevadas de metais tóxicos em seus corpos. No caso do atum, o tecido do músculo constitui uma parte importante do ponto de vista nutricional e, também, um conjunto representativo estável de metais traço.

Peixes predadores como tubarão e atum podem acumular mais Hg do que as espécies não carnívoras; como o homem está localizado acima dessa cadeia trófica, a acumulação dos metais tóxicos pode ser perigosa, dependendo do tipo e frequência do consumo (Jagtap et al., 2011). Segundo Miguéis et al. (2015) é importante a obtenção de dados relacionando a ingestão e a exposição ao mercúrio presente em pratos culinários à base de peixe devido ao grande crescimento no consumo destes alimentos nos últimos anos.

1.3 Mercúrio

O Hg tem atraído interesse científico e acadêmico desde a antiguidade por apresentar propriedades físico-químicas bem diferentes aos demais elementos do seu grupo. É um metal líquido em condições normais de temperatura e pressão e encontrado sob três estados de oxidação: mercúrio elementar ou metálico (Hg^0), mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e diversas espécies orgânicas (Azevedo, 2003). Este elemento também apresenta compostos organometálicos muito utilizados tanto na indústria como na agricultura. O mercúrio participa de importantes reações no meio ambiente envolvendo a conversão em compostos metilmercúrio e dimetilmercúrio e as interconversões entre estes compostos. Estas reações representam um importante papel no chamado “ciclo local” do mercúrio (Souza et al., 2014; Azevedo, 2003). Elas ocorrem naturalmente, mas podem ser intensificadas à medida que o teor de mercúrio aumenta na água e no sedimento, tanto em meio aeróbico quanto anaeróbico (USEPA, 2016; Rice et al., 2014). Existem inúmeras bactérias capazes de metilar mercúrio, entretanto a taxa de metilação dependerá de condições favoráveis ao seu crescimento. As maiores taxas, em ambiente aquático, ocorrem na camada superficial dos sedimentos, e em matéria orgânica em suspensão (Boening et al., 2000). A solubilidade do mercúrio orgânico e do metálico é maior nos lipídeos,

o que ocasiona um aumento no transporte biológico e uma maior toxicidade ao longo da cadeia trófica (Pedrosa *et al.*, 2006)

As fontes de Hg para o meio ambiente podem ser naturais, como a degaseificação da crosta terrestre e atividade vulcânica, e as antropogênicas, como as atividades industriais e agrícolas, a queima de combustível fóssil, a mineração, dentre outros (USEPA, 2016).

1.3.1 Mercúrio no meio ambiente

Entre as décadas de 50 e 60 o mercúrio tornou-se um sério problema de contaminação ambiental quando, na baía de Minamata no Japão uma indústria de acetaldeído lançou rejeitos contaminados não apenas por mercúrio, mas também por seus compostos. Cerca de seis mil pessoas desta região, foram atingidas em decorrência da ingestão do pescado contaminado. Aproximadamente quinhentas delas, que viviam na aldeia de pescadores, morreram em períodos que variaram entre vinte dias a quatro anos depois da contaminação e outras tantas adquiriram deficiências físicas permanentes, conhecida ainda hoje como doença de Minamata (Goyer,1991). Posteriormente, centenas de casos fatais ocorreram no Iraque, quando sementes para plantio, tratadas com fungicidas a base de sais de mercúrio, foram usadas como alimentos. Outro caso conhecido ocorreu no Novo México quando uma família foi envenenada ao consumir carne de porco, proveniente de um animal que havia sido alimentado com sementes tratadas com fungicida à base de mercúrio, que resultou em óbito de toda a família (Burger *et al.*, 2003).

1.3.2 Mercúrio no ambiente aquático

A dispersão de poluentes oriundos das descargas industriais e/ou de outra fonte potencialmente poluidora no ecossistema aquático está ligada a vários fatores, tais como: solubilidade, reatividade e/ou estabilidade química e a presença de organismos vivos (Sunderland *et al.*, 2006; Pedrosa *et al.*, 2006; Lacerda *et al.*, 2005).

A ação das bactérias metiladoras na conversão de espécies inorgânicas para as formas metiladas é o primeiro passo nos processos aquáticos denominados bioacumulação. Considera-se que estes processos ocorram tanto nos corpos d'água quanto no sedimento. Assume-se que as reações de metilação e desmetilação ocorram em todos os compartimentos ambientais, sendo que cada ecossistema

atinge seu próprio estado de equilíbrio com respeito às espécies individuais de mercúrio (Azevedo, 2003). No entanto, devido à bioacumulação de metilmercúrio, a metilação prevalece sobre a desmetilação em ambientes aquáticos (Micaroni, Bueno & Jardim, 2000).

Os compostos orgânicos de mercúrio são absorvidos diretamente do ambiente aquático ou da cadeia trófica. Os peixes, moluscos e crustáceos são capazes de concentrá-los várias ordens de grandeza (10^3 ou 10^4) em relação às concentrações na água (Kehrig *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2003). Por isso, esses organismos marinhos são responsáveis pela dinâmica destes poluentes no meio aquático. Também devem ser levados em consideração os fatores hidrodinâmicos, a salinidade e as condições do ecossistema aquático que podem disponibilizar ou não esses compostos orgânicos para a biota aquática (Canli & Atli, 2003).

Tais compostos quando ingeridos e assimilados pela biota aquática, tendem a concentrar-se ao longo da cadeia trófica à medida que passam de um nível trófico inferior a outro superior. Sendo assim, organismos que pertençam a níveis tróficos mais elevados apresentarão maior concentração deste composto (Fernandes *et al.*; 2007; Gray *et al.*, 2006). A via segundo a qual o mercúrio penetra no peixe pode variar de acordo com a espécie e com seu hábito alimentar. Normalmente as vias são as brânquias, local de difusão passiva de químicos lipofílicos e o hábito alimentar (Kehrig *et al.*, 2006). Devido à eficiência de transferência do mercúrio ao longo da cadeia trófica foi verificada uma maior retenção deste metal nos organismos superiores. Sendo que esta taxa de transferência é uma função da forma química do mercúrio encontrado na presa (Fernandes *et al.*; 2007; Gray *et al.*, 2006).

Os peixes eliminam preferencialmente mercúrio inorgânico e assimilam o MeHg^+ . Assim, à medida que a presa apresenta uma maior percentagem de mercúrio orgânico a eficiência da transferência será maior e conseqüentemente a assimilação pelo predador também (Souza, 2014). Portanto, as concentrações de MeHg^+ nos indivíduos do topo da cadeia trófica (peixes predadores, mamíferos aquáticos, etc.) serão maiores (Fernandes *et al.*; 2007; Kehrig *et al.*, 2010).

Existem outros fatores que também influenciam a bioacumulação e a biomagnificação do mercúrio pelos peixes predadores como, por exemplo: a posição geográfica, a maturidade sexual, o comprimento, o hábito alimentar, a qualidade da

água e a contaminação ambiental (Malm *et al.*; 2002; Kehrig *et al.*, 2006). A bioacumulação de mercúrio pelos organismos aquáticos é influenciada principalmente, pela quantidade do elemento a que estão expostos, ou seja, a concentração do metal nos compartimentos ambientais (sedimento, coluna d' água, raízes de macrófitas e alimento) (Boening *et al.*, 2000). No tecido muscular do peixe foi estabelecido que os níveis de concentração de mercúrio possuem uma correlação direta e positiva com o comprimento (idade) dos organismos (Silva & Estanislau, 2015; Kehrig *et al.*, 2010).

A temperatura é um importante fator de controle da toxicidade e velocidade de acumulação dos compostos de mercúrio uma vez que, sua variação pode afetar a bioacumulação deste pelos organismos marinhos. Em temperaturas elevadas ocorre um acréscimo na biomagnificação, mesmo que não ocorra mudança da concentração do elemento no sistema (Malm *et al.*; 2002).

1.3.3 O ciclo do mercúrio no meio ambiente

O mercúrio ocorre no meio ambiente associado a outros elementos, sendo o enxofre o mais comum, com quem forma o minério cinabre (HgS), composto de cor vermelha ou preta, cujas maiores reservas encontram-se na Itália e Espanha (Almaden). O aporte antrópico ocorre através de indústrias que queimam combustíveis fósseis, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de mercúrio, baterias, produtos odontológicos, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, dentre outros (Rice *et al.*, 2014).

Esses processos introduzem ao meio ambiente cerca de 10.000 toneladas de mercúrio por ano e representam maior risco à saúde humana dependendo da localização e da intensidade dos lançamentos (Azevedo, 2003). O mercúrio liberado para a atmosfera (fontes naturais ou antropogênicas) na forma de Hg⁰ sofre oxidação na interface sólido-líquido (neblina, gotículas de chuva) e através de reações mediadas pelo ozônio e raios-ultravioletas transforma-se em Hg²⁺. Este retorna ao ambiente aquático e terrestre sendo carregado pela água da chuva ou adsorvido à pequenas partículas (Souza, 2014). No ambiente aquático, o Hg²⁺ é adsorvido preferencialmente na superfície do sedimento, ácidos húmicos, material

particulado e argilas por processos de co-precipitação e co-reação (UNEP, 2009). Bactérias, incluindo as sulfato redutoras, transformam o Hg^{2+} em metilmercúrio ($MeHg^+$) na interface água-sedimento. O $MeHg^+$ é rapidamente absorvido pelos organismos marinhos e desta forma será bioacumulado e biomagnificado ao longo da cadeia trófica (USEPA, 2016). Em menor extensão, o $MeHg^+$ é, também, desmetilado a Hg^{2+} e posteriormente reduzido à Hg^0 retornando a atmosfera (UNEP, 2009; Carvalho, 2013) como demonstrado na figura 1.

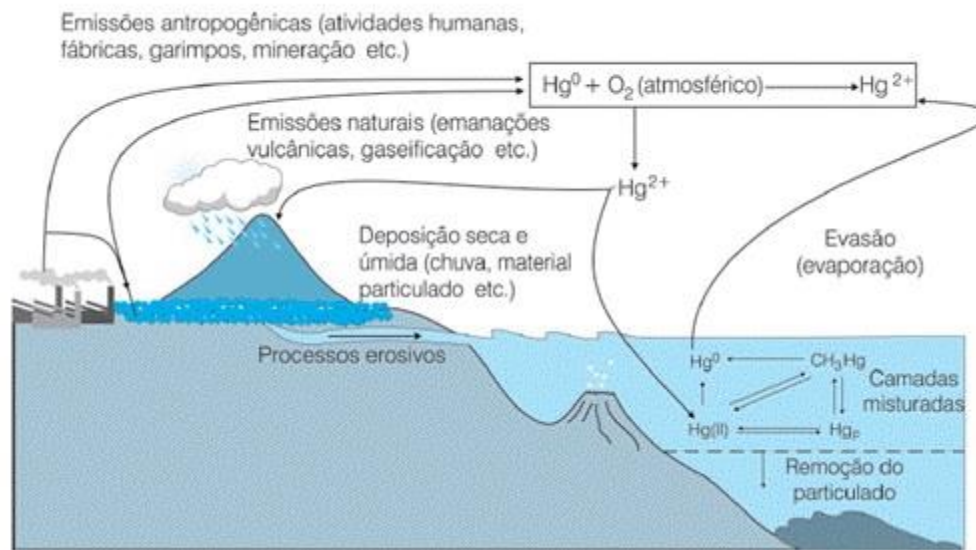


Figura 1: Ciclo do mercúrio

Fonte: Souza & Barbosa (2000)

Os compostos de mercúrio formados apresentam diferentes graus de toxicidade para o homem dependendo de suas propriedades químicas, sendo que estas espécies irão determinar o grau de absorção, distribuição e excreção no organismo humano. A afinidade destes compostos pelos grupos sulfidrílicos (SH) condiciona a maior parte de suas propriedades biológicas tornando-os capazes de inativar enzimas, mesmo em baixas concentrações e assim interferir no metabolismo celular (Carvalho, 2013). O Hg, também, se combina com outros ligantes de importância fisiológica, como fosfatos, carboxilato, imidazola, radicais hidroxil de enzimas e outras proteínas biológicas essenciais. A formação de complexos de menor toxicidade que o metilmercúrio, tais como CH_3HgSH ou CH_3HgSR , pode ser um processo regulador da contaminação da biota e explicam porquê, em alguns ambientes, observam-se concentrações elevadas de mercúrio na coluna de água e não na biota (Marins & Lacerda, 2013).

1.3.4 Toxicidade do Mercúrio

A toxicidade do mercúrio no ambiente depende das diferentes formas químicas sob a qual ele se apresenta, da espécie do organismo e das condições de lançamento no meio ambiente. Vestígios de mercúrio são solúveis em corpos de água, em que as bactérias podem provocar alterações químicas que transformam mercúrio em metil-mercúrio, uma forma mais tóxica. O metil-mercúrio liga-se fortemente às proteínas em tecidos de peixes, incluindo músculo e o cozimento não reduz sensivelmente o teor de metil-mercúrio do peixe (FDA, 1994). A baixa velocidade de eliminação do metilmercúrio pelos organismos faz com que ele seja considerado muito tóxico, se comparado com as outras formas de mercúrio inorgânico. Uma vez no organismo, ele rapidamente se converte em um complexo proteico de grande mobilidade através dos tecidos. A lipossolubilidade dos compostos orgânicos de mercúrio também facilitam a difusão deste entre os tecidos. Estes compostos também podem ser absorvidos pela pele e pelo trato gastrointestinal (Andayesh *et al.*, 2015)

No Brasil, estudos sobre a contaminação de mercúrio em peixes da Amazônia demonstram que o MeHg^+ corresponde a 90% da concentração total de Hg avaliado, sendo que a dieta da maioria da população indígena e ribeirinha é constituída por peixes, aumentando a exposição dessas povoados á contaminação por mercúrio (Silva & Estanislau, 2015).

Ao longo das últimas décadas, tem ocorrido crescente interesse na determinação dos níveis de metais pesados no meio marinho e isso também chamou a atenção para a determinação dos níveis de contaminação no abastecimento de alimentos públicos, particularmente peixes (Kalay, Aly & Canil, 1999; USEPA, 2016). Várias agências e organizações como o FDA e FAO, nos Estados Unidos e a Organização Mundial da Saúde (OMS) fornecem orientações sobre a ingestão destes elementos por seres humanos devido ao potencial tóxico associado (CAC, 2016). O Comitê Conjunto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) recomenda valores para ingestão semanal tolerável provisória (PTWI), para MeHg^+ , e ingestões diárias aceitáveis como diretrizes para aditivos alimentares e certos contaminantes em alimentos (FAO/WHO, 2011). Os Estados Unidos usam dose de referência, enquanto o Reino Unido/União Européia adotou ingestão diária tolerável (TDI), além dos valores estabelecidos pelo Codex, para

estimar a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente durante a vida sem risco apreciável para a saúde. Essas diretrizes de segurança representam uma entrada onde não há essencialmente nenhum risco, na medida em que pode ser julgado a partir da evidência científica disponível. No Brasil foi estabelecido o limite máximo tolerável de Hg para peixes e produtos da pesca (exceto predadores) de 0,5 mg/kg, e 1 mg/kg para peixes predadores (Anvisa, 2013). O valor de PTWI (ingestão semanal tolerável provisória) confirmado pelo JECFA durante sua 67ª reunião, realizada em 2006, para MeHg⁺ e Hg total é de 1,6 µg/kg peso corpóreo (pc) e 4,0 µg/kg pc, respectivamente (CAC, 2015).

1.3.5 Metilmercúrio (MeHg⁺)

Metilmercúrio é um organometálico formado por uma reação entre o Hg⁺² e o radical alquil de cadeia curta. O metilmercúrio possui grande afinidade pelo grupamento sulfidrílico das proteínas e afinidade menor com os grupos carboxílicos, fosforílicos, aminas e hidroxilas, alguns dos quais estão presentes em enzimas (Rice *et al.*, 2014). É solúvel em lipídeos, possui facilidade em se difundir através de membranas biológicas sendo facilmente distribuído pelo organismo e é bioacumulado ao longo da cadeia trófica. Devido à sua alta lipossolubilidade e rápida incorporação nos órgãos críticos pode atravessar a barreira placentária e cerebral causando danos à saúde do feto como distúrbios neurofisiológicos (Souza, 2014). Nos seres humanos são observados níveis de MeHg⁺ no cérebro seis vezes maiores que no sangue. Os responsáveis mais prováveis pela presença de MeHg⁺ no meio ambiente são os lançamentos diretos de seus compostos no meio, a biometilação de mercúrio inorgânico na interface sedimento água e a adsorção de mercúrio ao material particulado e às raízes de macrófitas (Azevedo, 2003).

Devido à sua tendência de bioacumulação ao longo da cadeia trófica, as maiores concentrações são observadas nos organismos do topo da cadeia alimentar. Esses organismos tendem a bioacumular MeHg⁺ principalmente nos músculos e no cérebro tornando-se portanto, a principal fonte de exposição para o ser humano (CAC, 2016). O MeHg⁺ possui baixa taxa de eliminação, caracterizando-se como a forma orgânica mais tóxica ao organismo. Quando acumulado em tecidos e órgãos, seus níveis superam em até cem vezes os níveis de mercúrio inorgânico (French *et al.*, 1997). A acumulação do MeHg⁺ pela biota aquática é rápida e a sua

eliminação é lenta, sendo mais efetivamente absorvido pelo trato gastrointestinal do que o mercúrio inorgânico (Souza, 2014).

Nos últimos 15 anos, vários estudos epidemiológicos têm-se centrado sobre os efeitos de exposição pré-natal, os quais concluíram que o mercúrio pode produzir alterações que afetam o desenvolvimento neurológico das crianças. Tanto o cérebro do adulto como o do feto estão suscetíveis à toxicidade do metilmercúrio, porém o sistema nervoso em desenvolvimento é particularmente mais sensível a este composto (USEPA, 2016). Crianças expostas a baixos níveis de metilmercúrio por longos períodos de tempo podem apresentar dificuldades de aprendizagem. A exposição à altas concentrações de metilmercúrio produz efeitos neurológicos adversos, tais como, paralisia cerebral, instabilidade mental, perda da capacidade de coordenação de movimentos, convulsões, perda de visão e audição, atraso no desenvolvimento, distúrbios da linguagem e perda de memória (CAC, 2016). Todos estes efeitos ocorrem devido a um atraso no desenvolvimento psicomotor. O metilmercúrio inibe a divisão e migração de células neuronais e interrompe a citoarquitetura do córtex cerebral em desenvolvimento (Clarkson *et al.*, 2003; ASAE 2008; Torres-Escribano *et al.*, 2010). O metilmercúrio presente no sangue de uma mulher grávida passa facilmente para o sangue do feto como também pode estar presente no leite materno (USEPA, 2016).

1.4 Cádmi

O cádmio é um elemento que pode estar presente no ar, solo e corpos d'água, devido à atividades antropogênicas e industriais em geral (Barone *et al.*, 2015). Este elemento é conhecido por se acumular no organismo induzindo disfunções no fígado e deficiências no sistema reprodutivo (Commission of the European Committees, 2001).

Boa concordância pôde ser observada quanto aos resultados existentes na literatura. Khansari, Khansari & Abdollahi (2005) encontraram valores compreendidos entre 50-72 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Cd em atum comercializados no Irã, enquanto valor médio de 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi determinado por Duran *et al.* (2014) em atuns enlatados disponíveis comercialmente na Turquia. As baixas concentrações de cádmio encontradas em amostras de atum enlatado sugerem que a exposição á

este contaminante ao público em geral através da ingestão de atum enlatado não apresenta riscos de toxicidade.

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2013), o limite máximo (LM) de Cd em atum é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto o JECFA estabelece um valor de PTMI (ingestão mensal tolerável provisória) de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo (CAC, 2016).

1.5 Chumbo

O chumbo e seus compostos podem entrar no ambiente durante a mineração, fundição, tratamento, utilização, reciclagem ou eliminação, podendo ser rejeitado em ambientes aquáticos contaminando peixes e organismos marinhos (Okyere *et al.*, 2015). A absorção de chumbo em crianças, através da ingestão, é maior que nos adultos e depende do tipo da dieta alimentar e do estado nutricional do indivíduo (Tavares, 1990). O efeito tóxico em crianças é maior por que o chumbo depositado nos ossos fica em constante mobilidade devido ao seu crescimento. O esqueleto, na primeira infância, aumenta quarenta vezes em relação à sua massa original, e durante esse período há uma maior capacidade de acumular. Chaves e Ramara (2014) mostraram que as crianças absorvem cerca de 40% do chumbo ingerido, enquanto que os adultos absorvem somente 5 a 10%.

Quanto aos dados disponíveis na literatura, encontra-se teores de Pb em amostras de atum enlatado comercializados na Turquia variando de 90 a $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Duran, Tuzen & Solay, 2014) e de 15 a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Manthey-Karl *et al.*, 2014).

Em relação ao Pb tanto a RDC 42 (ANVISA, 2013) quanto o JECFA (CAC, 2016) estabelecem limite máximo de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) para peixes.

1.6 Estanho

O estanho, assim como outros elementos traço, ocorre naturalmente no solo, em baixas concentrações e em formas não prontamente disponíveis para o homem em sua maioria (Rodrigues, 2007). Entretanto, algumas atividades como a mineração disponibilizam o metal para o ambiente. Segundo Sakuma (2004), as atividades de mineração são potencialmente poluidoras, além de contribuírem para a contaminação do entorno das minas.

A exposição ao Sn e seus compostos pode produzir diversos efeitos tais como neuro, hemato e imunológicos. Estes podem causar efeitos gastrointestinais, inibição da síntese do heme oxigenase, podendo também ser genotóxicos. Causam ainda irritação severa e queimação na pele, quando absorvidos por esta via. Outros efeitos são danos renais e hepáticos (WHO, 2005). O limite máximo estabelecido pela RDC 42 (ANVISA, 2013) é de 250 mg kg⁻¹ para Sn em alimentos enlatados e a estimativa de exposição em relação ao PTWI de 14 mg kg⁻¹, conforme estabelecido pelo JECFA (CAC, 2016)

1.7 Métodos de Determinação dos Contaminantes Inorgânicos

1.7.1 Determinação de mercúrio

Na literatura encontram-se estudos relacionados à determinação de mercúrio com a finalidade de se estimar seu real impacto no meio ambiente, principalmente para o sistema aquático, vegetação, e seres humanos, gerando grande progresso do desenvolvimento de técnicas para análise desse metal. Além disso, a alta toxicidade associada ao baixo nível de mercúrio em algumas amostras, ou associação com outros compostos, faz com que sejam necessárias técnicas precisas e sensíveis para sua determinação (Gray *et al.*, 2006).

A determinação de Hg tem sido realizada através da técnica de espectrometria de absorção atômica acoplada à geração de vapor (CV AAS), ou acoplado ao forno de grafite (GF AAS); espectrometria por fluorescência atômica (CV AFS); espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) (Carbonell *et al.*, 2009) e espectrometria de massas hífenada a plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS) (García *et al.*, 2016). Outra técnica de análise extremamente viável para determinações de Hg em amostras de alimento, sólidas ou líquidas, é a utilização do princípio da decomposição térmica, amalgamação e absorção atômica, que compõem o método de análise direta de mercúrio. A análise é rápida, com mínima necessidade de preparo de amostra, mínimo manuseio e descarte de produtos químicos perigosos. Além disso, possibilita obter baixos limites de detecção e de quantificação (Ferreira *et al.*, 2015).

O equipamento de termodecomposição, DMA-80 (Direct Mercury Analyser), é um instrumento de detecção por espectrometria de absorção atômica específico

para determinação de mercúrio. Neste instrumento, as amostras são pesadas diretamente em “barquinhas” de níquel ou de quartzo e inseridas no amostrador do equipamento. O princípio de funcionamento desta técnica consiste no aquecimento da amostra até uma temperatura adequada (>700 °C) para posterior concentração do vapor de mercúrio, em fios de ouro, formando um amálgama. A amálgama de Hg e Au pode formar compostos como $AuHg_2$, Au_2Hg e/ou $AuHg$ (Melamed & Villas Bôas, 2002). Em uma segunda etapa de aquecimento, agora do amálgama, o mercúrio é reduzido ao seu vapor monoatômico e detectado por absorção atômica. Esta técnica analítica tem como grande vantagem perante outras técnicas de absorção atômica o fato de dispensar a etapa de pré-tratamento da amostra, ou seja, a amostra sólida não requer a conversão do Hg para o meio aquoso para determinar Hg total (Ipolyi *et al.*, 2004). Além do mais, os produtos químicos gerados na preparação da amostra, na maioria das vezes são tóxicos e geram rejeitos que precisam ser tratados (Ricotta & Boylan, 1999). Blake e colaboradores (2005) utilizaram o analisador direto de mercúrio (DMA-80) para análise de cabelo. Análise da amostra direta em triplicata requereu apenas 15 minutos. Maggi e colaboradores (2009) desenvolveram um método analítico simples e rápido para determinação de metimercúrio em sedimentos utilizando como técnica para quantificação de mercúrio utilizando o DMA; entretanto, o método proposto faz uso de 10 mL de HBr, 40 mL de tolueno e 12 mL de L-cisteína como meio extrator, gerando grande quantidade de resíduo químico potencialmente tóxico. Além disso, a extração realizada no trabalho citado foi processada em duas etapas de 20 minutos cada, requerendo maior tempo de análise.

Os métodos analíticos mais comumente usados para a determinação de $MeHg^+$ utilizam as técnicas de cromatografia líquida ou gasosa acopladas á detectores de alta sensibilidade e seletividade, como a espectrometria de absorção atômica (AAS) (Jagtap *et al.*, 2011), a espectrometria por fluorescência atômica (AFS) (Ohki *et al.*, 2013), a espectrometria de emissão atômica, e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Tu, Qian & Frech, 2000). Nos últimos anos vem crescendo o uso da espectrometria de absorção atômica por decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) para estudo de Hg total (Morgano *et al.*, 2015) e orgânico (Paiva *et al.*, 2016) em alimentos.

1.7.2 Determinação de Cd, Pb e Sn em atum enlatado

Os métodos analíticos mais comumente usados para a determinação de Cd, Pb e Sn em amostras de atum enlatado estão baseados na técnica de espectrometria de absorção atômica por chama (FAS AAS) (Okyere *et al.*, 2015); espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF-AAS) (Andayesh *et al.*, 2015), espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) (Clémens *et al.*, 2011, Mahalakshmi, 2012) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) (Pastorelli *et al.*, 2012).

1.8 Referências Bibliográficas

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

ASAE, 2008. Perigos Químicos nos Alimentos: Caso Específico do Pescado. Ministério da Economia e da Inovação. Disponível em: <http://www.asae.pt/?cn=59605963AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA>. Acessado em: 18.02.14

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

Azevedo, F.A. "Toxicologia do mercúrio. São Paulo: Editora RIMA/Intertox, 2003. 272p.

Barone, G., Storelli, A., Garofalo, R., Busco, V. Pietro, Quaglia, N. C., Centrone, G., & Storelli, M. M. (2015). Assessment of mercury and cadmium via seafood consumption in Italy: estimated dietary intake (EWI) and target hazard quotient (THQ). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(8), 1277–1286.

- Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, 1335-1351.
- Burger, J., & Gochfeld, M. (2004). Mercury in canned tuna: White versus light and temporal variation. *Environmental Research*, 96(3), 239–249.
- Burger, J., Dixon, C., Boring, C. S., & Gochfeld, M. (2003). Effect of deep-frying fish on risk from mercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 66(9), 817–828.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. (2016). Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the gsctff 10th Session Rotterdam, Netherlands 4 - 8 April. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf10/cf10_13e.pdf. Acessado em: 14.12.16.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. (2015). Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9th Session New Delhi, India, 16 - 20 March. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf. Acessado em 05.08.16.
- Canli, M.; Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, 121(1), 129-136.
- Carbonell, G., Bravo, J. C., Fernández, C., & Tarazona, J. V. (2009). A new method for total mercury and methyl mercury analysis in muscle of seawater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 210–213.
- Carvalho, Leticia Reis de. Meio ambiente e multilateralismo: o papel do Brasil nos regimes de clima e mercúrio. Brasília, 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília.

- Chaves, L. H. G., & Ramara, S. S. (2014). Crescimento, distribuição e acumulação de cádmio em plantas de *Jatropha curcas*. *Revista de Ciências Agrárias*, 37(3), 286-291.
- Clarkson, T. W., Magos, L., Myers, G. J. (2003). The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *The New England Journal of Medicine*. 349, 1731-1737.
- Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. X., Amouroux, D., Guérin, T. (2011). Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2699–2711.
- Commission of the European Communities, (2001). Commission Regulation (EC) No.221/2002 of 6 February 2002 amending regulation (EC) No. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, Brussels, 6 February 2002.
- Costa, S. M., Magalhaes, V. F., Domingos, P., Oliveira, A. C., Azevedo, L. O., & Marinho, M. (2003). Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42 (3), 289-295.
- Duran, A., Tuzen, M., & Soylak, M. (2014). Assessment of trace metal concentrations in muscle tissue of certain commercially available fish species from Kayseri, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4619–4628.
- Emami Khansari, F., Ghazi-Khansari, M., & Abdollahi, M. (2005). Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chemistry*, 93, 293–296.
- FAO/WHO. (2011). Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Technical Report Series*; n. 960.

- FDA (Food and Drug Administration). (1994). Compliance policy guide. Washington, D.C: Food and Drug Administration.
- Feng, C. H-I. (2012).The tale of sushi : History and Regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 208-211
- Fernandes, C.; Fontainhas-Fernandes, A.; Peixoto, F.; & Salgado, M. A. (2007). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66 (3), 426-431.
- Ferreira, S. L. C., Lemos, A. A., Silva, O. B., Queiroz, A. F., & Souza, S. A. (2015). Analytical strategies of sample preparation for determination of mercury in food matrices. *Microchemical Journal*, 43(2), 67-92.
- French, S. A., Story, M., & Downes, B. (1997). Ethnic differences in psychosocial and health behavior correlates of dieting, purging, and binge eating in a population-based sample of adolescent females. *International Journal of Eating Disorders*, 22, 315-322.
- García, M. Á., Núñez, R., Alonso, J., & Melgar, M. J. (2016). Total mercury in fresh and processed tuna marketed in Galicia (NW Spain) in relation to dietary exposure. *Environmental Science and Pollution Research*. (In press – DOI 10.1007/s11356-016-7634-9).
- Gray, C. W., Dunham, S. J., Dennis, P. G., Zhao, F. J., & McGrath, S. P. (2006). Field evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. *Environmental Pollution*, 142, 530-539.
- Goyer, R. A. (1991). Toxic Effects of Metals. In: ANDUR, Mary O. et al (org.) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 4. Ed. São Paulo, SP: Pergamon, 681-713.

- Hall, G.M. et al. (2007). Fish processing: sustainability and new opportunities. Ed. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Holub, D. J., & Holub, B. J. (2004). Omega-3 fat acids from fish oils and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263 (1-2), 217-225.
- Ipolyi, I., Massanisso, P., Sposato, S., Fodor, P., & Morabito R. (2004). Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). *Analytica Chimica Acta*, 505, 145–151.
- Jagtap, R., Krikowa, F., Maher, W., Foster, S., & Ellwood, M. (2011). Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS. *Talanta*. 85, 49–55.
- Kalay, M., Aly, O., & Canil, M. (1999). Heavy metal concentrations in fish tissue from the northeast Mediterranean Sea, *Bulletin of Environment Contamination Toxicology*, 63, 673–681.
- Kehrig, H. A., Costa, M., Moreira, I., & Malm, O. (2006). Total and methylmercury in different species of mollusks from two estuaries in Rio de Janeiro State. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 1409 – 1418.
- Kehrig, H. A., Seixas, T. G., Malm, O., & Moreira, I. (2010). Inorganic and methylmercury: Do they transfer along a tropical coastal food. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (12), 2350-2356.
- Lacerda, C. F., Cambraia, J., Oliva, M. A., & Ruiz, H. A. (2005). Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 54 (1), 69-76.
- Mahalakshmi M. (2012). Characteristic levels of heavy metals in canned tuna fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4, 43–45.

- Manthey-Karl, M., Ostermeyer, U., Altinelataman, C., Çelik, U., & Oehlenschläger, J. (2014). Chemical composition, cholesterol, trace metals and amino acid composition of different canned fish products produced and sold in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences*, 8(1), 17-26.
- Maggi, C., Berducci, M. T., Bianchi, J., Giani, M., & Campanella, L. (2009). Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641(1–2), 32–36.
- Malm, O., Moreira, I., Costa, M., & Kehring, H. A. (2002). Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 1018-1023.
- Marins, R.V., & Lacerda, L. V. (2013). Impact of drainage basin changes on suspended matter and particulate copper and zinc discharges to the ocean from the Jaguaribe River in the semiarid NE Brazilian coast. *Journal of Coastal Research*, 29 (5), 1137-1145.
- Melamed, R., & Villas Bôas, R. C. (2002). Mecanismos de interação físico-química e mobilidade do mercúrio em solos, sedimentos e rejeitos de garimpo de ouro. *Serie Tecnologia Ambiental*, 25; Rio de Janeiro: CETEMMCT.
- Micaroni, R. C. D. M., Bueno, M. I. M. S., & Jardim, W. D. (2000) Mercury compounds. Review on determination, treatment and disposal methods. *Química Nova*, 23, 487–495.
- Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., Esteves, A. (2015). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32 – 36.
- Morgano, M. A., Milani, R. F., & Perrone, A. A. M. (2015). Determination of Total Mercury in Sushi Samples Employing Direct Mercury Analyzer. *Food Analytical Methods*, 8(9), 2301–2307.

- Nunes, E., Cavaco, A., & Carvalho, C. (2014). Children's health risk and benefits of fish consumption: risk indices based on a diet diary follow-up of two weeks. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 77, 103–14.
- Ohki, A., Hayashi, K., Ohsako, J., Nakajima, T., & Takanashi, H. (2013). Analysis of mercury and selenium during subcritical water treatment of fish tissue by various atomic spectrometric methods. *Microchemical Journal*, 106, 357–362.
- Okyere, H., Voegborlo, R. B., & Agorku, S. E. (2015). Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine. *Food Chemistry*, 179, 331–335.
- OMS (2013) Organização das Nações Unidas. Disponível em: <<http://nacoesunidas.org/consumo-per-capita-de-peixes-cresce-no-brasil-diz-fao>> Acessado em 22.03.15.
- Paiva, E. L., Alves, J. C., Milani, R. F., Boer, B. S., Quintaes, K. D., & Morgano, M. A. (2016). Sushi commercialized in Brazil: Organic Hg levels and exposure intake evaluation. *Food Control*, 69, 115–123.
- Pastorelli, a. a., Baldini, M., Stacchini, P., Baldini, G., Morelli, S., Sagratella, E., Ciardullo, S. (2012). Human exposure to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption in Italy: a pilot evaluation. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29, 1913–1921.
- Pedrosa, R. C., Dal Magro, J. Oliveira, T. B., Wilhelm Filho, D., Benassi, J. C., & Lima, P. L. (2006). Time-Course Variations of DNA Damage and Biomarkers of Oxidative Stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Effluents From a Swine Industry. *Environmental Contamination and Toxicology*, 50 (1), 23-30.
- Rice, K. M., Walker, E. M., Wu, M., Gillette, C., & Blough, E. R. (2014). Environmental mercury and its toxic effects. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 47(2), 74-83.

- Ricotta, A. C., & Boylan, H. M. (1999). Field application of the direct mercury analyzer (DMA). Annual Meeting & Exhibition Proceedings CD-ROM - Air & Waste Management Association, 92nd, St. Louis, MO, United States, June 20-24, 1999, 4346-4350.
- Rodrigues, A. F. S. (2007). Estanho. In: Balanço Mineral Brasileiro. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/portal/assets/galeriaDocumento/BalancoMineral2001/estanho.pdf>. Acessado em 11.08.16.
- Rímoli, J. K. B., Strier, K. B., & Ferrari, S. F.(2008). Seasonal and longitudinal variation in the behavior of free-ranging black tufted capuchins *Cebus nigrinus*. In: A Primatologia no Brasil, Aracaju, 130-146.
- Sakuma, A. M. (2004). Avaliação da exposição humana ao arsênio no Alto Vale do Ribeira, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.
- SanGiovanni, J. P., Berkey, C. S., Dwyer, J. T., & Colditz, G. A. (2000). Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Human Development*, 57, 165–188.
- Silva, M. W., & Estanislau, C. A. M. (2015). Concentração de mercúrio em peixes da Amazônia. *Boletim ABLimno*, 41(1), 8-14.
- Souza, J. S; Batista, G; Bernstein, A. (2014). “Mercúrio na Amazônia: a bomba relógio bioquímica”. Conclusão do curso Sustentabilidade no Contexto das Ciências, oferecido pela Diretoria de Extensão da Fundação CECIERJ. Disponível em: <http://www.educacaopublica.rj.gov.br/biblioteca/quimica/0019.html>. Acessado em 16.08.16.

- Souza, J. R.; Barbosa, A. C. (2000). Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Revista Química Nova na Escola. Seção Química e Sociedade*, nº 12, nov.
- Sunderland, E. M., Gobas, F. A. P. C., Branfireun, B. A., & Heyes, A. (2006). Environmental controls on the speciation and distribution of mercury in coastal sediments. *Marine Chemistry*, 102, 111-123.
- Tavares, T. M. (1990). Avaliação de efeitos das emissões de cádmio e chumbo em Santo Amaro - Bahia. 272f. 1990. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Torres-Escribano, S., Vélez, D., & Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants*, 27(3), 327–337.
- Trondsen, T., Scholderer, J., Lund, E., & Eggen, A. E. (2003). Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Appetite*, 41 (3), 301-314.
- Tu, Q., Qian, J., & Frech, W. (2000). Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC–MIP-AES or GC–ICP-MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15, 1583 – 1588.
- UNEP - United Nations Environmental Programme. (2009). Report of the governing Council, Twenty-fifth Session (16-20 February 2009). General Assembly, Supplement No. 25. United Nations Environment Programme (UNEP), New York, U.S.
- US Environmental Protection Agency (USEPA). 2016. "Mission Bangkok: 5th Asia-Pacific Mercury Monitoring Network Meeting. Available from. <https://blog.epa.gov/blog/2016/10/mission-bangkok-5th-asia-pacific-mercury-monitoring-network-meeting/>. Acessado em 25.09.16.

World Health Organization (WHO, 2005). International Labour Organization. Concise International Chemical Assessment Document 65: Tin and Inorganic Tin Compounds. United Nations Environmental Programme. Geneva. Disponível em: http://www.who.int/entity/ipcs/publications/cicad/cicad_65_web_version.pdf. Acessado em 05.09.16.

CAPÍTULO 2

**Sushi commercialized in Brazil: organic Hg levels and exposure
intake evaluation**

Esther Lima de Paiva, Jeanne Clécia Alves, Raquel Fernanda Milani, Bárbara
Sia Boer, Késia Diego Quintaes, Marcelo Antonio Morgano.

Food Control, v. 69, p. 115-123, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.029>

Abstract

The presence of organic mercury (methylmercury) in tuna, salmon and kani sushis marketed in restaurants specialising in Japanese foods (Campinas, São Paulo, Brazil), was investigated by atomic absorption spectrometer with thermal decomposition and amalgamation. Total mercury was analyzed directly, whilst organic mercury was quantified after a previous extraction with toluene in an acid solution, assisted by microwaves. Under these analytical conditions there was no interconversion between the inorganic and organic mercury. High sensitivity was observed for organic mercury, with limits of detection and quantification of 2.0 and 6.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The organic mercury contents ranged from 12 to 583 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 6.6 to 8.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and no detected values, for the tuna, kani and salmon sushi, respectively. The mean proportion of organic Hg / total Hg for tuna sushi was 88%, indicating that the most toxic form of mercury, organic Hg, predominate in this food. Considerations regarding the estimated exposure to methylmercury were made by taking into account the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI 1.6 $\mu\text{g/kg}$) and considering the consumption per adults (60 kg) and children (15 kg). Our results demonstrated that the consumption of one portion of tuna sushi (150g) and four portions for children and adults, respectively, exceed 100 % of PTWI.

Keywords: sushi, tuna, TDA AAS, exposure intake, methylmercury.

1.Introduction

Fish is recognized as an important source of many essential nutrients and its consumption is widely encouraged to prevent hypertension, cancer and coronary heart disease (Sioen, Henauw, Verdonck, Thuyne, & Camp, 2007). However, fish can contain toxic elements in their tissues, such as Hg, and consequently may represent a source of human exposure to such components (Burger, Stern, & Gochfeld, 2005; Dorea & Barbosa, 2005; Morgano, Rabonato, Milani, Miyagusku & Quintaes, 2014).

The effects of high exposure to Hg in humans include neurodevelopmental deficits (JECFA, 2004; Steuerwald et al., 2000), poor cognitive performance (Freire et al., 2010; Oken et al., 2008), increased rates of cardiovascular disease (Choi et al., 2009), and neurological and locomotion deficits (Hightower & Moore, 2003; Hites, Carpenter, Hamilton, Knuth & Schwager, 2004). The National Health and Nutrition Examination Survey estimates that 8 to 15% of fetuses in the USA have excessive exposure to Hg (Trasande, Landrigan, & Schechter, 2005). Recently, the FDA (US Food and Drug Administration) and EPA (US Environmental Protection Agency) have advised pregnant women, those who may become pregnant, breastfeeding mothers, and young children to broaden the variety of fish they eat and choose those lower in Hg, restricting fish consumption to 2 or 3 servings/week (Burger, Stern & Gochfeld, 2013).

Mercury can be found in the environment in various chemical species. All Hg species are considered toxic, but organic species such as methylmercury (MeHg+) and ethylmercury are considered more toxic than elemental Hg and its inorganic species. It is well recognized that the main pathway of human exposure to Hg is through eating fish containing MeHg+, which is the most common Hg species found in fish. Due to biomagnification along the food chain, MeHg+ reaches maximum levels in fish at the top of the food chain, and as a result, about 90% of the total Hg present in fish can be found as MeHg+ (Horvat & Gibicar, 2005).

An accurate analytical method for the determination of organic Hg species is required to assess the real toxicity of the samples (Harrington, 2000). The analysis of organic Hg is generally carried out using chromatographic separation techniques coupled with different detectors (Zhang, Yang, Dong & Xue, 2012). The

chromatographic separation techniques include: gas chromatography (GC) (Barst et al., 2013; Kenšová, Kružiková, & Svobodová, 2012; Nevado, Martín-Doimeadios, Bernardo, Moreno, Roperó & de Marcos Serrano, 2011), liquid chromatography (HPLC) (Batista, Rodrigues, De Souza, Oliveira Souza & Barbosa Jr., 2011; Chen, Han, Cheng, Wang, Liu, Xu & Hu, 2013) and ionic chromatography (IC) (Shade & Hudson, 2005). The most commonly used detection techniques are: inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Batista et al., 2011; Clémens, Monperrus, Donard, Amouroux, & Guérin, 2011), atomic absorption spectroscopy (AAS) (Naozuka & Nomura, 2011; Sarica & Türker, 2012), atomic fluorescence spectrometry (AFS) (Nevado et al., 2011; Zhang et al., 2012), electron capture detection (ECD) (Kehrig et al., 2009; Kenšová et al., 2012), microwave induced plasma-atomic emission spectrometry (MIP-AES) (Sanz, De Diego, Raposo, & Madariaga, 2003), atomic emission detection (Kuballa, Leonhardt, Schoeberl, & Lachenmeier, 2011) and isotope dilution mass spectrometry (IDMS) (Demuth & Heumann, 2001), and for the determination of total mercury, thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS) (Morgano, Milani & Perrone, 2015).

Japanese dishes usually include tuna of various species, salmon, eel, and many other fish, as well as shrimp and crab, which may be consumed in sushi dishes as well as vegetarian varieties (Burger et al., 2013).

Sushi, technically referring to fish and other items served with vinegar and sticky rice (Nibble, 2012), has become a generic term often encompassing sashimi (raw fish) and several varieties of fish surrounded by rice (maki rolls), and fish over rice (nigiri). The consumption of sushi and related dishes has recently increased greatly in Brazil and other countries, with these foods being available over lunch counters, grocery stores, especially restaurants and sushi bars (Martins, 2006). Although there is a growing trend for the consumption of sushi (Issenberg, 2007), there is very little quantitative data on either the consumption patterns of sushi or the contaminants in sushi (Lowenstein, Burger, Jeitner, Amato, Kolokotronis & Gochfeld, 2010).

Regarding to the presence of methylmercury in sushi samples, this work aims: i) to develop and validate a quick, simple, low cost method with minimal reagent consumption; ii) to quantify organic mercury (methylmercury) in sushi

samples using the technique of thermal decomposition amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS); iii) to estimate the organic mercury intake from sushi consumption and iv) to delineate an organic extract stability study.

2. Materials and methods

2.1 Instrumentation

The technique of TDA AAS using a direct mercury analyzer (DMA-80, Dual Cell, Milestone, Sorisole, Italy) was used to quantify both the total and organic mercury content of sushi samples. The organic mercury extracts were obtained via microwave extraction (Start E, Milestone, Sorisole, Italy). The samples were heated in a nickel or quartz container, making use of compressed air as the oxidant gas. A catalyst removed the combustion products and the Hg vapors were trapped in a gold amalgamator. Temperatures around 850°C were applied for desorption, and the Hg content was quantified by determining the absorption at 253.7 nm.

2.2. Reagents and standards

Only analytical grade reagents were used in this study. The water (18.2 MΩ cm) was purified using a reverse osmosis system (Gehaka, São Paulo, Brazil) and the nitric acid using a sub-boiling distiller (Distillacid, Berghof, Eningen, Germany). Toluene (Synth, Diadema, Brazil) and a 30% HCl solution (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the microwave extractions. A 2.5% L-cysteine solution (Sigma, Steinheim, Germany) was prepared to stabilize the organic mercury species. Certified standard solutions of mercury at 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were used to construct the analytical curves, together with a 0.5% (v/v) solution of HNO₃.

2.3. Samples

A total of 60 sushi samples were acquired from different Japanese restaurants and supermarkets located in Campinas, São Paulo, Brazil, with 20 samples each of the most consumed types of sushi : 20 samples of tuna (*Thunnus sp*), 20 of salmon (*Salmon sp*) and 20 of kani (a mix of fish species flavoring with crab meat). The samples were separately triturated according to their specie, taking

a complete dish with all ingredients, using a domestic processor to obtain a homogenized mass. The homogeneous mass samples were kept under freezing until analyses. Sample portions weight was determined experimentally as, approximately, 150g (6 pieces of sushi).

2.4 Determination of total and organic mercury in the sushi samples

2.4.1 Determination of total mercury

For the determination of total mercury, the homogenized samples were weighed directly into nickel containers and the value determined using TDA AAS. According to Morgano et al. (2015) the optimal conditions for the total mercury analysis were: drying process (200 °C for 60s) and decomposition process (600 °C for 180s), using a 60 mg sample.

2.4.2 Determination of organic mercury

The extraction method for the organic species present in sushi samples was developed using a certified reference material (CRM) with a certified MeHg⁺ value. The following parameters were optimized: the extraction temperature employed in the system assisted by microwaves; the extraction time; the concentrations of the L-cysteine solution and the volume of organic solvent (toluene) (Maggi, Berducci, Bianchi, Giani & Campanella, 2009; Carbonell, Bravo, Fernandez & Tarazona, 2009; Huang, Pan, Han, Wu, Tang & Tan, 2012 and Ruiz-de-Cenzano, Rochina-Marco, Cervera & laGuardia, 2014).

The samples were subjected to closed extraction assisted by microwaves using an organic solvent (toluene) in an acid solution. A PFA teflon extraction vessel was weighed on an analytical balance and a 1 g aliquot of sample introduced, to which was added: 8 mL of toluene pa, 1 mL of demineralized water and 0.75 mL of a 30% (v/v) HCl solution. The vessels were sealed and transferred to a 1000 W microwave extractor which was programmed as follows: (a) room temperature to 110°C in 10 min; (b) maintain a constant temperature of 110°C for 5 min. After cooling, the vessels were opened and a 4 mL aliquot of the organic phase withdrawn and transferred to a centrifuge tube containing 2 mL of a 2.5% L-cysteine solution

(w/v). After manual agitation, the solution was centrifuged for 6 min at 3500 rpm and the aqueous phase used for the analysis.

A DMA analyzer was used to determine the organic mercury fraction by measuring 100 mg of the aqueous phase containing L-cysteine organic mercury into a quartz vial. The optimal reading conditions in the mercury analyzer were: sample drying temperature = 120°C for 60 s; decomposition temperature = 300°C for 180 s; desorption temperature = 850°C for 12 s; absorbance determined at 253.7 nm. The ranges for the two detection cells of the equipment were: 0.5 to 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 20 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.5 Stability of the organic mercury extracts

The stability of the organic extract was tested under two conditions: storage in polypropylene tubes under ambient (22°C) and refrigerated (4°C) conditions; and also in glass tubes under ambient and refrigerated conditions. The determination continued for 22 days according to the amount of extract available.

3. Results and discussion

3.1 Validation of the method for the determination of total and organic mercury

The method was validated based on the INMETRO (2011) recommendations and consisted of evaluating the following: linearity of the analytical curves, accuracy (using certified reference materials and recovery tests), sensitivity (detection and quantification limits) and the precision.

The evaluation of linearity was assessed by the regression coefficients of the analytical curves obtained for the two mercury analyzer cells. For both concentration ranges (low: 0.5 to 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and high: 20 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$), satisfactory values were observed, with $r^2 > 0.999$.

The sensitivity of the method was evaluated by analyzing a sushi sample with low mercury content, carrying out seven analytical repetitions. The values obtained for organic and total mercury were: LOD (3s) of 2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 0.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ (10s) = 6.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively; "s" being the standard deviation

value for the concentrations of seven replicates. These values were lower than those reported by Kuballa *et al.* (2011) who used the GC-MS method to study MeHg⁺ levels in fish samples, obtaining values of 6.0 µg kg⁻¹ and 20 µg kg⁻¹ for LOD and LOQ, respectively. Cheng & Hight (2008) analyzed MeHg⁺ using the HPLC-ICP-MS, and also observed higher values than those obtained in this study (3.8 µg kg⁻¹ and 28 µg kg⁻¹ for LOD and LOQ, respectively). Wang *et al.* (2013) comparing two methods (HPLC-ICP-MS and GC-MS using isotope dilution, ID-GC-MS) to study MeHg⁺, obtained the following LOD and LOQ values: 5 ng g⁻¹ and 15 ng g⁻¹; and 3.4 ng g⁻¹ and 10.2 ng g⁻¹, respectively.

Regarding the determination of MeHg⁺ in biological samples, Maggi *et al.* (2009) used an extraction solution containing a HBr/toluene and L-cysteine mixture, with detection by TDA AAS. Despite obtaining lower values for LOD and LOQ (1.5 ng g⁻¹ and 2.5 ng g⁻¹, respectively), the sample preparation method was applied using two extraction stages and a large amount of chemical reagents: about 35 mL of toluene and 10 ml of concentrated HBr. In the method proposed here, smaller solvent volumes were used and only one extraction step.

The accuracy of the MeHg⁺ method was assessed using certified reference materials (NRC TORT-2 lobster hepatopancreas and NCR DORM-4 fish protein) and recovery trials at three levels. In our previous study (Morgano *et al.*, 2015), accuracy for total mercury method was evaluated using three certified reference materials with similar compositions to the sushi samples: NIST SRM 1568b rice flour, NIST SRM 1566b oyster tissue and NCR DORM-4 fish protein. Table 1 summarizes the obtained results.

As shown in Table 1, the recovery ranged between 94 and 111% for methylmercury, consistent with the recommendations of the AOAC (2013), where the values are between 75 and 120% for this level of concentration. In addition, the values for the z-scores were calculated from the experimental data, and both CRMs demonstrated satisfactory values (less than 2.0) according to those recommended by INMETRO (2011).

Table 1. Accuracy evaluation of the analytical methods using certified reference materials for MeHg⁺ and total mercury (n=3).

	Certified Reference Materials	Certified Values (µg kg ⁻¹)	Values Obtained (µg kg ⁻¹)	Recovery (%)	Z-score
	<i>Fish protein</i>	354 ± 31	333 ± 22	94 ± 6	-0.3
<i>Methylmercury</i>	<i>Lobster hepatopancreas</i>	152 ± 13	168 ± 3	111 ± 2	1.3
	<i>Oyster tissue</i>	37.9 ± 1.1	35.9 ± 0.3	97 ± 1	0.9
<i>Total Mercury*</i>	<i>Rice flour</i>	5.89 ± 0.39	5.61 ± 0.23	95 ± 4	1.1
	<i>Fish protein</i>	412 ± 57	406 ± 15	97 ± 14	-0.2

*Morgano *et al.* (2015)

Recovery trials for organic Hg were also carried out. For this evaluation, a sushi sample with low organic mercury content was fortified at three different levels: 10, 100 and 1000 µg kg⁻¹ of methylmercury, using solutions prepared from the salt of this specie (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The values obtained in (µg kg⁻¹) were: 11.1 ± 0.2; 94 ± 4 and 964 ± 67 respectively; which correspond to recoveries of 111%, 94% and 96%. Thus the values observed ranged between 94 and 111%, consistent with the AOAC (2013).

In order to verify the absence of interconversion between inorganic and organic mercury, the sushi sample was fortified with 100 µg kg⁻¹ of a standard solution containing only inorganic mercury (i-Hg). The result obtained was below the limit of quantification of the method and therefore it could be concluded that interconversion between the Hg species did not occur.

The precision of the method for MeHg⁺ was evaluated using 16 analytical repetitions (8 repetitions/day) from a sample of tuna sushi (organic Hg = 192 ± 17 µg kg⁻¹). The value obtained for the coefficient of variation was 9.0%, which satisfies the condition recommended by the AOAC (2013), which is 16% in the concentration range studied. The total Hg coefficient of variation was 5.5% (Morgano *et al.*, 2015).

3.2 Assessing the stability of the organic extract

According to data available in the literature, glass is the most suitable container for the storage of Hg (Houserova *et al.*, 2006). In this study, the evaluation of the stability of organic extract was performed considering both glass and polypropylene tubes. In Figure 1 the observed results are presented.

Figure 1 demonstrates that when the organic extract was stored in a glass tube and kept at ambient conditions, its stability is significant for up to 21 days. In the present study a gradual reduction of methylmercury was observed after 22 days of refrigerated storage in a brown glass bottle.

The extraction method used by Houserova *et al.* (2006) was also based on a high-pressure microwave system, making use of 6 mol/l HCl + 0.1 mol/l NaCl as the extraction agent. The researchers verified that the organic extracts remained stable for 3 days under ambient conditions, using 20 mL of solvent, repeating the extraction procedure twice, and storing in new polypropylene tubes with caps (Ruiz-de-Cenzano *et al.*, 2014). The present results also showed that the extract kept in glass and stored under refrigeration showed similar stability to that at room temperature up to the 11th day, after which a drop of approximately 10% of the organic Hg concentration was observed. Therefore it was concluded that the longer the storage time of the organic extract, the greater the propensity of the mercury content to decrease in solution. In addition, wide variations between replicates were observed with increase in the storage time of the extract.

Similar assays were carried out with the storage of the organic extracts in polypropylene tubes (Corning, New York, USA - PP) under ambient and refrigerated conditions. The graph presented in Figure 1 shows that refrigerated storage resulted in a higher relative stability profile, where the extract was stable for 22 days (the entire analytical period), whereas the extract maintained at room temperature proved to be as stable as the one submitted to refrigeration for 14 days, after which it showed a decline of approximately 7% in the organic Hg content, corroborating with studies on the possibility of the adsorption of Hg on plastic containers used for storage purposes (Houserova *et al.*, 2006).

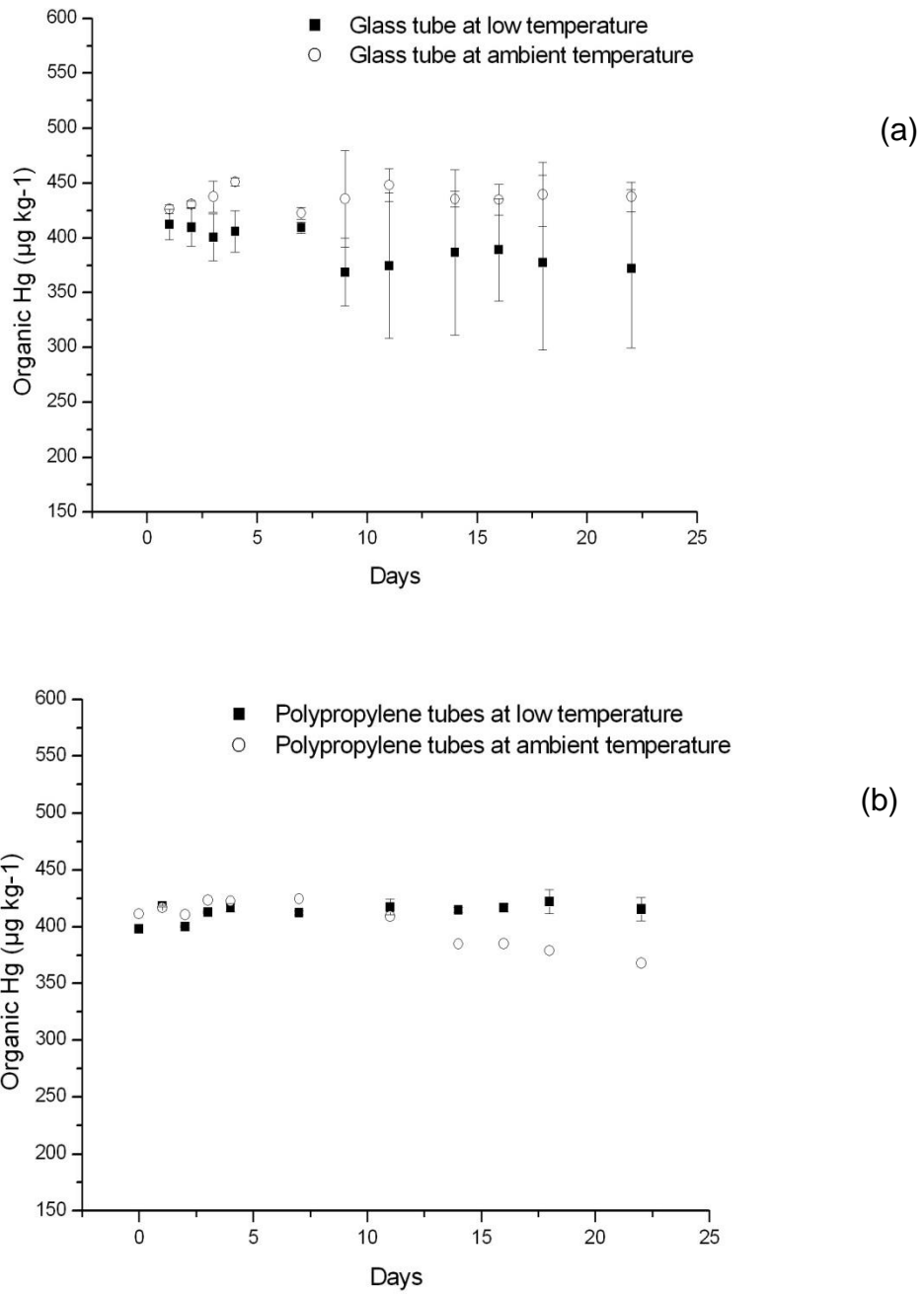


Figure 1. Stability graph of MeHg⁺ extracts stored in: (a) glass tubes (b) polypropylene tubes.

3.3 Results obtained for the samples

The Joint FAO/WHO (2011) Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption concluded that amongst women of childbearing age, pregnant women and nursing mothers, when considering the benefits of docosahexaenoic acid (DHA) versus the risks of methylmercury, fish consumption lowered the risk of suboptimal neurodevelopment in their offspring compared to not eating fish under most of the circumstances evaluated. More specifically it was concluded that even considering the highest estimate for the methylmercury risk, the neurodevelopmental risks of not eating fish exceeded the risks of eating fish for up to at least seven 100 g servings per week for all fish containing less than 0.5 µg/g (mg/kg) methylmercury (WHO, 2015).

Table 2 shows the results obtained for total (tHg), inorganic (iHg) and organic (oHg) mercury present on the samples and the ratios of oHg/tHg and iHg/tHg. For organic mercury, the assessment was carried out for those samples with values greater than 6.6 µg kg⁻¹ of total mercury, which corresponds to the LOQ of the oHg method. Levels below the limit of quantification of the methods were not considered to the average calculation.

Of the 20 tuna sushi samples analyzed, a broad concentration range was observed for organic mercury: > 6.6 to 583 µg kg⁻¹ (Table 2). This result was possibly due to the origin and age of the fish. In the study of Burger *et al.* (2013), sushi samples containing eel, salmon, crab and tuna were analyzed and significant differences in mercury levels amongst the types and components of the sushi were found, with tuna sushi having the highest levels and eel, crab, and salmon having lower levels. In this study, the levels in the tuna rolls averaged 470 µg kg⁻¹.

For what concerns tuna fish, literature reported similar concentrations for total Hg: a mean of 390 µg kg⁻¹ was found in a study of three important commercially marine fishes in Sri Lanka. The fish species analyzed were yellowfin tuna (*Thunnus albacores*), swordfish (*Xiphias gladius*) and red snapper (*Lutjanus sp*) (Jinadasa, Rameesha, Edirisinghe & Rathnayake, 2010).

The groups of Ordiano-Flores, Galván-Magaña & Rosiles-Martínez (2011) and Olmedo, Pla, Hernandez, Barbier, Ayouni & Gil (2013) performed an Hg evaluation in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) muscle in different sites of Pacific Ocean and Spain coasts. They obtained mean Hg values of 210 µg kg⁻¹ and 470 µg

kg⁻¹, respectively. Martorell, Perellò, Martí-Cid, Llobet, Castell & Domingo (2011) studying the diet intake of Catalonia population (Spain) found Hg levels in tuna fish of 554 mg kg⁻¹.

A mean concentration of 350 µg kg⁻¹ for Hg in tuna fish was also observed by Galimberti, Corti, Cressoni, Moretti, Menotta, Galli & Cambiaghi (2016), which developed an assessment elements (Hg, Cd, Pb) in fishery products and fish imported in North Italy, from extra-European Union Countries.

Table 2. Total (tHg), organic* (oHg) and inorganic (iHg) mercury levels observed in the sushi samples analyzed

Sample	tHg (µg kg ⁻¹)	oHg (µg kg ⁻¹)	oHg / tHg (%)	iHg (µg kg ⁻¹)	iHg / tHg (%)
Tuna 1	11.8 ± 0.1	< 6.6	-	-	-
Tuna 2	43 ± 1	41 ± 1	95	2	5
Tuna 3	197 ± 7	187 ± 14	95	10	5
Tuna 4	438 ± 10	413 ± 18	94	25	6
Tuna 5	63 ± 3	48 ± 2	76	15	24
Tuna 6	88 ± 6	75 ± 2	85	14	16
Tuna 7	761 ± 67	559 ± 2	73	20	27
Tuna 8	595 ± 51	533 ± 14	90	62	10
Tuna 9	587 ± 13	583 ± 6	99	4	1
Tuna 10	6.2 ± 0.4	< 6.6	-	-	-
Tuna 11	30 ± 3	26 ± 1	87	4	13
Tuna 12	432 ± 33	392 ± 7	91	40	9
Tuna 13	58 ± 2	47 ± 3	81	11	19
Tuna 14	80.3 ± 0.2	69 ± 5	86	11	14
Tuna 15	292 ± 17	278 ± 15	95	14	5
Tuna 16	45 ± 3	31 ± 4	69	14	31
Tuna 17	144 ± 14	130 ± 8	90	14	10
Tuna 18	178 ± 1	169 ± 3	95	9	5
Tuna 19	159 ± 8	142 ± 3	89	17	11
Tuna 20	62 ± 2	57 ± 2	92	5	8
Kani1	12 ± 1	8 ± 1	67	4	33
Kani2	13.5 ± 0.8	7.8 ± 0.4	58	5.7	42
Kani 3	<1.4	-	-	-	-
Kani 4	<1.4	-	-	-	-
Kani 5	2.8 ± 0.8	-	-	-	-
Kani 6	2.3 ± 0.1	-	-	-	-
Kani 7	3.4 ± 0.4	-	-	-	-
Kani 8	9.6 ± 0.7	< 6.6	-	-	-
Kani 9	9.4 ± 1.1	< 6.6	-	-	-
Kani 10	5.5 ± 0.8	-	-	-	-
Kani 11	11.4 ± 1.2	< 6.6	-	-	-

Kani 12	4.5 ± 0.3	-	-	-	-
Kani 13	7.9 ± 0.4	< 6.6	-	-	-
Kani 14	6.6 ± 1.1	-	-	-	-
Kani 15	10.5 ± 0.9	< 6.6	-	-	-
Kani 16	4.5 ± 0.2	-	-	-	-
Kani 17	5.8 ± 0.1	-	-	-	-
Kani 18	9.8 ± 1.2	< 6.6	-	-	-
Kani 19	6.3 ± 1.3	-	-	-	-
Kani 20	3.4 ± 0.3	-	-	-	-
Salmon 1	3.2 ± 0.3	-	-	-	-
Salmon 2	3.1 ± 0.3	-	-	-	-
Salmon 3	4.6 ± 0.4	-	-	-	-
Salmon 4	3.1 ± 0.4	-	-	-	-
Salmon 5	2.7 ± 0.3	-	-	-	-
Salmon 6	1.4 ± 0.2	-	-	-	-
Salmon 7	3.8 ± 0.3	-	-	-	-
Salmon 8	3.1 ± 0.2	-	-	-	-
Salmon 9	3.0 ± 0.4	-	-	-	-
Salmon10	1.9 ± 0.1	-	-	-	-
Salmon11	2.6 ± 0.5	-	-	-	-
Salmon12	3.1 ± 0.4	-	-	-	-
Salmon13	1.7 ± 0.2	-	-	-	-
Salmon14	1.5 ± 0.1	-	-	-	-
Salmon15	4.1 ± 0.2	-	-	-	-
Salmon16	3.7 ± 1.0	-	-	-	-
Salmon17	2.8 ± 0.1	-	-	-	-
Salmon18	<1.4	-	-	-	-
Salmon19	<1.4	-	-	-	-
Salmon20	3.1 ± 0.3	-	-	-	-

* Levels observed in the sushi samples analyzed, considering those with total Hg > 6.6 µg kg⁻¹).

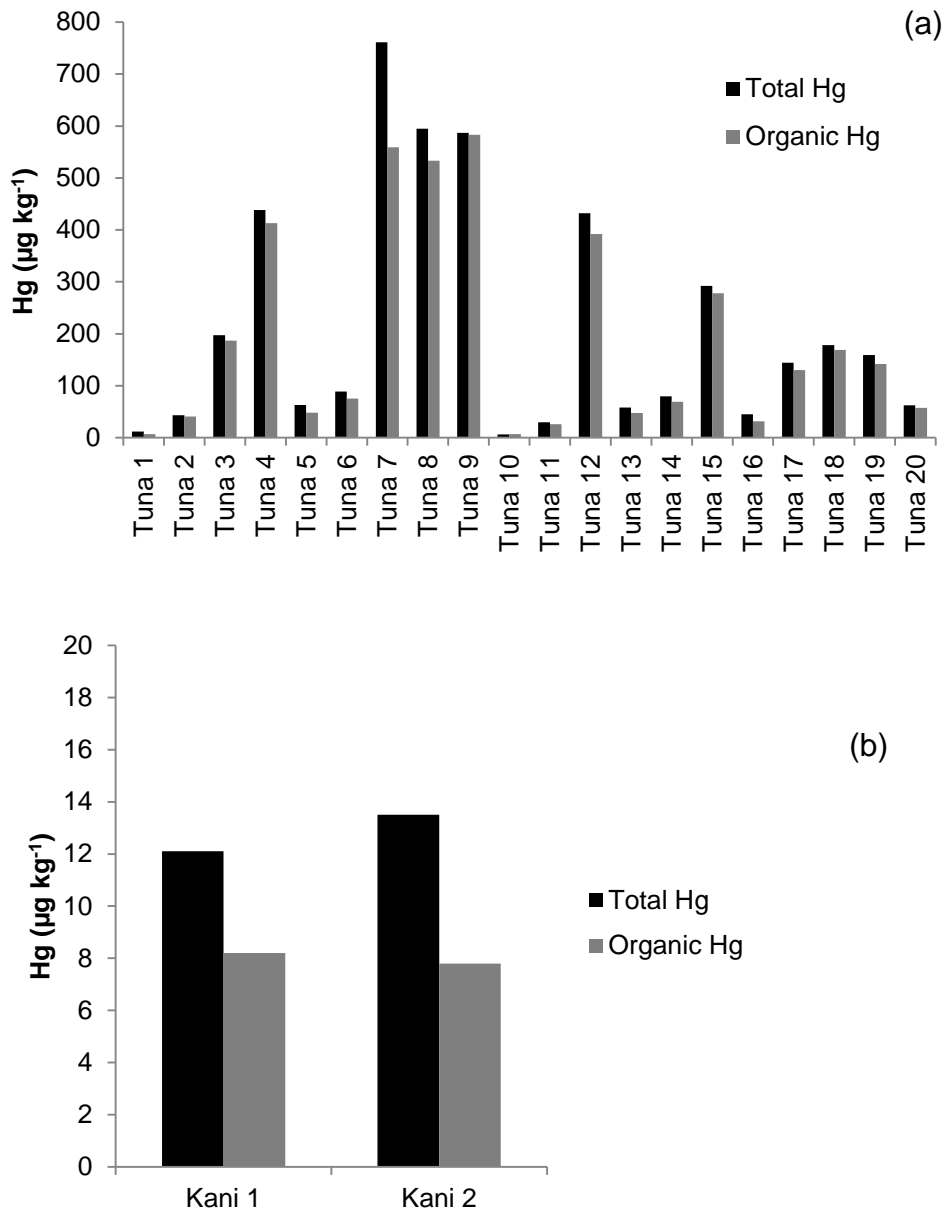


Figure 2. Organic mercury levels observed in the samples of (a) Tuna sushi and (b) Kani sushi.

Sushi samples present different mercury levels: tuna > kani > salmon. These results are comparable with studies of other authors concerning to predatory fishes, such as tuna. These species are present in marine pelagic ecosystems at the top of food chain and they tend to accumulate great quantities of Hg. Regarding the ratio (in percent) between the organic and total mercury for tuna sushi, values of 69-99% were observed, with an average of 88%. This result is higher than those reported by Kuballa *et al.* (2011) who found a ratio of 70%, and it is consistent with the study of

Burger *et al.* (2013) who presented a ratio of 90% between the organic and total mercury. Regarding the levels of methylmercury, Burger *et al.* (2013) found an average value of $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ in tuna sushi; Bosch, O'Neill, Sigge, Kerwarth & Hoffman (2016) found values ranging from 230 to $1024 \mu\text{g kg}^{-1}$ in tuna muscle, whereas in this work a mean of $560 \mu\text{g kg}^{-1}$ was determined.

The inorganic mercury (i-Hg) values were calculated as the difference between the total and organic mercury levels, with values between 2 to $202 \mu\text{g kg}^{-1}$ for tuna sushi and 4 to $5.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ for kani sushi in the present study. The ratios, in percent, between the total and inorganic levels ranged from 1-31% and 33-42% for the tuna and kani sushi, respectively. For the kani sushi samples, values near to $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ were also found for the organic mercury concentration, with a ratio corresponding to an average of 63% of the total mercury present in these samples (Figure 2). There is no available data in the literature about mercury species in kani.

For salmon sushi, the inorganic mercury content was not calculated since the organic mercury levels were below the method limit of quantification ($6.6 \mu\text{g kg}^{-1}$). In our study, the mean value of total mercury was $2.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ for this sushi type. In literature are very few data regarding to sushi samples. Data for the presence of total Hg in pink and red canned salmon samples from the United States, showed levels of 22–79 and 15–67 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively (Ikem & Egiebor, 2005). Low values were verified for Zhang *et al.* (2001), which observed Hg values varying from 25 to $137 \mu\text{g kg}^{-1}$ for salmon. In a previous study of our group (Morgano *et al.*, 2014) performed in samples marketed in Brazil, total Hg levels in salmon sashimi (*Salmo salar*) ranging from 10 to $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. These values are higher than levels of this study: levels ranged from no detected to $4.6 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.4 Estimation of the daily intake of methylmercury from the consumption of sushi and the exposure risk assessment

The estimated exposure to organic mercury was calculated considering an average daily portion of sushi: 150 g, value experimentally obtained by weighing the commercially available sushis. A number of sushi consumption situations were considered: occasional consumption (1 portion / week) ranging to moderate

consumption (7 portions / week). In order to enable a comparison with the PTWI values established for MeHg⁺, some considerations were admitted:

- As methylmercury (MeHg⁺) is the main organic chemical specie in fish, the organic mercury content was considered as MeHg⁺;

- For kani sushi samples with total Hg <6.6 µg kg⁻¹ (LOQ method for organic mercury) the values for MeHg⁺ were estimated based on the average proportion (63%) determined experimentally (see Table 2);

- For salmon sushi samples with total Hg <6.6 µg kg⁻¹ (LOQ method for organic mercury), the MeHg⁺ levels were estimated using the average proportion of tuna sushi (88%) (see Table 2).

The values estimated for exposure are shown in Table 3, where it can be seen that the tuna sushi samples had significant MeHg⁺ values: considering the weekly consumption of one portion of this sushi, average and maximum values of 0.50 µg kg⁻¹ bw (body weight) and 1.25 µg kg⁻¹ bw were estimated for adults, corresponding to 31% and 91% of the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI), respectively. For the consumption of 4 servings, the average and maximum values exceeded 100% of the PTWI established for MeHg⁺: 121% and 352%, respectively. Low values were estimated for the kani and salmon sushi varieties: a weekly consumption of 7 servings of these sushi could contribute up to 8.0% and 3.8%, respectively.

In the present study values established by the World Health Organization for the PTWI (1.6 µg kg⁻¹) were used, and weight values of 60 kg for adults and 15 kg for children (age 2-6 years), according to FAO (2011) recommendations. In the Table 3 a portion of 150 g was considered for adults and 20 g for children, once there is no data about its consumption by age group. For children, the consumption of just one portion of tuna sushi exceeded the PTWI for MeHg⁺ by 100%.

Table 3. Estimated exposure to methylmercury (average and range), assuming the consumption of 1 to 7 weekly sushi portions by a 60 kg adult and a 15 kg child.

Sushi	Portion/ week	Adults ^c		Children ^d	
		MeHg ⁺⁺ (µg kg ⁻¹ bw)	%PTWI	MeHg ⁺⁺ (µg kg ⁻¹ bw)	%PTWI
Tuna	1	0.50 (<0.09-1.25)	31 (<6-91)	0.2(<0.03–0.8)	17(<1.9-47)
	2	0.91 (<0.19-2.50)	60 (<12-176)	0.5 (<0.06–1.6)	29 (<3.7-97)
	3	1.41 (<0.27–3.75)	92 (<18–264)	0.8 (<0.11–2.1)	44 (<5.6-146)
	4	1.91 (<0.36–5)	121(<25-352)*	1.1 (<0.14–2.7)	58 (<7.5–194)
	5	2.32 (<0.47-6.25)	157 (<30-477)	1.3 (<0.17–3.3)	73 (<9.3–242)
	6	2.88 (<0.54–7.5)	186 (<36–568)	1.6 (<0.20–4.0)	87 (<11.2–291)
	7	3.33 (<0.66-8.75)	216 (<41-657)	1.9 (<0.23–4.8)	102 (<13.1 -340)
Kani ^a	1	0.021 (<0.019-0.020)	0,6 (<0.1-1.1)	0.01(<0.0001–0.003)	0.65 (<0.01–0.7)
	2	0.043 (<0.004-0.036)	1,1 (<0.2-2.3)	0.02 (<0.0003-0.005)	1.27 (<0.03–1.3)
	3	0.062 (< 0.006–0.054)	1,8 (<0.3–3.3)	0.03(<0.0004–0.008)	1.87(<0.04–2.0)
	4	0.081(<0.008–0.072)	2,4 (<0.4–4.2)	0.04(<0.0005–0.010)	2.67(<0.05–2.5)
	5	0.103 (<0.009-0.091)	2,8 (<0.6-5.7)	0.05(<0.0007–0.013)	3.47 (<0.07–3.2)
	6	0.121 (<0.01-0.108)	3,6 (<0.7–6.8)	0.06(<0.0008–0.015)	4.00 (<0.08–3.7)
	7	0.144(<0.013-0.128)	4,0 (<0.8-8.0)	0.07(<0.0009–0.018)	4.67(<0.09–4.4)
Salmon ^b	1	0.009 (<0.002-0.018)	0,3 (<0.2-0.5)	0.004 (<0.0001–0.001)	0.3 (<0.01- 0.6)
	2	0.010 (<0.005-0.017)	0,6 (<0.3-1.1)	0.008(<0.0003–0.002)	0.6 (<0.04–0.6)
	3	0.012 (< 0.008–0.019)	0,9 (<0.4–1.6)	0.012(<0.0004–0.003)	0.9 (<0.05–0.7)
	4	0.013 (< 0.011–0.021)	1,3 (<0.6–2.1)	0.160(<0.0005–0.004)	1.2 (<0.08–0.7)
	5	0.026 (<0.013-0.044)	1,6 (<0.8-2.7)	0.200(<0.0007–0.005)	1.4 (<0.09–0.8)
	6	0.031 (<0.015–0.055)	1,9 (<0.9–3.2)	0.240(<0.0008–0.006)	1.7 (<0.11–0.8)
	7	0.036 (<0.018-0.061)	2,3 (<1.2–3.8)	0.280(<0.0007–0.007)	2.1 (<0.12–0.8)

PTWI: provisional tolerable weekly intake for MeHg⁺ = 1.6 µg kg⁻¹ bw (body weight) (FAO / WHO, 2015).

^aFor non analyzed samples, values were estimated from the experimental data (63%).

^bEstimated values based on the percentage of organic mercury in tuna sushi (88%).

^cAssuming a value of 60 kg for the weight of an adult (FAO / WHO, 2009).

^dAssuming the value of 15 kg for the weight of a child (FAO / WHO, 2009)

*Values above 100% of the PTWI are highlighted in the table

Therefore, divulging of the data concerning the high methylmercury levels and its toxicity is extremely important with respect to tuna sushi consumption by children, since the habit of eating fish, especially raw fish, has increased significantly and is increasing in popularity in other countries besides Japan (Yano, Yokoyama, Satomi, Oikawa & Chen, 2004). Thus the contaminants in fish sushi, as well as the

health benefits, need to be considered when examining the risks and benefits of fish consumption.

The work developed by Burger *et al.* (2013) used the common risk assessment default assumption of a 70 kg male for the EPA's default risk guidance. The mean daily intake assuming a 60 kg body weight (bw) varied around values of 0.34 µg/kg/day, which is greater than the threshold oral reference dose published by the USEPA (2015) of 0.1 µg/kg/day, based on the neurodevelopmental effects of methylmercury, and also that published by the Agency for Toxic Substances and Disease Research, who indicated a minimum risk level of 0.3 µg/kg/day (ATSDR, 1999). Nevertheless, the estimated exposure for children was not evaluated.

Estimating the mercury exposure from sushi is complex. This task is closely related to the eating habits of people from different regions, ethnicity, income, and also as a function of the number of fish-sushi meals per month, number of fish-sushi pieces per meal, and hence the number of fish-sushi pieces per month. An interview carried out by Burger *et al.* (2013) in a New Jersey university community regarding fish and sushi consumption, showed that 77% of the community consumed sushi (mean = 3.27 meals/month). Caucasians and Asians ate more sushi meals/month, and more sushi pieces/meal than other ethnicities, with East Asians eating more than South Asians. In the same study it was reported that some people in all ethnic groups ate more than 40 fish-sushi pieces/ month. This data suggests that East Asians and Caucasians are more at risk from mercury in fish than other ethnic groups because of their sushi consumption patterns. Despite most of Japanese meals are composed by numerous fish species, sushi is generally composed by just one. Therefore, it is important to aware regular consumers of this dish regarding to mercury exposure, especially categories considered "vulnerable", as young children, pregnant and breastfeeding women to include a wide range of fish species in their diet, as well to control the consumption of tuna sushi.

4. Conclusion

The method developed for organic mercury using a system assisted by microwaves and TDA AAS was successfully applied to the sushi samples, agreeing to the concepts of "green chemistry", with high extraction efficiency and a reduction in

the risk of contamination and loss when compared with conventional methods in open systems. There was no interconversion between the inorganic and organic chemical species of mercury under the analytical conditions used. From the studies carried out to assess the organic extract stability, it could be seen that the organic fractions suffered no significant variation for three weeks when stored in glass tubes and held under either ambient or refrigerated conditions.

The study revealed that samples of salmon and kani sushi had low values of Hg whilst tuna sushi presented the highest overall levels of total and organic Hg, with an average proportion of organic Hg / total Hg of 88%, indicating that the most toxic form of mercury (organic) predominated in this food. The evaluation of exposure to MeHg⁺ from sushi consumption was performed for adults and children: while for kani and salmon sushi the contribution for PTWI was insignificant; four portions of tuna sushi could contribute 100% of the PTWI for MeHg⁺ for adult and for children (one of the most susceptibility groups) only one portion (150g) was sufficient to exceed 100% of the PTWI.

The present results highlighted the importance of including sushi consumption in risk assessments for fish intake and mercury exposure. People who eat fish frequently (more than once a week), young children, pregnant and breastfeeding women, should choose wisely and include a wide range of fish species in their diet.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of FAPESP (process 2012/50667-9) and CNPq (process 442025/2014-9). E. L. Paiva and J. C. Alves acknowledge CAPES and B. S. Boer acknowledge CNPq for the fellowships.

References

AOAC (2013) – Association of Official Agricultural Chemists. *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1999). Available from <http://app2.erg.com/registration/index.htm>. Accessed 15.10.15.

Barst, B. D., Hammerschmidt, C. R., Chumchal, M. M., Muir, D. C., Smith, J. D., Roberts, A. P., Rainwater, T. R. & Drevnick, P. E. (2013). Determination of mercury speciation in fish tissue with a direct mercury analyzer. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(6), 1237-1241.

Batista, B. L., Rodrigues, J. L., De Souza, S. S., Oliveira Souza, V. C., & Barbosa Jr., F.(2011). Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. *Food Chemistry*, 126(4), 2000-2004.

Bosch, A. C., O'Neill, B., Sigge, G. O., Kerwarth, S. E. & Hoffman, L. C. (2016). Mercury accumulation in Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) with regards to muscle type, muscle position and fish size. *Food Chemistry*, 190, 351-356.

Burger, J., Stern, A. H., & Gochfeld, M. (2005). Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk. *Environmental Health Perspectives*, 113(3), 266-271.

Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Donio, M. & Pittfield, T. (2013) Sushi consumption rates and mercury levels in sushi: ethnic and demographic differences in exposure. *Journal of Risk Research*, 16 (8), 1057-1075.

Carbonell, G., Bravo, J. C., Fernandez, C& Tarazona, J. V. (2009). A new method for total mercury and methylmercury analysis in muscle of seawater fish. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 83, 210-213.

Chen, X., Han, C., Cheng, H., Wang, Y., Liu, J., Xu, Z., & Hu, L. (2013). Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange

chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 1314, 86-96.

Choi, A. L., Budtz-Jorgensen, E., Jorgensen, P. J., Salonen, J. T., Tuomainen, T., Murata K, Nielsen, H. P., et al. (2009). Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environmental Health Perspectives*, 117, 367–372.

Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. X., Amouroux, D., & Guérin, T. (2011). Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9), 2699-2711.

Demuth, N., & Heumann, K. G. (2001). Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Analytical Chemistry*, 73(16), 4020-4027.

Dorea, J. G., & Barbosa, A. C. (2005). Fish consumption and blood mercury: proven health benefits or probable neurotoxic risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42(2), 249-250.

FAO/WHO. (2011). *Report of the joint expert consultation on the risks and benefits of fish consumption*. Rome: FAO Fishery and Aquaculture Report.

Freire, C., Ramos, R., Lopez-Expinosa, M., Diez, S., Vioque, J., Ballester, F., et al. (2010) Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environmental Research*, 110, 96–104.

Galimberti, C., Corti, I., Cressoni, M., Moretti, V. M., Menotta, S., Galli, U. & Cambiaghi, D. (2016). Evaluation of mercury, cadmium and lead levels in fish and fishery products imported by air in North Italy from extra-European Union Countries. *Food Control* 60, 329-337.

- Harrington, C. F. (2000). The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 19(2), 167-179.
- Hightower, J. M., & Moore, D. (2003) Mercury levels in high-end consumers of fish. *Environmental Health Perspective*, 111(4), 604–608.
- Hites, R. A., Foran, J. A., Carpenter, D. O., Hamilton, M. C., Knuth, B. A. & Schwager, S. J. (2004). Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science*, 303(5655), 226–229.
- Horvat, M., & Gibičar, D. (2005). Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health. In *Handbook of elemental speciation II - Species in the environment, food, medicine and occupational health* (pp. 281-304). Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Houserova, P., Kuban, V., Spurny, P. & Habarta, P. (2006). Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of Moravian rivers. *Veterinarni Medicina*, 51(3), 101-110.
- Huang, Z., Pan, X-D., Han, J-L., Wu, P-G., Tang, J. & Tan, Y. (2012). Determination of methylmercury in marine fish from coastal areas of Zhejiang, China. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 5 (3), 182-187.
- Ikem, A. & Egiebor, N. O. (2005). 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(8), 771–787.
- INMETRO (2011) - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev.: 04, 1-20.

Issenberg, S. (2007). *The Sushi Economy: Globalization and the Making of a Modern Delicacy*. New York: Penguin Gotham Books.

JECFA. (2004). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *In Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives* (pp. 132-139). Geneva: World Health Organization.

Jinadasa, B. K. K. K., Rameesha, L. R. S., Edirisinghe, E. M. R. K. B. & Rathnayake, R. M. U. S. K. (2010). Mercury, cadmium and lead levels in three commercially important marine fish species of Sri Lanka. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 15, 39-43.

Kenšová, R., Kružiková, K. & Svobodová, Z. (2012). Mercury speciation and safety of fish from important fishing locations in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science*, 30(3), 276-284.

Kehrig, H.D. A., Seixas, T. G., Palermo, E. A., Baêta, A. P., Castelo-Branco, C. W., Malm, O., et al. (2009). The relationships between mercury and selenium in plankton and fish from a tropical food web. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(1), 10-24.

Kuballa, T., Moellers, M., Schoeberl, K. & Lachenmeier, D. W. (2011). Survey of methylmercury in fish and seafood from the southwestern German market. *European Food Research and Technology*, 232(4), 737-742.

Lowenstein, J. H., Burger, J., Jeitner, C. W., Amato, G., Kolokotronis, S.-O. & Gochfeld, M. (2010). "DNA Barcodes Reveal Species-Specific Mercury Levels in Tuna Sushi that Pose a Health Risk to Consumers." *Biology Letters* 6: 692–695.

Maggi, C., Berducci, M. T., Bianchi, J., Giani, M. & Campanella, L. (2009). Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta*, 641(1), 32-36.

- Martins, F. O. (2006). Assessment of hygienic and sanitary quality of preparations (sushi and sashimi) based on raw fish served in buffets in the city of São Paulo. São Paulo, Brazil: M. Se. Dissertation. Faculdade de Saúde Pública, 142pp.
- Martorell, I., Perellò, G., Martí-Cid, R., Llobet, J. M., Castell, V. & Domingo, J. L. (2011). Human exposure to arsenic, cadmium, mercury, and lead from foods in Catalonia, Spain: temporal trend. *Biological Trace Element Research*, 14(3), 309-322.
- Morgano, M. A., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Miyagusku, L. & Quintaes, K. D. (2014). As, Cd, Cr, Pb and Hg in seafood species used for sashimi and evaluation of dietary exposure. *Food Control*, 36(1), 24-29.
- Morgano, M. A., Milani, R. F. & Perrone, A. M. (2015). Determination of total mercury in sushi samples employing direct mercury analyzer. *Food Analytical Methods*, 8(3), 2301-2307.
- Morgano, M. A., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Miyagusku, L. & Balian, S. C. (2011). Assessment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). *Food Control*, 22(5), 778-785.
- Naozuka, J. & Nomura, C. S. (2011). Total determination and direct chemical speciation of Hg in fish by solid sampling GF AAS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(11), 2257-2262.
- Nevado, J. B., Martín-Doimeadios, R. R., Bernardo, F. G., Moreno, M. J., Roperó, M. P., & de Marcos Serrano, A. (2011). Mercury speciation in fish tissues from a Mediterranean river basin: the Tagus River (central Spain) as a case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4), 642-652.
- Nibble. 2012. "Types of Sushi & Sashimi: And a Glossary of Sushi & Sashimi Terms. Available from <http://www.thenibble.com/reviews/main/fish/seafood/sushi-glossary.asp>. Accessed 17.09.15.

- Oken, E., Radesky, J. S., Wright, R. O., Bellinger, D. C., Amarasiriwardena, C. J., Kleinman, K. P., Hu, H. & Gillman, M. W. (2008). Maternal Fish Intake during Pregnancy, Blood Mercury Levels, and Child Cognition at Age 3 Years in a US Cohort. *American Journal of Epidemiology*, 167(10), 1171-1181.
- Olmedo, P., Pla, A., Hernandez, A. F., 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. *Environmental International*, 59, 63-72.
- Ordiano-Flores, A., Galván-Magaña, F. & Rosiles-Martínez, R. (2011). Bioaccumulation of Hg in muscle tissue of yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*, of the Eastern Pacific Ocean. *Biological Trace Element Research*, 144(1), 606-620.
- Ruiz-de-Cenzano, M., Rochina-Marco, A., Cervera, M. L. & de laGuardia, M. (2014). Speciation of methylmercury in market seafood by thermal degradation, amalgamation and atomic absorption spectroscopy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 90–96.
- Sanz, J., De Diego, A., Raposo, J., & Madariaga, J. (2003). Routine analysis of mercury species using commercially available instrumentation: chemometric optimization of the instrumental variables. *Analytica Chimica Acta*, 486(2), 255-267.
- Sarıca, D. Y. & Türker, A. R. (2012). Speciation and determination of inorganic mercury and methylmercury by headspace single drop microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry in water and fish. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 40(5), 523-530.
- Shade, C. W., & Hudson, R. J. M. (2005). Determination of MeHg⁺ in environmental sample matrices using Hg-thiourea complex ion chromatography with online

cold vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Environmental Science & Technology*, 39(13), 4974-4982.

Sioen, I., Henauw, S., Verdonck, F., Thuyne, N., & Camp, J. (2007). Development of a nutrient database and distributions for use in a probabilistic risk-benefit analysis of human seafood consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(8), 662-670.

Steuerwald, U., Weihe, P., Jorgansen, P. J., Bjerve, K., Brock, J., Heinzow, B. et al. (2000). Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurological function. *Journal of Pediatrics*, 136, 599–605.

Trasande, L., Landrigan, P. J. & Schechter, C. (2005). Public health and economic consequences of methylmercury toxicity to the developing brain. *Environmental Health Perspectives*, 113(5), 590–596.

US Environmental Protection Agency (USEPA). 2015. “Fish: What Pregnant Women and Parents Should Know. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Metals/ucm393070.htm>. Accessed 22.09.15.

WHO – World Health Organization. (2009). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44065/9/WO_EHC_240_9_eng_Chapter6.pdf. Accessed 25.11.15.

WHO - World Health Organization. (2015). Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9 th Session New Delhi, India, 16 – 20 March. Available from: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf Accessed 20.11.15

- Yano, Y., Yokoyama, M., Satomi, M., Oikawa, H. & Chen, S. S. (2004). Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1617-1623.
- Zhang, W.-B., Yang, X.-A., Dong, Y.-P., & Xue, J.-J. (2012). Speciation of inorganic and methyl-mercury in biological matrixes by electrochemical vapor generation from an l-cysteine modified graphite electrode with atomic fluorescence spectrometry detection. *Analytical Chemistry*, 84(21), 9199-9207.
- Zhang, X., Naidu, A. S., Kelley, J.J., Jeewett, S.C., Dasher, D., Duff, L.R. (2001). Baseline concentration of total mercury and methylmercury in salmon returning via the Bering Sea (1999–2000). *Marine Pollution Bulletin*, 42(10), 993–997.

CAPÍTULO 3

**Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in
Brazil: risk assessment and exposure evaluation**

Esther Lima de Paiva, Raquel Fernanda Milani, Bárbara Sia Boer, Késia
Diego Quintaes, Marcelo Antonio Morgano.

Submitted to Food Additives & Contaminants: Part A

Abstract

The objective of this work was to determine the organic and total mercury contents in twelve fish species used in preparing *sashimi* in Japanese restaurants and estimate the exposition to organic mercury due to the consumption of this food. The mercury species were quantified by atomic absorption with thermal decomposition and amalgamation. Total mercury was analyzed directly, whereas organic mercury was quantified after extraction with toluene in an acid medium using a microwave assisted system. Needlefish and tuna showed the highest levels of mercury species and salmon and mullet the lowest levels. The mean ratios between organic Hg/ total Hg were 93% and 87% for sandperch and octopus, respectively, indicating that the most toxic form (organic Hg) predominates in these species. Exposure to methylmercury was estimated and compared with the PTWI and the results showed that the ingestion of 2 portions of needlefish and tuna exceeded the values established by 100%.

Keywords: *sashimi*, needlefish, health risk, methylmercury, target hazard quotient (THQ).

1. Introduction

Fish consumption has grown exponentially throughout the world in a search for healthier foods and improved quality of life. Recent surveys have shown that dishes based on raw fish are more and more accessible in common and specialized restaurants, buffets and *sushi* bars. However, the ingestion of fish and derived products is considered to be the main via for human exposition to mercury (Barone *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2015). Recent studies have reported that cooking generally increases the mercury content in fish and seafood (Costa *et al.*, 2015), but nevertheless the consumption of raw fish such as *sashimi* can significantly influence the final concentration of ingested mercury, so obtaining data concerning the ingestion and exposition to the species of mercury present in culinary dishes based on raw fish, is important (Miguéis *et al.*, 2015).

The predominant organic mercury form found in fish is methylmercury (MeHg⁺), which is highly toxic, and can show the potential to bioaccumulation throughout the food chain (Eisler, 2000). Exposition to MeHg⁺ can cause adverse effects on the nervous system and also compromise brain development in fetuses. The compound is also able to cross the placental barrier and establish itself in the blood cells, nerve endings and muscle tissues of fetuses. In 2001 the Food and Drug Administration (FDA) issued an alert destined for pregnant and/or breastfeeding women to reduce their consumption of fish such as swordfish, needlefish and dogfish, which, due to their mercury contents, could compromise the development of normal cognition in fetuses and children (FDA, 2001a). In 2002 the FDA recommended that the alert was extended to the consumption of tuna (CAC, 2015).

Toxic metal contaminants such as mercury can be classified as carcinogenic or non-carcinogenic. Recently studies on contamination by toxic metals have intensified and different methods to evaluate the potential health risk have been proposed. Evaluation of the Target Hazard Quotient (THQ) has been applied to risk evaluation studies (Wang *et al.*, 2005), providing indications of the risk associated with exposition to a non-carcinogenic contaminant, with qualitative information concerning an adverse effect. This method was applied with success by Chien *et al.* (2002) in a study concerning the contaminants arsenic, cadmium, copper and zinc in

oyster samples collected in the coastal region of Taiwan, and was also applied in the present study.

A quantitative method frequently used to evaluate the risk arising from exposition to contamination from the consumption of mercury species is based on the comparison values with the Provisional Tolerable Weekly Ingestion (PTWI). In 2000 the value established by JECFA for the general population was $3.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ b.w. (body weight), making previsions for developing children and fetuses since they are more sensitive to MeHg^+ (WHO, 2000). Subsequently the value for PTWI was reduced to $1.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ b.w., this value being considered safe for the health of the population (WHO, 2004).

For quantification, the analytical methods most used to determine MeHg^+ use liquid or gas chromatographic techniques coupled to highly sensitive and selective detectors such as atomic absorption spectrometry (AAS) (Martorell *et al.*, 2011), atomic fluorescence spectrometry (AFS), atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Pastorelli *et al.*, 2012). Thermal decomposition and amalgamation atomic absorption spectrometry (TDA AAS) has been used to quantify the total mercury content (Morgano *et al.*, 2015).

Thus the objectives of the present work were: i) determine the organic and total mercury contents using the TDA AAS technique in twelve fish species used in the preparation of *sashimi*; ii) determine the organic mercury: total mercury ratio in the different fish species; iii) estimate the risk of exposition to MeHg^+ by consuming fish, using qualitative (THQ) and quantitative (PTWI) methods.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

A total of 50 small portions of raw filleted fish commercialized as *sashimi*, prepared using the 12 different species of fish most commonly used to elaborate this dish in Japanese restaurants located in the southeastern region of Brazil (City of Campinas, State of São Paulo) were acquired. The species studied were: tuna (*Thunnus thynnus*, $n=5$), salmon (*Salmo salar*, $n = 5$), octopus (*Octopus vulgaris*, $n = 5$), mullet (*Mugil platanus*, $n = 5$), black anchovy (*Ruvettus pretiosus*, $n = 5$),

barracuda (*Boulengerella maculata*, $n = 5$), amberjack (*Seriola lalandi*, $n = 2$), golden fish (*Coryphaena hippurus*, $n = 3$), and some species of white fish such as sea bass (*Centropomus sp.*, $n = 5$), needlefish (*Strongylura marina*, $n = 3$), swordfish (*Trichiurus lepturus*, $n = 4$) and sandperch (*Pseudoperca numida*, $n = 3$). Figure 1 shows the probable origin of the fish species evaluated in the present study.

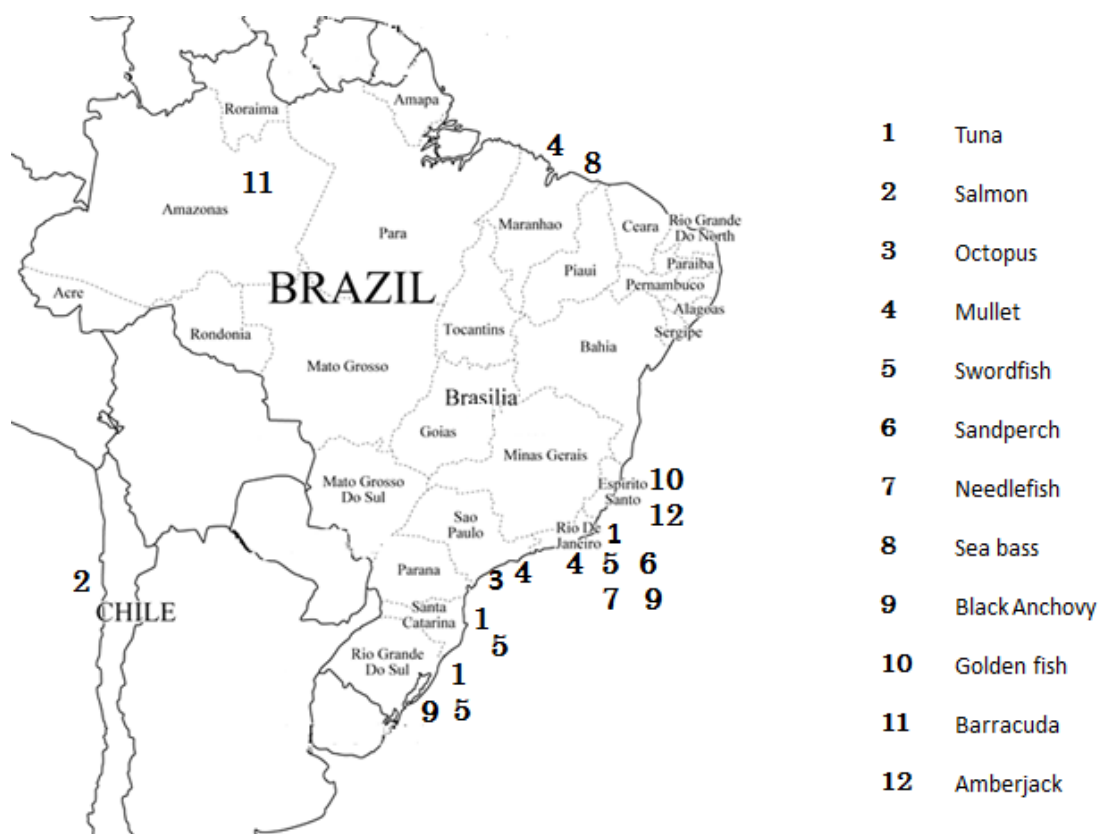


Figure 1. Fish species localization.

The origin of most of the species was in the southeastern and southern regions of the Atlantic coast, especially in the states of Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina and Espírito Santo. The states of Maranhão and Amazonas on the northern coast, contributed with the mullet, sea bass and barracuda fish, and the origin of the salmon was exclusively from the Pacific coastline, Chile being the main representative.

The samples were ground separately according to species, using a domestic processor to obtain a homogenous mass, and stored frozen (-18°C) until analyzed. The mean weight obtained experimentally for the *sashimi* portions was 100 g, corresponding to 4 units (fillets) of fish. The mean standard size of the slices was 2.5 cm wide, 4 cm long and 0.5 cm thick. The total and organic mercury were determined in triplicate.

2.2. Reagents and standards

Only analytical grade reagents were used in this study. The water (18.2 MΩ cm) was purified by reverse osmosis (Gehaka, São Paulo, Brazil) and the nitric acid in a sub-boiling distiller (Distillacid, Berghof, Eningen, Germany). Toluene (Synth, Diadema, Brazil) and a 30% HCl solution (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the extractions carried out by microwaves. A 2.5% L-cysteine solution (Sigma, Steinheim, Germany) was prepared to stabilize the organic mercury species. The analytical curves were constructed using certified 1.000 mg L⁻¹ standard mercury solutions (Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) together with a 0.5% HNO₃ solution (v / v).

2.3. Instrumentation

The total and organic mercury contents in the *sashimi* samples were quantified by TDA AAS using a direct mercury analyzer (DMA-80, Dual Cell, Milestone, Sorisole, Italy). The samples were submitted to an initial heating step and subsequent determination of the mercury in an amalgamator containing gold.

2.4. Determination of total mercury and extraction of organic mercury (MeHg)

2.4.1. Determination of total mercury

The instrumental conditions used to determine total mercury (tHg) by TDA AAS were established based on the study developed by Morgano *et al.* (2015): drying at 200°C for 60s; decomposition at 600°C for 180s, desorption at 850°C and detection at 253.7 nm. The homogenized samples were weighed into nickel recipients (60 to 100 mg for the fish species) for the subsequent determination of tHg.

2.4.2. Extraction of organic mercury (MeHg)

Organic mercury (oHg) was determined using a closed microwave-assisted extraction system as described by Paiva *et al.* (2016): 1 g of sample was weighed into a Teflon PFA recipient followed by the addition of 8 mL toluene pa, 1 mL of demineralized water and 0.75 mL of a 30% HCl solution (v / v). The analytical conditions of the microwave extractor were: 1000 W power applied; (A) heating ramp to 110°C in 10 min; (B) temperature constant at 110°C for 5 min.

After extraction, a 4 mL aliquot of the organic phase was transferred to a centrifuge tube containing 2 mL of a 2.5% L-cysteine solution (m / v) and the mixture centrifuged at 3500 rpm for 6 min. A 100 mg portion of the L-cysteine phase was weighed into a quartz recipient and the mercury content determined in a DMA-80 analyzer. The optimized instrumental conditions for the determination of organic mercury were: drying of sample at 120°C for 60s; decomposition at 300°C for 180s; desorption at 850°C for 12s; and the absorbance determined at 253.7 nm. The detection ranges for the two cells of the equipment were: 0.5 to 20 µg kg⁻¹ and 20 to 1000 µg kg⁻¹.

2.5. Estimation of methylmercury exposition

Two parameters were considered to evaluate the potential risk of exposition to methylmercury: the Target Hazard Quotient (THQ) (Chien *et al.*, 2002) and the Provisional Tolerable Weekly Ingestion (PTWI) (MeHg⁺ = 1.6 µg kg⁻¹ bw) (WHO, 2015).

- The methodology used to estimate THQ is described by US EPA (2007a), as from which calculations were carried out to evaluate the risk considering the following equation described by Chien *et al.* (2002):

$$\text{THQ} = \frac{\text{Ef} \times \text{Ed} \times \text{Ir} \times \text{C}}{\text{RfDo} \times \text{BW} \times \text{AT}} \times 10^{-3} \quad (1)$$

Where Ef is the exposition frequency (365 days/year); Ed is the duration of exposition (71 years for men and 78.6 years for women according to data of the Brazilian Institute of Geography and Statistics) (IBGE, 2013); Ir is the fish ingestion

rate (g / person / day); C is the MeHg⁺ concentration in the fish ($\mu\text{g kg}^{-1}$); Rf Do is the oral reference dose (mg / kg / dia); BW is the body weight for adults (60 kg) and children (15 kg); AT is the mean exposition time to non-carcinogenic contaminants (365 days/year x years of exposition: 71 and 78.6 years for men and women, respectively); and 10^{-3} is the unit conversion factor (Wang *et al.*, 2005).

THQ values below 1 indicate that the population is not experiencing adverse effects of the contaminant, whilst values between 1 and 5 indicate that the consumers are already exposed to risks which could cause damage to the health, and THQ values above 5 denote a significant potential for risk to the health.

- The estimated exposition to organic mercury as a function of PTWI was calculated as follows:

Estimated methylmercury exposition = $[\text{MeHg}^+] \times (\text{portion} / \text{body weight})$; where $[\text{MeHg}^+]$ (mean and interval of concentration, $\mu\text{g kg}^{-1}$); portions of 100 g and 20 g of *sashimi* were considered for adults of 60 kg and children of 15 kg, respectively. Hence the estimated exposition to MeHg⁺ is given in $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}^{-1}$.

The maximum tolerable number of portions per week for adults and children was indicated by values above 100% for PTWI.

$\% \text{PTWI} = 100 \times (\text{Estimated exposition to methylmercury}) / (\text{MeHg}^+ \text{PTWI})$; (2)
where $\text{MeHg}^+ \text{PTWI} = 1.6 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw}^{-1}$ (WHO, 2015).

3. Results and Discussion

3.1 Analytical characteristics

The figures showing the accuracy, precision, linearity of the analytical curves, detection limits and quantification limits were evaluated according to INMETRO (2011). The accuracy of the methods used to determine total and organic mercury was verified using certified reference materials for total (fish protein – NCR DORM-4) and organic (fish protein – NCR DORM-4 and oyster tissue – NIST SRM 1566b) mercury, the recovery values obtained being: $97 \pm 14\%$ for total mercury (DORM-4) and $94 \pm 6\%$ and $111 \pm 2\%$ for methylmercury (DORM-4 and NIST

SRM 1566b). The precision of the method was evaluated by the coefficient of variation (16 analytical repetitions) obtaining values of 5.5% and 9.0%, respectively for total and organic mercury. The analytical curves for the determination of mercury presented linearity in the ranges from 0.5 to 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 20 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($R > 0.999$). The limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) for organic and total mercury were: LOD (3s) = 2.0 and 0.40 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ (10s) = 6.6 and 1.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively; "s" being the value of the standard deviation for the concentrations of ten repetitions.

3.2. Results obtained for total mercury and methylmercury in sashimi

Table 1 shows the results obtained for tHg and oHg in the different fish species used in the preparation of *sashimi*. Different concentrations of total and organic mercury were found amongst the 12 fish species studied. The species that presented the highest mean contents of tHg and oHg were: needlefish (1010 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 855 $\mu\text{g kg}^{-1}$); tuna (902 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 683 $\mu\text{g kg}^{-1}$); barracuda (743 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 476 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and anchovy (517 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 322 $\mu\text{g kg}^{-1}$), respectively.

The contents obtained for total and organic mercury in the different fish species were in the following order: needlefish > tuna > barracuda > anchovy > sandperch > amberjack > swordfish > octopus > golden fish > sea bass > salmon > mullet. The fish species needlefish and tuna were those presenting the greatest contents of mercury, both organic and total.

Of the 12 species studied used in the elaboration of *sashimis*, needlefish, swordfish and tuna are classified as predators and the others as non-predators. The mean mercury contents found in the swordfish were approximately five times less than those found in the needlefish and tuna. This fact could be related to the fish habitat and contamination area. In Figure 1 it can be seen that the swordfish and anchovy (lower mean Hg levels) came from the same fishing region. According to Grandjean *et al.* (2010), the aquatic environment of the southern Brazilian coast, where these fish species predominate, is less polluted and has a lower concentration of methylating bacteria.

Table 1.
Total and organic Hg levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$) observed in sashimi fish species.

Fish species)	n		Total Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg* ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
			Mean \pm SD (Range)	
Needlefish	3		1010 \pm 480 (644 - 1576)	855 \pm 416 (589 - 1379)
		% samples > LM*	33	33
Sandperch	3		476 \pm 44 (422 - 512)	442 \pm 20 (408 - 486)
		% samples > LM*	33	0
Sea bass	5		36 \pm 20 (4 - 61)	24,4 \pm 13.9 (17 - 46)
		% samples > LM*	0	0
Tuna	5		902 \pm 703 (303 - 1790)	683 \pm 523 (261 - 1395)
		% samples > LM*	40	40
Salmon	5		12 \pm 2.2 (8 - 14)	7.5 \pm 1.6 (2 - 12)
		% samples > LM*	0	0
Amberjack	2		322 \pm 260 (477 - 157)	229 \pm 175 (90 - 355)
		% samples > LM*	50	0
Swordfish	4		189 \pm 145 (102 - 410)	145 \pm 116 (76 - 348)
		% samples > LM*	0	0
Barracuda	5		743 \pm 285 (305 - 1036)	476 \pm 181 (192 - 745)
		% samples > LM*	80	40
Octopus	5		130 \pm 96 (67 - 304)	113 \pm 83 (54 - 261)
		% samples > LM*	0	0
Black anchovy	5		517 \pm 156 (319 - 732)	332 \pm 104 (192 - 504)
		% samples > LM*	60	0
Golden fish	3		124 \pm 39 (83 - 177)	67 \pm 29 (48 - 106)
		% samples > LM*	0	0
Mullet	5		4.0 \pm 2.4 (0.45 - 8.5)	< 6.6
		% samples > LM*	0	0

Samples above establish maximum limit (ML) by Brazilian legislation (RDC 42/ANVISA, 2013): 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total Hg for fish and 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for predatory fish. The same levels were established for MeHg, according to CODEX (CAC, 2015).

The World Health Organization (CAC, 2015) established maximum limits for MeHg* of 1 mg kg^{-1} for predatory fish and 0.5 mg kg^{-1} for non-predatory fish. In the present study, the species needlefish and tuna presented values varying from 589 to 1379 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 261 to 1395 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, contents above the established

levels. The MeHg⁺ levels observed could be associated with the characteristics of these fish (predatory fish), showing a greater tendency to accumulate mercury.

For the non-predatory species such as barracuda and black anchovy, MeHg⁺ contents above the maximum limit established by JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives (WHO, 2015) of 0.5 mg kg⁻¹ were found, with intervals between 192 and 745 µg kg⁻¹ and 192 and 504 µg kg⁻¹, respectively. Fish species such as sandperch, amberjack and swordfish showed MeHg⁺ values below the maximum permitted limit, and even lower values were observed for MeHg⁺ amongst the samples of sea bass, salmon and mullet, with respective mean values of 28.9 µg kg⁻¹, 6.8 µg kg⁻¹ and not detected. For the species mullet, total mercury contents varying between 0.45 and 8.5 µg kg⁻¹ were found and the MeHg⁺ levels, were below the quantification limit of the method (6.6 µg kg⁻¹).

To evaluate the proportion of organic mercury present in the fish species used in the elaboration of *sashimi*, the ratios (%) between the organic and total mercury contents were calculated, and the results are presented in Figure 2. The *sashimi* elaborated with sandperch showed the highest oHg/tHg ratio with a value of 93%, and the *sashimi* samples made with octopus and needlefish also showed elevated oHg/tHg ratios of 87% and 85%, respectively. With respect to the octopus *sashimi*, the result obtained in the present study was comparable with that observed by Raimundo *et al.* (2010), who found values varying between 70 and 99%. With respect to the tuna *sashimi*, Storelli *et al.* (2002) found values for the oHg/tHg ratio of between 77 and 100%, whilst Burguer *et al.* (2013) found mean values of 90%. A value of 77% was found in the present work, in agreement with the values found by Storelli *et al.* (2002).

Torres-Escribano *et al.* (2010) found higher values for the oHg/tHg ratio (89%) in swordfish *sashimi* than those found in the present study (77%), and for anchovy, Martorell *et al.* (2011) found an oHg/tHg ratio of 93%, as against 64% found in the present study. For golden fish *sashimi* a value of 54% was observed in the present study, but to the best of the authors' knowledge, studies found in the literature with this fish species only reported the data for tHg.

For salmon *sashimi* a value for the oHg/tHg ratio of 63% was found in the present study, inferior to those reported in the literature: Chung *et al.* (2008) found a

mean value of 74%; Costa *et al.* (2015) observed a valor of 82%; and the group of Martorell (2011) found a mean proportion of 100%. For amberjack sashimi a higher oHg content was found in the present study as compared to data available in the literature (71% for the oHg/tHg ratio), whereas Gibic̃ar *et al.* (2009) reported a value of 61%. The mullet sashimi presented oHg contents below the quantification limit of the method ($6.6 \mu\text{g kg}^{-1}$), and hence the oHg/tHg ratio for this species could not be represented in Figure 2. However, Chung *et al.* (2008) obtained a mean ratio of 64%.

According to Forsyth *et al.* (2004), factors related to the origin of the fish, location where fished, environmental conditions and anthropogenic activities could be associated with the availability of mercury in the environment, and consequently different proportions between the mercury species can be observed in the fish.

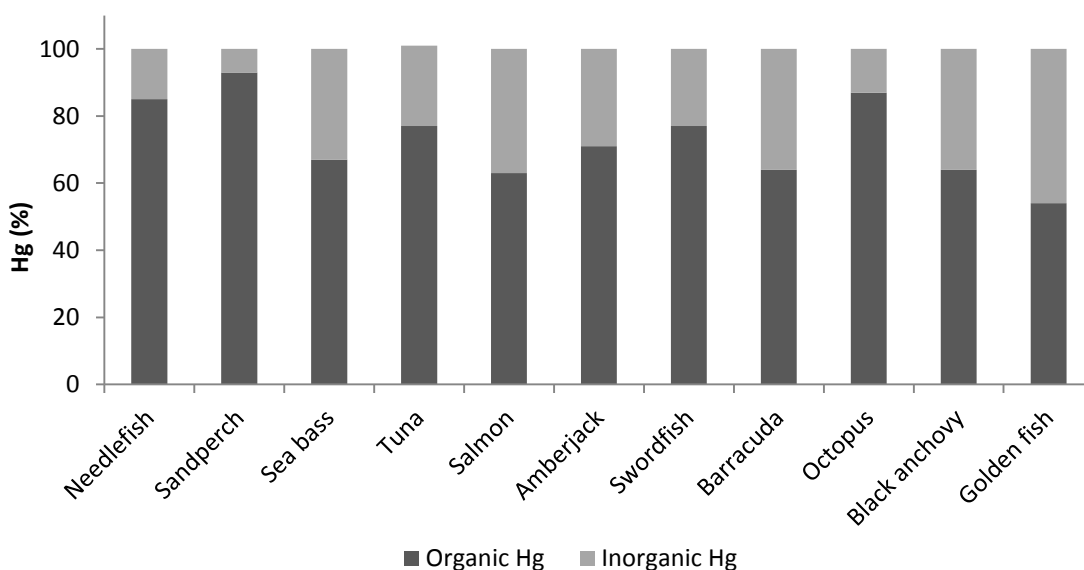


Figure 2. Ratio between oHg / iHg (%) in analyzed sashimi samples.

Table 2.

Comparison of total and MeHg⁺ results for different fish species used for sashimi dishes (mean values or range and literature reference).

<i>Fish specie</i>	n	Total Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MeHg ⁺ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Literature reference
		Mean or (Range)	Mean or (Range)	
Swordfish	9	(638 – 3845)	(486 – 1492)	Forsyth <i>et al.</i> , 2004
	27	(170 – 1720)	(160 – 1530)	Torres-Escribano <i>et al.</i> , 2010
	6	(1025 – 1700)	-	Cortes and Fortt 2007
	10	529	-	Pastorelli <i>et al.</i> , 2012
	11	540	-	Olmedo <i>et al.</i> , 2013
	4	(102 – 410)	(76 – 348)	Present study
Tuna	8	(77 – 2121)	(61 – 1303)	Forsyth <i>et al.</i> , 2004
	33	491	442	Burger <i>et al.</i> , 2013
	5	840	800	Storelli <i>et al.</i> , 2002
	5	(303 – 1790)	(261 – 1395)	Present study
Salmon	3	34	25	Chung <i>et al.</i> , 2008
	25	28	23	Costa <i>et al.</i> , 2015
	24	10	10	Martorell <i>et al.</i> , 2011
	5	12	7,5	Present study
Amberjack	200	301	184	Gibic̃ar <i>et al.</i> , 2009
	2	322	230	Present study
Needlefish	3	(50 – 710)	-	Hosseini <i>et al.</i> , 2013
	3	(644 - 1576)	(601 – 1336)	Present study
Sandperch	1	454	-	Morgano <i>et al.</i> , 2014
	3	476	442	Present study
Sea bass	4	1700	-	Farias <i>et al.</i> , 2005
	5	36.1	28.9	Present atudy
Barracuda	7	(303 – 2129)	-	Bastos <i>et al.</i> , 2008

Capítulo 3 – Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in Brazil: risk assessment and exposure evaluation

	5	(305 - 1036)	(192 – 745)	Present study
	12	(130 -760)	(110 – 750)	Raimundo <i>et al.</i> , 2010
Octopus	1	443	-	Bonsignore <i>et al.</i> , 2013
	5	20	-	Galimbert <i>et al.</i> , 2016
	5	(67 - 304)	(54 – 261)	Present study
Black anchovy	24	140	130	Martorell <i>et al.</i> , 2011
	5	516.67	332.4	Present study
	20	(26 – 90)	-	Sellanes <i>et al.</i> , 2002
Golden fish	385	(12 – 550)	-	Adams 2009
	57	(10 – 490)	-	Cai <i>et al.</i> , (2007)
	3	(83 - 177)	(48 – 106)	Present study
Mullet	3	14	9	Chung <i>et al.</i> , 2008
	5	3.90	< 6.6	Present study

The MeHg⁺ and total mercury levels observed in the present study were in agreement with those of other authors: Forsyth *et al.* (2004) found MeHg⁺ levels varying from 61 to 1303 µg kg⁻¹ in tuna samples coming from Canada; Storelli's group (2002) evaluated different tuna species (*Thunnus alalunga*) and (*Thunnus thynnus*) obtained from the Adriatic and Ionian seas, and obtained mean values of 430 µg kg⁻¹ for MeHg⁺; whereas samples of tuna *sashimi* collected from the New Jersey region (USA) presented mean values of 442 µg kg⁻¹ for the organic mercury species (Burger *et al.*, 2013).

Hosseini *et al.* (2013) studied predatory species of needlefish from the Persian Gulf and reported total mercury contents of 50 to 710 µg kg⁻¹, whereas in the present study the results varied from 644 to 1576 µg kg⁻¹ for total mercury and from 589 to 1379 µg kg⁻¹ for MeHg⁺.

In general the values obtained in the present study for the total Hg and MeHg⁺ contents of swordfish were similar to those found in studies carried out in other fishing areas: values between 638 and 3845 µg kg⁻¹ were found by Forsyth *et*

al. (2004) for total mercury and from 486 to 1492 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MeHg^+ in samples acquired in Canadian markets; the group of Torres-Escribano (2010), who studied swordfish acquired from the Spanish coast obtained total mercury contents varying from 170 to 1720 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and MeHg^+ contents from 160 to 1530 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Cortes & Fortt (2007) observed mean levels of 1362 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for total mercury in samples obtained on the Chilean coast, whereas Pastorelli *et al.* (2012) and Olmedo *et al.* (2013) found mean contents of 529 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 540 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for fish from Italy and Spain, respectively.

With respect to the species barracuda, similar concentrations of total mercury were reported by Bastos *et al.* (2000) in a study carried out in the Amazon basin, with values varying from 303 to 2129 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For the species anchovy, Martorell *et al.* (2011) found contents of total and organic mercury of 140 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 130 $\mu\text{g kg}^{-1}$, values below those found in the present work of 516.67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 332.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Distinct values for concentration can be attributed to different fishing areas, determined geographically by the FAO fishing areas. According to this division, the fish samples used in the present work come from the Southeast Atlantic, whereas those in the study of Martorell *et al.* (2011) were from the Northeast Atlantic.

Although there is not a large volume of data available in the literature concerning the sandperch, Morgano *et al.* (2014) analyzed the total mercury content in samples from the southeast coast of Brazil, obtaining mean values of 454 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In the present study the total mercury and MeHg^+ contents were determined in 3 samples of *sashimi* of this fish and the mean contents obtained were 476 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 472 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

To the best of the authors' knowledge, there is little data available in the literature with respect to the presence of MeHg^+ in octopus. In the study carried out by Raimundo *et al.* (2010) to determine the mercury species in octopus from the Portuguese coast, significant levels of total mercury (130 to 760 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and MeHg^+ (110 to 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were encountered. Bonsignore *et al.* (2013) found medium values of 443 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total mercury, whereas Galimberti *et al.* (2016) found 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the same species of mercury in the south and north regions of Italy, respectively.

The sea bass samples analyzed in the present study presented low values of total mercury and MeHg⁺, namely 36.1 µg kg⁻¹ and 28.9 µg kg⁻¹, respectively. On the other hand, Farias *et al.* (2005) observed high levels of total mercury (1700 µg kg⁻¹, on average) in samples fished in the Bay of Santos, Brazil, but since this fish is not predatory, the elevated mercury content could be related principally to the localization of the estuary, just below the industrial complex of Cubatão, which is a direct, primary receptor of contaminated effluents.

With respect to samples with low Hg contents such as the golden fish, values of 26 and 90 µg kg⁻¹ of total mercury were found by Sellanes *et al.* (2002) in samples collected on the Rio de Janeiro State coast, Brazil. Adams (2009) reported total mercury levels of between 12 and 550 µg kg⁻¹ in samples from the southeast coast of the USA, whereas Cai *et al.* (2007) obtained minimum values of 10 µg kg⁻¹ and maximum values of 490 µg kg⁻¹ in fish from the northern region of the Gulf of Mexico. In the present study, the golden fish samples collected in the southeast of Brazil presented total mercury and MeHg⁺ contents varying from 83 to 177 µg kg⁻¹ and from 48 to 106 µg kg⁻¹, respectively.

The species mullet presented the lowest concentration of total mercury. Chung *et al.* (2008) found mean values of 14 µg kg⁻¹ for total mercury and 9 µg kg⁻¹ for MeHg⁺ in mullet samples commercialized in China, and in the present study, the mean value obtained for total Hg was 3.9 µg kg⁻¹ and the levels for organic Hg were below the quantification limit of the method (LOD = 6.6 µg kg⁻¹). Since this species is small, the low Hg contents found could be associated with the correlation existing between the mercury concentration and size of the fish.

3.3 Evaluation of the potential risk related to the ingestion of MeHg⁺

On considering the metal contents in marine organisms versus human consumption one of the most important aspects to be evaluated is their toxicity. With this objective in mind, different approaches to the estimation of health risks from the consumption of mercury have been proposed. In the food area, the approach most used has been the quantitative comparison with the PTWI values, which represent the amount of the substance that can be ingested during a lifetime without significant risks to the health, and which was defined by the FAO/WHO committee of experts in

food additives (JECFA) (WHO, 2008). One approach that has been used in environmental studies to evaluate the potential risk has been the determination of the target hazard quotient (THQ) (USEPA, 2014). This factor consists of a qualitative risk index that compares the levels of ingestion of a contaminant with a standard dose of the reference. A THQ <1 signifies that the level of exposition is less than that of the reference dose. It is thus presumed that the daily exposition to this level does not cause any negative effects to the health throughout the entire life of a human population (Barone *et al.*, 2015).

A - Target Hazard Quotient

The evaluation of the risk of exposition to MeHg⁺ was also carried out as a function of the THQ value, which expresses the ratio between exposition to the contaminant and its respective daily reference dose (DRD) for non-carcinogenic compounds. The value used for the DRD of MeHg⁺ was 0.1 µg kg⁻¹ day⁻¹ (USEPA, 2007a). Figure 3 shows the results obtained for THQ using Equation (1) for each fish species used in the *sashimis* studied.

The results showed that 42% of the fish samples analyzed had THQ ≥ 5, that is, they were above the maximum limit for danger, indicating a high risk of the exposition to contamination by the consumption of some of the fish species. Of these, needlefish and tuna stood out with elevated THQ values, followed by sandperch, barracuda and anchovy. Fish of the species amberjack, swordfish, octopus and golden fish (33% of the samples) presented 1 <THQ< 5, denoting a significant risk associated with the consumption of these fish species. THQ values < 1 were only obtained for salmon and sea bass, indicating no potential risk of contamination associated with the MeHg⁺ contents present in these *sashimis*.

The values reported as a function of THQ provided evidence that the fish species used in the elaboration of the *sashimis* had a high capacity to retain mercury compounds, principally the toxic organic species (MeHg⁺). The analysis of the target hazard quotient also showed that 10 of the 12 fish species used in the *sashimis* evaluated in this study had THQ values > 1. Barone *et al.* (2015), working with fish samples from different regions of the Mediterranean Sea, observed THQ values of from 0.74 to 0.8 for mercury in tuna and swordfish, respectively. Although these THQ

values were lower than those obtained in the present study, they were still close to 1 (minimum exposition limit).

THQ < 1 → minor health risk ;

THQ 1-5 → concerning level;

THQ >5 → major health risk.

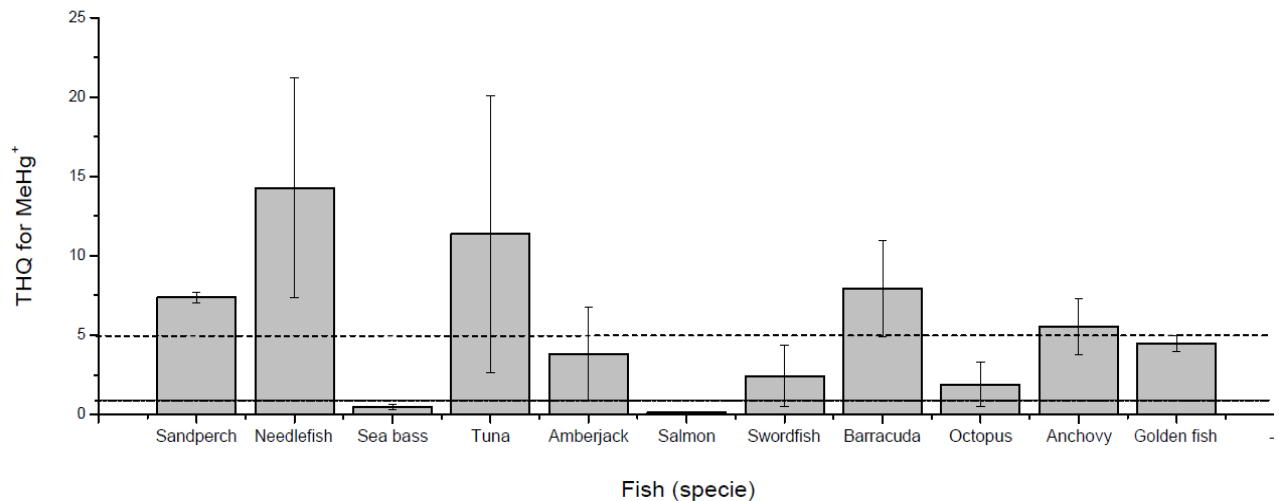


Figure 3. The estimated target hazard quotient of MeHg⁺ in fish species used in sashimi preparation.

The results obtained for THQ for the *sashimi* samples provided evidence of the need to promote consumer consciousness with respect to the ingestion of some fish species and fish-based dishes.

B – Estimate of the exposition to methylmercury: evaluation of the consumption of sashimi and comparison with PTWI value

The estimate of the exposition to MeHg⁺ from the consumption of *sashimi* from different fish species was calculated considering the mean weight of a *sashimi* portion determined experimentally as 100g for adults and estimated as 20g for children. The calculations were done using PTWI values for MeHg⁺ of 1.6 µg kg⁻¹, considering the weight of an adult as 60kg and that of a child (2 to 6 years old) as 15kg, as recommended by FAO/WHO (2011). With the objective of comparing the

Capítulo 3 – Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in Brazil: risk assessment and exposure evaluation

values obtained with the PTWI established for MeHg⁺, it was considered that this was the main organic mercury species present in the different fish species evaluated.

Table 3 shows the mean MeHg⁺ content present in each of the fish species used to elaborate the *sashimis*, the value for the % of the PTWI reached by adults and children considering the consumption of one *sashimi* portion, and the number of *sashimi* portions necessary to reach 100% of the PTWI for MeHg⁺.

Table 3.

Estimated exposure to MeHg⁺ from sashimi consumption portions considering 100% of PTWI, adults of 60 kg and children of 15 kg.

Fish species used in Sashimi	Adults				Children			
	Organic Hg (µg kg ⁻¹ bw)	Organic Hg (µg/100 g)*	PTWI (%)	Sashimi portions to achieve 100% of PTWI	Organic Hg (µg kg ⁻¹ bw)	Organic Hg (µg/20 g)**	PTWI (%)	Sashimi portions to achieve 100% of PTWI
Needlefish	1.4	86	89	1.1	1.14	17.2	71	1.4
Sandperch	0.7	44	46	2.1	0.58	8.8	37	2.7
Sea bass	0.04	2.9	0	33	0.03	0.6	24	41
Tuna	1.1	68	71.1	1.4	0.91	13.6	57	1.7
Salmon	0.01	0.7	0.71	140	0.009	0.14	05	175
Amberjack	0.38	23	24	4.1	0.30	4.6	19	5.2
Swordfish	0.24	14	15	6.6	0.19	2.9	12	8
Barracuda	0.79	48	49.5	2.1	0.63	9.5	39	2.5
Octopus	0.18	11	12	8.5	0.15	2.2	94	10.6
Black anchovy	0.55	33	34.6	2.8	0.44	6.6	27	3.7
Golden fish	0.11	6.7	7	14.2	0.09	1.3	56	17.8
Mullet	ND<6.6	ND<6.6	ND<6.6	-	ND<6.6	ND<6.6	ND<6.6	-

*Considering a sashimi portion of 100 g for adults of 60 kg.

** Considering a sashimi portion of 20 g for children of 15 kg.

The analysis of the values estimated for ingestion showed that some fish species had expressive MeHg⁺ contents in the portion considered, and consequently contributed significantly to the calculation of the PTWI. Of these, *sashimis* elaborated with needlefish and tuna presented 86 and 68 µg kg⁻¹ of MeHg⁺, respectively. The consumption of just 1.1 and 1.4 weekly portions of *sashimi* made from these fish for adults, or 1.4 and 1.7 weekly portions for children, exceeded the PTWI value established for MeHg⁺ (1.6 µg kg⁻¹ bw) by 100%.

Fish such as sandperch, barracuda and anchovy also presented significant concentrations of the organic mercury species, where the mean consumption of three weekly portions exceeded the value of the PTWI established for MeHg⁺ for both adults and children by 100%. In fish with smaller MeHg⁺ levels such as golden fish, sea bass and salmon, the number of portions necessary to exceed the ingestion limits established were 14.2, 33 and 140 for adults, and 17.8, 41 and 175 for children, in this order, indicating that the consumption of these *sashimis* presented no potential health risk even when ingested with greater frequency and amounts.

The choice of the fish species used in the elaboration of *sashimi* should be made with care for those groups of the population more vulnerable to the toxic effects of the contaminant mercury, such as children and pregnant and/or gestating women. Due to their greater susceptibility to contamination by MeHg⁺, the EFSA (European Food Safety Authority) recommends that this category includes a wide variety of fish in their diet, and controls the consumption of predatory fish such as tuna and needlefish (EFSA, 2004a). The results of the present study showed that the *sashimis* containing the species mullet, salmon, sea bass and golden fish were those presenting the lowest amounts of this contaminant.

In the study carried out by Afonso *et al.* (2015) involving fish from the Portuguese coast, it was observed that the monthly consumption of 160 g of raw fish (tuna) was associated with a 3% - 5% probability of exceeding the maximum limits established for MeHg⁺. According to Grandjean *et al.* (2010) the organic mercury contents present in fish species are greatly influenced by the distinct environmental conditions such as a contaminated marine habitat and the presence of methylating bacteria.

4. Conclusions

The study showed that the *sashimis* samples made from needlefish and tuna possessed greater amounts of total and organic mercury, whilst those made from mullet, salmon, sea bass and golden fish presented the lowest levels. The ratio oHg/tHg was high for all the fish species used in the elaboration of *sashimi*, with values above 54%, the highest ratios being obtained for the *sashimis* from sandperch (93%) and octopus (87%), indicating a predominance of the more toxic mercury form (MeHg⁺). With respect to the estimate of exposition to MeHg⁺ from the consumption of *sashimi* made using the target hazard quotient (THQ), it was shown that 42% of the fish species presented THQ values ≥ 5 indicating they were above the maximum limit for the danger of exposition. On the other hand, using the provisional tolerable weekly ingestion (PTWI), it was seen that the ingestion of 2 *sashimi* portions (100g) of needlefish or tuna exceeded the maximum values established for adults and children by 100%, whereas for mullet and salmon the contribution to the PTWI was insignificant.

The results presented highlighted the importance of evaluating the exposition to MeHg⁺ from the ingestion of *sashimi*. Frequent consumers (> once a week) should check on the variety of fish in the diet in order to make a conscious choice, especially in the case of consumers belonging to groups at risk such as pregnant women, lactating mothers and children.

Acknowledgements:

The authors acknowledge the financial support from FAPESP (process 2012/50667-9) and CNPq (process 442025/2014-9), E. L Paiva acknowledge the fellowship from CAPES and B. S Boer acknowledge the fellowship from CNPq/PIBIC.

5. References

Adams, D. H. (2009). Consistently low mercury concentrations in dolphinfish, *Coryphaena hippurus*, an oceanic pelagic predator. *Environmental Research*, 109, 697–701.

- Afonso, C., Costa, S., Cardoso, C., Bandarra, N. M., Batista, I., Coelho, I., Castanheira, I., Nunes, M. L. (2015). 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 Chemistry*, 170, 249 – 256.
- Barone, G., Storelli, A., Garofalo, R., Busco, V. P., Nicoletta Cristiana Quaglia, N. P., Centrone, G., Storelli, M. M. (2015). Assessment of mercury and cadmium via seafood consumption in Italy: estimated dietary intake (EWI) and target hazard quotient (THQ). *Food Additives and Contaminants*, 32, 1277-1286.
- Bastos, W. R., Rebelo, M. F., Fonseca, M. F., Almeida, R., Malm, O. (2008). A description of mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. 38, 431 – 438.
- Bonsignore, M. D., Manta, S., Oliveri, E., Sprovieri, M., Basilone, G., Bonanno, A., Falco, F., Traina, A., Mazzola, S. (2013). Mercury in fishes from Augusta Bay (southern Italy): Risk assessment and health implication. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 184 - 194.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T. (2013). Sushi consumption rates and mercury levels in sushi: ethnic and demographic differences in exposure, *Journal of Risk Research*, 16, 1057 - 1075.
- CAC - Codex Alimentarius Commission (2015). Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9 th Session New Delhi, India, 16 e 20 March. http://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf. Accessed: 08.06.2016.
- Cai, Y., Rooker, J. R., Gill, G. A., Turner, J. P. (2007). Bioaccumulation of mercury in pelagic fishes from the northern Gulf of Mexico. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64, 458 – 469.

- Chien, L. C., Hung, T. C., Choang, K. Y., Yeh, C. Y., Meng, P. J., Shieh, M. J., Han, B. C. (2002). Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 285, 177 – 185.
- Chung, S. W.C., Kwong, K. P., Tang, A. S. P., Xiao, Y., Ho, P. Y. Y. (2008). Mercury and methylmercury levels in the main traded fish species in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants*, 1, 106 – 113.
- Cortes, S. & Fortt, A. (2007). Mercury contents in Chilean fish and estimated intake levels. *Food Additives and Contaminants*, 24, 955–959.
- Costa, S., Afonso, C., Cardoso, C., Batista, I., Chaveiro, N., Nunes, M. L., Bandarra, N. M. (2015). Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: Effect of culinary treatment. *Food Chemistry*, 185, 268 – 276.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2004a). Opinion of the Scientific Panel of Contaminants in the food chain on a request from the commission related to mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal*, 34, 1 - 14.
- Eisler, R. (2000). *Mercury, in Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazard to Human, Plants and Animals*, Vol.1, Metals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 313 – 409.
- FAO/WHO (2011). Report of the joint expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. Rome: FAO Fishery and Aquaculture Report.
- Farias, L. A., Azevedo, J. S., Fávares, D. I. T., Braga, E. S. (2005). *Evaluation of mercury, selenium and methylmercury in fish consumed by Santos Bay communities*, São Paulo, Brazil. INAC, Santos, SP, Brazil.
- FDA (Food and Drug Administration) (2001a). FDA consumer advisory. <http://www.cfsan.fda.gov/Bdms/hgpdfdoc.html>. Accessed: 13.06.2016.

- Forsyth, D. S., Casey, V., Dabeka, R. W., McKenzie, A. (2004). Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada, *Food Additives and Contaminants*, 21, 849 – 856.
- Galimberti, C., Corti, I., Cressoni, M., Moretti, V. M., Menotta, S., Galli, U., Cambiaghi, D. (2016). Evaluation of mercury, cadmium and lead levels in fish and fishery products imported by air in North Italy from extra-European Union Countries. *Food Control*, 60, 329 – 337.
- Gibic̆ar, D., Horvat, M., Logar, M., Fajon, V., Falnoga, I., Ferrara, R., Lanzillotta, E., Ceccarini, C., Barbara Mazzolai, B., Denby, B., Pacyna, J. (2009). Human exposure to mercury in the vicinity of chlor-alkali plant. *Environmental Research*, 109, 355 – 367.
- Grandjean, P., Satoh, H., Murata, K., Etoh, K. (2010). Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications . *Environmental Health Perspectives*, 118, 1137–1145.
- Hosseini, M., Mohammad, S., Nabavi, B., Parsa, Y. (2013). Bioaccumulation of Trace Mercury in Trophic Levels of Benthic, Benthopelagic, Pelagic Fish Species, and Sea Birds from Arvand River, Iran. *Biological Trace Element Research*, 156, 175 – 180.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Expectativa de vida* (2013). <http://teen.ibge.gov.br/noticias-teen/7827-expectativa-de-vida>. Accessed 11.06.16.
- Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Llobet, J. M., Castell, V., Domingo, J. L. (2011). Human Exposure to Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead from Foods in Catalonia, Spain: Temporal Trend. *Biological Trace Element Research*, 142, 309 – 322.
- Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., Esteves, A. (2015). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32 – 36.

Capítulo 3 –Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in Brazil: risk assessment and exposure evaluation

- Morgano, M. A., Milani, R. F., Perrone, A. M. (2015). Determination of total mercury in sushi samples employing direct mercury analyzer. *Food Analytical Methods*, 8, 2301 - 2307.
- Morgano, M. A., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Miyagusku, L., Quintaes, K. D. (2014). As, Cd, Cr, Pb and Hg in seafood species used for sashimi and evaluation of dietary exposure. *Food Control*, 36, 24 – 29.
- Olmedo, P., Pla, A., Hernandez, A. F., 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. *Environment International*, 59, 63 - 72.
- Paiva, E. L., Alves, J. C., Milani, R. F., Boer, S. B., Quintaes, K. D., Morgano, M. A. (2016). Sushi commercialized in Brazil: Organic Hg levels and exposure intake evaluation. *Food Control*, 69, 115 – 123.
- Pastorelli, A. A., Baldini, M., Stacchini, P., Baldini, G., Morelli, S., Sagratella, E., Zaza, S., Ciardullo, S. (2012). Human exposure to lead, cadmium and Mercury through fish and seafood product consumption in Italy: a pilot evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 299, 1 – 9.
- Raimundo, J., Carlos Vale, C., Canário, J., Vasco Branco, V., Moura, I. (2010). Relations between mercury, methylmercury and selenium in tissues of *Octopus vulgaris* from the Portuguese Coast. *Environmental Pollution*, 158, 2091 – 2100.
- Sellanes, A. G., Mársico, E. T., Santos, N. N, São Clemente, S. C., Oliveira, G. A., Monteiro, A. B. S. (2002). Mercury in marine fish. *Acta Scientiae Veterinariae*, 30, 107–112.
- Storelli, M. M.,Stuffer, R. G., Marcotrigiano, G .O. (2002). Total and methylmercury residues in tuna-fish from the Mediterranean Sea. *Food Additives and Contaminants*, 19, 715 – 720.

Torres-Escribano, S., Vélez, D., Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants*, 27, 327-337.

Torres-Escribano, S., Calatayud, M., Ruiz, A., De La Flor, M. T., Devesa, V., Vélez, D., Montoro, R. (2010). The effect of cooking on mercury bioaccessible contents of predatory fish, *Toxicology Letters*, 196, 310.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2007a). Risk-based concentration table. Philadelphia PA: United States Environmental Protection Agency, Washington, DC. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0073.htm. Accessed: 10.05.2016.

USEPA - United States Environmental Protection Agency, 2014. Risk-Based Concentrations Table [Internet]. [cited 2014 Oct 3]. <http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/index.htm>. Accessed: 16.05.2016.

Wang, X. L., Sato, T., Xing, B. S., Tao, S. (2005). Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Science of the Total Environment*, 1, 28 – 37.

WHO (World Health Organization) (2000). Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additives Series 44, Lead. http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_numerical/en. Accessed: 09.06.2016.

WHO (World Health Organization) (2004). Safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO. Food Additive Series: 52, International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.

WHO (World Health Organization) (2008). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva (Switzerland): UNEP Chemicals Branch and

Capítulo 3 – Methylmercury in fish species used in preparing sashimi in Brazil: risk assessment and exposure evaluation

WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases.
<http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/chem./mercury/> en. Accessed:
20.06.2016.

CAPÍTULO 4

Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

Esther Lima de Paiva, Raquel Fernanda Milani, Marcelo Antônio Morgano.

Submitted to Food Additives & Contaminants:Part B

Abstract

Este trabalho teve como objetivo determinar os teores de contaminantes inorgânicos em amostras de atum enlatado de 5 marcas comerciais em 3 lotes distintos, em conservas de água e óleo, totalizando 30 amostras. As mesmas foram adquiridas no ano de 2015, no comércio local de Campinas, São Paulo, Brasil. Mercúrio total e metilmercúrio foram determinados usando a técnica de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação; cádmio, chumbo e estanho por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado. Os resultados indicaram que 20% das amostras de atum ultrapassaram os limites máximos estabelecidos pela legislação Brasileira para cádmio; para chumbo o maior valor foi $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o estanho não foi detectado em nenhuma amostra. Os teores máximos encontrados para Hg total e metilmercúrio foram 261 e $258 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A partir dos resultados obtidos foi estimado que o consumo de 4 latas/semana (540g) de atum em conserva em água pode ultrapassar 100% da PTWI para MeHg⁺.

Palavras-chave: atum enlatado; metais pesados; metilmercúrio; estimativa de exposição.

1. Introdução

O peixe tem sido reconhecido como um alimento essencial em uma dieta balanceada, fornecendo proteínas de alta qualidade, vitaminas e diversos outros nutrientes de grande importância nutricional (Pieniak et al., 2010). Além disso, é uma fonte significativa de ácidos graxos poli-insaturados como ômega-3, cujos benefícios se relacionam à diminuição do risco de doenças cardiovasculares e à contribuição para o desenvolvimento neurológico normal em crianças (Mozaffarian, 2009; Swanson et al., 2012).

A preservação dos peixes pode ser feita de muitas formas incluindo o congelamento, a salga, a defumação e a secagem sendo, atualmente, a preservação na forma de conservas enlatadas uma das mais utilizadas (Jedrychowski et al., 2007). Em contraste aos potenciais benefícios a saúde, produtos à base de peixes têm sido constante alvo de estudos, pois estes alimentos são considerados uma fonte de contaminantes inorgânicos como Hg, Cd e Pb (Hernández et al., 2010). O descarte de efluentes por parte da indústria, a deposição atmosférica e os derrames acidentais de produtos químicos tóxicos são fontes de poluição do ambiente aquático (Domingo, 2007). A contaminação de corpos d'água por metais é menos visível comparada a outros tipos de contaminação, porém resulta em extensa e direta influência sobre ecossistemas marinhos e ao homem (Emami Khansari et al., 2005). A presença de metais no ambiente aquático merece significativa atenção devido à toxicidade e propriedade de acumulação nos organismos marinhos, como também à sua persistência no ambiente não sendo facilmente degradável na natureza (Dórea et al., 2007).

A forma inorgânica do mercúrio é biologicamente transformada em metilmercúrio (MeHg^+) em ambientes aquáticos por bactérias metiladoras, sendo passível de se bioacumular ao longo de uma cadeia trófica (Carrasco & Vassileva, 2014). Os peixes absorvem o MeHg^+ da água por meio das guelras e da alimentação de outros organismos aquáticos, ligando-se fortemente às proteínas que constituem os tecidos e músculos dos peixes. O processo de cozimento não reduz sensivelmente o teor de MeHg^+ do pescado (FDA, 1994). Assim, consumidores adeptos a dietas com base em pescados estão mais expostos aos efeitos adversos do MeHg^+ , principalmente os neurotóxicos. Esta é uma questão

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúriu total e metilmercúriu em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

particularmente relevante quanto à ingestão de pescados por crianças, gestantes e mães em período de amamentação, consumidores que pertencem ao grupo de risco segundo a classificação do Comitê do CODEX de Contaminantes em Alimentos (CAC, 2015; Ramón et al., 2008).

Apesar de serem encontrados na literatura estudos relacionados à determinação de Hg total (mercúriu total) em atum enlatado, poucos trabalhos abordam a determinação da sua fração orgânica (metilmercúriu). Os métodos analíticos mais usados para a determinação de MeHg⁺ utilizam as técnicas de cromatografia líquida ou gasosa acopladas a detectores de alta sensibilidade e seletividade, como a espectrometria de absorção atômica (AAS) (Jagtap et al., 2011), a espectrometria por fluorescência atômica (AFS) (Ohki et al., 2013), a espectrometria de emissão atômica, e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Tu et al., 2000). Nos últimos anos vem crescendo o uso da espectrometria de absorção atômica por decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) para estudo de Hg total (Morgano et al., 2015) e orgânico (Paiva et al., 2016) em alimentos. Para a determinação de cádmio (Cd), chumbo (Pb) e estanho (Sn) em peixes tem sido utilizadas a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (Clémens et al., 2011), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (Dai et al., 2012), a espectrometria de absorção atômica por chama (FAS AAS) (Okyere et al., 2015) e espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF-AAS) (Andayesh et al., 2015).

O consumo de atum enlatado é frequente no Brasil, no entanto, poucos estudos avaliaram os teores de MeHg⁺ e Hg total, Cd, Pb e Sn neste alimento. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar as concentrações destes contaminantes em amostras de atum enlatado disponíveis no comércio de Campinas, Brasil. Hg total e MeHg⁺ foram determinados pela técnica de absorção atômica com decomposição térmica e amalgamação (TDA AAS) enquanto para Cd, Pb e Sn foi utilizada a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os resultados obtidos no estudo permitiram a avaliação da ingestão de contaminantes inorgânicos a partir do consumo de atum enlatado no Brasil e sua relação com os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira e internacional.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras

Foram adquiridas durante o ano de 2015 cinco diferentes marcas de atum enlatado, de 3 lotes, em conservas de água e óleo, totalizando 30 amostras. As 5 marcas de atum enlatado estudadas foram as mais comumente consumidas e disponíveis nos maiores mercados localizados na região de Campinas (estado de São Paulo, Brasil).

Após a separação da água ou óleo, as amostras de atum foram trituradas individualmente com o uso de processador doméstico até a obtenção de uma massa homogênea. As amostras homogeneizadas foram armazenadas sob congelamento (-18 °C) até o momento das análises. A determinação dos contaminantes inorgânicos foi realizada em triplicata analítica.

2.2 Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados no estudo foram de grau analítico ou superior. A água (18,2 MΩ cm) foi purificada usando um sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil) e o ácido nítrico um destilador de sub-ebulição (Berghof, Eningen, Alemanha). Para extração do mercúrio orgânico (metilmercúrio) foi utilizado tolueno p.a. (Synth, Diadema, Brasil) e solução de HCl 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Solução de L-cisteína 2,5% (m/v) (Sigma, Steinheim, Alemanha) foi usada para estabilização das espécies orgânicas de mercúrio. Para determinação dos metais foi realizada digestão utilizando HNO₃ destilado e H₂O₂ 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). As curvas analíticas foram preparadas a partir de soluções padrão certificadas de: Hg 1,000 mg L⁻¹ (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Suíça) em solução 0,5% de HNO₃ (v / v); Cd, Pb e Sn a partir de solução 1,000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha), em solução 2,5% de HNO₃ (v / v).

Para a avaliação da exatidão do método foram utilizados materiais de referência certificado TORT-2 Lobster hepatopancreas; NCR DORM-4 Fish protein e NIST SRM-1566b Oyster tissue.

2.3 Instrumentação

Os processos de digestão e extração do metilmercúriu foram realizados usando um sistema fechado de micro-ondas (Start E, Milestone, Sorisole, Italy) equipado com 24 frascos de teflon (PFA) de média pressão.

Os teores de mercúriu total e metilmercúriu foram quantificados através da técnica de TDA AAS utilizando um analisador direto de mercúriu (DMA-80, Dual Cell, Milestone, Sorisole, Itália).

A determinação dos contaminantes inorgânicos foi realizada utilizando ICP-OES, modelo 5100 VDV (Agilent Technology, Tóquio, Japão) equipado com uma câmara de nebulização de duplo passo e um nebulizador seaspray. Para a determinação de Cd, Pb e Sn foi utilizado argônio líquido com 99,996% de pureza (Air Liquide, São Paulo, Brasil) para geração do plasma, gás de nebulização e como gás auxiliar. As condições otimizadas de operação do equipamento foram: potência do gerador de radiofrequência (1200 W); vazão de argônio do nebulizador (0,5 L min⁻¹); vazão principal de argônio (12 L min⁻¹ Ar); vazão auxiliar de argônio (1 L min⁻¹ Ar); vazão amostra (0,5 L min⁻¹), modo de visão axial; número de réplicas (n=3) e comprimentos de onda: Cd (214.439 nm); Pb (220.353 nm) e Sn (189.925).

2.4 Digestão em sistema fechado assistido por micro-ondas para determinação de Cd, Pb e Sn em ICP OES

Para determinação de Cd, Pb, e Sn foi utilizado um sistema fechado de digestão por micro-ondas (Start D, Milestone, Sorisole, Italy), no qual: 1 g de amostra foi pesado em vaso de digestão de PTFE, adicionados 4 mL de HNO₃ concentrado, 4 mL de água desionizada e após um período de contato *overnight* foram adicionados 2 mL de H₂O₂. Os vasos foram selados, transferidos para o digestor de micro-ondas e realizada a digestão usando 4 rampas de aquecimento com aplicação de 1000 W de potência: (a) temperatura ambiente a 70 ° C por 5 min; (b) de 70 ° C a 120 ° C em 5 min; (c) de 120 ° C a 170 ° C em 5 min e (d) manteve-se em 170 ° C por 25 min. Após o resfriamento, os vasos foram abertos e a solução resultante foi transferida para tubo Falcon de 25 mL em HNO₃ 5% (v/v). Para a determinação de Cd, Pb e Sn no ICP OES foi utilizado o método de calibração externa sendo as

curvas analíticas preparadas nas seguintes faixas de concentração: de 0,002 a 0,5 mg L⁻¹ para Cd e Pb; e de 0,05 a 10 mg L⁻¹ para Sn.

2.5 Determinação de mercúrio total

As condições instrumentais utilizadas para determinação do mercúrio total por TDA AAS foram estabelecidas baseado no estudo desenvolvido por Morgano et al. (2015): as amostras homogeneizadas foram pesadas em recipientes de níquel (60 e 80 mg para as conservas em água e óleo, respectivamente); temperatura de secagem de 200°C por 60s; temperatura de decomposição 600 °C por 180s, temperatura de dessorção 850°C e detecção em 253,7 nm.

2.6 Determinação de metilmercúrio: extração com tolueno em sistema fechado assistido por micro-ondas

Foi utilizado um sistema de extração fechado assistido por micro-ondas, conforme descrito por Paiva et al. (2016). Resumidamente o método utilizado consistiu em: 1 g de amostra foi pesado em recipiente de Teflon PFA seguido da adição de 8 mL de tolueno; 1 mL de água purificada e 0,75 mL de uma de solução de HCl de 30% (v / v). Condições analíticas do extrator de micro-ondas: potência aplicada de 1000 W; rampas de aquecimento (a) temperatura ambiente a 110°C em 10 min; (b) temperatura constante a 110°C durante 5 min. Após extração, uma alíquota de 4 mL da fase orgânica foi retirada e transferida para tubo de centrífuga contendo 2 mL de uma solução de L-cisteína 2,5% (m/v) e centrifugada durante 6 min a 3500 rpm. Uma porção de 100 mg da fase de L-cisteína contendo o mercúrio orgânico foi pesada em um recipiente de quartzo e determinado o teor de mercúrio no analisador DMA-80. O conteúdo de mercúrio orgânico obtido foi considerado composto apenas por metilmercúrio. As condições instrumentais otimizadas para a determinação do metilmercúrio foram: temperatura de secagem da amostra = 120°C durante 60s; temperatura de decomposição = 300°C durante 180s; temperatura de dessorção = 850°C durante 12s e comprimento de onda = 253,7 nm. As faixas de

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

concentração para detecção do Hg para as duas células do equipamento foram: 0,5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 20 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias e intervalo de concentração analisados por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey para verificar se existe diferença significativa entre as médias, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) usando o programa XLSTAT versão 2012.6.03 (Addinsoft, França).

2.8 Controle de qualidade

Os métodos analíticos foram validados e as figuras de mérito exatidão, precisão, linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação foram avaliadas conforme INMETRO (2011). A exatidão do método para determinação de Cd, Pb e Sn foi verificada utilizando material de referência certificado (NCR TORT-2 - hepatopancreas), enquanto para Hg total e metilmercúrio utilizou-se tecido de ostra – NIST SRM 1566b e NCR DORM-4 proteína de peixe, respectivamente (Tabela 1). A precisão do método foi avaliada utilizando 16 repetições analíticas (8 repetições/dia) com coeficientes de variação compreendidos entre 3,7% e 9,5%; os quais satisfazem as recomendações da AOAC (2013) nas condições estudadas. A linearidade das curvas analíticas foi determinada através do coeficiente de correlação sendo obtidos valores com $r^2 \geq 0,999$. Para avaliação de Sn foi realizada fortificação em três níveis de concentração, de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$; uma vez que este elemento não apresenta valor certificado nos materiais de referência utilizados. Os valores de recuperação obtidos variaram de $89 \pm 0,8\%$ a $92 \pm 1,2\%$; e valores obtidos de LOD (limite de detecção) e LOQ (limite de quantificação) de 94 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 314 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 1

Resultados obtidos na validação do método para determinação de cádmio, de chumbo, de Hg total e Hg orgânico em atum enlatado utilizando materiais de referência certificados (MRC).

Parâmetros	Contaminantes inorgânicos			
	Cádmio	Chumbo	Hg Total	Hg Orgânico
Valor certificado (mg kg ⁻¹)	26,7 ± 0,6	0,35 ± 0,13	0,27 ± 0,06	0,152 ± 0,001
Valor obtido (mg kg ⁻¹)	23,2 ± 0,1	0,31 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,168 ± 0,003
Recuperação (%)	87 ± 1	87 ± 2	97 ± 1	111 ± 2
LOD (µg kg ⁻¹) ^a	0,01	0,03	0,4	1,7
LOQ (µg kg ⁻¹) ^b	0,03	0,10	1,4	5,7
Precisão (%) ^c	3,7	4,1	5,5	9,0

^aLOD (3 s) = limite de detecção, n = 10.

^bLOQ (10 s) = limite de quantificação, n = 10.

^cPrecisão = coeficiente de variação (n=16).

MRC para Cd e Pb = hepatopancreas (TORT-2), Hg total = tecido de ostra (NIST SRM-1566b) e MeHg⁺ = proteína de peixe (NCR DORM-4).

3. Resultados e discussão

3.1 Contaminantes inorgânicos em atum enlatado

Os resultados obtidos para Cd, Pb, Sn, Hg e metilmercúrio para as diferentes amostras de atum enlatado estão apresentadas na Tabela 2.

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

Tabela 2

Teores médios e intervalo de concentração, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, para Cd, Pb, Sn e Hg (total e orgânico) obtidos para as amostras de conservas de atum enlatado. Para cada marca foram avaliados 3 lotes.

	Conserva água Média / Intervalo					Conserva óleo Média / Intervalo				
	Marca1	Marca2	Marca3	Marca4	Marca5	Marca1	Marca2	Marca3	Marca4	Marca5
Cd	26 (13–35) ^a	18 (nd-37) ^{ab}	21 (13 – 29) ^{ab}	12 (nd – 16) ^b	18 (17-21) ^{a,b}	32 (18-51) ^{ab}	85 (15-213) ^a	19 (17-22) ^b	13 (12 – 14) ^b	15 (12 – 18) ^b
Pb	46 (nd-64) ^a	34 (nd-45) ^b	38 (nd-51) ^{ab}	45 (38-53) ^a	40 (32-47) ^{ab}	31 (nd – 33) ^b	37 (nd – 49) ^{ab}	33 (nd – 47) ^b	44 (30 – 63) ^a	33 (nd – 42) ^b
Sn	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}	nd ^{**}
Hg total	143 (120–162) ^b	185 (116 – 251) ^{ab}	261 (98 – 460) ^a	183 (165 – 214) ^{ab}	83 (51 – 137) ^b	129 (116 – 148) ^{bc}	174 (104 – 248) ^{ab}	232 (185 – 273) ^a	236 (132 – 402) ^a	68 (44 – 103) ^c
Hg orgânico	142 (120–159) ^{bc}	187 (106 – 273) ^{ab}	258 (88 – 460) ^a	177 (152 – 212) ^{abc}	69 (41 – 121) ^c	115 (97 – 140) ^{ab}	167 (103 – 158) ^a	195 (163 – 213) ^a	240 (145 – 393) ^a	47 (35 – 89) ^b

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

**nd= não detectado; $< 8,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ Cd, $< 30 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Pb; $< 94 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Sn (LOD limite de detecção do método).

Capítulo 4 – Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

As amostras de atum enlatado em conserva em óleo foram as que apresentaram os maiores teores médios de Cd ($85 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Pb ($44 \mu\text{g kg}^{-1}$); enquanto que as amostras de atum em conserva de água apresentaram menores valores médios de Cd ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e Pb ($<30 \mu\text{g kg}^{-1}$). O Sn não foi detectado em nenhuma das amostras ($<94 \mu\text{g kg}^{-1}$) podendo-se inferir a partir dos resultados encontrados, que o verniz utilizado no recobrimento das embalagens metálicas destinadas às amostras de atum estão adequadas.

As amostras em conserva de óleo apresentaram valores dos contaminantes inorgânicos variando de: $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $213 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Cd); não detectado a $63 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Pb); não detectado (Sn); $44 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $402 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg total) e $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $393 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg orgânico). Quanto às amostras de atum enlatado em conserva de água foram obtidos intervalos de concentração compreendidos entre: não detectado a $37 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Cd); não detectado a $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Pb); não detectado (Sn); $51 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $460 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg total) e $41 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $460 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Hg orgânico).

Os resultados obtidos para os teores de contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de atum enlatado comercializado no Brasil foram concordantes com os existentes na literatura. Emami Khansari et al. (2005) encontraram valores compreendidos entre $50\text{-}72 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Cd, em atum enlatado comercializado no Irã, enquanto valor médio de $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi determinado por Duran et al. (2014) em atuns enlatados da Turquia. Estudos realizados em amostras de atum enlatado da Líbia (Voegborlo et al., 1999), Arábia Saudita (Ashraf, 2006) e Irã (Ganjavi et al., 2010) mostraram elevados valores médios de $180 \mu\text{g kg}^{-1}$, $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $150 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No presente trabalho, foram obtidos teores de Cd compreendidos entre não detectado- $213 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A avaliação das amostras de atum enlatado em conserva em óleo demonstrou que 20% destas ultrapassaram os limites máximos estabelecidos pela RDC-42 (ANVISA, 2013) e pela Comunidade Europeia (CE, 2006) de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Esse elemento é conhecido por se acumular no organismo humano, causando disfunção renal e comprometimento do sistema reprodutivo (Comissão da Comunidade Europeia, 2001).

Em relação ao Pb, baixas concentrações foram obtidas neste trabalho (não detectado – $64 \mu\text{g kg}^{-1}$) com valores comparáveis aos reportados em atum enlatado comercializado nas regiões do Alabama e da Geórgia nos Estados Unidos (Ikem &

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúriu total e metilmercúriu em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

Egiebor, 2005), com teores médios de $31 \mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações encontradas no presente estudo são menores comparadas ao intervalo de $90\text{-}400 \mu\text{g kg}^{-1}$ obtido por Uluozlu et al. (2007) em amostras comercializadas na Turquia. Nenhuma das amostras analisadas ultrapassou o limite estabelecido pelo JECFA (CAC, 2015) como também pela legislação brasileira de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) ANVISA (RDC 42, 2013). Chumbo e seus compostos podem entrar no ambiente durante a mineração, fundição, tratamento, utilização, reciclagem ou eliminação, podendo ser rejeitados em ambientes aquáticos contaminando peixes e organismos marinhos (Okyere et al., 2015).

Mercúriu total e metilmercúriu (MeHg^+) foram detectados em todas as amostras, com valores compreendidos entre $44\text{-}402 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg total e $35\text{-}393 \mu\text{g kg}^{-1}$ de MeHg^+ em conserva de óleo; $51\text{-}460 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg total e $41\text{-}460 \mu\text{g kg}^{-1}$ MeHg^+ em conserva de água. No estudo realizado por Burger & Gochfeld (2004) em amostras de atum enlatado procedentes de Nova Jersey (EUA) foram obtidos teores médios de $431 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $419 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg total nas conservas de água e óleo, respectivamente. Martorell et al. (2011) encontraram valor médio de $222 \mu\text{g kg}^{-1}$ em atuns enlatados comercializados na Catalunha (Espanha). Nestes trabalhos foram avaliados apenas os níveis de Hg total, sendo importante a determinação do MeHg^+ que é considerada a forma mais tóxica das espécies de Hg.

Na figura 1 é apresentada a razão em porcentagem entre as formas orgânica (MeHg^+) e total obtidas para o Hg presente nas diferentes amostras de atum enlatado estudadas. A razão entre Hg orgânico (MeHg^+) / Hg total variou de 82% a 99% para todas amostras de atum enlatado. Os resultados mostram que existe a predominância da forma química mais tóxica do Hg, a orgânica, e conforme reportado por Horvat & Gibicar (2005), de forma geral, predomina em pescado as espécies MeHg^+ . No estudo desenvolvido por Paiva e colaboradores (2016) em amostras de sushis de atum comercializados no sudeste do Brasil, foram obtidos maiores teores de Hg total ($45\text{-}761 \mu\text{g kg}^{-1}$) para atum com razão para Hg orgânico/Hg total variando de 69 até 99%.

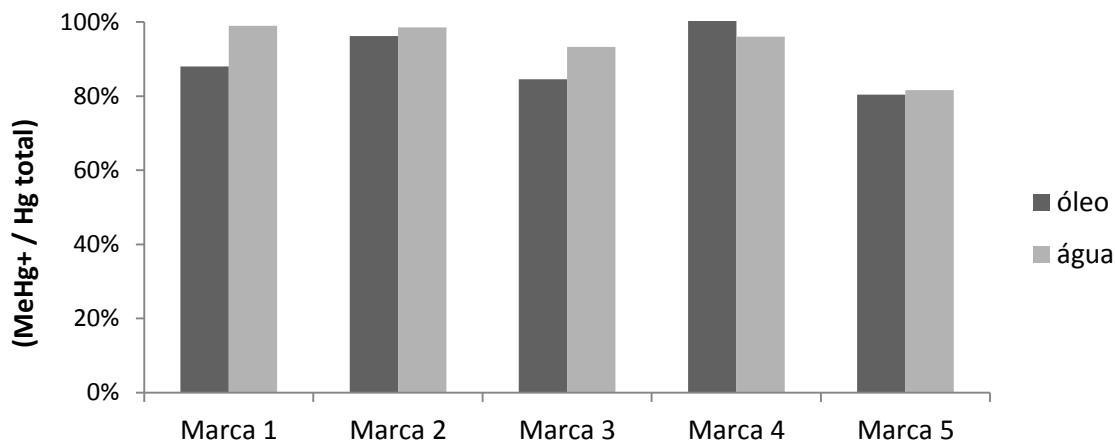


Figura 1. Razão entre MeHg⁺/ Hg total em amostras de atum enlatado em conservas de água e óleo.

Com base no exposto, pode-se observar uma maior propensão à concentração de mercúrio total em atum fresco e menores teores em atum enlatado; porém nestes, há predominância da espécie orgânica tóxica de mercúrio (MeHg⁺). No trabalho desenvolvido por García et al., (2016) em atum enlatado comercializado na Galícia, Espanha, também foram observados maiores níveis de mercúrio total em atum fresco em relação aos tecnologicamente processados; com valores médios de: 765 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 305 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Esta tendência é confirmada por dados da literatura, os quais relatam que peixes maiores e de mais idade podem apresentar maiores concentrações de mercúrio acumuladas (Storelli et al. 2010; Yang et al. 2015). Conforme relatado por Knowles et al. (2003) e Ruelas-Inzunza et al. (2011) os pescados de maior porte são comumente destinados ao consumo fresco.

No trabalho desenvolvido por Burger & Gochfeld (2004) não foi encontrada diferença nas concentrações de mercúrio total em amostras de peixe nas conservas analisadas (água e óleo), enquanto Yess (1993) reportou valor médio de 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e mercúrio total em 26 amostras de atum em conserva de óleo e 110 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 106 amostras em conserva de água.

3.2 Estimativa de ingestão de Cd, Pb e Hg pelo consumo de atum enlatado e avaliação da exposição do risco

A estimativa de exposição aos contaminantes inorgânicos Cd, Pb e Hg total e metilmercúrio pelo consumo de atum enlatado foi calculada considerando uma porção drenada com valor médio de 135 g.

Cádmio (Cd): O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabelece para Cd um valor de PTMI (Ingestão Mensal Tolerável Provisória) de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo (CAC, 2015). Considerando o maior valor encontrado de 213 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para um adulto de 60 kg, seria necessário o consumo de 52 latas/mês (7 kg) para caracterizar um risco. Portanto, os baixos teores de Cd encontrados nas amostras de atum, indicam que a exposição ao Cd através do consumo de atum enlatado não é significativa.

Chumbo (Pb): Em 2010, o JECFA retirou a PTWI para o chumbo devido a estudos que demonstraram que o valor anteriormente estabelecido de 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo permitia a perda de 3 pontos no QI de crianças e causava um aumento da pressão arterial em adultos quando expostos ao Pb (CAC, 2015). Desta forma foram estabelecidos limites máximos (LM) para Pb em diferentes classes de alimentos, sendo que para pescados o LM foi de 0,3 mg/kg (300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) que concorda com a legislação do Brasil, RDC 42 (ANVISA, 2013). Neste estudo, o maior teor médio de Pb observado foi de 46 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com valores mínimos e máximos de 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 64 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Mercúrio total e orgânico (Hg total; MeHg⁺): Em 2006 o JECFA (CAC, 2015) reafirmou o PTWI de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo para o Hg total e 1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso corpóreo para MeHg⁺. Para as amostras de atum em conserva de óleo foi obtida concentração média de 169 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 154 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg total e MeHg⁺, respectivamente. Considerando um adulto de 60 kg e porção de 135g (1 lata) de atum enlatado, seria necessária a ingestão de 11 latas (aproximadamente 1,5 kg) e 5 latas (675 g) de atum por semana, para se atingir o limite de ingestão estabelecido para Hg total e MeHg⁺, respectivamente. Do mesmo modo, para as amostras em conserva de água, foram obtidos teores médios de Hg total e orgânico de 173 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que o consumo de 10 latas (1,4 kg) e de 4 latas (540 g) por semana, para Hg total e orgânico, respectivamente, podem atingir 100% da PTWI.

A ingestão de peixes contendo MeHg^+ é reconhecidamente a principal via de exposição humana ao Hg e, devido, à sua capacidade de bioacumulação ao longo de uma cadeia trófica, esta espécie química pode atingir altas concentrações principalmente em peixes predadores (Horvat & Gibicar, 2005), como é o caso do atum avaliado no presente estudo. Quanto à toxicologia, espécies orgânicas de Hg são conhecidas por atravessar barreiras placentárias e induzir alterações no desenvolvimento normal do cérebro de fetos e recém-nascidos e ainda provocar alterações neurológicas em adultos, quando presente em concentrações elevadas (FAO, 2011).

4. Conclusões

- Em relação ao Cd 20% das amostras de atum em conserva de óleo ultrapassaram o limite máximo permitido pela legislação brasileira de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.
- Proporções acima de 82 % entre MeHg^+ / Hg total foram observadas nas amostras de atum enlatado.
- O consumo de apenas 4 latas (540 g) de atum de conserva em água, ou 5 latas (675 g) de atum na conserva em óleo por semana são suficientes para ultrapassar o PTWI ($\text{PTWI MeHg}^+ = 1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$). Assim, é importante a inclusão de diferentes variedades de peixe na dieta, especialmente aos consumidores de grupos de risco como gestantes, mães em período de amamentação e crianças, de forma a evitar o consumo restrito ao atum.
- Os resultados obtidos para Pb nas amostras de atum apresentaram valores abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira.
- Todas as amostras de atum analisadas apresentaram teores de Sn abaixo do limite de detecção do método.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPESP (processo 2012/50667-9) e CNPq (processo 442025/2014-9). E. L. Paiva agradece a bolsa de mestrado da CAPES.

5. Referências Bibliográficas

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*. 8:93–98.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Resolu%C3%A7%C3%A3o%2042%20-%20ANVISA.pdf. Acessado em 11.10.16.

Ashraf, W., Seddigi, Z., Abulkibash, A., & Khalid, M. 2006. Levels of selected metals in canned fish consumed in kingdom of Saudi Arabia. *Environ Monit Assess*. 117: 271–279.

Barone G, Storelli A, Garofalo R, Busco V Pietro, Quaglia NC, Centrone G, Storelli MM. 2015. Assessment of mercury and cadmium via seafood consumption in Italy: estimated dietary intake (EWI) and target hazard quotient (THQ). *Food Addit Contam Part A*. 32:1277–1286.

Burger J, Gochfeld M. 2004. Mercury in canned tuna: White versus light and temporal variation. *Environ Res*. 96:239–249.

CAC - Codex Alimentarius Commission. 2015. Discussion paper on maximum levels for methylmercury in fish. 9 th Session New Delhi, India, 16 e 20 March. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/cccf/cccf9/cf09_13e.pdf. Acessado em 05.08.16.

Carrasco L, Vassileva E. 2014. Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*. 122:106–114.

Capítulo 4 – Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

Clémens S, Monperrus M, Donard OX, Amouroux D, Guérin T. 2011. Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data. *Anal Bioanal Chem.* 401:2699–2711.

Commission of the European Communities, 2006. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 amending regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, Brussels, 19 December 2006.

Commission of the European Communities 2001. Commission Regulation (EC) No. 221/2002 of 6 February 2002 amending regulation (EC) No. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. Brussels, 6 February 2002.

Dai B, Cao M, Fang G, Liu B, Dong X, Pan M, Wang S. 2012. Schiff base-chitosan grafted multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase extraction adsorbent for determination of heavy metal by ICP-MS. *J. Hazard. Mater.* 219–220:103–110.

Domingo JL, Bocio A, Falcó G, Llobet JM. 2007. Benefits and risks of fish consumption. Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology.* 230:219–226.

Dórea HS, Bispo JRL, Aragão KAS, Cunha BB, Navickiene S, Alves JPH, Romão LPC, Garcia CAB. 2007. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. *Microchem J.* 85:234–238.

Duran A, Tuzen M, Soylak M. 2014. Assessment of trace metal concentrations in muscle tissue of certain commercially available fish species from Kayseri, Turkey. *Environ Monit Assess.* 186:4619–4628.

Emami Khansari F, Ghazi-Khansari M, Abdollahi M. 2005. Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chem.* 93:293–296.

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

- FAO/WHO (Expert Committee on food additives).2011.Report of the joint expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. Rome: FAO Fishery and Aquaculture Report.
- FDA (Food and Drug Administration) .1994. Compliance policy guide. Washington, D.C: Food and Drug Administration.
- Ganjavi M, Ezzatpanah H, Givianrad MH, Shams A. 2010. Effect of canned tuna fish processing steps on lead and cadmium contents of Iranian tuna fish. Food Chem. 118:525–528.
- García MÁ, Núñez R, Alonso J, Melgar MJ. 2016. Total mercury in fresh and processed tuna marketed in Galicia (NW Spain) in relation to dietary exposure. Environ. Sci. Pollut. Res.(in press - DOI 10.1007/s11356-016-7634-9).
- Hernández OD, Gutiérrez AJ, González-Weller D, Lozano G, García Melón E, Rubio C & Hardisson A. 2010. Accumulation of toxic metals (Pb and Cd) in the sea urchin (*Diadema aff. Antillarum*) Philippi, 1845, in an oceanic island (Tenerife, Canary Islands). Environ. Toxicol. 25: 227-233.
- Horvat M & Gibicar D. 2005. Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health. In Handbook of elemental speciation II e Species in the environment, food, medicine and occupational health (pp. 281-304). Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- 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.
- Jagtap R, Krikowa F, Maher W, Foster S, Ellwood M. 2011. Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS. Talanta. 85:49–55.

Capítulo 4 – Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

- Jedrychowski W, Perera F, Jankowski J, Rauh V, Flak E, Caldwell KL, Jones RL, Pac A, Lisowska-Miszczyk I. 2007. Fish consumption in pregnancy, cord blood mercury level and cognitive and psychomotor development of infants followed over the first three years of life. Krakow epidemiologic study. *Environ Int.* 33:1057–1062.
- Knowles TG, Farrington D, Kestin SC .2003. Mercury in UK imported fish and shellfish and UK-farmed fish and their products. *Food Addit Contam* 20:813–818.
- Martorell I, Perelló G, Martí-Cid R, Llobet JM, Castell V, Domingo JL. 2011. Human exposure to arsenic, cadmium, mercury, and lead from foods in catalonia, Spain: Temporal trend. *Biol. Trace Elem. Res.* 142:309–322.
- Morgano MA, Milani RF, Perrone AAM. 2015. Determination of Total Mercury in Sushi Samples Employing Direct Mercury Analyzer. *Food Anal Methods.* 8:2301–2307.
- Mozaffarian, D. 2009. Fish, Mercury, Selenium and Cardiovascular Risk: Current Evidence and Unanswered Questions. *Int J Environ Res Public Health.* 6:1894–1916.
- Ohki A, Hayashi K, Ohsako J, Nakajima T, Takanashi H. 2013. Analysis of mercury and selenium during subcritical water treatment of fish tissue by various atomic spectrometric methods. *Microchem J.* 106:357–362.
- Okyere H, Voegborlo RB, Agorku SE. 2015. Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine. *Food Chem.* 179:331–335.
- Paiva EL, Alves JC, Milani RF, Boer BS, Quintaes KD, Morgano MA. 2016. Sushi commercialized in Brazil: Organic Hg levels and exposure intake evaluation. *Food Control.* 69:115–123.

Capítulo 4 – Cádmiu, chumbo, estanho, mercúriu total e metilmercúriu em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

- Pieniak Z, Verbeke W, Scholderer J. 2010. Health-related beliefs and consumer knowledge as determinants of fish consumption. *J. Hum. Nutr. Diet.* 23:480–488.
- Ramón R, Murcia M, Ballester F, Rebagliato M, Lacasaña M, Vioque J, Llop S, Amurrio A, Aguinagalde X, Marco A, et al. 2008. Prenatal exposure to mercury in a prospective mother-infant cohort study in a Mediterranean area, Valencia, Spain. *Sci Total Environ.* 392:69–78.
- Ruelas-Inzunza J, Patiño-Mejía C, Soto-Jiménez M, Barba-Quintero G, Spanopoulos-Hernández M (2011) Total mercury in canned yellowfin tuna *Thunnus albacares* marketed in northwest Mexico. *Food Chem Toxicol* 49:3070–3073.
- 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.
- Swanson D, Block R, Mousa S. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr.* 3: 1–7.
- Tu Q, Qian J, Frech W. 2000. Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC–MIP–AES or GC–ICP–MS following simultaneous ultrasonic-assisted in situ ethylation and solvent extraction. *J. Anal. At. Spectrom.* 15:1583 – 1588.
- Uluozlu OD, Tuzen M, Mendil D, Soylak M. 2007. Trace metal content in nine species of fish from the Black and Aegean Seas, Turkey. *Food Chem.* 104:835–840.
- Voegborlo RB, El-Methnani AM, Abedin MZ. 1999. Mercury, cadmium and lead content of canned tuna fish. *Food Chem.* 67:341–345.
- Yang HR, Kim NY, Hwang LH, Park JS, Kim JH (2015) Mercury contamination and

Capítulo 4 – Cádmio, chumbo, estanho, mercúrio total e metilmercúrio em atum enlatado comercializado em São Paulo, Brasil

exposure assessment of fishery products in Korea. Food Addit Contam Part B 8:44–49.

Yess NJ.1993. US Food and Drug Administration survey of methylmercury in canned tuna. J. AOAC Int. 76:36–38.

CONCLUSÃO GERAL



Conclusão Geral

O resultado do presente estudo realizado em amostras de pescados coletadas na região de Campinas indicou que dentre elas o sushi de atum apresentou os maiores teores de Hg total e MeHg⁺, com proporção média de Hg total/MeHg⁺ de 88%, demonstrando a predominância da forma mais tóxica do mercúrio neste alimento. A estimativa de exposição ao MeHg⁺ foi avaliada para adultos e crianças, sendo observado que o consumo de apenas 4 porções/semana de sushi de atum pode atingir o valor de PTWI estabelecido.

Em relação ao sashimi, dentre as 12 espécies de pescados avaliados, as amostras de atum e peixe agulha apresentaram maiores concentrações de Hg total e MeHg⁺. As maiores proporções entre MeHg⁺ / Hg total foram observadas em sashimis de peixe namorado e polvo, com valores de 93% e 87%, respectivamente. O cálculo da estimativa de exposição ao MeHg⁺, indicou que a ingestão de 2 porções de sashimi de peixe agulha ou atum ultrapassam a PTWI, tanto para adultos como crianças. A exposição ao MeHg⁺ calculada através do quociente de perigo (THQ) demonstrou que 42% das amostras de sashimis analisadas apresentaram valores de THQ ≥ 5, indicando que estão acima do limite seguro de exposição.

A avaliação de contaminantes inorgânicos presentes em atum enlatado mostrou que 20% das amostras de atum em conserva em óleo analisadas, ultrapassaram o limite máximo estabelecido pela legislação nacional e internacional (ANVISA/CODEX) em relação ao Cd.

Devido ao crescente consumo e difusão de pratos da culinária Japonesa no Brasil, os dados obtidos neste trabalho destacam a importância da determinação de contaminantes inorgânicos, bem como a avaliação da exposição através do consumo de alimentos à base de pescados. Principalmente aqueles que possuem atum em seu preparo, uma vez que esta espécie apresentou os maiores teores dos contaminantes estudados.

Portanto, consumidores adeptos e frequentes destes alimentos, devem incluir maior variedade de peixes na dieta, especialmente aqueles pertencentes aos grupos de risco, como mulheres grávidas e em período de amamentação e crianças, devido à maior susceptibilidade destes aos efeitos nocivos dos contaminantes.

ANEXO



**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 11, 2016

This Agreement between Esther Paiva ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3916621211470
License date	Jul 26, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Food Control
Licensed Content Title	Sushi commercialized in Brazil: Organic Hg levels and exposure intake evaluation
Licensed Content Author	Esther Lima de Paiva, Jeanne Clécia Alves, Raquel Fernanda Milani, Bárbara Sia Boer, Késia Diego Quintaes, Marcelo Antonio Morgano
Licensed Content Date	November 2016
Licensed Content Volume Number	69
Licensed Content Issue Number	n/a
Licensed Content Pages	9
Start Page	115
End Page	123
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Determination and quantification of organic and total mercury levels in fish samples
Expected completion date	Dec 2016
Estimated size (number of pages)	100
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Esther Paiva Avenida Imperatriz Leopoldina

Campinas, Sao Paulo 13073035Brazil
Attn: Esther Paiva

Thank You For Your Order!

Dear Miss. Esther Paiva,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Elsevier has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful.

Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below:

<http://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?ref=714e217d-0974-4d6a-8772-4e7a800f006d>

Order Details

Licensee: Esther Paiva

License Date: Jul 26, 2016

License Number: 3916621211470

Publication: Food Control

Title: Sushi commercialized in Brazil: Organic Hg levels and exposure intake evaluation

Type Of Use: reuse in a thesis/dissertation

Total: 0.00 USD

To access your account, please visit <https://myaccount.copyright.com>.

Please note: Online payments are charged immediately after order confirmation; invoices are issued daily and are payable immediately upon receipt.

To ensure that we are continuously improving our services, please take a moment to complete our [customer satisfaction survey](#).

B.1:v4.2

