



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Lucileida Ramos Lima

DETERMINAÇÃO DO VERDE DE MALAQUITE EM
AMOSTRAS DE PEIXE DE AQUACULTURA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões
Pena e do Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira,
e apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Lucileida Ramos Lima

DETERMINAÇÃO DO VERDE DE MALAQUITE EM AMOSTRAS DE PEIXE DE AQUACULTURA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e do Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Aos meus pais André Corsino Lima e Maria Antónia Ramos,
por me terem colocado nesse mundo, por me terem
permitido crescer e aprender tudo o que sei hoje.

Aos meus filhos Miklos e Yarah por me terem dado forças
para continuar sempre que tive a sensação de querer desistir.

Agradecimentos

Com essa dissertação finalizo o meu mestrado que contribuirá para a minha vida futura profissional e pessoal, sem deixar de citar que só cheguei até aqui com a ajuda tanto direto como indiretamente de algumas pessoas que são muito importantes para a minha vida, por isso agradeço a todos pelo apoio, disponibilidade e carinho.

Em primeiro lugar agradeço à Deus por me ter permitido chegar até aqui sem desistir, mesmo encontrando muitos obstáculos pelo caminho, utilizei-os para fortalecer-me e ajudar-me a construir o meu futuro.

Depois quero agradecer ao Professor Doutor André Pereira por me ter acompanhado sempre e prestado orientação durante o tempo todo na realização da minha dissertação sem nunca me deixar em vão.

À Professora Doutora Angelina Pena por ter aceitado ser a minha orientadora e por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho com um tema muito interessante.

Aos meus amigos que me ajudaram muito a conseguir frequentar às aulas porque sem eles não seria possível chegar até aqui.

Não esquecendo de alguns dos meus colegas que me estenderam as mãos nos momentos mais difíceis durante o meu primeiro ano de mestrado, agradeço pelo carinho, apoio e pela amizade que construí com alguns deles e que dura até hoje.

Agradeço ao meu marido Elton, que me apoiou sempre, mesmo discordando de muitas coisas ele sempre esteve do meu "lado" me orientando em algumas coisas e sempre deixando claro a minha força e dedicação para a realização desse trabalho.

E por último e não menos importante agradeço aos meus filhos por me incentivarem a nunca desistir e sempre lutar por nós, aos meus irmãos, ao meu pai e a minha mãe que de uma forma indireta me apoiaram e também agradeço as instituições que me pagaram os estudos porque sem esse apoio a realização do meu mestrado não seria possível.

Agradeço a todos por acreditarem em mim e por me terem ajudado a chegar até aqui. Serei eternamente grata a todos vocês.

O MEU MUITO OBRIGADO A TODOS.

Abstract

The use of veterinary medicines (VM) in aquaculture is very important to ensure a good productivity namely in intensive production system. With the inappropriate use of VM and the lack of specific legislation in some countries in the world, there are problems in relation to the use of illegal substances in this activity.

Due to its toxicity, the use of malachite green (MG) presents risks to human and environmental health. Although it is not authorized in the production of aquaculture fish intended for human consumption, MG is used illegally in aquaculture worldwide as an antimicrobial and antiparasitic agent for the prevention and control of parasites and fungi in fish.

There is no maximum residue limit for fish tended for human consumption regarding MG, but there is a Minimum Required Performance Limit (MRPL) of 2 µg/kg for the residues of MG and its leucomalachite green (LMG) metabolite. The MRPL is the minimum content of an substance to be analysed in a sample, which can be detected and confirmed and aims to harmonize the performance of analytical methodologies in relation to substances for which a maximum residue limit have not been established.

The objective of this work was to detect the presence of MG and its LMG metabolite in 28 aquaculture fish, for sale in commercial establishments in Coimbra, through the ELISA test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Of the 28 samples analysed, the presence of MG and LMG residues was verified in 5 samples with only one being confirmed through mass spectrometry. Therefore, this reinforces that there is still the illegal use of MG dye in aquaculture fish highlighting the importance of monitoring studies for this substance.

Keywords: Malachite green; Toxicology; Residues; MRPL; Aquaculture; ELISA; Food Safety.

Resumo

O uso de medicamentos veterinários (MVs) em aquacultura, é muito importante para assegurar uma boa produtividade, nomeadamente nos sistemas de produção intensiva. Com o uso inadequado de MVs e com a falta de legislação específica em alguns países existem problemas relativamente ao uso de substâncias ilícitas nesta atividade.

Devido à sua toxicidade, a utilização do verde de malaquite (VM) apresenta riscos para a saúde humana e ambiental, sendo por isso proibido a sua utilização na produção de peixe destinado ao consumo humano. Apesar desta proibição, a sua utilização é feita em todo mundo, de forma ilegal, como agente antimicrobiano e antiparasitário para a prevenção e controlo dos parasitas e fungos em peixe.

Apesar de não existir um limite máximo de resíduo para VM em peixe para consumo humano, foi estabelecido um Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de 2 µg/kg para a soma do VM e do seu metabolito verde de leucomalaquite (VLM). O LMDR é o conteúdo mínimo de um analito a analisar numa amostra, que pelo menos deve ser detetado e confirmado e tem como objetivo harmonizar o desempenho analítico de métodos em relação as substâncias para as quais não tem estabelecido um limite permitido.

O objetivo deste trabalho foi detetar a presença do VM e do seu metabolito VLM em 28 peixes de aquacultura à venda em estabelecimentos comerciais de Coimbra através do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Das 28 amostras analisadas por ELISA, verificou-se a presença de resíduos de VM e VLM em 5 amostras, tendo-se confirmado o resultado por espectrometria de massa em uma amostra. Estes dados realçam o uso ilegal do VM em peixe de aquacultura, realçando a importância da monitorização desta substância.

Palavras-chave: Verde de malaquite; Toxicologia; Resíduos; LMDR; Aquacultura; ELISA; Segurança Alimentar.

Índice

Agradecimentos	4
Abstract.....	5
Resumo	6
Índice de Tabelas.....	9
Índice de Figuras.....	10
Abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	14
2. Aquacultura.....	16
2.1 – Definição de aquacultura	16
2.2 – Abordagem geral	16
2.3 – Tipos de aquacultura	17
2.4 – Produção global da aquacultura	18
2.5 – Aquacultura na Europa e em Portugal.....	22
2.6 – Bem-estar animal.....	27
2.7 – Produtos utilizados na aquacultura	28
2.7.1 – O verde de malaquite	29
2.7.1.1 – Legislação	30
2.7.1.2 – Características físicas e químicas	31
2.7.1.3 – Metabolização e distribuição do VM em peixe.....	32
2.7.1.4 – Toxicidade do VM em peixe.....	33
2.7.1.5 – Toxicidade do VM e do VLM nos humanos	35
2.7.1.6 – Ocorrência do VM em tecido de peixe na UE e em outros países.....	38
2.8 – Metodologias analíticas para determinação de VM e de VLM.....	42
2.8.1 – Metodologia de ELISA.....	42
2.9 – Comparação entre metodologias analíticas.....	43
3. Procedimento Experimental	45
3.1 – Reagentes e soluções	45
3.2 – Materiais utilizados e equipamentos no procedimento experimental	46
3.3 – Amostras.....	46
3.4 – Metodologia analítica.....	47
3.4.1 – ELISA – Extração	48
3.4.1.1 – Procedimentos prévios.....	48
3.4.1.2 – Preparação da amostra/extração	48
3.4.2 – ELISA – Detecção.....	50
4. Apresentação e discussão dos resultados.....	53

4.1 – Validação da metodologia analítica.....	53
4.1.1 – Linearidade e limite de detecção	53
4.2 – Ocorrência do VM e VLM nas amostras de peixe.....	55
5. Conclusão.....	59
6. Referências Bibliográficas.....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1. Pescas e produção de aquacultura por ano (Milhões de toneladas). Adaptado de (FAO, 2020)	19
Tabela 2. Utilização de peixe obtido pela pesca e aquacultura. Adaptado de (FAO, 2020)	20
Tabela 3. Comercialização de peixe obtidos pela pesca e aquacultura. Adaptado de (FAO, 2020).....	20
Tabela 4. Evolução da produção de aquacultura por meios de cultura. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])	26
Tabela 5. LMDR estabelecido para controlar o VM e VLM. Adaptado de (EFSA, 2016b)	30
Tabela 6. Usos legais e ilegais do VM. Adaptado de (BfR, 2008)	32
Tabela 7. Valores de LC50 do VM em muitas espécies de peixe (Srivastava, Sinha e Roy, 2004)	34
Tabela 8. Estatísticas resumidas ^(a) para a exposição alimentar crônica hipotética (ng/kg pc/dia) de VM e VLM realizado de acordo com a classe de idade ^(b) . Adaptado de (EFSA, 2016)	37
Tabela 9. Ocorrência do VM e VLM em peixe de aquacultura. Adaptado de (Bilandžić et al., 2012) e (EFSA, 2016)	41
Tabela 10. Lista das amostras.....	47
Tabela 11. Absorvância relativa de cada padrão	54
Tabela 12. Resultados das concentrações com as amostras fortificadas com 1 µg/kg.....	55
Tabela 13. Concentrações do VM e VLM	56
Tabela 14. Teste de Confirmação do VM.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Captura mundial de pescas e produção de aquacultura em milhões de toneladas. Adaptado de (FAO, 2020)	19
Figura 2. Utilização mundial de peixe e consumo aparente em milhões de toneladas, o fornecimento de alimentos per capita e a população em biliões. Adaptado de (FAO, 2020).	21
Figura 3. Contribuição regional para a pesca mundial e produção aquícola. Adaptado de (FAO, 2020).....	22
Figura 4. Origem dos produtos de pesca em Portugal. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.]	24
Figura 5. Saldo externo dos produtos pesqueiros. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.]	25
Figura 6. Produção aquícola por meios de cultura. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.]	26
Figura 7. Produção de aquacultura extensiva, intensiva e semi-intensiva em Portugal. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.]	26
Figura 8. Estrutura química do VM. Adaptado de (BfR, 2008).....	31
Figura 9. Estrutura química do VLM. Adaptado de (BfR, 2008)	32
Figura 10. Número de resultados não-conformes para VM e VLM em produtos de aquacultura entre os anos de 2002 e 2014. Adaptado de (EFSA, 2016)	39
Figura 11. Número de eventos de notificação no RASFF do VM e VLM em peixe e produtos de peixe entre os anos de 2002 e 2014. Adaptado de (EFSA, 2016)	39
Figura 12. Componentes do <i>Kit</i> ELISA.....	45
Figura 13. Etapas de extração	49
Figura 14. Padrões utilizados.....	50
Figura 15. Deteção - ELISA.....	51
Figura 16. Etapas de Deteção.....	52
Figura 17. Curva de calibração dos padrões.....	54

Abreviaturas

µg – micrograma

µL – microlitro

ABS – Absorvância

ACN – Acetonitrilo

ASAE – Autoridade da Segurança Alimentar e Económica

Dez – dezembro

DO – Densidade Ótica

Dp – Desvio padrão

EFSA – European Food Safety Authority / Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Ensaio Imunoabsorvente ligado a enzima

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

g – Grama

H₂O – água

HPLC – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

IUPAC – International Union of Applied Chemistry

kg – quilograma

LC50 – Concentração Letal

LMDR – Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LOD – Limite de Detecção

m/z – Razão massa/carga

ml – mililitro

MRS/SRM – Monitorização de Reação Seleccionada

Ms – Espectrometria de Massa

Ms/Ms – Espectrometria de Massa em Série

MV – Medicamentos Veterinários

ng – nanograma
nm – nanómetro
Nov – novembro
°C – Graus Celsius
Out – outubro
Pc – Peso corporal
pKa – Constante de ionização
RPA – Ponto de Referência para Ação
SEB-A – Samples Extraction Buffer A
SEB-B – Sample Extraction Buffer B
SEB-D – Sample Extraction Buffer D
U – Unidade
UA – Unidade Arbitrária
UE – União Europeia
UI – Unidade Internacional
UV – Ultravioleta
UV/VIS – Espectroscopia UV/VIS
V – Volt
VIS – Visível
VLM – Verde de Leucomalaquite
VM – Verde de Malaquite

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo principal a determinação da presença de resíduos do VM e do seu metabolito VLM pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em amostras de peixes oriundos de aquacultura para salvaguardar a segurança dos consumidores de peixe.

I. Introdução

Com o aumento do consumo de peixe em todo mundo, principalmente na União Europeia (UE), houve a necessidade de aumentar a produção intensiva e semi-intensiva destes em aquacultura, surgindo a necessidade de utilizar medicamentos veterinários (MV) para garantir um alimento seguro para os consumidores de peixe e para satisfazer a produção necessária.

O peixe é um dos alimentos mais rico em proteínas, é de fácil digestão, rico em vitaminas B e minerais, como por exemplo o ferro, cálcio, potássio, etc. São ricos em ácidos gordos ómega-3, que é um ácido essencial para o nosso organismo, por isso deve fazer parte da nossa dieta.

Ao administrar antibióticos em aquacultura, tem que se ter em consideração a concentração recomendada, respeitar o limite máximo de resíduos no peixe, ter em conta a segurança do consumidor, a integridade dos animais e também o ambiente. Para garantir um alimento seguro para o consumidor, faz-se a monitorização contínua da administração dos antibióticos em aquacultura (Gastalho *et al.*, 2014).

Se essas exigências não forem respeitadas pode haver o impacto sobre o ambiente, onde pode haver o “aparecimento de resistência antimicrobiana, tanto em bactérias comensais do intestino humano e animal, como nas bactérias do meio ambiente e pode haver a disseminação de genes de resistência entre diversas populações bacterianas” (Gastalho *et al.*, 2014c).

O verde de malaquite (MV) é utilizado para combater doenças infecciosas na produção animal, como por exemplo no tratamento e prevenção dos parasitas e bactérias em peixe de aquacultura (Gastalho *et al.*, 2014a). É utilizado como aditivo alimentar e também como corante trifenilmetano na indústria têxtil (Bilandžić *et al.*, 2012a). Nunca foi autorizado como MV, mas ele é utilizado em aquacultura como um dos fungicidas mais eficazes, parasiticidas, antiprotozoários e bactericidas (Bilandžić *et al.*, 2012). Além de ser utilizado como um fungicida é também utilizado como um desinfetante médico e anti-helmíntico (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

Há estudos que mostram que o VM é metabolizado a verde de leucomalaquite (VLM) (VLM: *p*, benzilidenebis-*N*, *N*-dimetilnilina CAS nr. 129-73-7) pelo peixe (Stammati *et al.*, 2005a). O último composto é muito persistente e prevalente em peixe tratado com VM (Stammati *et al.*, 2005). Mesmo depois do tratamento térmico, os resíduos destas substâncias são estáveis tanto no ambiente como no peixe cozinhado (Hashimoto *et al.*, 2011).

O corante VM é utilizado em aquacultura pelos produtores de peixe. Como é prejudicial para a saúde dos consumidores de peixe, é proibido na UE. Mesmo com a sua proibição, ainda se

encontra resíduos do VM e do VLM em peixe e produtos de peixe à venda na UE, o que é motivo de preocupação.

A vigilância sanitária destes compostos tem que ser feita de uma forma rigorosa e continuada em todos os países para garantir a segurança dos consumidores de peixe. Apesar da proibição do uso de VM em peixe de aquacultura para consumo humano, os produtores continuam a utilizá-lo para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas em peixe, por ser um produto de fácil acesso, eficaz e pouco dispendioso.

A Decisão Da Comissão de 22 de dezembro de 2003 que altera a Decisão 2002/657/ define o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de 2 µg/kg para a soma de VM e de VLM em peixe para consumo humano (COMISSÃO, 2003).

O LMDR é o conteúdo mínimo de um analito a analisar numa amostra, que pelo menos deve ser detetado e confirmado e tem como objetivo harmonizar o desempenho analítico de métodos em relação às substâncias para as quais não tem estabelecido um limite permitido (EFSA, 2013). Os LMDRs foram adotados como padrão de desempenho garantindo o controle efetivo da legislação Comunitária ao testar amostras para a presença de certas substâncias não permitidas (EFSA, 2013).

2. Aquacultura

2.1 – Definição de aquacultura

“A aquacultura consiste na produção em cativeiro de animais (peixes, moluscos, crustáceos, répteis, batráquios, equinodermes) ou plantas que tenham um habitat predominantemente aquático em pelo menos uma fase da sua vida. A cultura destes seres vivos implica a sua propagação, manutenção e colheita em ambientes controlados. Para se poder considerar que um produto tem origem na aquacultura é necessário que durante o seu ciclo de vida este seja objeto de algum tipo de intervenção humana” (CASSAMO, 2012).

“A aquacultura é a produção de organismos cujos ciclos de vida naturais se dão, total ou parcialmente, em meio aquático, para fins de consumo humano. A aquacultura abrange várias atividades que podem ser subdivididas em piscicultura (criação de peixes), malacocultura (criação de moluscos, como lulas, ostras e mexilhões), carnicultura (criação de camarões, caranguejos e siris), algicultura (cultivo de micro ou macro algas), ranicultura (criação de rãs) e criação de jacarés” (Botelho *et al.*, 2012).

2.2 – Abordagem geral

Num mundo onde o crescimento populacional é uma realidade são necessárias medidas que garantam a disponibilidade alimentar para todos sem comprometer a segurança alimentar e os recursos naturais. O peixe e os produtos de pesca são efetivamente reconhecidos como alguns dos alimentos mais saudáveis e como alguns dos menos impactantes para o meio ambiente. Dito isto, eles devem ser considerados na vertente da segurança alimentar nacional, regional e global e como uma das estratégias de nutrição que contribuem para a transformação contínua dos sistemas alimentares para garantir a eliminação da fome e desnutrição (FAO, 2020).

Segundo a FAO, a aquacultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce atualmente e que é responsável por cerca de 50% da produção de peixe consumido no mundo (FAO, 2020).

Além do consumo de peixe fazer parte da cultura de muitos consumidores, ela é também muito benéfica para a saúde, possuindo um excelente perfil nutricional, visto que, é rico em ácidos gordos (ómega 3), uma boa fonte de proteínas, micronutrientes essenciais, vitaminas e minerais (FAO, 2020).

Nas últimas décadas, a produção de peixe em aquacultura, assim como o setor de pesca expandiram de forma significativa e em 2018 a produção, o comércio e o consumo totais atingiram um recorde histórico (FAO, 2020).

2.3 – Tipos de aquacultura

“A aquacultura na UE é sustentável e assegura ao consumidor europeu um acesso a produtos saudáveis, seguros e de grande qualidade”. São produzidas diversas espécies na UE de diversos tipos de aquacultura, tais como (Comissão Europeia, 2012):

❖ A aquacultura em água doce:

- Os lagos são tratados de forma a favorecer o desenvolvimento da fauna aquática a um rendimento superior ao do ecossistema natural.
- A densidade é fraca e a alimentação do peixe é natural.
- Alguns produtores fornecem um complemento alimentar.
- Estes lagos desempenham um papel importante e positivo na paisagem, na gestão da água e na biodiversidade.

Espécies produzidas: em policultura temos a carpa, com outras espécies como o coregono, lucioperca, lúcio, peixe-gato.

❖ A aquacultura das espécies marinhas em instalação em terra:

- A criação de peixe marinho, especialmente o peixe chato, pode-se fazer em tanques artificiais em terra, mas são alimentados por água do mar.
- A recirculação de água, permitindo um ambiente fechado e controlado, é necessária para uma produção otimizada nas maternidades e zonas de alevinagem de espécies marinhas.

Espécies produzidas: o pregado, o linguado legítimo, o linguado do Senegal, o robalo legítimo e a dourada.

❖ A aquacultura em águas salobras:

- Esta forma de aquacultura desempenha um papel importante na conservação do património natural costeiro.
- Os animais frequentemente carregados pelos fluxos marinhos, são preservados em lagoas preparados para o efeito (por exemplo a valicultura italiana).

- A introdução de alevins de maternidade e de suplementos alimentares reforçam o carácter semi-extensivo desta criação.

Espécies produzidas: o robalo, a enguia, o linguado legítimo, o linguado do Senegal, a dourada, a tainha, o esturjão, o camarão e os moluscos.

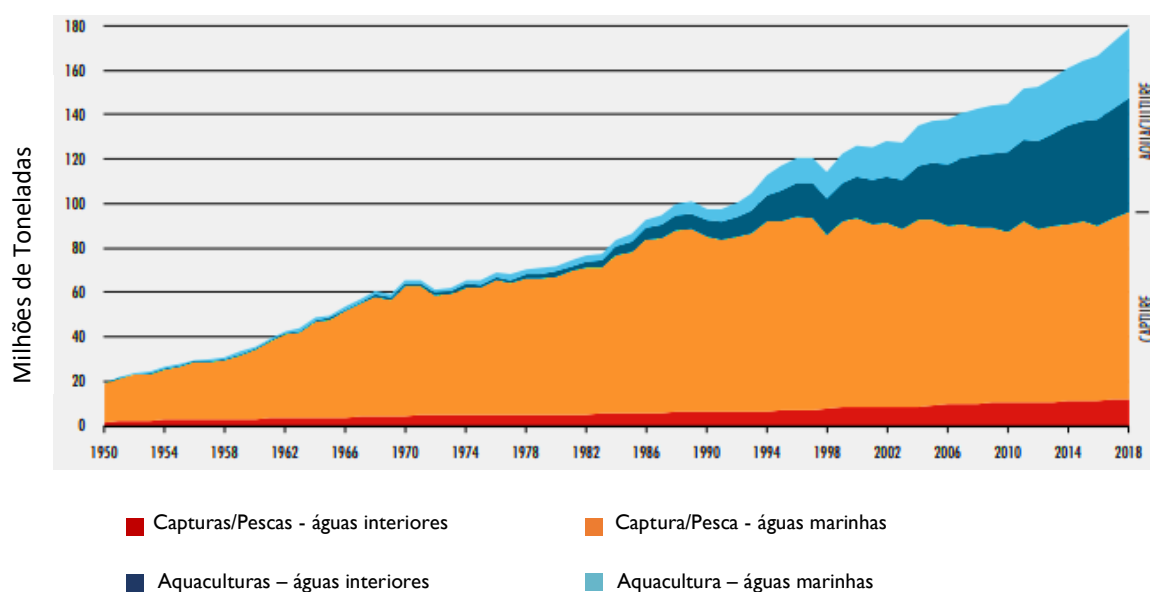
Para além dos tipos de aquacultura já referidos a produção em mar aberto tem ganho o seu espaço, contribuindo para o aumento de produção.

Para além do tipo de aquacultura esta divide-se em três regimes de produção: o regime extensivo, o regime semi-intensivo e o regime intensivo.

- Regime de produção extensivo: aproveita exclusivamente as condições naturais disponíveis. A espécie a que se deseja cultivar é capturada no meio natural ou tem origem em unidades de reprodução. A produção efetua-se com recurso a alimentação exclusivamente natural (REA, 2019).
- Regime de produção semi-intensivo: feita a partir da produção artificial para aquisição de ovos e juvenis e durante a fase de engorda fazem-se amostragens e calibragens frequentes para ter um bom crescimento e aumentar o rendimento, recorrendo a suplementos alimentares artificiais e alimentos naturais (REA, 2019).
- Regime de produção intensivo: todos os parâmetros de produção estão sob observação permanente. Para que se aumente o rendimento, faz-se calibragens e amostragens sucessivas, controlando-se a reprodução e o crescimento. Neste sistema alimenta-se a espécie exclusivamente de alimento artificial (REA, 2019).

2.4 – Produção global da aquacultura

A nível mundial, com o passar dos anos, em relação a produção de produtos de pesca e de aquacultura, nos anos 90 verifica-se que há uma substituição dos produtos de pesca pelos produtos de aquacultura. Em 2018 a pesca tem vindo a estabilizar, enquanto que a aquacultura tem vindo a aumentar cada vez mais. Pelo gráfico, verifica-se que a captura ronda os 100 milhões de toneladas, enquanto que a aquacultura ronda os 80 milhões de toneladas. A produção de pesca de captura global em 2018 atingiu 96,4 milhões de toneladas, um aumento de 5,4% em relação à da média dos três anos anteriores. Este aumento deve-se a pesca de captura marinha, em que a produção aumentou de 81,2 milhões de toneladas em 2017 para 84,4 milhões de toneladas em 2018. A aquacultura sofreu um crescimento exponencial no mundo todo (Figura I e Tabela I)(FAO, 2020).



Nota: exclui mamíferos aquáticos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas.

Figura I. Captura mundial de pescas e produção de aquacultura em milhões de toneladas. Adaptado de (FAO, 2020)

As capturas globais em águas interiores são responsáveis por 12,5% da produção total. A produção mundial de peixe de aquacultura em 2018 atingiu 82,1 milhões de toneladas, em que a produção foi dominada por peixe, 57,3 milhões de toneladas foram oriundos de aquacultura interior e 30,8 milhões de toneladas provenientes de aquacultura marinha e costeira. (Figura I e Tabela I) (FAO, 2020).

Tabela I. Pescas e produção de aquacultura por ano (Milhões de toneladas). Adaptado de (FAO, 2020)

Produção de peixe / ano	1986-1995	1996-2005	2006-2015	2016	2017	2018
Captura interior	6,4	8,3	10,6	11,4	11,9	12,0
Captura marinha	80,5	83,0	79,3	78,3	81,2	84,4
Total de captura	86,9	91,4	89,8	89,6	93,1	96,4
Aquacultura interior	8,6	19,8	36,8	48,0	49,6	57,3
Aquacultura marinha	6,3	14,4	22,8	28,5	30,0	30,8
Total de aquacultura	14,9	34,2	59,7	76,5	79,5	82,1
Total de pesca e aquacultura mundial	101,8	125,6	149,5	166,1	172,7	178,5

Nota: Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas. Os totais podem não coincidir devido a arredondamentos.

Na Tabela 2, está descrito o destino que é dado a milhões de toneladas de peixe de consumo humano e os de usos não alimentares ao longo dos últimos anos, conseguidos através da captura de peixe e produção de aquacultura, a população global e um consumo aparente anual de peixe per capita (FAO, 2020).

Tabela 2. Utilização de peixe obtido pela pesca e aquicultura. Adaptado de (FAO, 2020)

Utilização de peixe / ano ¹	1986-1995	1996-2005	2006-2015	2016	2017	2018
Consumo humano (milhões de toneladas)	71,8	98,5	129,2	148,2	152,9	156,4
Usos não alimentares (milhões de toneladas)	29,9	27,1	20,3	17,9	19,7	22,2
População global (bilhões) ²	5,4	6,2	7,0	7,5	7,5	7,6
Consumo aparente (Kg per capita)	13,4	15,9	18,4	19,9	20,3	20,5

Nota: Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas. Os totais podem não coincidir devido a arredondamentos.

¹Os dados de utilização para 2014-2018 são estimativas provisórias.

²Fonte de dados populacionais: UN DESA, 2019.

Por ano, o consumo global de peixe aumentou em média 3,1% entre os anos de 1961 a 2017, quase o dobro da percentagem do crescimento populacional mundial por ano (1,6%), para o mesmo período. O consumo per capita de peixe cresceu de 9,0 kg de peso vivo em 1961 para 20,5 kg em 2018, o que equivale a cerca de 1,5% / ano (FAO, 2020).

O consumo aparente de peixe nos países desenvolvidos aumentou de 1961 com 17,4 kg per capita para 26,4 kg per capita em 2017 e depois diminuiu gradualmente para 24,4 kg ainda em 2017. Nos países em desenvolvimento o consumo aparente de peixe aumentou significativamente em 1961 de 5,2 kg per capita para 19,4 kg em 2017, com uma percentagem média por ano de 2,4%. Entre estes, os países menos desenvolvidos aumentaram o seu consumo de 6,1kg em 1961 para 12,6 kg em 2017, o que dá uma taxa média anual de 1,3% e nos países com défice alimentar, o consumo de peixe aumentou em 1961 de 4,0 kg para 9,3 kg em 2017, uma taxa anual de cerca de 1,5% (FAO, 2020).

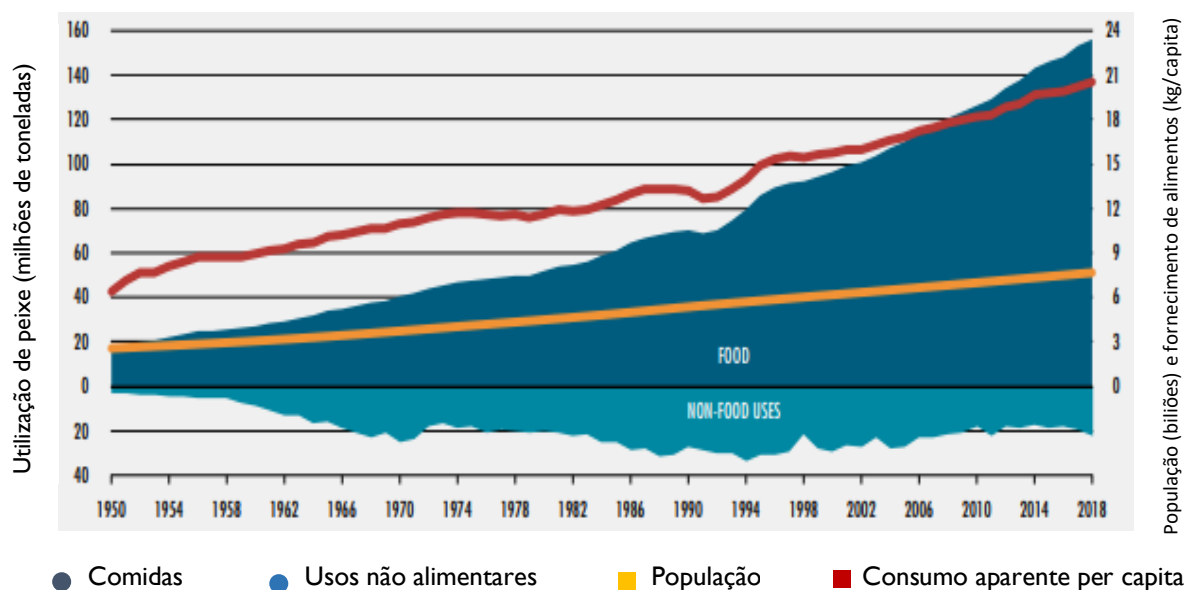
Na Tabela 3, está descrita a comercialização de peixe ao longo dos últimos anos, onde a exportação é feita por quantidades (milhões de toneladas), com uma percentagem da participação das exportações e em relação ao valor das exportações em bilhões de dólares.

Tabela 3. Comercialização de peixe obtidos pela pesca e aquicultura. Adaptado de (FAO, 2020)

Comercialização de peixe / ano	1986-1995	1996-2005	2006-2015	2016	2017	2018
Exportações de peixe (milhões de toneladas)	34,9	46,7	56,7	59,5	64,9	67,1
Participação das exportações na produção total (%)	34,3	37,2	37,9	35,8	37,6	37,6
Exportações de peixe (bilhões de dólares)	37,0	59,6	117,1	142,6	156,0	164,1

Nota: Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas. Os totais podem não coincidir devido a arredondamentos.

Na Figura 2, pode-se comprovar que foram destinados para usos não alimentares as restantes 22 milhões de toneladas e que foram utilizados principalmente para produção de farinha de peixe e óleo de peixe (FAO, 2020).



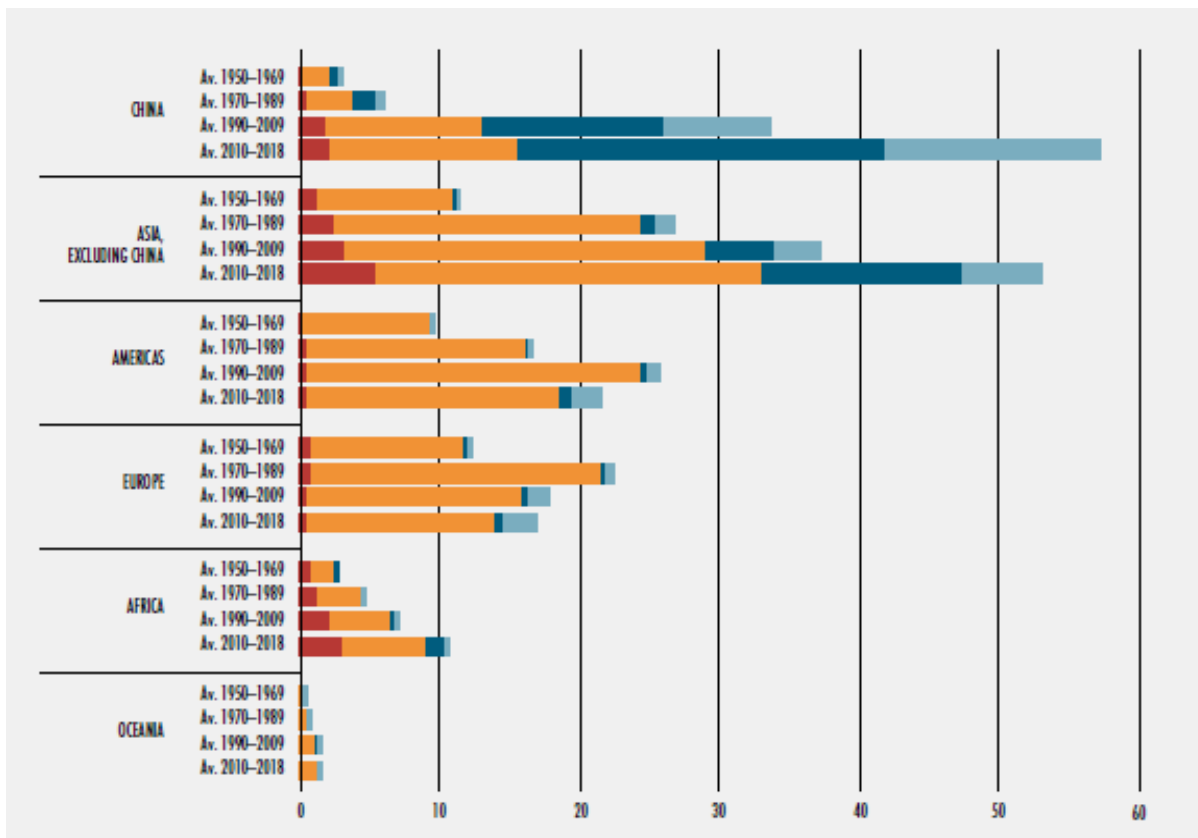
Nota: exclui mamíferos aquáticos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas.

Figura 2. Utilização mundial de peixe e consumo aparente em milhões de toneladas, o fornecimento de alimentos per capita e a população em bilhões. Adaptado de (FAO, 2020)

Segundo os dados da FAO, a aquicultura é responsável por 46% da produção total e 52% de peixe para consumo humano. Em 2018, a China foi um dos maiores produtores de pescado a nível mundial, contabilizando uma produção global de peixe de 35%, seguido da Ásia (com exclusão da China) que teve uma produção significativa de 34%, depois pelas Américas com uma produção de 14%, a Europa produziu 10%, a África produziu 7% e a Oceânia 1%. A produção total aumentou em todos os continentes nas últimas décadas, com exceção da Europa em que a produção diminuiu no final de 1980 e veio a recuperar lentamente nos últimos anos. Em África e na Ásia a produção quase que dobrou nos últimos 20 anos (Figura 3) (FAO, 2020).

A contribuição da aquicultura mundial para a produção de peixe atingiu 46,0% em 2018, um aumento de 25,7% desde 2000 e de 29,7% no resto do mundo, excluindo a China, em comparação com os 12,7% desde 2000. Em relação ao nível regional, a aquicultura representou 17,9% do total da produção de peixe na África, 17,0% na Europa, 15,7% nas Américas e 12,7% na Oceânia. Na Ásia, a participação da aquicultura de produção de peixe, excluindo a China, atingiu 42,0% em 2018 e a partir de 19,3% em 2000 (Figura 3) (FAO, 2020).

De acordo com os resultados da Figura 3, a China é o maior produtor entre os anos de 2010 e 2018, seguido da Ásia (excluindo a China), sendo que a maior produção de peixe ocorreu entre 2010 e 2018. Nas Américas, a maior produção decorreu entre os anos de 1990 e 2009, a África com maior produção nos anos de 2010 e 2018, seguido da Oceânia com baixas produções entre os anos de 1950 a 1989, subindo um pouco nos anos de 1990 e 2018 (FAO, 2020).



Milhões de Toneladas

- Capturas – águas interiores
- Capturas – áreas marinhas
- Aquacultura – águas interiores
- Aquacultura - áreas marinhas

Nota: Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas marinhas e outras plantas aquáticas. A Europa inclui dados da União das Repúblicas Socialistas Soviéticas nos anos 1950 – 1987. Av. = Média por ano.

Figura 3. Contribuição regional para a pesca mundial e produção aquícola. Adaptado de (FAO, 2020)

Como se pode ver pela Figura 3, na China, ao contrário dos outros países, a produção em aquicultura é maior do que nas capturas marinhas.

2.5 – Aquacultura na Europa e em Portugal

Em relação às estatísticas oficiais mais recentes, em 2009 a aquacultura em relação a UE constitui cerca de 25% da produção de peixes, moluscos e crustáceos, ficando o resto

assegurado pela pesca. Na UE os principais produtores de peixe são Reino Unido (salmão) e a Grécia (dourada e robalo), enquanto que na produção de moluscos temos a Espanha (mexilhão), a França (ostra) e a Itália (amêijoia cristã) (Comissão Europeia, 2012).

Em relação ao crescimento elevado da produção aquícola no mundo, o que aumentou desde os anos 90, mais de 4 vezes, em particular na Ásia, a Europa não acompanhou esse crescimento. Em 2011, a Europa representava cerca de 3,2% do volume da produção da aquacultura mundial. Porém, a produção aquícola na Europa não constitui uma alternativa, em relação a termos quantitativos, à produção oriunda das capturas, a qual tem vindo a sofrer um declínio duradouro (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

A UE apresenta uma produção em aquacultura que ronda os 1,28 milhões de toneladas, que corresponde a uma percentagem de 1,5%. Encontrando-se principalmente em 5 países: Espanha, França, Reino Unido, Itália e Grécia, portanto conjuntamente esses países justificam 75% daquela produção em valor e em peso. Enquanto que Portugal, em 2011 não ultrapassa 2% do valor da produção no contexto da UE (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

A localização geográfica da costa continental portuguesa, na transgressão de duas importantes sub-províncias oceanográficas do Norte atlântico, onde temos a subtropical e a subtropical/subpolar, permite a existência de uma grande variedade de habitats. Por esse motivo é considerada uma das zonas mais ricas biologicamente, sobretudo pelas qualidades das suas águas e pela variedade das espécies que existem nelas (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Considerando as características geográficas portuguesas, que estão sob influência de águas do mar Mediterrâneo e de águas do Oceano Atlântico, percebe-se que o potencial para a prática de aquacultura é alto, podendo assim apresentar capacidades para desenvolver cultura de espécies com alto interesse comercial (Teixeira e Cunha, Da, 2016).

Tendo em conta as condições geomorfológicas da costa continental de Portugal e das ilhas Atlânticas, incluindo as condições do mar nos meses de frio, não são das mais vantajosas para instalarem unidades de aquacultura nos oceanos, recorrendo assim, obrigatoriamente a recurso tecnológicos adaptadas às condições desse meio. É uma costa que está muito visível, principalmente a costa Ocidental do Continente e do Norte das Ilhas Atlânticas, onde há poucos espaços naturais que possam defender as estruturas de aquacultura no mar aberto, de modo que isso seja aproveitado para a instalação de estabelecimentos de aquacultura exigirá a utilização de tecnologias inovadoras (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Contudo, mesmo com esse problema, a costa algarvia, a costa sul da Madeira, incluindo lagunas, rias e alguns estuários, para além de algumas baías mais resguardadas, reúnem condições razoáveis para a prática da aquacultura em mar aberto, onde estão instaladas jaulas flutuantes para peixes na Madeira e cabos em suspensão para cultivo de bivalves no Algarve (Agricultura e Dgrm, [s.d.]). Em Portugal, a aquacultura é caracterizada por conter grandes números de estabelecimentos de pequeno tamanho, como viveiros de bivalves em zonas estuarinas ou de ria (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Apesar da aquacultura ser um complemento muito importante das formas tradicionais de abastecimento de pescado, em Portugal, até a data de hoje, ainda não se tem uma alternativa consistente ao pescado proveniente da atividade pesqueira (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Em 2012, o valor de 10.317 toneladas foi devido a produção em aquacultura, o que corresponde a uma percentagem de 5,4% das descargas de pescado. Portugal tem um decréscimo de descargas de pescado a nível europeu, não só por causa das limitações de capturas, como no acesso a pesqueiros, sobretudo os externos, o que levou a sua redução, onde as descargas nos anos 90 em média foi de 247,2 mil toneladas por ano e houve uma redução nos primeiros 12 anos deste século para cerca de 210,3 mil toneladas (Figura 4) (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Anualmente, na Europa, são consumidos cerca de 23 kg de produtos com origem aquática, sendo que um décimo destes produtos deriva da aquacultura, juntamente com os produtos aquícolas importados, como os camarões tropicais da Tailândia, Bangladeche e Índia, o salmão que vem da Noruega, e o pangasius da Vietname (Comissão Europeia, 2012).

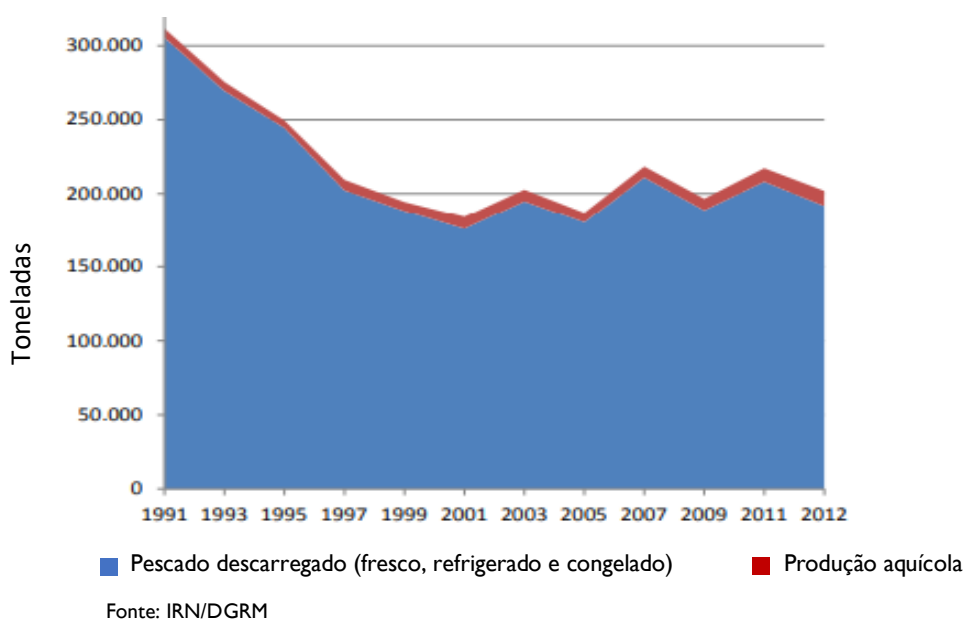
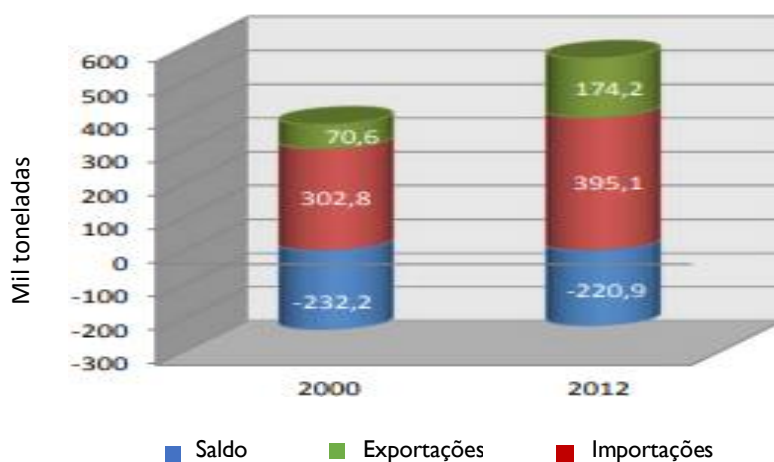


Figura 4. Origem dos produtos de pesca em Portugal. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])

Portugal é um país onde o consumo de pescado é muito elevado chegando a cerca de 56,7 kg por habitante/ano, por esse motivo o país tem a necessidade de fazer importações para conseguir satisfazer o consumo nacional como se verifica na Figura 5. A produção de aquacultura em Portugal não tem sido muito elevado, ou seja, tem sido insuficiente para diminuir o saldo negativo da balança comercial dos produtos de pesqueiros e a importação dos produtos não são suficientes para substituírem a produção aquícola nacional, como por exemplo o bacalhau e a pescada.



Fonte: IRN/DGRM

Figura 5. Saldo externo dos produtos pesqueiros. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])

Enquanto que o saldo externo negativo diminui ao longo dos anos de uma forma ligeira, de -232,2 mil toneladas em 2000 para -220,9 mil toneladas em 2012, as importações de pescado sofreram um aumento significativo de 302,8 mil toneladas para 395,1 mil toneladas e as exportações aumentaram também de 70,6 mil toneladas para 174,2 mil toneladas (Figura 5) (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

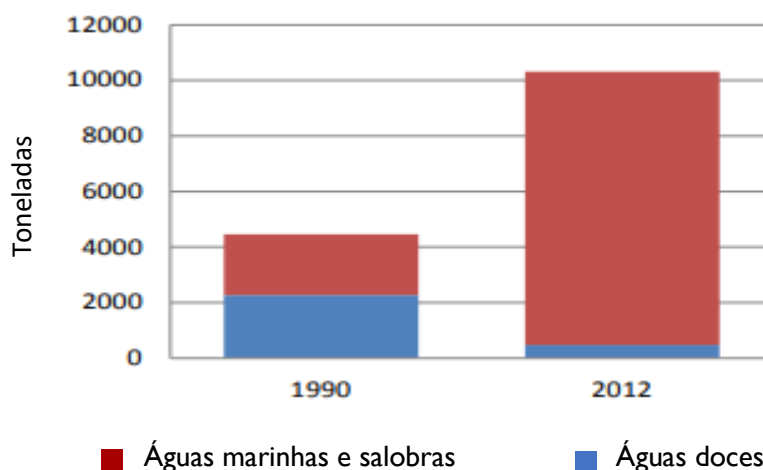
Em Portugal a produção aquícola aumentou desde o início dos anos 90, de 4.457 toneladas em 1990 para 10.317 toneladas em 2012, onde representou um valor de 54 milhões de euros (Tabela 4). No período de 1990-2012 houve um aumento da diversificação da produção, no ano de 1990 a produção era limitada para duas espécies: truta e amêijoia e no ano de 2012 houve produções consideráveis de diversas espécies de peixes e bivalves, onde a produção de pregado se destaca com 4,4 mil toneladas, seguido da amêijoia boa, com 2,3 mil toneladas (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Como se pode constatar na Figura 6, durante o período de 1990-2012 a produção aquícola nas águas doces sofreu uma redução em termos absolutos e relativos, em relação às produções provenientes de culturas nas águas marinhas e salobras (Agricultura e Dgrm, [s.d.]).

Tabela 4. Evolução da produção de aquacultura por meios de cultura. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])

Meio de cultura	1990	1995	2000	2005	2010	2012
Águas doces (Toneladas)	2,266	958	1,296	845	950	479
Águas marinhas e salobras (Toneladas)	2,191	4,081	6,240	5,850	7,063	9,839
Total (Toneladas)	4,457	5,039	7,536	6,695	8,013	10,317

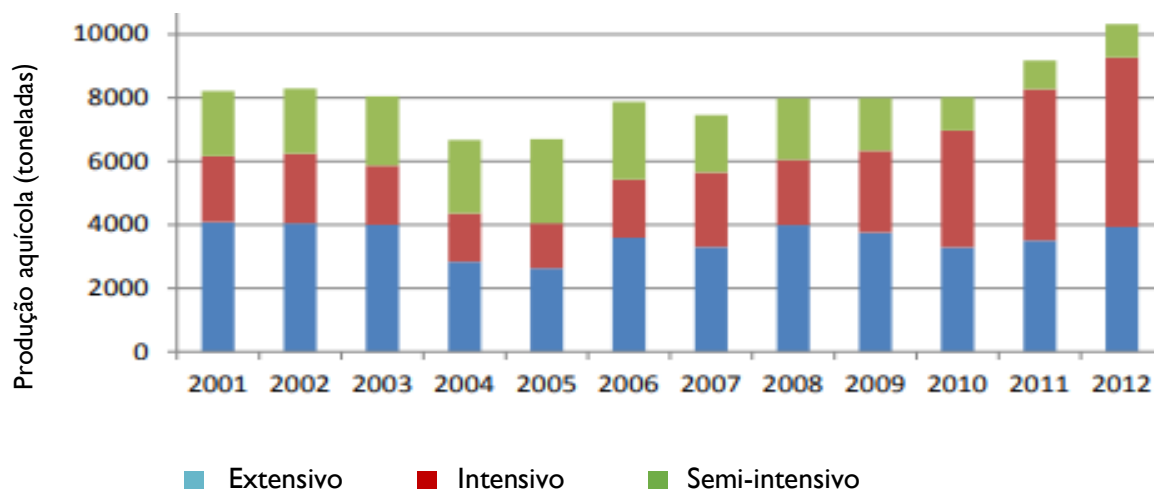
Fonte: INE/DGRM



Fonte: INE/DGRM

Figura 6. Produção aquícola por meios de cultura. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])

Em relação ao regime de exploração, a produção de aquacultura intensiva é exclusivamente feita em águas doces. Enquanto que, 39% do volume de produção provém do regime extensivo nas águas marinhas e salobras, onde é cultivado sobretudo os bivalves. No regime semi-intensivo temos produção de 10,7% e no regime intensivo, 49,4% (Figura 7).



Fonte: INE/DGRM

Figura 7. Produção de aquacultura extensiva, intensiva e semi-intensiva em Portugal. Adaptado de (Agricultura e Dgrm, [s.d.])

2.6 – Bem-estar animal

De uma forma global, os animais aquáticos e os produtos de animais aquáticos são uma das principais fontes de proteína dietética. A produção na aquacultura tem vindo a crescer de forma significativa em relação aos outros setores nos últimos anos e vai continuar a crescer nos próximos anos. Só que, com a forte expansão da produção da aquacultura mundial, essa produção intensiva tem causado problemas de saúde e de bem-estar, o que mostra que, a produção em aquacultura pode não atender às leis de proteção animal que estão estabelecidas para proteger o bem-estar animal e que fogem de padrões éticos aceitáveis. Logo, não estão a priorizar o bem-estar animal, principalmente se houver faltas de recursos ou quando a segurança alimentar e os aspetos da saúde humana do ponto de vista legislativos são priorizados (OIE, 2004).

Há uma controvérsia entre alguns autores, onde se debatem se o peixe sente dor ou não. Segundo Rose (2004) é inaceitável que o peixe possa sentir qualquer dor ou emoção, apesar de exibir respostas a estímulos nocivos. É importante que as respostas ao stresse sejam consideradas relevantes para o bem-estar do peixe, mas Rose continua a defender que como o peixe não tem consciência, ele não sente dor e não sofre. Com a ausência de um neocórtex no peixe, que é um pré-requisito considerado para a consciência, conclui-se que o peixe não sente dor. Enquanto que outros autores mostraram que, quando há administração de substâncias nocivas, há evidência de nociceção (percepção de estímulos agressivos) e desconforto em peixe (OIE, 2004).

Como em outros animais também podem ser observados comportamentos em relação a doenças ou stresse em peixe. Embora diferentes espécies de peixe possam demonstrar diferentes comportamentos em relação a alterações na capacidade de nadar, mudança na frequência respiratória e na absorção de alimentos, isso significa que esses comportamentos afetam o bem-estar do peixe (OIE, 2004).

Em relação ao impacto ambiental, os requisitos e exigências ambientais para o bem-estar e desempenhos ideais para todas as espécies de peixe em viveiro não são totalmente conhecidos, o que implica que cada espécie tem o seu critério, logo o que é bom para um não é favorável para outro (OIE, 2004).

A circulação da água dentro dos tanques é muito importante porque a sua diminuição pode provocar agressões em peixe, causar crescimento heterogéneo e ficam mais suscetíveis a doenças. É complexa a relação entre o meio ambiente, a doença e o bem-estar, mas é quase

certa de que a má qualidade da água pode provocar perturbações no peixe devido a problemas agudas ou stresse crónico (OIE, 2004).

A nutrição do peixe em piscicultura é muito importante. O peixe produzido na aquacultura depende de dietas formuladas, e quando essas dietas não correspondem às necessidades nutritivas do peixe pode ocorrer desnutrição. Portanto, tem de se realçar que o uso ético e adequado de diferentes tipos de matéria-prima alimentar é indispensável, ou seja, a dieta adequada para cada espécie de peixe é muito relevante para o bem-estar do peixe, evitando assim problemas de saúde futuros (OIE, 2004).

2.7 - Produtos utilizados na aquacultura

Geralmente a aquacultura, e em específico a piscicultura sofrem significativamente com efeitos da bioconstrução. Por esse motivo a indústria da aquacultura utiliza diversos tipos de substâncias tais como: detergentes, anti incrustantes e produtos químicos. Estes produtos químicos são essenciais para a aquacultura porque ajudam a aumentar e a controlar a produção de sementes nas incubadoras, aumentar a eficiência alimentar, melhorar as taxas de sobrevivência, controle de patógenos e doenças e redução do stresse no transporte (Guardiola *et al.*, 2012).

Apesar dos seus efeitos benéficos na aquacultura, estas substâncias podem causar danos potenciais nos organismos e a saúde aquática, visto que, esses produtos são ingeridos pelo peixe e crustáceo podendo inclusive promover problemas de saúde nos consumidores desses alimentos. Tanto os produtos químicos, como os metais pesados podem prejudicar o meio ambiente, logo os responsáveis pela utilização destes produtos podem desempenhar um papel importante na disseminação dos mesmos. Esta utilização pode aumentar o risco para a saúde animal e humana nomeadamente devido à emergência de resistências bacterianas promovidas pela utilização de antibióticos e metais pesados (Guardiola *et al.*, 2012).

O uso de imunoestimulantes na aquacultura para prevenir doenças é um novo desenvolvimento promissor. Os imunoestimulantes são um grupo de compostos sintéticos e biológicos que aumentam a defesa dos mecanismos não específicos nos animais, conferindo uma proteção generalizada maior e mais eficaz contra os vírus, bactérias, fungos e parasitas. Porém, esta proteção é muito importante para o peixe que é criado em ambientes onde a natureza do patógeno é desconhecida pois aceleram o amadurecimento de imunidade não específicas e específicas em animais jovens que são mais suscetíveis (Bairwa *et al.*, 2002).

Uma variedade de substâncias tem efeitos imunostimuladores e são derivados microbianos, plantas ou extratos de animais, vitaminas, hormonas e produtos químicos sintéticos. Mas, particularmente os extratos de ervas e produtos de origem animal são mais utilizados como imunostimulantes em piscicultura, pois, podem ser adquiridos com muita facilidade, são pouco dispendiosos e agem contra um amplo espectro de patogêneos, e podem ser administrados por via oral, que é um método muito conveniente de imunostimulação (Bairwa *et al.*, 2002).

2.7.1 - O verde de malaquite

Com o aumento da produção aquícola mundial foi necessário recorrer a alguns métodos para combater doenças/infeções no peixe. Por exemplo os antibióticos, que são utilizados na aquicultura como medidas terapêuticas. O uso inapropriado dos antibióticos podem causar a resistência aos antibióticos, problemas no bem-estar animal e conseqüentemente nos consumidores de peixe (Aly e Albutti, 2014).

Apesar de as doenças bacterianas serem em algumas situações controladas por manutenção de uma boa higiene e vacinação, porém, a terapêutica antimicrobiana permanece de grande importância para o tratamento, e em alguns casos para a prevenção de algumas doenças bacterianas (Aly e Albutti, 2014).

Quando se faz o uso apropriado dos antibióticos, reduzindo o risco de resistência antimicrobianas, estes aceleram a recuperação e curam animais doentes, melhoram o bem-estar dos animais tratados e reduz a disseminação da infecção para outros animais, e em caso de doença zoonótica para os humanos (Aly e Albutti, 2014).

A resistência aos antibióticos e possíveis falhas nos tratamentos em animais de produção estão-se a tornar numa preocupação de crescimento rápido envolvendo diversas indústrias agrícolas e espécies, porém na indústria da aquicultura, o problema não é diferente, onde o problema da resistência antimicrobiana tem sido relatado em ambientes de água doce e marinhos (Aly e Albutti, 2014).

O VM é um corante trifenilmetano que tem um amplo espectro de atividades fúngicas e ectoparasiticida, que é utilizado como um composto eficaz no tratamento de infecções externas por fungos e protozoários em peixe (Mitrowska e Posyniak, 2004). No entanto, foi relatado que o VM e seu metabolito VLM são teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos para os humanos, tendo sido listado como um fármaco proibido para a aquicultura em vários países

(Li *et al.*, 2017). O VM é um corante de fácil acesso, pouco dispendioso e é conhecido pela sua eficiência na prevenção e tratamento de infeções em peixe e a sua aplicação tem sido efetuada no mundo inteiro (Li *et al.*, 2017).

Os corantes trifenilmetano são um grupo de corantes orgânicos muito utilizados na indústria para tingir lã, seda, náilon, couro e papel (Oplatowska *et al.*, 2011).

2.7.1.1 – Legislação

Segundo a EFSA (2016), o VM é utilizado em todo o mundo como agente terapêutico em aquacultura, mas não é autorizado na produção de alimentos e derivados de animais destinados ao consumo humano na UE. Por esse motivo, é preciso fazer uma vigilância continuada do peixe, crustáceo e produtos de peixe, visto que, já foram encontrados resíduos do VM e de seu metabólito VLM nos produtos de aquacultura em programas de vigilância nos Estados-Membros da UE (EFSA, 2016a).

Na Tabela 5, é indicada o LMDR que foi estabelecido para controlar o VM e o VLM em produtos de aquacultura, onde o LMDR é usado como ponto de referência para ação (RPA), que tem de ser baixo o suficiente para que não cause problemas na saúde dos consumidores (EFSA, 2016b).

O LMDR é o conteúdo mínimo de um analito a analisar numa amostra, que pelo menos deve ser detetado e confirmado e tem como objetivo harmonizar o desempenho analítico de métodos em relação as substâncias para as quais não tem estabelecido um limite permitido (EFSA, 2013). Os LMDRs foram adotados como padrão de desempenho garantindo o controle efetivo da legislação Comunitária ao testar amostras para a presença de certas substâncias não permitidas. Porém, os LMDRs correspondem ao limite médio acima do qual a deteção de uma substância ou de resíduos podem ser interpretados como metodologicamente significativos (EFSA, 2013).

Tabela 5. LMDR estabelecido para controlar o VM e VLM. Adaptado de (EFSA, 2016b)

Substância e/ou metabólito	Matrizes	LMDR
Somatório de verde de malaquite e de verde de leucomalaquite	Carne dos produtos de aquacultura	2 µg/kg

2.7.1.2 – Características físicas e químicas

O VM e o seu metabolito VLM são idênticos na sua fórmula molecular, onde o VM tem o mesmo número de carbono (23) que o VLM, diferenciam-se apenas em um átomo de hidrogénio, ficando o VM com 25 e o VLM com 26, mantendo o mesmo número de Azoto tanto no VM como no VLM. O peso molecular tem uma ligeira diferença entre o VM e VLM, de 329,45 g/mol para 330,47 g/mol. Quanto ao ponto de fusão é aproximadamente 159 °C para o VM e aproximadamente 100-102 °C para o VLM. O VM é solúvel em água a 110 g/l e o VLM é ligeiramente solúvel em água. Na Figura 8 e 9 está representado as fórmulas estruturais do VM e do VLM. Na Tabela 6, está referenciado os usos legais e ilegais do VM em diversos setores da indústria (BfR, 2008).

Nome comum: Verde de malaquite

Nome químico (IUPAC): 4 - [(4-dimetilaminofenil) – fenil-metil] – N, N-dimetil-anilina

Fórmula molecular: C₂₃H₂₅N₂

Peso molecular: 329,45 g/mol

Ponto de fusão: ~ 159 °C (forma de oxalato)

Solubilidade em água e solventes orgânicos: 110g/l H₂O (24 °C)

pKa: 6.9

Fórmula estrutural:

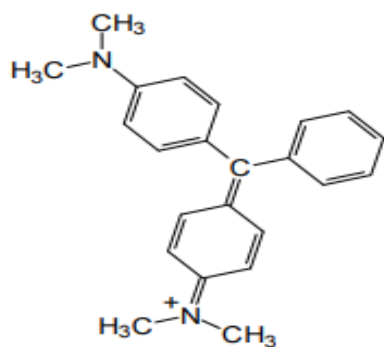


Figura 8. Estrutura química do VM. Adaptado de (BfR, 2008)

Quimicamente o VM é utilizado como um corante de trifenilmetano (C₂₃H₂₆N₂O, Cl 42.000). É verde escuro, sólido e cristalino e é preparado por condensação de uma parte de benzaldeído com duas partes de diemtilanilina na presença de ácido sulfúrico concentrado ou cloreto de zinco (Srivastava, Sinha e Roy, 2004e).

Tabela 6. Usos legais e ilegais do VM. Adaptado de (BfR, 2008)

Usos legais (não proibidos)	- Medicamento veterinário em aquacultura em peixes ornamentais.
	- Corante em produtos de consumo: seda, couro e papel.
	- Mancha biológica.
	- Ganho médio para detetar sangue latente na medicina legal.
Usos ilegais	- Medicamento veterinário em aquacultura em peixes de consumo humano.
	- Corante em alimentos: doce.

Nome comum: Verde de leucomalaquite

Nome químico (IUPAC): 4, 4'-Benzilidenebis(N,N-dimetilanilina)

Fórmula molecular: C₂₃H₂₆N₂

Peso molecular: 330,47 g/mol

Ponto de fusão: ~100-102 °C

Solubilidade em água e solventes orgânicos: ligeiramente solúvel em água

pKa: não tem

Fórmula estrutural:

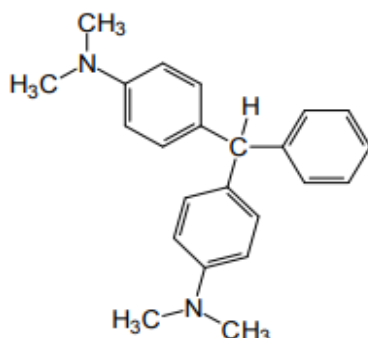


Figura 9. Estrutura química do VLM. Adaptado de (BfR, 2008)

2.7.1.3 – Metabolização e distribuição do VM em peixe

O VM é utilizado para tratar e prevenir doenças infecciosas por fungos e parasitas, é reduzido a VLM e acumula-se nos tecidos do peixe exposto (Srivastava, Sinha e Roy, 2004). O VM armazena-se no fígado, no músculo, no soro, pele e vísceras do peixe (Srivastava, Sinha e Roy, 2004). Segundo Alderman (1992) o VM é absorvido por todos os peixes e a acumulação de resíduos no peixe é considerável e o do corante é muito persistente (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

2.7.1.4 – Toxicidade do VM em peixe

O VM é muito persistente no ambiente e tóxico para uma ampla gama de animais aquáticos e terrestres. As observações clínicas e experimentais relatadas até agora revelam que o VM é tóxico para múltiplos órgãos. Diminui a ingestão de alimentos, taxas de crescimento e fertilidade; causa danos no fígado, baço, rins e coração; inflige lesões na pele, olhos, pulmões e ossos (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

O VM tem sido utilizada de uma forma alargada como fungicida e ectoparasiticida na aquicultura em todo mundo desde 1936. A sua utilização é para prevenir o crescimento excessivo de fungos em peixe e ovos de peixe, como profilaxia e terapia pós-infecção (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

Foram feitos alguns estudos e estimados valores da concentração letal para 50% da população (LC50) em peixe. Estes dados mostram-nos a influência de vários fatores, como a dureza, o pH, a temperatura, o oxigénio dissolvido da água e o tempo de exposição, na toxicidade em diferentes espécies de peixe (Srivastava, Sinha e Roy, 2004). Um estudo feito por Bills *et al.* (1977) sobre os valores de LC50 do VM em peixe adulto e alevinos de muitas espécies, verificou os efeitos do tempo de exposição, da temperatura e do pH em relação à toxicidade desse corante, onde mostra que a toxicidade de VM aumenta com o aumento da temperatura. Estudos feitos por Srivastava *et al.* (1995a) detetaram alterações nos valores de LC50 do VM em peixe-gato de água doce e afirmou que a toxicidade aumenta com o tempo de exposição (Tabela 7) (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

Vários estudos feitos em relação ao VM, mostraram que este corante tem uma toxicidade elevada para o peixe de água doce, tanto para exposições agudas como para exposições crónicas (Srivastava, Sinha e Roy, 2004). Na truta arco-íris foi utilizado o VM para tratamento e foi descrito que é carcinogénico, mutagénico, provoca fraturas cromossómicas, teratogenicidade e reduz a fertilidade (Srivastava, Sinha e Roy, 2004). O VM atua também na parte respiratória do peixe (como por exemplo a truta arco-íris e tilápia do nilo) causando desconforto respiratório (Srivastava, Sinha e Roy, 2004).

Tabela 7. Valores de LC50 do VM em muitas espécies de peixe. Adaptado de (Srivastava, Sinha e Roy, 2004)

Peixe	LC50 (mg/l)	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
De Bills et al. (1977) Peixe adulto de brânquia azul do sol (<i>Iepormis macrochirus</i>)	2,0 7,430 2,19	8,0 6,5 7,5	12 12 12	3 3 6
Peixes alevinos* Peixe-gato-do-canal (<i>Ictarulus punctatus</i>)	0,238 0,960 0,4 0,519 1,72 1,3 0,286	7,5 7,5 7,5 9,5 8,0 8,0 8,0	22 12 22 12 12 12 12	6 6 6 6 6 6 24
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1,4 2,35 6,8	7,5 8,0 8,0	12 12 12	3 3 6
Robalo (<i>Micropterus dolomieu</i>)	0,154 0,0453	7,5 7,5	12 12	24 96
<i>Micropterus salmoides</i>	0,282 0,0728	7,5 7,5	12 12	24 96
Salmão coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	3,0 0,569 0,383	7,5 7,5 7,5	12 12 12	6 24 96
Salmão do Atlântico (<i>Salmo solar</i>)	3,560 1,090 0,497 0,283	7,5 7,5 7,5 7,5	12 12 12 12	3 6 24 96
Truta (<i>Salmo trutta</i>)	1,730 1,270 0,352 0,237	7,5 7,5 7,5 7,5	12 12 12 12	3 6 24 96
Camarão de água doce (<i>Palaemonetes kadiakensis</i>)	9,1 1,9	7,5 7,5	16 16	24 96
De Srivasta et al (1995a) Peixe-gato de água doce (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	5,60 1,40 1,25 1,0	7,7 7,7 7,7 7,7	22 22 22 22	24 48 72 96

“*Os peixes juvenis começam como ovos que eclodem em larvas, depois desenvolvem escamas e barbatanas de trabalho. A transição para um peixe juvenil é completa e designa-se de alevinos”.

2.7.1.5 – Toxicidade do VM e do VLM nos humanos

O uso do VM em aquacultura é problemático por ser um composto que apresenta sérios riscos para a saúde dos consumidores de peixe que foram tratados com esse composto (Stammati *et al.*, 2005c). O VM e o VLM podem ser carcinogénico e genotóxico para o homem (Stammati *et al.*, 2005d).

O painel de peritos em contaminantes da EFSA (CONTAM) calculou a hipotética exposição alimentar crónica humana utilizando o valor de ponto de referência para ação (RPA) de 2 µg/kg para todos os tipos de peixe, produtos de peixe e crustáceo (excluindo moluscos aquáticos) e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Todas as referências à “exposição dietética” não são baseadas em dados de ocorrência real, mas referem-se à exposição alimentar crónica hipotética com base no valor de RPA (EFSA, 2016).

A exposição alimentar média e a exposição alimentar para o percentil 95 (P95) de VM e VLM foram calculadas separadamente para cada pesquisa e faixa etária, utilizando os dados de consumo registados no banco de dados (EFSA, 2016).

No grupo de bebés, a mediana da exposição dietética ao VM e VLM para consumidores médios foi de 0,4 ng/kg de peso corporal (pc)/dia. Para o grupo das crianças pequenas, foi de 1,2 ng/kg de pc /dia. A exposição dietética para grandes consumidores variou de 1,4 ng/kg de pc /dia no grupo dos bebés a 5,5 ng/kg de pc /dia no grupo das crianças pequenas. A exposição alimentar máxima para os consumidores médios foi observada no grupo de crianças, embora a exposição alimentar máxima para consumidores elevados tenha sido observado em outro grupo de crianças (EFSA, 2016).

Ainda foi observado através do painel CONTAM, que para o outro grupo de crianças, a diferença entre o máximo e a mediana e para a exposição dietética de percentil 95 é substancial, visto que, leva-se em consideração os diferentes níveis de consumo de peixe e produtos de pesca entre as duas faixas etárias, bem como a faixa etária de cada uma delas. No grupo de crianças pequenas, entre os 12 meses e 36 meses de idade, não há grande diferença entre o consumo na média e no percentil 95, pois o consumo de peixe e produtos de peixe é relativamente baixo na faixa etária coberta por este grupo. O grupo de crianças cobre uma faixa etária mais ampla, entre os 36 meses e os 10 anos, e é por isso que diferentes níveis de consumo de peixe e produtos de peixe podem ocorrer, por exemplo, em uma criança de 3 a 9 anos de idade. (EFSA, 2016).

Os RPAs devem ser baixos o suficiente para excluir riscos à saúde dos consumidores. O parecer científico da EFSA, identificou uma abordagem para estabelecer RPAs para várias

categorias de substâncias farmacologicamente ativas não permitidas. Assumindo que os resíduos de VM e VLM estariam presentes apenas em peixe e crustáceo, esta orientação levaria a um chamado limite de quantificação baseado em toxicologia (TB LOQ) de 0,15 ou 0,30 µg/kg de alimento (crianças ou adultos respectivamente) como base para o estabelecimento de um RPA. Este TB LOQ está abaixo do RPA atual de 2 µg/kg e abaixo dos limites de quantificação (LOQs) que são atualmente alcançáveis por métodos analíticos usados na monitorização de rotina. Uma avaliação de risco específica é necessária e a CE pediu à EFSA para avaliar se o RPA existente de 2 µg/kg para o volume de VM e VLM é adequado para proteger a saúde pública (EFSA, 2016).

Para humanos, houve um caso de metahemoglobinemia em uma menina de 3 anos após uma exposição aguda a VM (cerca de 2,6 µg/kg de pc) através de um produto de peixe de aquário contendo 0,075% de VM (EFSA, 2016).

O painel CONTAM selecionou o limite de confiança de 95% para uma resposta de 5% de risco extra (BMDL05) de 6 µg/kg de pc/dia como um ponto de referência para os efeitos de VM e VLM em indivíduos não neoplásticos (EFSA, 2016).

Devido aos dados de ocorrência limitados para VM e VLM, nenhuma avaliação de exposição humana confiável pode ser realizada e portanto, o painel CONTAM não pode caracterizar o risco (EFSA, 2016).

O painel CONTAM avaliou se um RPA de 2 µg/kg para a soma de VM e o VLM é adequado para proteger a saúde pública. Para o consumidor médio, a mediana da exposição alimentar crônica hipotética a VM e VLM em pesquisas dietéticas resultaria em margens de exposição (MOEs) para efeitos neoplásticos de cerca de $1,1 \times 10^7$ para crianças e $2,2 \times 10^7$ para adultos e em MOEs para efeito não neoplásticos de cerca de $40,8 \times 10^6$ para crianças e $9,7 \times 10^6$ para adultos. Foi considerado que esses MOEs para efeito neoplásticos e não neoplásticos são suficientemente grandes e não indicam um problema de saúde, ou seja, o painel CONTAM concluiu que é improvável que a exposição a alimentos contaminados com VM e VLM em ou abaixo do RPA de 2 µg/kg represente um problema à saúde (EFSA, 2016).

Tabela 8. Estatísticas resumidas^(a) para a exposição alimentar crônica hipotética (ng/kg pc/dia) de VM e VLM realizado de acordo com a classe de idade^(b). Adaptado de (EFSA, 2016)

Classe de idade (faixa etária)	Número de pesquisa	Exposição dietética crônica hipotética		
		Mínimo	Mediana	Máximo
Médias				
Bebês (< de 12 meses de idade)	6	0,1 ^(d)	0,4	1,1
Crianças (≥ 12 meses a < 36 meses de idade)	10	0,5	1,2	5,0
Outras crianças (≥ 36 meses a < 10 anos de idade)	18	0,3	1,1	2,7
Adolescentes (≥ 10 anos a < 18 anos de idade)	17	0,2	0,6	1,5
Adultos (≥ 18 anos a < 65 anos de idade)	17	0,2	0,6	1,9
Idosos (≥ 65 anos a < 75 anos de idade)	14	0,1	0,7	1,9
Muito idosos (≥ 75 anos de idade)	12	0,1	0,7	1,8
Percentil 95^(c)				
Bebês (< de 12 meses de idade)	5	0,0 ^(d)	1,4	5,8
Crianças (≥ 12 meses a < 36 meses de idade)	7	3,3	5,5	6,2
Outras crianças (≥ 36 meses a < 10 anos de idade)	18	2,3	4,7	9,1
Adolescentes (≥ 10 anos a < 18 anos de idade)	17	1,6	2,7	5,7
Adultos (≥ 18 anos a < 65 anos de idade)	17	1,6	3,0	4,9
Idosos (≥ 65 anos a < 75 anos de idade)	14	1,2	2,9	5,2
Muitos idosos (≥ 75 anos de idade)	9	1,1	2,7	3,6

Legenda - pc: peso corporal

Para evitar a impressão de que uma precisão muito alta está sendo utilizada, os números de todas as estimativas de exposição foram arredondados para dois valores.

(a): são apresentados os valores mínimo, mediano e máximo da exposição média e do percentil 95 em inquéritos alimentares em países europeus.

(b): Este cenário contém todos os tipos de peixe, produtos de peixe e crustáceo (exceto moluscos aquáticos) que estão contaminados com VM e VLM em uma concentração igual ao ponto de referência para ação de 2 µg/kg.

(c): As estimativas do percentil 95 obtidas em pesquisas dietéticas / classe de idade com menos de 60 observações podem não ser estatisticamente robustas (EFSA, 2011a), portanto não estão incluídas nesta tabela.

(d): O mínimo mais baixo para a exposição do percentil 95 em comparação com o mínimo para a exposição média é devido a um número muito baixo de bebês (<5%) consumindo uma grande quantidade de peixe em uma pesquisa, resultando que, a média seja mais alta que o percentil 95 nessa pesquisa.

2.7.1.6 – Ocorrência do VM em tecido de peixe na UE e em outros países

Podem ser utilizados alguns métodos descritos para a determinação de VM e VLM em uma variedade de matrizes, como a cromatografia líquida com detecção UV-Vis ou detecção eletroquímica, mas alguns novos procedimentos analíticos utilizam a detecção por espectrometria de massa para confirmação de resultados (Mitrowska e Posyniak, 2004).

O Sistema Europeu de Alerta Rápida para Alimentos e Rações (RASFF) regista todos os anos notificações sobre a presença de VM e VLM em peixe de aquacultura para consumo humano. Em geral, os peixes contaminados são a truta, o salmão, a bagre, a enguia e o pangásio provenientes principalmente da China, Tailândia, Indonésia e Vietname (Oplatowska *et al.*, 2011).

Resíduos de VM e de VLM foram detetados em produtos de aquacultura através de programas de monitorização dos Estados Membros da UE. Para realizar os testes do VM e do VLM em alimentos de origem animal foi necessário realizar amostragem de alimentos e de materiais relacionados, seguindo o contexto dos planos nacionais de monitorização de resíduos conforme a Diretiva do Conselho 96/23/CE e utilizando as metodologias analíticas seguindo os critérios da Decisão da Comissão 2002/657/CE para métodos de triagem e confirmação (EFSA, 2016).

Segundo os planos nacionais de monitorização de resíduos, entre os anos 2002 e 2014, foram analisadas 21.000 amostras provenientes da aquacultura (variando de pelo menos 860 a 2600 por ano) para determinar se há presença do VM e do VLM em todos os Estados membros e na Noruega. Foram relatadas 548 (2,6%) amostras não-conformes para VM e VLM. As amostras não-conformes foram distribuídas ao longo dos anos, como se vê na Figura 10. O maior número de amostras não-conforme (que contêm VM ou VLM) foi relatada em 2006 (EFSA, 2016).

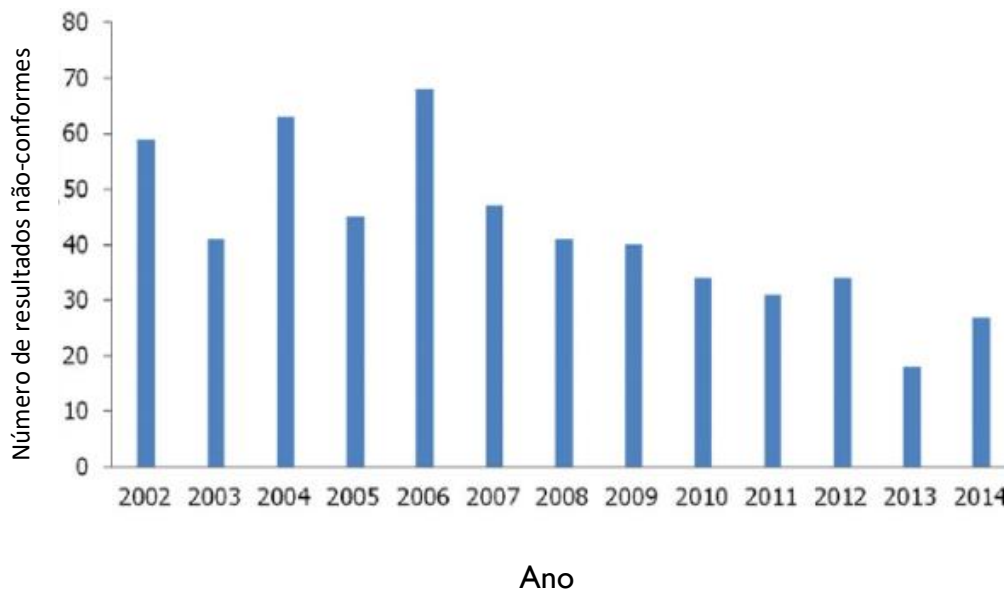


Figura 10. Número de resultados não-conformes para VM e VLM em produtos de aquacultura entre os anos de 2002 e 2014. Adaptado de (EFSA, 2016)

Segundo o banco de dados do RASFF, foram relatadas 135 notificações de eventos do VM e do VLM em produtos alimentícios entre os anos de 2002 e 2014, como se vê na Figura 11. As categorias de produtos incluídos nesses relatos foram peixe e produtos de peixe, crustáceo e produtos de crustáceo, peixe de cultivo e produtos derivados (exceto crustáceos e moluscos). Foram relatados 50 notificações em 2005, o maior número relatado (EFSA, 2016).

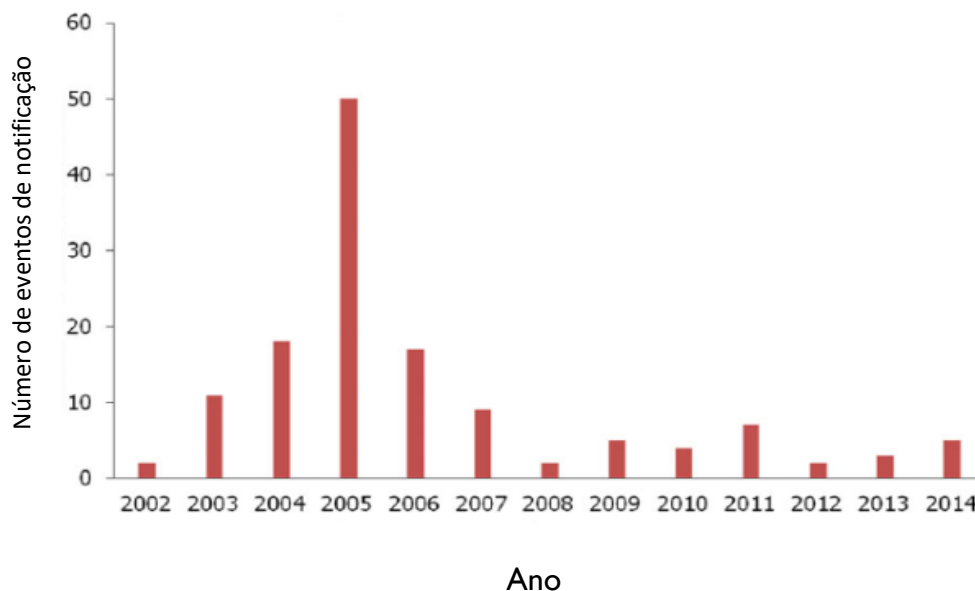


Figura 11. Número de eventos de notificação no RASFF do VM e VLM em peixes e produtos de peixe entre os anos de 2002 e 2014. Adaptado de (EFSA, 2016)

Ao longo dos anos e em vários países do mundo, foram realizados estudos para detetar resíduos do VM e do VLM em peixe de aquacultura (Tabela 9).

Na Croácia, um total de 72 amostras de tecidos musculares foram analisadas durante um período de três anos (2009 e 2011) para detetar a presença de resíduos de VM, 42 carpas (*Cyprinus carpio*) e 30 trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) de pisciculturas. Foi detetado o VM em 13 amostras, mas em concentrações abaixo de LMDR de 2 µg/kg.

Em Itália em 2013, analisaram 15 amostras de robalo e 15 amostras de dourada e foram detetadas concentrações até 1,21 µg/kg, com uma concentração média de 0,48 µg/kg (EFSA, 2016).

Na Holanda, em 2003 analisaram 18 amostras de trutas, 10 amostras de enguias e 20 amostras de salmão para presença de resíduos do VM e VLM. Foi detetado VLM em 72% (13) das amostras de trutas com concentrações entre 1,3 e 14,9 µg/kg. Em 50% (5) amostras de enguia verificaram-se concentrações de 1,5 a 9,7 µg/kg e em 15% (3) amostras de salmão com concentrações de 0,2 a 2,9 µg/kg (EFSA, 2016).

Na Alemanha, em 2008 analisaram 45 amostras de enguias e foi encontrado resíduos de VM em 56% (25) amostras com concentrações de 0,053 a 0,765 µg/kg (EFSA, 2016).

Na Bélgica, em 2000 e 2009 analisaram 91 amostras de enguias europeias e 1 amostra de enguia, onde o VM e VLM foram detetados em 74,8% e 25% das amostras com concentrações de 9,61 e 0,96 µg/kg e concentrações médias de 0,56 e 0,07 µg/kg (EFSA, 2016).

No Irão, em 2011 foram testadas 144 amostras de truta arco-íris para analisar a presença de VM e VLM. Foram encontrados resíduos de VM e VLM em 49% das amostras com concentrações de 0,3 a 146,1 µg/kg e em 33% das amostras o nível igual ou superior ao LMDR (EFSA, 2016).

Na Austrália, foram analisadas 60 amostras de peixes de criação locais e importados e foi detetado VLM em 10 amostras e VM em 2 amostras. A concentração mais alta detetada de VLM foi de 880 µg/kg em peixes importados do Vietname (EFSA, 2016).

No Reino Unido, de 2001 a 2010, foram encontrados níveis de resíduos do VM e VLM em amostras de peixes (Bilandžić *et al.*, 2012f). Em 2001, em 99 amostras testadas de salmão e trutas de aquacultura foram encontradas 16 amostras com resíduos do VM e VLM. Em 2002, em 141 amostras testadas de salmão e truta de aquacultura foram encontradas 14 amostras com resíduos de VM e VLM, enquanto que em 2003, em 168 amostras testadas de salmão e truta de aquacultura foram encontradas 7 amostras com resíduos de VM e VLM, as concentrações não foram fornecidas (Bilandžić *et al.*, 2012g).

Devido à toxicidade do VM e do VLM no homem o seu uso foi proibido em diversos países, mas ainda continua a ser utilizado, nomeadamente, por ter um custo baixo, por ter uma boa disponibilidade e por ser eficaz (Stammati *et al.*, 2005e).

Mesmo sendo proibido a comercialização do VM na medicina veterinária na UE, os seus resíduos foram encontrados em quase todos os países. Por esse motivo, a vigilância do peixe e produtos de pesca deve ser apertada, especialmente para o peixe e produtos de pescados provenientes da Ásia (Bilandžić *et al.*, 2012).

Tabela 9. Ocorrência do VM e VLM em peixe de aquacultura. Adaptado de (Bilandžić *et al.*, 2012) e (EFSA, 2016)

Espécie de peixe	Ano de estudo	País de origem	Número de amostras	Percentagem (%) de contaminação	Intervalo das concentrações	Média das concentrações	Referência bibliográfica
Carpas e Trutas	2009 - 2011	Croácia	72	18,1% (13)	0,1 a 0,3 µg/kg	0,231 µg/kg	(Bilandžić <i>et al.</i> , 2012)
Robalos	2013	Itália	15	Nf	Até 1,21 µg/kg	0,48 µg/kg	(EFSA, 2016)
Douradas			15	Nf			
Trutas	2003	Holanda	18	72% (13)	1,3 a 14,9 µg/kg	Nf	(EFSA, 2016)
Enguias			10	50% (5)	1,5 a 9,7 µg/kg	Nf	
Salmão			20	15% (3)	0,2 a 2,9 µg/kg	Nf	
Enguias Silvestres	2008	Alemanha	45	55,6% (25)	0,053 a 0,765 µg/kg	Nf	(EFSA, 2016)
Enguias selvagens	2000 - 2009	Bélgica	91	74,8%	9,61 µg/kg	0,56 µg/kg	(EFSA, 2016)
Enguia			1	25%	0,96 µg/kg	0,07 µg/kg	
Trutas arco-íris	2011	Irão	144	49%	0,3 a 146,1 µg/kg	Nf	(EFSA, 2016)
Salmão e Trutas	2001	Reino Unido	99	16,2% (16)	Nf	Nf	(Bilandžić <i>et al.</i> , 2012)
	2002		141	9,92% (14)	Nf	Nf	
	2003		168	4,2% (7)	Nf	Nf	

Nf – Não fornecido

2.8 – Metodologias analíticas para determinação de VM e de VLM

A proibição do uso do VM em peixe estimulou o desenvolvimento de um programa de controle que exige um método analítico robusto e confiável para a determinação de resíduos de VM e seu metabolito VLM nos tecidos de peixe (Mitrowska e Posyniak, 2004).

Geralmente os métodos utilizados para a detecção do VM em produtos aquáticos são a cromatografia líquida de alto desempenho (LC), cromatografia líquida de alto desempenho-espectrometria de massa (LC-MS). Estas metodologias apresentam algumas desvantagens como instrumentos caros, demoradas e operações complicadas (pré-tratamento de amostra complexa). Para a detecção do VM e do VLM em amostras do tecido de peixe e água deve-se estabelecer um método rápido, específico e preciso, como o método de ELISA. Esta metodologia pode ser utilizada para detetar o VM em rações, peixe e água para aquicultura (Li *et al.*, 2017).

2.8.1 – Metodologia de ELISA

Uma vez que o uso de antimicrobianos na aquicultura ainda é amplamente utilizada resíduos não regulamentados, principalmente em produtos provenientes de países asiáticos e sul-americanos, podem ser encontrados em alimentos para animais e peixe. Portanto, o ELISA é um método prático, sensível e específico para fins de vigilância e este tipo de metodologia carece de confirmação dos resultados, muitas vezes por LC/MS (Oliveri Conti *et al.*, 2015).

O ELISA é um método comumente usado para a detecção de resíduos de fármacos, pesticidas, toxinas biológicas e patogênicos, incluindo o VM em alimentos devido à alta sensibilidade inerente, simplificação, produz resultados rapidamente e de baixo custo. No entanto, este método tem algumas desvantagens em relação ao anticorpo biológico exigidos no ELISA, como o longo período de preparação (processo de preparação complexo), instabilidade e a impossibilidade de reutilização (Li *et al.*, 2017).

O método de ELISA utiliza um antígeno que está ligado a uma fase sólida, onde se utiliza tubos e microplacas de poliestireno rígido, polivinilo e polipropileno. As microplacas utilizadas devem ser capazes de adsorver adequadamente o antígeno e o anticorpo, mas não pode adsorver os componentes das outras fases (Aydin, 2015).

Os métodos de imunensaio enzimático são considerados como homogêneos e heterogêneos. Nos métodos de imunensaio enzimático homogêneo, as enzimas tornam-se inativadas quando se ligam ao anticorpo e, portanto, não há uma etapa (lavagem) em que o

antígeno seja separado do meio. Porém, é geralmente utilizado para medir pequenas quantidades de substâncias, como fármacos e é um método caro e de baixa sensibilidade, mas com uma vantagem na sua facilidade de uso (Aydin, 2015).

Enquanto que, nos métodos de imunoenensaio enzimático heterogéneo são mais comumente usados por serem mais sensíveis que o homogéneo. Neste método, a fim de evitar a interferência de qualquer molécula no meio com ele após a ligação do antígeno e do anticorpo, o complexo antígeno-anticorpo é ligado às paredes dos tubos de experimento e qualquer interferência que não seja o complexo é removido do meio através de procedimentos de lavagem, o que quer dizer que nestes métodos é essencial ter uma etapa de lavagem para separar o antígeno ligado do antígeno livre após a interação antígeno-anticorpo (Aydin, 2015).

ELISA é uma técnica de imunoenensaio heterogénea utilizada para detetar anticorpos específicos e antígenos solúveis. Visto que, as estruturas e as características das substâncias a serem medidas não são sempre as mesmas foi preciso desenvolver uma variedade de tipos de ELISA para aumentar a especificidade da medição (Aydin, 2015).

Foram desenvolvidas muitas técnicas de cromatografia líquida para a deteção de trifenilmetano em produtos do mar, onde podemos analisar o VM e o VLM separadamente ou como VM total após a conversão da forma leuco à cromática por oxidação. (Oplatowska *et al.*, 2011).

A espectrometria de massa, os detetores UV/vis e fluorescentes são amplamente utilizada como tecnologia de confirmação e deteção. O ELISA pode ser uma alternativa aos métodos cromatográficos, principalmente para a triagem de grande número de amostras, devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade (Oplatowska *et al.*, 2011).

2.9 – Comparação entre metodologias analíticas

Foram propostas muitas estratégias sofisticadas para a deteção do VM, como os métodos baseados em cromatografia, métodos baseados em espectroscopia de massa, métodos baseados em imunidade ligada a enzimas e métodos baseados em espectroscopia. Porém os métodos cromatográficos são muito sensíveis, alta precisão, e são amplamente utilizados em laboratórios como métodos padrão (Ouyang *et al.*, 2018).

Segundo o padrão nacional Chinês GB/T19857-2005, o VM e seu metabolito VLM são detetados após a separação por LC juntamente com a derivatização, que apresenta um limite de deteção (LOD) de 2 µg/kg e se for combinado com a espectrometria de massa, o LOD pode diminuir para 0,5 µg/kg. Visto que é, necessário o uso de instrumentos dispendiosos e

procedimentos de pré-tratamento muito exigentes, esses métodos não são muito apropriados para a inspeção rápida de VM. Nesse caso o método mais adequado para a detecção de VM e VLM é o método de ELISA, que é um método simples e seletivo muito utilizado para a inspeção rápida (Ouyang *et al.*, 2018).

O ensaio imunoenzimático tem por objetivo quantificar e verificar a presença de antígeno ou anticorpos, onde os resultados do teste podem ser enquadrados em duas categorias, o quantitativo e o qualitativo. Nos quantitativos, onde ocorre a quantificação da concentração da amostra em análise em Densidade Ótica (DO) e os resultados são expressos em Unidade Arbitrária (UA), Unidades Internacionais (UI) ou Unidades (U). Enquanto que, os resultados qualitativos são classificados como positivos ou negativos e reagentes ou não reagentes, considerando os valores da absorbância por Densidade Ótica ou a coloração da reação final (ROCHA, 2016).

3. Procedimento Experimental

3.1 – Reagentes e soluções

a) Solventes utilizados

- Acetonitrilo (ACN)
- N-hexano
- Diclorometano
- Água purificada (Milli-Q)

b) Kit ELISA (Figura 12)

- Concentrado de tampão de extração de amostra A
- Tampão de extração de amostra B
- Tampão de extração de amostra D
- Solução de lavagem
- Diluente de conjugado VM-Botina
- Conjugado de VM-Botina
- Estreptavidina-HRP
- Diluente de Estreptavidina-HRP
- Substrato TMB
- Solução de paragem/Stop
- Solução oxidante
- Padrão de Controle

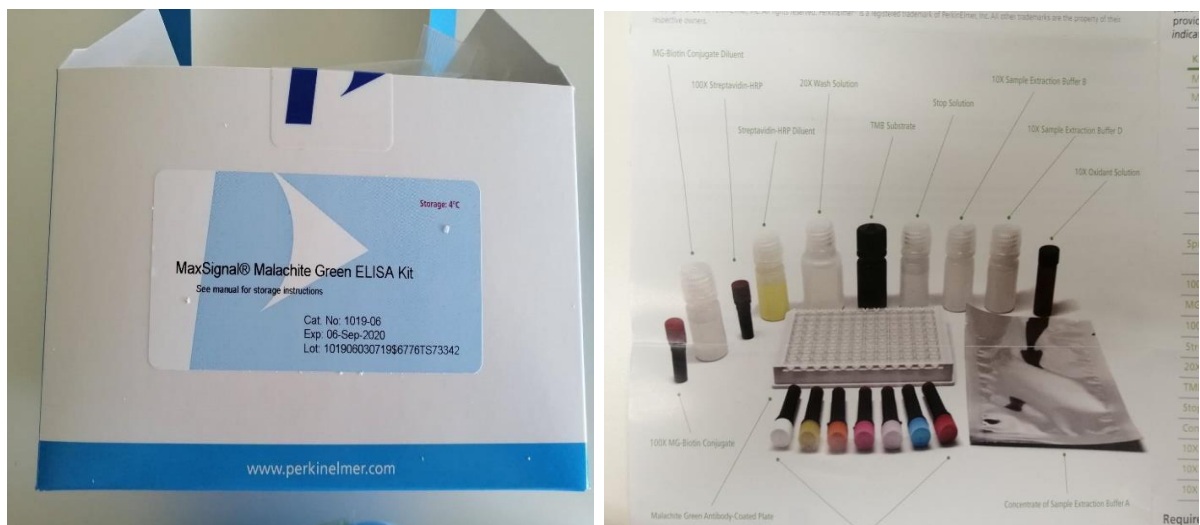


Figura 12. Componentes do Kit ELISA

3.2 – Materiais utilizados e equipamentos no procedimento experimental

- Espátula
- Sacos de plásticos
- Pinças
- Balança analítica de precisão (Mettler Toledo, - PB303-S/FACT)
- Pipetas Gilson
- Tubos de ensaio
- Trituradora Krups (GVA2 Speedy Pro Plus)
- Agitador Vortéx (VELP, Zx3)
- Centrifugadora (SIGMA, 3-16k)
- Frigorífico (5°C)
- Arca congeladora (-18°C)
- Bacia
- Copos de precipitação
- Parafilm
- Evaporador para concentrar amostras (Stuart, SBH 200D/3)
- Bloco de aquecimento para concentrar amostras (Stuart, SBHCONC/1)
- Espectrofotómetro para ler as placas de ELISA – optic ivymensystem 2100-C
- Equipamento Milli-Q para produção de água purificada

3.3 – Amostras

Foram adquiridas 28 amostras de peixe em diversas superfícies comerciais de Coimbra, provenientes de aquacultura de diversos países de Europa, nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2019. Esta amostragem incluiu robalos, douradas, salmões e trutas salmonadas, com origem em Portugal, Turquia, Espanha, Grécia e Noruega. Depois de adquiridas, as amostras foram identificadas, cortadas em filetes, trituradas e congeladas até o dia da análise.

Na Tabela 10, está representado espécies de peixe adquiridas, os países de origem, local de compra e data de aquisição.

Tabela 10. Lista das amostras

Mês de outubro			
Espécie	País de origem	Local de compra	Data de aquisição
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Turquia	Pingo doce	23/10/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	Auchan	24/10/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha	Continente	25/10/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Portugal	Pingo doce	23/10/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	Continente	25/10/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	Pingo doce	28/10/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Auchan	24/10/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Portugal	Pingo Doce	28/10/2019
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	Pingo Doce	23/10/2019
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal	Pingo doce	08/10/2019
Mês de novembro			
Espécie	País de origem	Local de compra	Data de aquisição
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Turquia	Auchan	13/11/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	Pingo Doce	13/11/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha	Pingo doce	13/11/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Portugal	Auchan	13/11/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	Auchan	13/11/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Pingo Doce	14/11/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Pingo doce	26/11/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Continente	19/11/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Espanha	Pingo Doce	13/11/2019
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	Auchan	13/11/2019
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	Continente	14/11/2019
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal	Auchan	13/11/2019
Mês de dezembro			
Espécie	País de origem	Local de compra	Data de aquisição
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Turquia	Auchan	10/12/2019
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	Auchan	10/12/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Auchan	10/12/2019
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	Auchan	10/12/2019
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	Auchan	10/12/2019
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	Auchan	10/12/2019

3.4 – Metodologia analítica

Neste trabalho foi implementado a metodologia de ELISA, que é um teste rápido, pouco dispendioso, sensível, preciso e o mais indicado para a deteção do VM e do VLM em peixe de aquacultura segundo alguns estudos. Foi utilizado o *kit* de ELISA MaxSignal Malachite Green, Cat. No: 1019-66, Exp: 06-Sep-2020 que oferece um ensaio quantitativo rápido de alto rendimento, muito específico e de fácil compreensão.

3.4.1 – ELISA – Extração

3.4.1.1 – Procedimentos prévios

Em relação ao espaço da realização do procedimento tem de se ter em conta algumas técnicas de higienização e desinfeção do espaço utilizado, dos equipamentos e dos materiais para evitar qualquer tipo de contaminação da amostra.

3.4.1.2 – Preparação da amostra/extração

- ✓ Na preparação da amostra, o peixe é cortado em filetes com uma faca bem afiada, descartando a pele e as espinhas. Depois tritura-se os filetes de forma que fica uma pasta fina para facilitar na mistura com os solventes. De seguida, coloca-se os filetes em sacos de plástico devidamente identificados com o nome e a data de aquisição do peixe e congela-se (-18°C) até a análise (Figura 13).
- ✓ Após descongelar as amostras já trituradas à temperatura ambiente, pesa-se 2 g de cada amostra, num tubo de ensaio previamente identificado, numa balança analítica. Em cada tubo de ensaio adiciona-se 0,6 ml do tampão de extração de amostra A, mais 0,4 ml do tampão de extração de amostra B e 6,5 ml de acetonitrilo (ACN) e fecha-se o tubo com uma película Parafilm. Leva-se o preparado ao vortéx em velocidade máxima durante 3 minutos para misturar bem o conteúdo dentro do tubo até que o mesmo fique homogéneo. Com uma pipeta adiciona-se para o tubo 3 ml de água e 2 ml de diclorometano e leva-se novamente ao vortéx durante 1 minuto para misturar tudo.
- ✓ Centrifuga-se a amostra por 5 minutos a 4000 g. Depois transfere-se 3 ml da camada superior de solvente orgânica para um novo tubo de vidro contendo 100 µL de solução oxidante e misture bem. Incubar as amostras à temperatura de 20-25 °C durante 25 minutos.
- ✓ Posteriormente, seca-se a amostra utilizando o evaporador fazendo passar o azoto sobre a amostra colocada no bloco de aquecimento a 60 °C por cerca de 20 minutos. Certifique-se de que a amostra esteja completamente seca antes de avançar para o próximo passo.
- ✓ Adiciona-se 2 mL de n-hexano para dissolver a amostra e 1,6 mL de tampão de extração de amostra D (acetonitrilo, 4:1, v/v) e volta novamente ao vortéx durante 1 minuto. Centrifugue a amostra por 10 minutos a 4000 g.
- ✓ Com uma pipeta, elimina-se a camada superior do n-hexano.
- ✓ No final, retire-se 90 µL da camada aquosa que ficou na parte inferior do tubo.

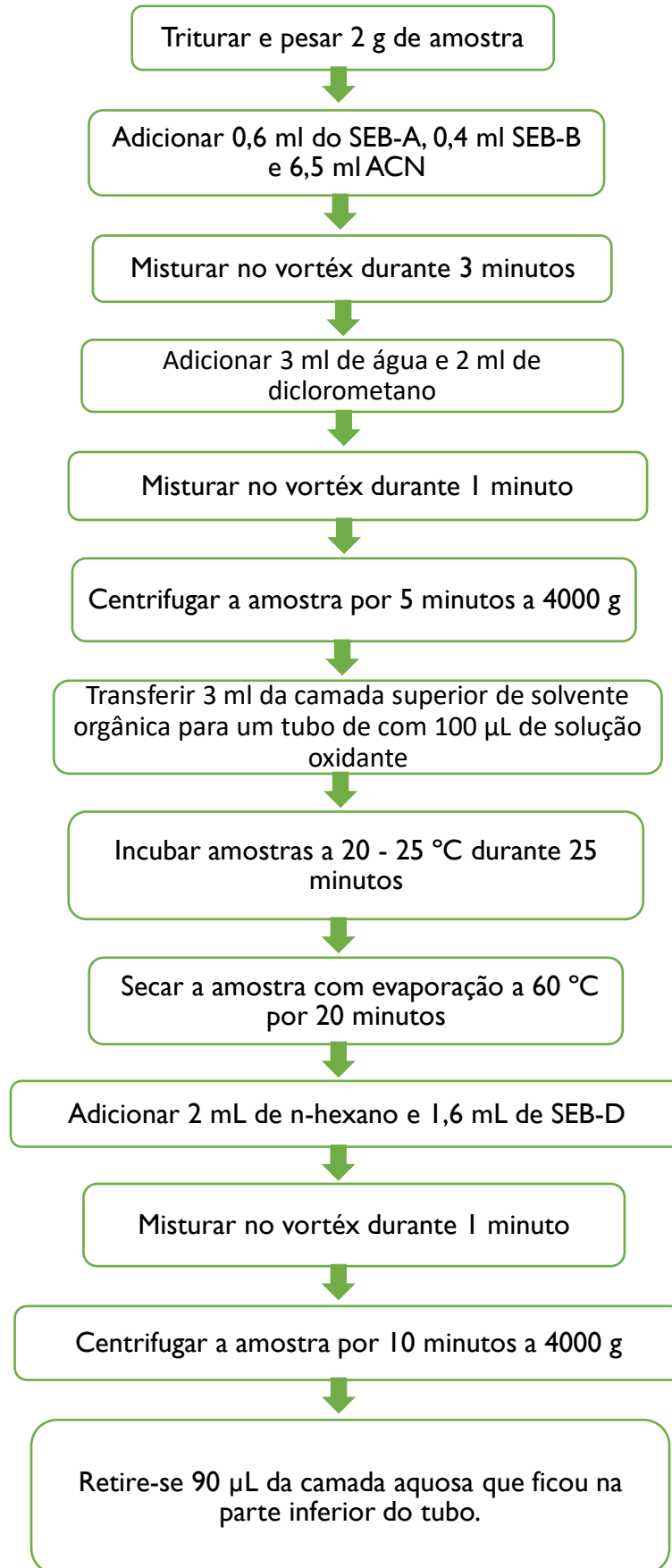


Figura 13. Etapas de extração

3.4.2 – ELISA – Detecção

Para realizar a outra parte do ensaio de ELISA foi necessário utilizar um controlo negativo e 5 padrões (0,05 ng/mL; 0,15 ng/mL; 0,5 ng/mL; 1,5 ng/mL e 4,5 ng/mL) (Figura 14).



Figura 14. Padrões utilizados

- ✓ Todos os ensaios foram feitos em duplicado, usando dois poços, utilizando uma nova ponta de pipeta para a adição de cada padrão ou amostra.
- ✓ Adicionou-se 90 μ L do controlo negativo e cada padrão aos poços (Figura 16).
- ✓ Adicionou-se 90 μ L de cada amostra aos poços restantes.
- ✓ De seguida, adicionou-se 30 μ L de anticorpo VM a cada poço.
- ✓ Misturou-se a solução nos poços durante 1 minuto utilizando um agitador de placa ou batendo levemente na placa, de modo a não permitir que nenhum líquido derrame.
- ✓ Com um papel de alumínio para ajudar a proteger da luz solar, cobriu-se a placa já com os extratos das amostras e deixou-se incubar por 30 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).
- ✓ Depois de 30 minutos, esvaziaram-se todos os poços, fez-se a lavagem dos mesmos utilizando 250 μ L de solução de lavagem preparada anteriormente, e deixou-se estar durante 15 segundos em cada poço e depois esvaziou-se completamente todos os poços da solução de lavagem, repetindo as etapas por mais 2 vezes.
- ✓ Após as três lavagens concluídas, inverteu-se a placa e bateu-se com força contra as toalhas de papel até que não haja mais solução de lavagem no interior dos poços.

- ✓ Procedeu-se a adição de 100 μ L de Estreptavidina-HRP recém preparada a cada poço, misturou-se a solução nos poços durante 1 minuto utilizando um agitador de placa ou batendo levemente na placa de forma a não permitir que derrame algum líquido. Voltou-se a cobrir com papel de alumínio e deixou-se em incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).
- ✓ Procedeu-se novamente a lavagem das placas com a solução de lavagem como feito nas etapas anteriores, repetindo o processo por mais 2 vezes e secando muito bem os poços.
- ✓ Logo em seguida, colocou-se 100 μ L de substrato TMB em cada poço, misturando a solução nos mesmos durante 1 minuto batendo levemente na placa evitando que o líquido se derrame. Cobriu-se as placas com papel alumínio, deixou-se incubar as placas durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C) no escuro.
- ✓ Após a incubação, adicionou-se 100 μ L de solução Stop a cada poço para interromper a reação do substrato, onde conseguimos observar a mudança de cor (Figura 15), possibilitando a leitura. Limpar muito bem cada poço antes da próxima etapa.

“Nota: Não se deve tocar com a ponta da pipeta no interior dos poços para evitar a contaminação destes. Se houver qualquer coloração antes da adição do substrato nos poços deve-se descartar o resultado.”

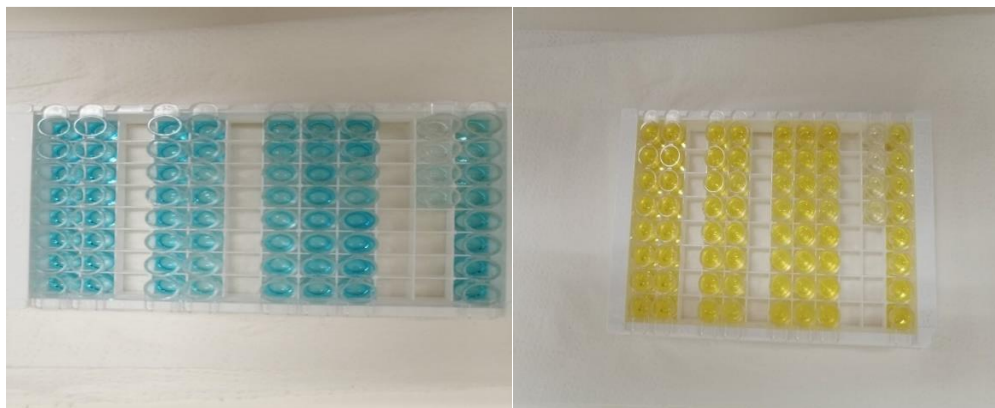


Figura 15. Detecção - ELISA

Inicialmente, foi feita a visualização do resultado dos poços diretamente através da mudança de cor (Figura 15) que depois foi transformado em valores numéricos através da leitura no espectrofotômetro. A Absorvância (ABS) para todos os ensaios foi medida a 450 nm com o leitor de microplacas. Para obter os valores de absorvância, coloca-se a placa dentro do leitor de microplacas ajustado em filtro primário de 450 nm (comprimento de onda), onde será feita a leitura dos resultados.

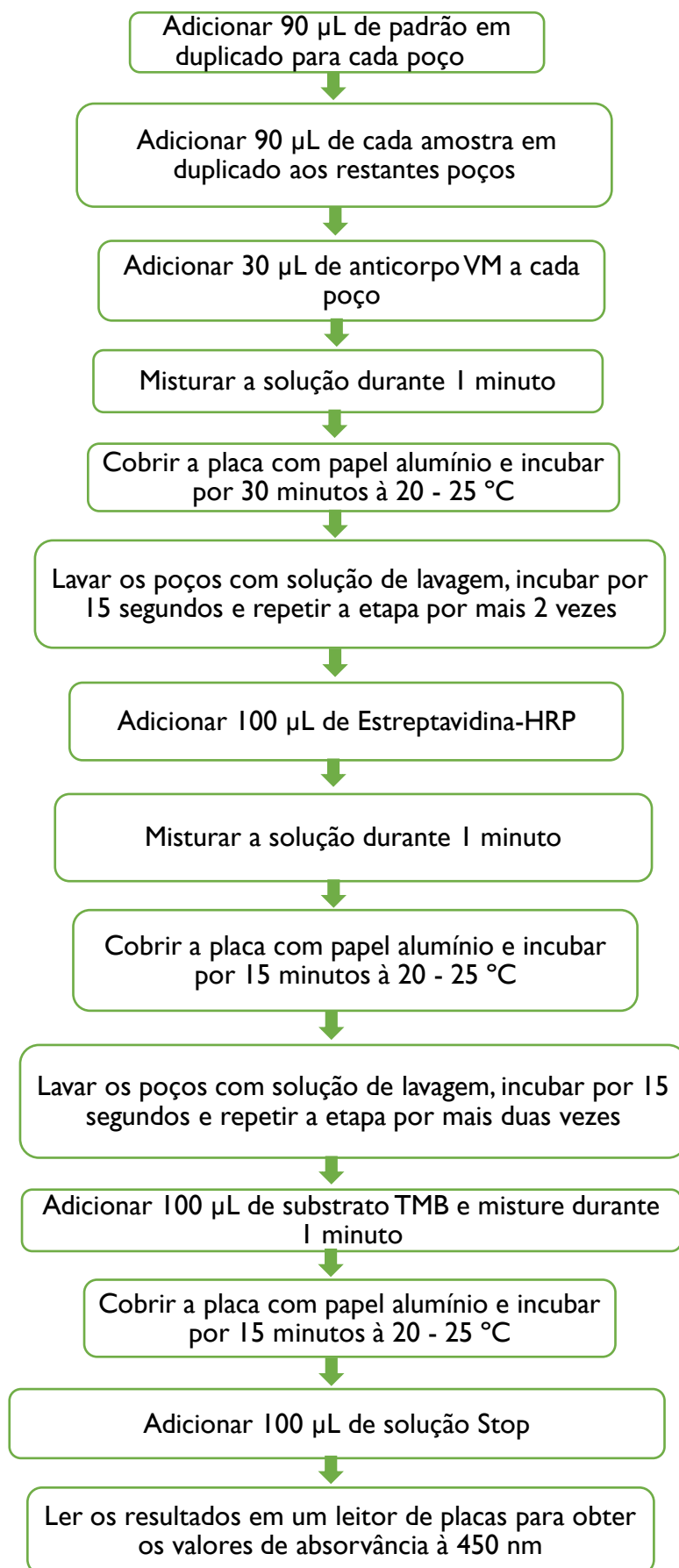


Figura 16. Etapas de Detecção

4. Apresentação e discussão dos resultados

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar se há presença ou ausência do VM e do seu metabolito VLM em peixe produzido em aquacultura utilizando a metodologia de ELISA.

Como já tinha sido referido anteriormente, ELISA é um ensaio imunoenzimático rápido e sensível. Se não for feito corretamente poderá fornecer resultados errados, daí ter de seguir rigorosamente todos os procedimentos que constam do *kit* ELISA utilizado.

Para obter resultados concretos, devemos começar por ter muito cuidado na preparação das amostras evitando uma possível contaminação das mesmas. É de se esperar que se houver qualquer “erro” durante o processo, os resultados podem ser alterados, podendo originar um falso positivo ou um falso negativo.

4.1 – Validação da metodologia analítica

A validação incorpora um processo de avaliação de todos os procedimentos de um determinado método analítico utilizado em laboratório, para identificar e quantificar um composto em uma determinada matriz. O método analítico utilizado foi adequado para determinar o VM e VLM em peixe de aquacultura. O método utilizado foi validado mediante as características exigidas pelos pré-requisitos do fabricante do *kit* ELISA.

Para fazer a validação da metodologia analítica foi feita a avaliação de alguns parâmetros como a linearidade e a exatidão, a validação foi efetuada recorrendo a recursos de padrões, brancos e fortificações.

4.1.1 – Linearidade e limite de deteção

A linearidade foi calculada a partir da curva de calibração utilizando o controlo negativo (0) e os 5 padrões (0,05 ng/mL; 0,15 ng/mL; 0,5 ng/mL; 1,5 ng/mL e 4,5 ng/mL). Os ensaios foram feitos em duplicados e a absorvância (ABS) medida a 450 nm.

A média dos valores de ABS obtidos para os padrões foram divididos pelo valor de ABS do controlo negativo e multiplicado por 100. O controlo negativo é igual a 100% e os valores da ABS são apresentados em percentagens. (Tabela I I). A absorção é inversamente proporcional à concentração de VM.

Tabela II. Absorvância relativa de cada padrão

	Concentração (ng/mL)	ABS 1	ABS 2	Média	Absorvância Relativa (%)
Controlo negativo	0	1,702	1,703	1,703	100
Padrão	0,05	1,507	1,499	1,503	88,282
Padrão	0,15	1,293	1,323	1,308	76,828
Padrão	0,5	0,981	0,974	0,978	57,416
Padrão	1,5	0,474	0,534	0,504	29,604
Padrão	4,5	0,336	0,327	0,332	19,471

O gráfico utilizado foi o da dispersão que serve para comparar o conjunto de dois valores, em que, neste caso temos o eixo vertical (eixo y ou eixo das ordenadas) onde temos a absorvância e o eixo horizontal (eixo x ou eixo das abcissas) a concentração para determinar a curva de calibração.

Na Figura 17, foi obtida a equação da curva de calibração e através dessa equação foi calculada as concentrações das amostras. Observa-se que a equação é $y = -16,36\ln(x) + 42,292$ e uma reta com o coeficiente de correlação (r^2) de 0,9784. Este valor é aproximado de 1. A relação é tanto maior quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação (r^2) de 1. Isto mostra uma boa linearidade entre as concentrações 0,05 e 4,5 ng/ml que corresponde na amostra a concentração entre 0,1 e 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

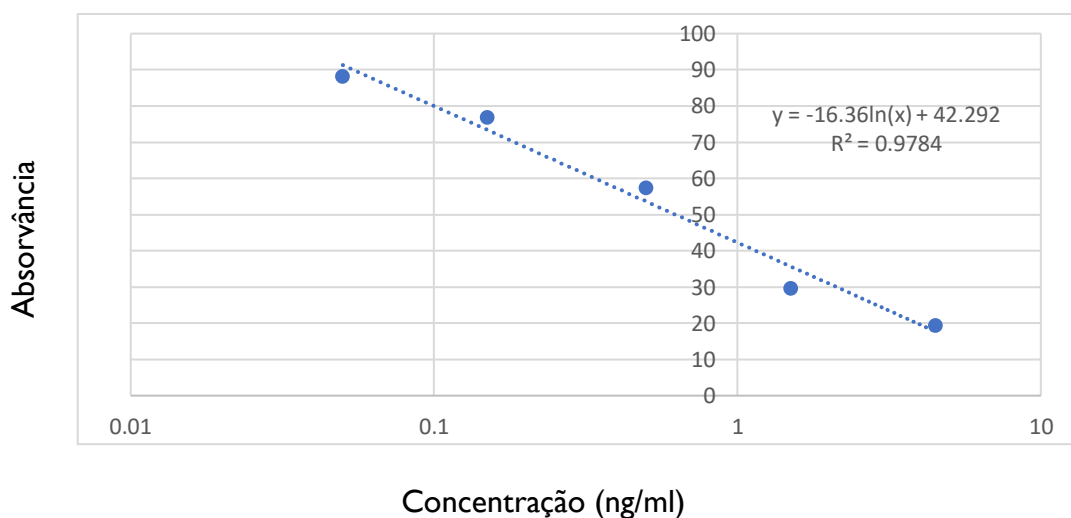


Figura 17. Curva de calibração dos padrões

O limite de deteção desta metodologia analítica preconizado pelo fabricante é de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, abaixo do LMDR de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ requerido pela legislação.

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados num determinado ensaio e um valor dado como referência aceite como verdadeiro. São utilizados ensaios de recuperação para a validação de métodos analíticos quando não houver material de referência. A recuperação está diretamente relacionada com a exatidão, pois traduz-se na percentagem de determinado analito recuperado (Tavares, 2010).

A avaliação da exatidão do método foi realizada através de ensaios de fortificação, onde inicialmente foram realizados 4 ensaios com 4 amostras (branco) de espécies diferentes e com as mesmas 4 amostras fortificadas a 1 µg/kg.

Na Tabela 12, pode verificar-se que as 4 amostras foram fortificadas com 1 µg/kg e foi detetado valores de concentrações superiores a 1 µg/kg. Na dourada detetou-se 1,490 µg/kg (149%), na truta detetou-se 1,186 µg/kg (119%), no salmão 1,561 µg/kg (156%) e no robalo 1,525 µg/kg (153%). O cálculo da concentração foi feito através da equação da curva de calibração e o fator diluição.

Tabela 12. Resultados das concentrações com as amostras fortificadas com 1 µg/kg

Fortificação 1 µg/kg 2g (amostra) fortificada com 20 µl solução de fortificação 100 µg/L	Concentração µg/kg usando equação da curva de calibração e fator de diluição
Dourada	1,490
Truta	1,186
Salmão	1,561
Robalo	1,525

Os valores obtidos foram todos superiores à fortificação efetuada o que resulta na ausência de falsos negativos, critério fundamental na determinação por ELISA. Este ensaio também permitiu verificar que esta metodologia analítica funciona para diversas espécies de peixe.

4.2 – Ocorrência do VM e VLM nas amostras de peixe

Como já mencionado anteriormente, o peixe não deve conter nenhum vestígio de VM e VLM. Entretanto, nas 28 amostras de peixe que foram analisadas, foram detetados o VM e/ou VLM em 5 amostras (17,9%) de espécies de peixe e de locais diferentes (Tabela 13). Dito isto, será importante reforçar que nos tecidos de animais aquáticos (peixe) de aquacultura destinados ao consumo humano é proibida a ocorrência de resíduos do corante VM ou do seu metabolito VLM.

Na Tabela 13, foi utilizado um limite de deteção de 0,1 µg/kg para identificar as amostras positivas e foi calculada a concentração do VM e/ou VLM nas amostras de peixe positivas. As 5 amostras positivas foram: Robalo 3 (outubro) com origem em Espanha, o valor da concentração foi de 0,48 µg/kg e foi o valor mais alto observado; Truta salmonada 10 (outubro) com origem em Portugal, o valor foi de 0,13 µg/kg; Robalo 1 (novembro) com origem em Turquia, o valor foi de 0,22 µg/kg; Robalo 4 (novembro) com origem em Espanha, o valor foi de 0,27 µg/kg; Dourada 6 (novembro) com origem em Turquia, o valor foi de 0,23 µg/kg. Quanto às restantes amostras o resultado foi não detetado.

Neste trabalho, foi utilizado peixe com origem em Portugal, Turquia, Noruega, Grécia e Espanha. Os países asiáticos não entraram nesta avaliação. Das 5 amostras contaminadas com VM e/ou VLM, 2 amostras de robalo tiveram origem em Espanha apresentando as concentrações mais elevadas. Com origem na Turquia foram encontradas 2 amostras de espécies diferentes (dourada e robalo) e por fim, em Portugal, identificou-se 1 amostra de truta salmonada, com a menor concentração detetada.

Apesar da proibição da utilização de VM em peixe de aquacultura 17,9% das amostras testaram positivo para este corante e/ou do seu metabolito (VLM) utilizando o kit ELISA.

Tabela 13. Concentrações do VM e VLM

Tipos de peixe	Limite de deteção 0,1 µg/kg Concentração de VM e VLM (µg/kg)
O. Robalo 1 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
O. Robalo 2 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
O. Robalo 3 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	0,48
O. Robalo 4 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
O. Dourada 5 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
O. Dourada 6 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
O. Dourada 7 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
O. Dourada 8 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
O. Salmão 9 (<i>Salmo salar</i>)	ND
O. Truta Salmonada 10 (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	0,13
N. Robalo 1 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	0,22
N. Robalo 2 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
N. Robalo 4 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	0,27
N. Robalo 5 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
N. Dourada 6 (<i>Sparus aurata</i>)	0,23
N. Dourada 7 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
N. Dourada 8 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
N. Dourada 9 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
N. Dourada 10 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
N. Salmão 11 (<i>Salmo salar</i>)	ND
N. Salmão 12 (<i>Salmo salar</i>)	ND
N. Truta Salmonada 13 (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	ND

D. Salmão 6 (<i>Salmo salar</i>)	ND
D. Dourada 1 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
D. Dourada 2 (<i>Sparus aurata</i>)	ND
D. Robalo 3 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
D. Robalo 4 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	ND
D. Salmão 5 (<i>Salmo salar</i>)	ND

ND – Não detetado

Legenda: O – outubro N – novembro D – dezembro

4.3 – Teste de confirmação

Um *kit* de ELISA é um teste de triagem sendo necessário recorrer a um teste de confirmação para comprovar a existência de VM e/ou VLM nas amostras positivas.

Para confirmar os resultados obtidos pelo *kit* ELISA realizou-se um ensaio de confirmação do VM por injeção direta em espectrometria de massa em série (MS/MS).

O MS foi operado em modo de ionização positiva utilizando aquisição de dado em monitorização de reação selecionada. O azoto foi usado como gás nebulizador, com fluxo de gás de 15 (unidade arbitrária) e fluxo de gás auxiliar de 5 (unidade arbitrária). A temperatura capilar foi ajustada a 350 °C e a tensão em 20 V. O gás de colisão foi o hélio com uma energia de colisão normalizada de 65,0%. Um ião precursor (m/z 329) e três iões produto foram adquiridos para fins de confirmação (m/z 208, 251, 285) (Tabela 14).

No teste de confirmação que fizemos, de acordo com as condições utilizadas uma amostra mostrou-se positiva e outra inconclusiva, ou seja, nas condições que utilizámos, para 3 amostras não tivemos informações suficientes que nos permita dizer que eram positivas.

Para os padrões de 0,5 e de 4,5 ng/mL os resultados foram positivos para todos os iões pesquisados, quer para a sua identificação quer para a sua abundância relativa. No controlo negativo não se identificou nenhum dos iões pesquisados. No Robalo 3 apesar dos dados positivos para o ião 208, os iões 251 e o precursor (329) não aparecem nas proporções estabelecidas, sendo esta amostra inconclusiva. Na truta não apareceram nenhum dos iões pesquisados, logo podemos dizer que não há VM. Na dourada 6 e robalo 4 só se identificou nas proporções estabelecidas o ião 251, logo não se confirmou a presença de VM nestas amostras. No robalo 1 todos os iões foram identificados e dentro das abundâncias preconizadas, o que significa que há presença de VM nesta amostra.

Tabela 14. Teste de Confirmação do VM

Solução Padrão / Amostra	MS/MS (329) _ Iões identificados (% , abundância relativa) (1)				Resultados
	<i>m/z</i> 208 (100%)	<i>m/z</i> 251 (55- 75%)	<i>m/z</i> 285 (35- 55%)	<i>m/z</i> 329 (35- 55%)	
Padrão VM 4,5 ng/ml	x	x	x	x	D
Padrão VM 0,5 ng/ml	x	x	x	x	D
Controlo Negativo					ND
Amostra R3 OUT	x	? (79%)		? (67%)	?
Amostra T10 OUT					ND
Amostra D6 NOV		x			ND
Amostra R1 NOV	x	x	x	x	D
Amostra R4 NOV		x			ND

(1) Int. J. Environ. Res. Health 2016, 13, 814

Legenda: D – Detetado ND – Não Detetado ? – Incerteza

Mesmo que se tenha confirmado a ocorrência do VM e/ou VLM numa amostra e sendo outra inconclusiva podemos verificar que, há o uso ilegal deste corante VM em peixe de aquacultura destinados ao consumo humano. Com as implicações para a saúde pública daí existentes.

5. Conclusão

O VM não está autorizado para o tratamento de peixe de aquacultura destinado para o consumo humano, visto que, é um composto tóxico que pode causar danos à saúde humana. Mesmo sendo proibido em vários países do mundo, este continua a ser utilizado por ser um composto barato, de fácil acesso e eficaz.

Mesmo sendo proibida a comercialização do VM em medicina veterinária na UE, os seus resíduos foram encontrados em diversos países. Por esse motivo, a vigilância do peixe e produtos da pesca provenientes de aquacultura é fundamental.

Para este trabalho, foi utilizada a metodologia ELISA para determinar o VM e VLM em 28 amostras de músculo de peixe produzidos em aquacultura e adquiridos em Portugal, mais especificamente em Coimbra. O limite de deteção da metodologia analítica foi de 0,1 µg/kg, bastante inferior ao LMDR. Das 28 amostras analisadas, 5 foram positivos através da metodologia ELISA. Após a confirmação por MS/MS verificou-se que uma amostra era positiva, outra inconclusiva e as restantes 3 negativas.

Os dados de ocorrência do VM e do VLM em peixe e produtos derivados de pescado, revela o fato de que o sistema de vigilância deve ter um funcionamento rápido e eficaz. Tem de se fazer uma monitorização contínua em todos os países do mundo, para controlar melhor os níveis destes compostos, que devem respeitar a legislação.

Tendo em conta a ocorrência do VM e do VLM em peixe para o consumo humano e a sua toxicidade para o Homem, estes dados levantam questões de segurança alimentar. Para além das questões de segurança alimentar esta utilização também pode comprometer a saúde ambiental por contaminação dos aquíferos adjacentes.

Apesar dos dados aqui apresentados, o peixe é um alimento saudável que nos oferece muitos benefícios nutricionais e não o devemos excluir da nossa dieta.

6. Referências Bibliográficas

AGRICULTURA, Ministério Da; DGRM - **Plano estratégico para a aquicultura Portuguesa** [Consult. 23 ago. 2020]. Disponível em: https://www.dgrm.mm.gov.pt/documents/20143/43770/Plano_Estrategico_Aquicultura_2014_2020.pdf

ALY, Salah Mesalhy; ALBUTTI, Aqel - Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health Impact. **Journal of Aquaculture**. 2014) 1–6.

ANDERSEN, Wendy C.; TURNIPSEED, Sherri B.; ROYBAL, José E. - Quantitative and Confirmatory Analyses of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish and Shrimp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 0021-8561. 54:13 (2006) 4517–4523. doi: 10.1021/jf0532258.

AYDIN, Suleyman - A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**. 72:2015) 4–15.

BAIRWA, Mukesh Kumar *et al.* - Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. **Scholars Research**. 2:3 (2002) 397–400.

BFR - **Collection and pre-selection of available data to be used for the risk assessment of malachite green residues by JECFA**, atual. 2008. Disponível em <https://zenodo.org/record/580574#.XlPnmWhKjIV>

BILANDŽIĆ, Nina *et al.* - Malachite green residues in farmed fish in Croatia. **Food Control**. . ISSN 0956-7135. 26:2 (2012) 393–396. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2012.02.001.

BOTELHO, Rafael Grossi *et al.* - **Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura**, atual. 2012. [Consult. 29 ago. 2020]. Disponível em <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va11-meio-ambiente03.pdf>

CASSAMO, ANA ISABEL XAREPE - **AQUICULTURA EM PORTUGAL, PRODUÇÃO INTENSIVA DE PREGADO**, atual. 2012. [Consult. 23 ago. 2020]. Disponível em [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4655/1/Aquicultura em Portugal %3A producao intensiva de pregado %28Psetta maxima%29.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4655/1/Aquicultura%20em%20Portugal%20-%20producao%20intensiva%20de%20pregado%20-%20setta%20maxima.pdf)

COMISSÃO, DECISÃO DA - **DECISÃO DA COMISSÃO**, atual. 2003. [Consult. 17 mai. 2019]. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004D0025&from=EN>

COMISSÃO EUROPEIA - **A pesca e aquicultura na europa**, atual. 2012. [Consult. 29 ago.

2020]. Disponível em <https://www.acopec.pt/documents/Revista---A-Pesca-e-Aquicultura-na-EU---Junho-2012.pdf>

EFSA - Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for nonallowed pharmacologically active substances present in food of animal origin. **EFSA Journal**. 11:4 (2013) 12–24.

EFSA - Malachite green in food. **EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)**. 15–80:7 (2016) 14.

FAO - **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**, atual. 2020. [Consult. 24 jul. 2020]. Disponível em <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

GASTALHO, S. *et al.* - Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **actafarmacaceuticaportuguesa.com**. 3:1 (2014) 29–45.

GUARDIOLA, Francisco Antonio *et al.* - Risks of Using Antifouling Biocides in Aquaculture. **OPEN ACCESS**. 13:2012) 1–20.

HASHIMOTO, Juliana Campos *et al.* - Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**. . ISSN 1049-8850. 20:3 (2011) 273–294. doi: 10.1080/10498850.2011.569643.

LI, Lu *et al.* - Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film. **Food Chemistry**. 229 (2017) 403–408.

Malachite green in food - **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 14:7 (2016). doi: 10.2903/j.efsa.2016.4530.

MITROWSKA, Kamila; POSYNIK, Andrzej - Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green in fish muscle by liquid chromatography. **Department of Pharmacology and Toxicology, National Veterinary Research Institute**. 48:2004) 173–176.

OIE - **Animal welfare issues relating to aquaculture**, atual. 2004. [Consult. 22 ago. 2020]. Disponível em <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.135.2685&rep=rep1&type=pdf#page=221>

OLIVERI CONTI, Gea *et al.* - Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. **Food Control**. . ISSN 0956-7135. 50:2015) 937–941. doi: 10.1016/j.FOODCONT.2014.10.050.

OPLATOWSKA, Michalin *et al.* - Development and validation of a fast monoclonal based disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of triphenylmethane dyes and their metabolites in fish. **Analytica Chimica Acta**. 698:1–2 (2011) 51–60.

OUYANG, Lei *et al.* - Accurate SERS detection of malachite green in aquatic products on basis of graphene wrapped flexible sensor. **Analytica Chimica Acta**. 1027:2018) 83–91.

REA - **Produção em aquacultura**, atual. 2019. [Consult. 19 out. 2020]. Disponível em <https://rea.apambiente.pt/content/produção-em-aquicultura>>.

ROCHA, ANA CAROLINA ALVES - **COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS ANALÍTICAS ELISA E QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DOSAGEM DE ANTI-TRANSGLUTAMINASE IGA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DOENÇA CELÍACA**, atual. 2016. [Consult. 23 set. 2020]. Disponível em https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22206/1/2016_AnaCarolinaAlvesRocha.pdf>.

SRIVASTAVA, Shivaji; SINHA, Ranjana; ROY, D. - Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**. . ISSN 0166445X. 66:3 (2004) 319–329. doi: 10.1016/j.aquatox.2003.09.008.

STAMMATI, Annalaura *et al.* - Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. **Toxicology in Vitro**. . ISSN 08872333. 19:7 (2005) 853–858. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.021.

TAVARES, Adriano Duarte - **Determinação de Cádmio e Chumbo em Alimentos e Bebidas Industrializados por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica**, atual. 2010. [Consult. 15 out. 2020]. Disponível em https://www.google.com/search?q=Determinação+de+Cádmio+e+Chumbo+em+Alimentos+e+Bebidas+Industrializados+por+Espectrometria+de+Absorção+Atômica+com+Atomização+Eletrotérmica&rlz=1C1CHBD_pt-PTPT818PT818&oq=Determinação+de+Cádmio+e+Chumbo+em+Alimentos+e+Bebi

TEIXEIRA, Diogo Manuel; CUNHA, DA, Azevedo - **SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE PEIXES E BIVALVES EM AQUACULTURA: CRESCIMENTO E INDICADORES DE QUALIDADE**, atual. 2016. [Consult. 24 ago. 2020]. Disponível em https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/19813/1/Relatório de Estágio.D._fs.pdf