



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Pedro Miguel Madeira Fernandes Costa

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO 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 onteiro Pais Teixeira Pereira, e apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Pedro Miguel Madeira Fernandes Costa

Identificação e quantificação do Verde de Malaquite em
amostras de peixe de aquacultura

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, sob a orientação da
Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e do Professor Doutor André
Monteiro Pais Teixeira Pereira, apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Setembro 2019

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação representa a conclusão de mais uma etapa académica, contribuindo para o meu enriquecimento pessoal e profissional. Esta conquista deveu-se a várias pessoas, às quais presto o meu agradecimento do fundo do coração, pela ajuda, paciência e generosidade.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor André Pereira, pela disponibilidade total e por toda a orientação e colaboração prestadas ao longo deste trabalho.

À Professora Doutora Angelina Pena pela aceitação e oportunidade que me concedeu ao permitir a sua realização.

À Doutora Sofia Duarte, docente da Escola Universitária Vasco da Gama, pela colaboração e ajuda na realização da parte experimental desenvolvida em laboratório.

Aos meus colegas de mestrado, incluindo os que me acompanham nesta aventura desde a licenciatura, pela amizade e pela força e coragem que me deram nestes últimos anos da vida académica.

Aos “Pingus” por toda a amizade construída e pela ajuda para completar esta caminhada.

À Ana, minha namorada, por me apoiar em todas as decisões e me ter dado a maior força para a realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais, irmãos, avós, madrinha e restante família pelo incentivo constante e por acreditarem em mim, pois sem eles, o meu percurso académico não seria possível. Ser-lhes-ei eternamente grato pelo apoio prestado e demais incentivos a não desistir.

A todos vós, o meu sincero OBRIGADO.

ABSTRACT

In aquaculture, as well as other farming activities, the use of veterinary medicines is an important tool to ensure high productivity in intensive production systems.

The main objective of the work was to identify and quantify the presence of residues of the unauthorized dye in aquaculture Malachite Green (MG) and its metabolite – Leuco Malachite Green (LMG). This was accomplished by using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method in fish muscle tissue samples from aquaculture for sale in the North and Centre of Portugal.

Of the 41 samples analysed, all are contaminated with the presence of MG and/or LMG residues and all concentrations were above the minimum required performance limit (MRPL) established by Commission Decision 2002/657EC.

It is necessary not only to raise awareness among all stakeholders who are directly and indirectly involved in this illegal practice that endangers human and environmental health, but also a strict supervision by national and European entities in order to ensure food quality and safety.

Keywords: Aquaculture, ELISA; Food safety; Malachite green; MRPL

RESUMO

Na aquacultura, assim como em outras atividades agropecuárias, o uso de medicamentos veterinários é uma importante ferramenta para assegurar a alta produtividade nos sistemas de produção intensiva.

Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo identificar e quantificar a presença de resíduos do corante não autorizado em aquacultura Verde de Malaquite (VM) e do seu metabolito – Verde de Leucomalaquite (VLM). Esta determinação foi realizada pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em amostras de tecido muscular de peixe provenientes de aquacultura, à venda em superfícies comerciais nas regiões Norte e Centro de Portugal.

Das 41 amostras analisadas, verifica-se que todas se encontravam contaminadas com a presença de resíduos de VM e/ou VLM, sendo que todas as concentrações foram superiores ao valor limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) estabelecido pela Decisão 2002/657/CE da Comissão, e respectiva alteração (2004/25/CE).

Assim, torna-se necessário não só sensibilizar todos os intervenientes que estejam envolvidos de forma direta e indiretamente, para eliminar esta prática ilegal, que põe em causa a saúde dos consumidores e do meio ambiente, mas também uma maior vigilância fiscalização por parte das entidades nacionais e europeias de forma assegurar a segurança alimentar.

Palavras-chave: Aquacultura; ELISA; LMDR; Segurança Alimentar; Verde de Malaquite

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	3
ABSTRACT	4
RESUMO	5
Índice de Figuras.....	7
ABREVIATURAS	8
Objetivo	10
1. Revisão bibliográfica	11
1.1 Introdução	12
1.2 Benefícios do consumo de peixe	13
1.3 Aquacultura a nível europeu e mundial.....	14
1.4 Aquacultura em Portugal.....	17
1.5 Produtos utilizados na aquacultura	19
1.5.1 O verde de malaquite	20
1.6 Legislação.....	24
1.7 Metodologias analíticas.....	25
1.7.1 ELISA	25
1.8 Comparação entre metodologias analíticas	26
1.9 Ocorrência de verde de malaquite em tecido muscular de peixes	29
2. Procedimento experimental.....	32
2.1 Reagentes, soluções e equipamentos.....	33
2.1.1 Reagentes e soluções	33
2.1.2 Equipamento utilizado	33
2.2 Amostragem	35
2.3 Metodologia analítica.....	37
2.3.1 ELISA - Extração	37
2.3.2 ELISA - Detecção	39
3. Apresentação e discussão de resultados	40
3.1 Validação da metodologia analítica.....	40
3.1.1 Linearidade	40
3.1.2 Limites de deteção e quantificação instrumental	41
3.2 Ocorrência de VM e VLM nas amostras.....	42
4. Conclusão.....	46
5. Referências Bibliográficas	47

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características físico-químicas do corante VM	22
Tabela 2 - Características físico-químicas do metabolito VLM	22
Tabela 3 - LMDR da soma do VM e do principal metabolito VLM	25
Tabela 4 - Metodologias analíticas utilizadas na determinação do verde de malaquite e do verde de leucomalaquite em alimentos	28
Tabela 5 - Ocorrências de verde de malaquite e verde de leucomalaquite em peixes de aquacultura	31
Tabela 6 - Lista de amostras.....	36
Tabela 7 - Concentrações de VM e VLM.....	43

Índice de Figuras

Figura 1 - Pesca de captura mundial e produção de aquacultura.....	13
Figura 2 - Contribuição relativa da aquacultura e captura da pesca para o consumo de peixe	15
Figura 3 - Evolução da produção de aquacultura em Portugal, por tipo de regime	18
Figura 4 - Número de notificações para o VM e VLM em peixes entre o período 2002 – 2014	29
Figura 5 - Constituintes do kit ELISA.....	33
Figura 6 - Balança analítica de precisão.....	34
Figura 7 - Trituradora para moagem das amostras.....	34
Figura 8 - Centrífuga Sigma 3-16k.....	35
Figura 9 - Processo sequencial de extração.....	38
Figura 10 - Fase de deteção.....	39
Figura 11 - Curva de calibração dos padrões.....	41
Figura 12 – Ocorrência de VM e de VLM (Médias, mínimos e máximos de concentrações) em diversas espécies de peixes	45

ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrilo

CC - Curva de Calibração

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *European Food Safety Authority*

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*

FDA - Food and Drug Administration

GC/MS - Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policlorados

HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Precisão com Detetor Diode Array, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with a Diode-Array Detector*

HPLC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Precisão com detecção por espectrometria de massa, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*

HPLC-UV - Cromatografia Líquida de Alta Precisão com Detecção por Ultravioleta, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet*

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives

LC/MS - Cromatografia Líquida com detector de Espectrometria de Massa, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

LDI - Limite de Detecção Instrumental

LMDR - Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR - Limite Máximo de Resíduo

LQI - Limite de Quantificação Instrumental

OIE – Escritório Internacional de Epizootias

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBDEs – Éteres Difenilo Polibromados

PCBs – Bifenilos Policlorados

PCDEs – Éteres Difenilos Policlorados

PCNs – Naftalenos Policlorados

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

RASFF - Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais, do inglês *Rapid Alert System for Food and Feed*

RPA - Ponto de Referência de Ação, do inglês *Reference Points for Action*

UE - União Europeia

UPLC -

VLM - Verde de Leucomalaquite

VM — Verde de Malaquite

Objetivo

Para garantir a segurança dos consumidores e o bem-estar animal, são administrados diversos medicamentos veterinários e agentes antibacterianos aos animais destinados ao consumo humano, como é o caso dos peixes produzidos em regime intensivo e semi-intensivo de aquacultura. Porém, a sua incorreta utilização pode colocar em risco a saúde humana e a segurança dos consumidores. Deste modo, um ponto-chave para controlar a utilização de contaminantes em géneros alimentícios é a verificação da presença ou ausência destes através de ensaios laboratoriais de resposta rápida e baixo custo, sendo imprescindível o correto cumprimento da legislação em vigor. Posto isto, este trabalho tem como principal objetivo detetar e quantificar a presença de resíduos do corante verde de malaquite (VM) e do seu metabolito – verde de leucomalaquite (VLM) pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em amostras de tecido muscular de peixe provenientes de aquacultura.

I. Revisão bibliográfica

1.1 Introdução

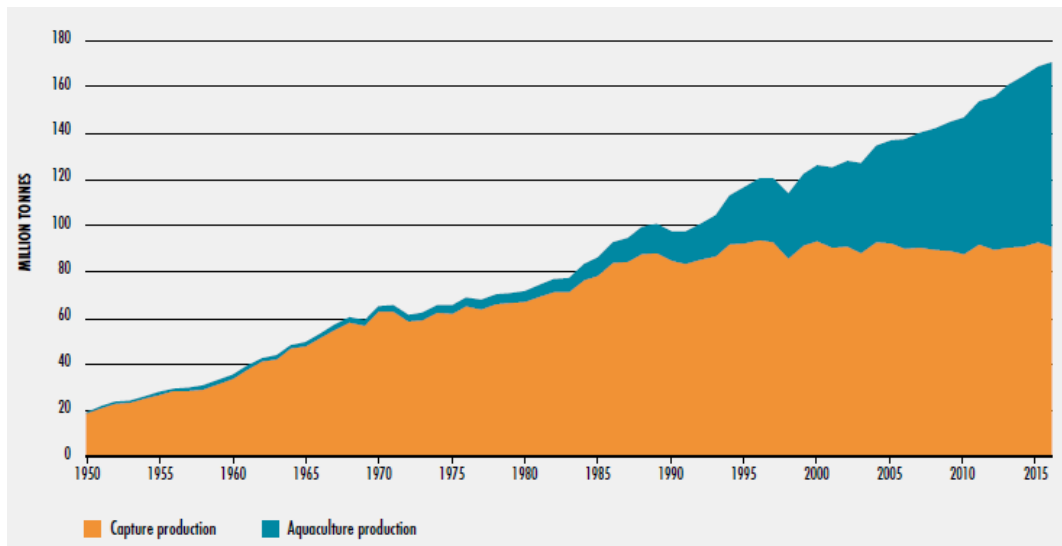
A sociedade enfrenta o enorme desafio de fornecer alimentos e meios de subsistência a uma população que excede 9 bilhões de pessoas em meados do século XXI, ao mesmo tempo em que aborda os impactos desproporcionais das mudanças climáticas e da degradação ambiental [1].

As tendências do consumo alimentar têm sofrido várias alterações nas últimas décadas. A idade, gênero, estilo de vida, ambiente envolvente, tradições culturais e religiosas, preços, preferências, propriedades sensoriais dos alimentos (textura, cor, cheiro e sabor), publicidade, bem como as preocupações crescentes dos consumidores com a saúde são algumas das variáveis que ajudam a explicar os diferentes padrões de consumo alimentar. O acesso a alimentos e a qualidade da alimentação ou a sua carência têm implicações tanto na saúde pública e bem-estar das pessoas como no capital humano, o que vai afetar o desenvolvimento da sociedade. Nesse sentido, a indústria alimentar continua a ter um papel bastante importante na economia dos países, não só pelo seu valor económico, mas também pelo seu posicionamento mais ético, mais transparente, procurando transmitir corretamente as informações pertinentes e assim conseguir a confiança dos consumidores [2].

A segurança alimentar, assim como suas consequências para a saúde humana, é um tópico extremamente importante para os consumidores e para as autoridades de saúde pública. Em particular, tem havido inúmeros eventos envolvendo a contaminação em larga escala de alimentos de origem animal [3].

Efetivamente, enquanto se verifica, a nível mundial, um aumento sustentado na produção de produtos da pesca e da aquacultura assiste-se, com maior intensidade a partir dos anos 90, a uma substituição dos produtos da pesca (captura) por produtos da aquacultura. As capturas da pesca estagnaram e, no primeiro decénio deste século, regrediram ligeiramente, aumentando de forma muito significativa a produção aquícola, conforme se verifica na Figura 1 [4].

Globalmente, a produção aquícola tornou-se o setor de produção de alimentos que mais cresce envolvendo espécies animais. Cerca de 430 (97%) das espécies aquáticas atualmente em cultivo foram domesticadas desde o início do século XX e o número de espécies aquáticas domesticadas continua a subir rapidamente. Foi recentemente estimado que a indústria da aquacultura fornece 43% de todo o peixe consumido pelos seres humanos [5].



Nota: Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas e outras plantas aquáticas

Figura 1 - Pesca de captura mundial e produção de aquicultura [1]

A rápida transição de um modelo de captura de espécies para um modelo de cultura e produção foi uma resposta necessária às necessidades do mercado. O aumento da poluição marinha e da sobrepesca, juntamente com a mudança climática global, afetou muito os *stocks* pesqueiros. A aquicultura tem maior possibilidade de produzir maiores quantidades de peixes em espaço reduzido do que a captura selvagem de espécies [3].

Embora a aquicultura tenha muitas vantagens teóricas, a realidade não é tão positiva. O rápido crescimento dessas produções resultou em preocupações com a qualidade e a segurança dos peixes e consumidores [3].

Um dos principais constrangimentos da aquicultura em regimes intensivo e semi-intensivo são as doenças infecciosas como um risco contínuo, resultando em grandes perdas de *stocks*. As mesmas estratégias usadas em outras áreas de produção animal são empregadas para controlar doenças infecciosas na aquicultura [3].

1.2 Benefícios do consumo de peixe

Os novos ritmos de vida, os recursos económicos insuficientes, o pouco tempo disponível para preocupações com questões de saúde, a falta de informação, e, até de motivação, levam os consumidores a cometerem erros alimentares que podem dar origem a determinadas doenças. Todos esses desequilíbrios têm-se traduzido no consumo excessivo de gorduras saturadas, baixa ingestão de hortofrutícolas e leguminosas, na diminuição do consumo de

alimentos ricos em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (presentes no peixe, alguns vegetais e frutos secos) e no aumento do consumo de ómega-6 (presentes em carnes, óleos vegetais, ovos, leite e derivados, manteiga, margarinas e cereais). Para um melhor equilíbrio alimentar a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo regular de pescado pelo menos duas vezes por semana ^[2].

O consumo de pescado faz parte dos hábitos alimentares da população europeia e mundial, nomeadamente por serem alimentos considerados saudáveis e fontes importantes de proteínas ^[6].

O peixe é um alimento de excepcional valor nutritivo, é fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas (A, B, D, E e K) e minerais (como sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, iodo e cobalto) que regularizam as funções do corpo e participam do metabolismo de nutrientes ^[7].

Ao consumo de produtos da pesca e de aquacultura são atribuídos inúmeros benefícios nutricionais. Assim, estes produtos são ricos em proteínas de elevado valor biológico, ácidos gordos polinsaturados (sobretudo da família n-3), apresentam baixos teores de colesterol e ácidos gordos saturados e são ainda pouco calóricos. Para além disso, o pescado é um alimento de digestão fácil, é uma excelente fonte de algumas vitaminas, nomeadamente a A e a D e apresenta também uma enorme variedade de elementos minerais, alguns dos quais essenciais ^[8].

1.3 Aquacultura a nível europeu e mundial

A aquacultura europeia oferece produtos de qualidade, que respeitam normas estritas nos domínios da sustentabilidade ambiental, da saúde animal e da proteção do consumidor. A excelente qualidade do pescado da União Europeia (UE) deveria constituir uma importante vantagem competitiva para a aquacultura da UE; contudo, a produção aquícola da UE está em estagnação, ao contrário do que sucede noutras regiões do mundo, onde conhece um forte crescimento. Em 2010, o valor da produção aquícola da UE foi de 3,1 mil milhões de euros, correspondentes a uma produção de 1,26 milhões de toneladas. Atualmente, o mercado dos produtos do mar da UE é abastecido a partir das pescarias da UE (25%), das importações (65%) e da aquacultura da UE (10%). No total, o consumo aparente de produtos da pesca e da aquacultura na UE atingiu cerca de 13,2 milhões de toneladas ^[9].

A produção mundial de aquacultura em 2016 incluiu 80,0 milhões de toneladas de peixes alimentares e 30,1 milhões de toneladas de plantas aquáticas, bem como 37 900 toneladas de

produtos não alimentares. A produção de pescado alimentar incluiu 54,1 milhões de toneladas de peixe, 17,1 milhões de toneladas de moluscos, 7,9 milhões de toneladas de crustáceos e 938 500 toneladas de outros animais aquáticos. A China, de longe o maior produtor de peixes de criação em 2016, produz mais do que o resto do mundo combinado desde 1991 [1]. A sua participação na produção mundial de pescado cresceu de 7% em 1961 para 35% em 2010, conforme a Figura 2, impulsionada pelo aumento na diversidade de peixe disponível [10].

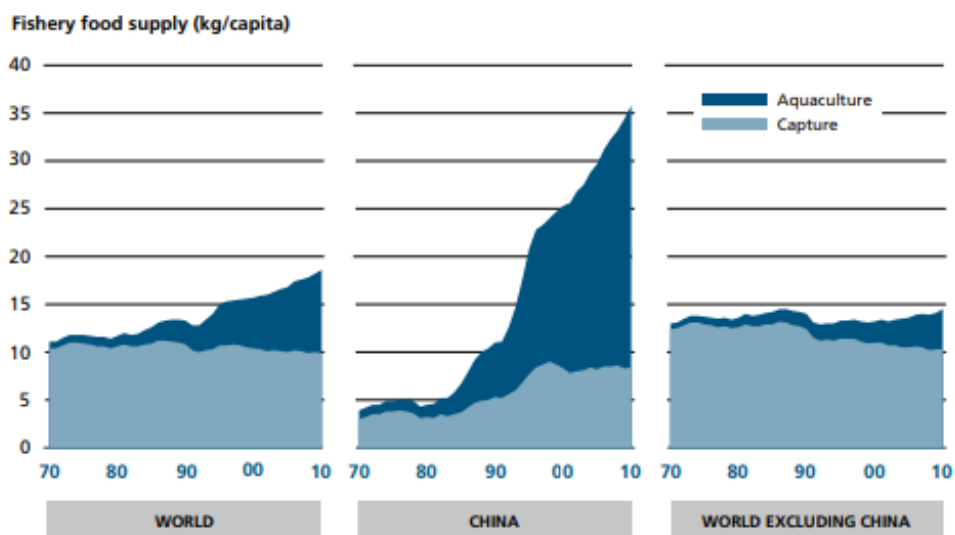


Figura 2 - Contribuição relativa da aquacultura e captura da pesca para o consumo de peixe [1]

A aquacultura desempenha um papel cada vez mais importante na produção mundial de alimentos de origem aquática, devido à sobre-exploração de grande parte dos recursos piscícolas. Está a afirmar-se globalmente como uma importante alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado, sendo de salientar que a produção dela proveniente ultrapassa mais de metade de todo o pescado consumido no mundo, razão porque é considerada um sector estratégico [11].

A Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM) define a Aquacultura como a criação ou cultura de organismos aquáticos, recorrendo a técnicas concebidas para aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção dos referidos organismos [11].

A aquacultura contribui cada vez mais para a produção global de peixes, crustáceos e moluscos e, assim, para a subsistência, segurança alimentar e nutrição de milhões de pessoas. Ao ajudar a atender à crescente demanda por esses produtos, a aquacultura também alivia os aumentos

de preços que, de outra forma, resultariam de uma lacuna crescente entre a oferta e a procura [12].

Na aquacultura está implícita a intervenção humana nesta atividade, incluindo-se aqui as diversas formas de propagação, de manutenção e de captura de espécies, em ambientes mais ou menos controlados. As principais áreas de aquacultura são classificadas segundo o tipo de organismos produzidos (crustáceos; algas; moluscos; ou peixes), segundo o ambiente de cultura (marinho; água doce; ou salobra), ou segundo a temperatura (água temperada ou água fria) [13].

Em aquacultura existem várias formas de produzir e cada um deles tem um determinado controlo do meio onde os organismos crescem. Numa forma simplista, são reconhecidas três formas ou regimes de produção aquícola: o intensivo, o semi-intensivo e o extensivo. Quanto mais intensiva for a produção, maior será o controlo do meio, com um maior rigor e manipulação das características da água, dos tanques e do meio envolvente aos tanques [14].

No regime extensivo, o menos controlado, o principal foco centra-se na limitação das movimentações nos casos dos organismos com uma locomoção ativa ou na preparação de um local para receber organismos sedentários. Aqui não há aporte de ração ou outro tipo de alimentação que não seja natural, não há controlo dos predadores nem de doenças, é o menos dispendioso, o que dá menos trabalho, mas também o menos rentável, sobretudo no que diz respeito à produção de peixe. Haverá uma pequena manipulação do meio, de modo a este ter melhores condições para produzir alimento natural das espécies alvo, mas nunca uma alimentação direta a estas mesmas espécies. É, exemplo disso, a engorda de bivalves na moluscicultura ou a produção de alguns peixes em baixas densidades e em tanques bastante extensos. Os organismos produzidos extensivamente são os mais saborosos e os mais procurados, pois são os que se aproximam mais dos selvagens, em termos de qualidade [14].

No regime semi-intensivo, existe um aumento do controlo de fatores de produção. As densidades são maiores, permitindo obter um maior número de peixes (nos casos das pisciculturas) num espaço mais confinado. Há fornecimento de ração para além do alimento natural presente na água, controlam-se os predadores e as doenças que causam maior prejuízo. O rendimento é maior, mas a qualidade é substancialmente inferior à produção extensiva [14].

No regime intensivo, com controlo do meio mais apertado, é o que leva a produção ao máximo, com densidades elevadas em espaços mais exíguos, mas com alguma perda de qualidade. A alimentação é praticamente toda fornecida por rações e as doenças são prevenidas, vigiadas e combatidas. Para se obter um rendimento máximo, é necessário um

controlo máximo e num número elevado de parâmetros diferentes. Esta forma de produção aquícola é muito dispendiosa, tanto em material e equipamentos como em mão-de-obra e, é comum produzir juvenis em maternidades, que requerem níveis de controlo elevados, e que serão mais tarde enviados para unidades de engorda. Aqui, o ciclo reprodutivo dos peixes reprodutores é artificialmente manipulado de forma a obter posturas de ovos de forma constante e planeável ao longo do ano ^[14].

Os sistemas de aquacultura também podem ser classificados dependendo de outras características, como: onde o sistema de produção está localizado (dentro do mar, em zona de maré ou em terra), o tipo de ambiente onde os animais são cultivados (água doce, marinha e salobra) ou o estágio de vida das espécies produzidas (ovos, alevinos, juvenis ou em crescimento), entre outros ^[15].

1.4 Aquacultura em Portugal

A localização geográfica da costa continental portuguesa, na transição de duas importantes sub-províncias oceanográficas do Norte Atlântico - a subtropical e a subtropical/subpolar - permite a existência de uma grande diversidade de habitats, sendo por isso considerada uma das zonas mais ricas em termos biológicos, nomeadamente pela qualidade das suas águas e pela diversidade das espécies nelas existentes. Contudo, as condições geomorfológicas da costa continental portuguesa e das ilhas atlânticas e, sobretudo, as condições de mar nos meses de inverno, não são das mais vantajosas para a instalação de unidades de aquacultura oceânica, obrigando ao recurso a soluções tecnológicas adaptadas às condições do meio. Apesar deste constrangimento, a costa algarvia, a costa sul da Madeira, bem como as lagoas e rias, para além de algumas baías mais abrigadas, reúnem condições satisfatórias para a prática da aquacultura em mar aberto ^[4].

O sector da pesca, integrando a captura, transformação e comercialização do pescado, constitui, em muitas regiões, uma atividade fundamental cuja relevância transcende os aspetos puramente económicos uma vez que o seu contributo social e como fonte de subsistência apresentam inegável importância e significado. A pesca em Portugal, continua a constituir a principal atividade económica de muitas comunidades ao longo da costa, funcionando como um importante fator de fixação das populações, existindo ao longo da costa muitas comunidades cuja atividade principal é a pesca ^[8].

Sendo Portugal um país com uma elevada captação no consumo de pescado, cerca de 56,7Kg por habitante/ano, a limitada produção nacional obriga a volumes muito elevados de importações para satisfazer o consumo nacional [4].

Em 2012, a produção aquícola nacional foi de 10.317 toneladas, correspondente a 5,4% das descargas de pescado [4].

Conforme a Figura 3, a produção de aquacultura sagrou-se, em 2016, em 11.259 toneladas e gerou uma receita de 75,2 milhões de euros. Estes valores traduzem um aumento de 17,8% em quantidade e um aumento de 38,9% em valor, quando comparados com os valores do ano anterior. A análise dos dados dos últimos 10 a 15 anos mostra uma tendência de redução de produção em regime semi-intensivo acompanhada por um aumento de produção em regime intensivo, que tem vindo a ganhar importância [11].

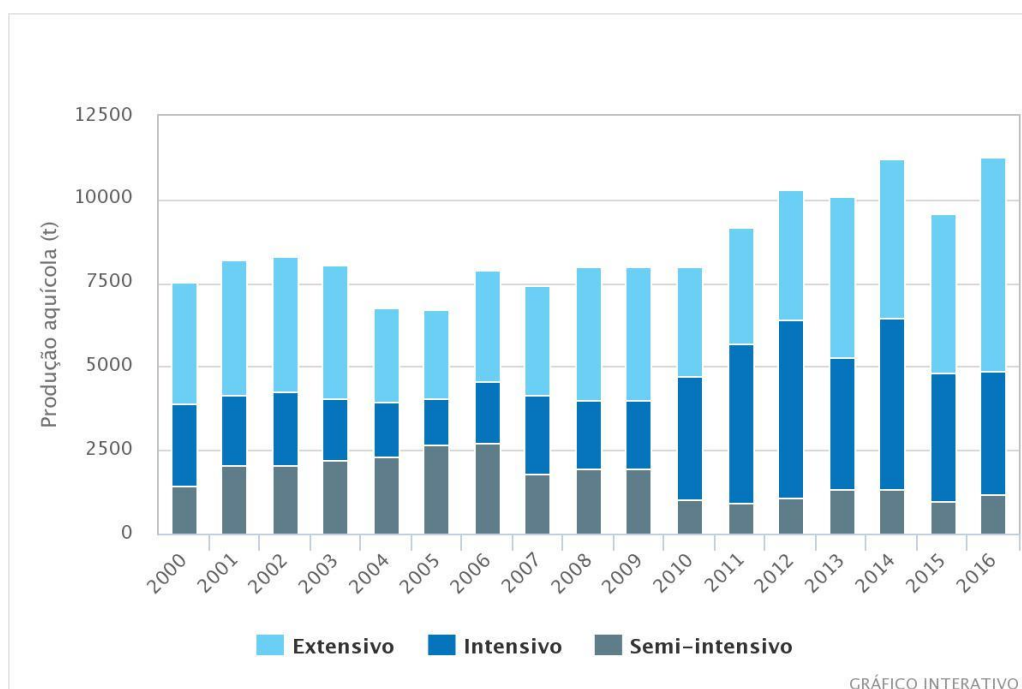


Figura 3 - Evolução da produção de aquacultura em Portugal, por tipo de regime

Fonte: INE/DGRM, 2018

Nos últimos 30-40 anos têm-se verificado enormes avanços técnicos neste sector, como o aperfeiçoamento dos alimentos artificiais, principalmente quanto à sua estabilidade na água e composição nutricional, e o melhoramento das técnicas de arejamento artificial que passaram a ser adotadas em diferentes regiões. As taxas de crescimento do produto cultivado chegam a ser superiores a 30% por ano, beneficiando ainda da pronta disponibilidade de recursos naturais e da sua fácil interação com o meio ambiente [13].

No nosso país, a aquacultura é baseada em cultura em águas continentais, sobressaindo a cultura de truta arco-íris, e na cultura em águas oceânicas onde predomina a cultura de robalo, dourada e amêijoas ^[16].

1.5 Produtos utilizados na aquacultura

À medida que a indústria aquícola se expande, é necessário o uso de mais medicamentos, desinfetantes e compostos *antifoulant* para eliminar os microrganismos nas instalações de aquacultura. O uso de biocidas no ambiente aquático, no entanto, provou ser prejudicial, pois tem efeitos tóxicos sobre o ambiente marinho ^[17].

O principal objetivo da aquacultura é a produção de alimentos de alto valor nutritivo para consumo humano. No entanto, além de seu valioso suprimento de alimentos e apoio económico para muitos países, a prática da aquacultura pode causar problemas ambientais como a poluição das águas circundantes com nutrientes, resíduos sólidos e produtos químicos (por exemplo, antibióticos) usados para o controle de doenças na aquacultura em tanques. Os principais contaminantes são os resíduos de medicamentos veterinários, os poluentes orgânicos persistentes (POPs), os pesticidas, os metais e os sais minerais (mercúrio, chumbo, cádmio, cromo hexavalente, arsénio e selénio ^[18].

Para além dos contaminantes presentes nos peixes de aquacultura proveniente da adição propositada pelo Homem podem estar presentes também contaminantes ambientais. O metilmercúrio (MeHg) e os bifenilos policlorados (PCBs) eram, até recentemente, os contaminantes a que se dava mais atenção. Todavia, vários estudos têm demonstrado que o pescado também pode conter outros contaminantes ambientais prejudiciais à saúde. Desses contaminantes destacam-se os metais, as dibenzodioxinas policloradas e dibenzofuranos (PCDD/ PCDFs), os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e ainda outros compostos organo-halogenados, como os éteres difenilo polibromados (PBDEs), e os éteres difenilos policlorados (PCDEs), naftalenos policlorados (PCNs) e compostos perfluorados (PFCs) ^[2].

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a OMS, o Escritório Internacional de Epizootias (OIE) e vários governos nacionais levantaram a questão do uso irresponsável de antibióticos nas indústrias de peixes, com particular preocupação os riscos potenciais para a saúde pública. A contaminação aquática por antibióticos resultou no

surgimento de resistências bacterianas e posterior desenvolvimento de agentes patogénicos nos mais resistentes e virulentos nos ambientes expostos ^[19].

1.5.1 O verde de malaquite

Na aquacultura, assim como em outras atividades agropecuárias, o uso de medicamentos veterinários é uma importante ferramenta para assegurar a alta produtividade nos sistemas de produção intensiva ^[20].

A atividade antibacteriana e outras propriedades terapêuticas dos corantes foram relatadas pela primeira vez no início dos anos 1900. Subsequentemente, as formulações das classes de corantes acridina, azo, trifenilmetano e tiazina foram amplamente utilizadas na medicina humana e veterinária, principalmente como antissépticos e desinfetantes tópicos. A maioria das aplicações terapêuticas dos corantes em humanos e em animais terrestres alimentares foram descontinuadas devido a considerações de segurança e ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes ^[21].

Em espécies aquáticas, certos corantes permanecem em uso como um meio económico e eficaz para o tratamento de infeções parasitárias e fúngicas.

Na produção de aquacultura, alguns agentes antibacterianos foram usados para tratar infeções em peixes. Para proteção do consumidor, é necessário cumprir o Intervalo de Segurança, o período de tempo após o tratamento cessar, após o qual o peixe é considerado livre de contaminantes. Os tempos de retirada variam especialmente dependendo do composto utilizado e da temperatura da água, variando entre 3 e 42 dias ^[22].

Muitos corantes e indicadores em contato com alimentos podem representar riscos à saúde. Foi demonstrado que alguns corantes orgânicos afetam adversamente e alteram marcadores bioquímicos em órgãos vitais, como, por exemplo, o fígado e rim em ratos, não só em doses mais elevadas, mas também em doses mais baixas.

O corante verde de malaquite (VM) pertence ao grupo dos corantes trifenilmetano, que constam da lista prioritária da “Food and Drug Administration” (FDA) para medicamentos para peixes ^[23].

O VM, originalmente usado na indústria têxtil, mas também como antisséptico tópico, amplamente utilizado para tratar parasitas, infeções por fungos e bactérias em peixes apresenta elevada solubilidade em água ^[24].

O VM é um corante que foi amplamente utilizado na produção de peixes desde o início da década de 1930. A razão para esta popularidade deriva do amplo espectro de ação antimicrobiana e eficácia na prevenção e tratamento de determinadas doenças piscícolas [20]. Entretanto, tem sido relatado que o VM e seu metabolito VLM são teratogénicos, carcinogénicos e mutagénicos para humanos. O VM pode também irritar o trato respiratório ao ser inalado e causar irritação no trato gastrointestinal, após a ingestão. Já o contato com a pele pode causar irritação, vermelhidão e dor, e em contato com os olhos pode causar uma lesão permanente [25]. No caso das espécies piscícolas, o VM causa efeitos prejudiciais no fígado, brânquias, rins, intestino, gónadas e células gonado trópicas pituitárias [25]. A proibição do VM, em 2000, em aquacultura na UE e em outros países é devida à preocupação com o potencial para a toxicidade humana e a presença do VM e do VLM no ambiente aquático obriga a uma maior monitorização em peixes de aquacultura. Ainda assim, o VM ainda é usado ilegalmente na aquacultura devido ao seu baixo custo e alta eficácia [22].

1.5.1.1 Propriedades físico-químicas

Nas Tabela I e II encontram-se algumas características físico-químicas do VM e do metabolito VLM. Em termos químicos, os dois compostos são bastante idênticos, ao possuírem o mesmo número de átomos de Carbono (n=23) e de Azoto (n=2), com a diferença que o principal metabolito do VM possui mais um átomo de hidrogénio, no total de 26. A massa molar de ambos é muito similar, na ordem dos 330g/mol, e em termos de ponto de fusão do VM é situado entre o 158-160°C, sendo que o ponto de fusão no VLM é atingido entre os 100 e os 102°C.

Tabela 1 - Características físico-químicas do corante VM ^[26]

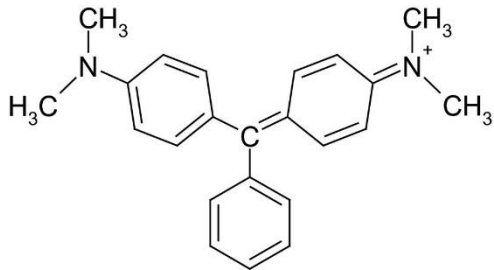
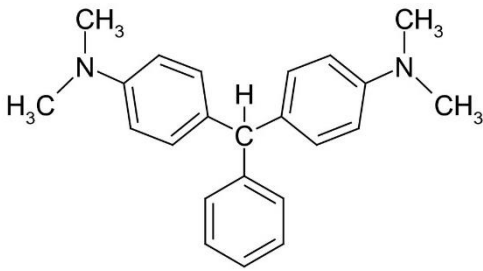
Verde de Malaquite	
Fórmula química	$C_{23} H_{25} N_2$
Nome IUPAC	4 - [(4-dimetilaminofenil) -fenil-metil] -N, N-dimetil-anilina
Estrutura	
Solubilidade em água	110 g/l H ₂ O ou 0,00138 mg / mL
pKa (constante de ionização)	6,9
Massa molar	329,45 g/mol
Ponto de fusão	158 a 160 ° C

Tabela 2 - Características físico-químicas do metabolito VLM ^[26]

Verde de Leucomalaquite	
Fórmula química	$C_{23} H_{26} N_2$
Nome IUPAC	4,4-Benzilidenebis (N, N-dimetilanilina)
Estrutura	
Solubilidade em água	Ligeiramente solúvel em água
pKa (constante de ionização)	Não existe (?)
Massa molar	330,46 g / mol
Ponto de fusão	100-102 ° C

1.5.1.2 Propriedades farmacocinéticas

Oxalato de VM reduz-se a VLM e acumula-se nos tecidos dos peixes expostos. Armazena-se principalmente no soro sanguíneo, no fígado, nos rins, nos músculos, na pele e nas vísceras de vários animais, incluindo os peixes. Plakas *et al.* (1996) analisaram a absorção, distribuição e metabolismo do VM. Foi rapidamente absorvido e concentrou-se no tecido durante a exposição através da água. O metabolito VLM não é o estado final da transformação do VM. De fato, vários estudos demonstraram que o VM, assim como o VLM, são desmetilados por oxidações sistemáticas sequenciais. Os produtos de degradação podem-se formar nos organismos dos peixes vivos durante a ação enzimática, mas também durante a degradação fotooxidativa na água [27].

1.5.1.3 Propriedades farmacodinâmicas

Oxalato de VM: As concentrações do composto VM no plasma de bagres americanos (*Ictalurus punctatus*), mais conhecido por peixe-gato-do-canal aumentou rapidamente durante a exposição através da água, sugerindo uma absorção eficaz do corante catiónico e (ou) do composto de carbinol através das guelras. Após a transferência dos peixes para água limpa, as concentrações de VM no plasma apresentaram uma redução triexponencial com uma meia-vida terminal de 4,7 horas, semelhante aos resultados em peixes sujeitos a administração intravascular. Os resíduos radioativos foram amplamente distribuídos e concentrados em todos os tecidos em relação ao plasma, particularmente no fígado e rim posterior. Na gordura abdominal, as concentrações de resíduos aumentaram com o tempo, provavelmente como resultado do metabolismo e redistribuição de resíduos entre os tecidos. As concentrações de resíduos na gordura eram consideravelmente mais elevadas que nos outros tecidos durante as amostragens para além de 4 horas. A gordura pode servir de compartimento de armazenagem a grande profundidade, que prolonga a eliminação de resíduos. A biotransformação de VM em VLM pode ser uma importante reação de desintoxicação em animais expostos a VM [22].

1.5.1.4 Toxicidade

A toxicidade do VM aumenta com o tempo de exposição, temperatura e concentração. Tem sido relatado por causar carcinogénese, mutagénese, alterações cromossómicas, teratogenicidade e toxicidade respiratória em alguns mamíferos. Além disso, ocorrem alterações significativas em parâmetros bioquímicos do sangue de peixes expostos ao VM. Em geral, os metabolitos provenientes da degradação do VM, como o VLM, acumulam-se nos tecidos adiposos e sua eliminação é fortemente dependente do teor de gordura em cada indivíduo. No entanto, apesar da grande quantidade de dados sobre os seus efeitos tóxicos, o VM é ainda muito utilizado como parasiticida em aquacultura e outras indústrias, como a indústria têxtil ^[28].

1.6 Legislação

O regulamento nº 2377/90 do Conselho da Comunidade Europeia (CCE) estabelece limites máximos de resíduos (LMRs) de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal para consumo humano, apenas para as substâncias farmacologicamente ativas aprovadas podem ser utilizadas para tratamento veterinário ^[29].

Posteriormente, o artigo 18.^a do Regulamento (CE) nº 470/2009 estipula que, para substâncias que não são classificadas como «substâncias permitidas» em conformidade com o referido regulamento, pode ser estabelecido um Ponto de Referência de Ação (PRA) para assegurar o funcionamento dos controlos de alimentos de origem animal. Considera-se que os alimentos de origem animal que contêm resíduos dessa substância iguais, ou acima, do PRA não cumprem a legislação da UE. Até agora, os PRA's foram baseados somente no Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) analiticamente orientados, e nenhuma consideração foi dada ao perfil toxicológico das substâncias não permitidas ^[26].

O LMDR é o teor mínimo de uma substância a analisar numa amostra que deve ser detetável e passível de confirmação, e pretende harmonizar-se o desempenho analítico de métodos relativos a substâncias para as quais não se encontre definido um limite permitido. No entanto, os LMDRs correspondem ao limite médio acima do qual a deteção de uma substância ou seus resíduos pode ser interpretada como metodologicamente significativa ^[30].

Assim, devido às limitações analíticas, não existe um nível seguro do resíduo estabelecido. No entanto, o LMDR de 2 µg / kg em produtos de aquacultura é especificado no anexo II da

Decisão 2002/657 / CE da Comissão, alterada pela Decisão 2004/25 / CE da Comissão (Tabela 3). Este LMDR refere-se à soma de VM e do seu metabolito VLM ^[31].

Segundo a Decisão 2002/657/CE da Comissão, de 14 de agosto de 2002:

Tabela 3 - LMDR da soma do VM e do principal metabolito VLM

Substância e seu metabolito	Matriz	LMDR
Verde de Malaquite + Verde de Leucomalaquite	Peixes provenientes de aquacultura	2 µg/kg

1.7 Metodologias analíticas

Em geral, os métodos usados para detetar VM em produtos aquáticos baseiam-se principalmente em cromatografia líquida e gasosa com detecção por espectrometria de massa com desvantagens porque são metodologias dispendiosas e complexas. Portanto, é imperativo estabelecer um método rápido, específico e preciso para a detecção de VM e de VLM em amostras de peixes e água, que é o caso do ensaio imunoenzimático (ELISA). Este método é comumente usado para a detecção de resíduos de medicamentos em alimentos devido à sua alta sensibilidade inerente, simplificação e baixo custo. O ELISA também foi aplicada para a detecção de VM em rações para peixes de aquacultura e água. No entanto, este método tem algumas desvantagens como o longo período de preparação, a instabilidade e a não reutilização ^[32].

1.7.1 ELISA

A placa de microtitulação remonta a 1951, constituída por uma microplaca de acrílico com 6 linhas de 12 poços que juntamente com um dispositivo de deposição com várias pontas, que permitem a realização de vários ensaios em simultâneo. A realização de vários ensaios em simultâneo, permitiu uma redução significativa no tempo de análise de diversas amostras por cada teste, aumentando significativamente o rendimento do laboratório. Desde então as microplacas evoluíram, tornando-se num dos equipamentos descartáveis mais comuns em laboratórios. O formato mais convencional consiste em 96 poços individuais dispostos em oito linhas e doze colunas com dimensões definidas pelo *American National Standards Institute* em 1996. O material utilizado é poliestireno, de alta transparência e o fundo chato e plano ^[33].

As microplacas são fabricadas a partir de um polímero (poliestireno ou polipropileno) e são utilizadas para examinar as características físicas, químicas ou biológicas de várias amostras em simultâneo ^[34].

O ELISA é um método de deteção que combina reconhecimento específico de antígeno e anticorpo com reação enzimática. Era comumente usado para a deteção de pesticidas, toxinas biológicas, patógenos e resíduos de medicamentos veterinários, incluindo o VM em alimentos, devido à sua alta sensibilidade inerente, simplificação e baixo custo ^[32].

Os ELISAs são um método de *screening* que têm como vantagem a rapidez, a especificidade e a sensibilidade, comparativamente com os métodos cromatográficos, especialmente para triagem de grande número de amostras ^[31].

Este método caracteriza-se ainda pela alta reprodutibilidade, sendo um método de alto rendimento, em que as amostras positivas podem ser usadas diretamente para métodos de confirmação, como exemplo, por cromatografia líquida com detetor de espectrometria de massa (LC/MS) ^[35].

1.8 Comparação entre metodologias analíticas

As metodologias analíticas podem ser classificadas em dois grandes grupos: em métodos de *screening* e métodos de confirmação.

Diversos métodos analíticos foram relatados para a determinação de resíduos de VM e VLM em tecidos de peixes. De acordo com a CE, os métodos para determinar VM nos tecidos de peixes devem atender ao LMDR de 2 µg/kg para a soma de VM e VLM. O ELISA, a cromatografia líquida de alta performance acoplada a detetores visíveis ou de fluorescência e espectrometria de massa são os métodos utilizados para determinação de VM e de VLM. No entanto, o método ELISA é a técnica analítica comum para o rastreio de resíduos de VM em produtos de aquacultura devido à sua alta sensibilidade, rapidez e baixo custo ^[36].

Para os métodos ELISA semi-quantitativos, é necessário estabelecer uma curva de calibração para o cálculo da concentração das amostras medidas posteriormente. Quando se utilizam kits ELISA comercialmente disponíveis, os padrões para a preparação da curva de calibração estão incluídos no kit. A curva de calibração (CC) deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear e o coeficiente de correlação. Assim, torna-se necessário o uso de um número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a

relação entre a concentração e a resposta. A CC pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido ^[37].

Encontra-se descrito na literatura científica diversos estudos de identificação e quantificação de resíduos de VM e VLM em diversas amostras de peixes produzidos em regime de aquacultura. Os métodos mais utilizados e precisos são testes ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), cromatografia líquida de alta pressão com detecção ultravioleta ou com detetor Diode Array (HPLC-UV, -DAD) e a cromatografia líquida com detecção por espectroscopia de massa (HPLC-MS). Mais recentemente surgiu também a cromatografia líquida de muito alta pressão (UPLC) que é mais eficiente do que a HPLC ^[38].

Na Tabela 4 encontram-se diversos resultados de validação de metodologias analíticas tais como o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ) e as recuperações. Num dos estudos, através do método cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), que tem como matriz o peixe-gato, em que o limite de quantificação de VLM foi 5,0 µg/kg, com uma taxa de recuperação $95,9 \pm 11,1$ (%). Por LC-UV/VIS foi estudado salmão onde não se definiu um limite de detecção, mas um limite de quantificação de 1 µg/kg com recuperação de 88.9 ± 2.6 (%); e por ELISA, um estudo de 2007 a diversos peixes definiu o limite de detecção de 0,05 µg/kg para a soma de VM e o seu metabolito VLM, com uma variação da taxa de recuperação entre 71- 108% e 62-105%, respetivamente.

Analisando os resultados descritos na Tabela 4, todos os métodos cumprem com os requisitos para o LOQ, sendo o valor mais alto na CG/MS, seguido de LC-UV/VIS com os valores entre 0,9 e 1 µg/kg e posteriormente mais baixos por ELISA e LC-MS/MS. Para a maioria dos estudos as taxas de recuperação situam-se acima dos 70%. No entanto, os estudos realizados através da metodologia ELISA apresentam recuperações mais baixas comparativamente com as técnicas LC-UV/VIS e LC-MS/MS.

Tabela 4 - Metodologias analíticas utilizadas na determinação do verde de malaquite e do verde de leucomalaquite em alimentos

Químico	Metodologia analítica	Matriz	Limite de Detecção (LOD)	Limite de Quantificação (LOQ)	Recuperação (%)	Referencias bibliográficas
VM	LC-UV/VIS	Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Nf	1 µg/kg	(88,9 ± 2.6)%	(Andersen et al, 2005)
VM + VLM	LC-UV/VIS	Truta	VM: 0,6 µg/kg	VM: 1 µg/kg	VM: 62%	(Bajc et al, 2007)
		Carpa	VLM: 0,5 µg/kg	VLM: 0,9 µg/kg	VLM: 72%	
VM + VLM	LC-MS/MS	Salmão	VM: 0,17 µg/kg VLM: 0,15 µg/kg	VM: 0,30 µg/kg VLM 0,35 µg/kg	VM: 103,7 ± 6,6% VLM: 95,7 ± 4,7%	(Dowling et al, 2007)
VLM	GC-MS	Peixe-gato	Nf	5,0 µg/kg	95,9 ± 11,1 %	(Turnipseed et al, 1995)
VM + VLM	LC-MS	Salmão	Nf	VM: 0,15 µg/kg	VM +VLM: (86-109 ± 6,4 -13)%	(Turnipseed et al, 1995)
VM + VLM	LC-MS	Salmão	0,15 µg/kg	Nf	VM: (70 ± 3,1)% VLM: (85 ± 1,3)%	(Valle et al, 2005)
VM + VLM	ELISA	Vários	VM + VLM: 0,05 µg/kg	Nf	VM: 71-108% VLM: 62-105%	(Yang et al, 2007)
VM + VLM	ELISA	Truta	VM: 0,30 µg / kg	Nf	VM: 79,1-86,2% VLM: 15 a 18%	(Barani & Tajik, 2017)

Legenda: Nf – Não facultado

1.9 Ocorrência de verde de malaquite em tecido muscular de peixes

A literatura científica reporta a ocorrência de VM e VLM em alimentos, principalmente em amostras de peixe, sendo também encontrado em ervilhas, molho de pimenta, gelados, doces à base de cereais, produtos salgados e algodão-doce ^[39].

Na base de dados do Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF), foram reportados 135 eventos de notificação para VM e VLM em produtos alimentícios, para o período de 2002 a 2014, conforme se visualiza na Figura 4. As notificações englobam as seguintes categorias de produtos: peixe e produtos de peixe, crustáceos e produtos derivados peixes e produtos derivados (com exclusão de crustáceos e moluscos) e peixes e produtos da pesca selvagem (com exceção dos crustáceos e moluscos). O maior número de notificações (n=50) foi reportado em 2005 ^[39].

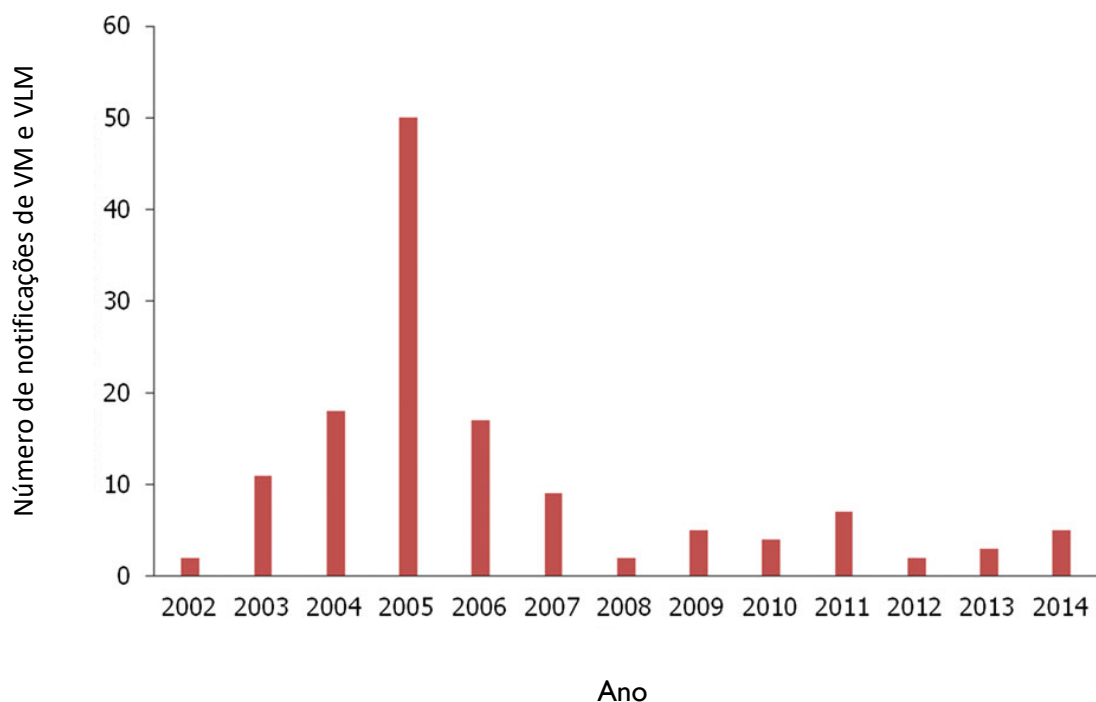


Figura 4 - Número de notificações para o VM e VLM em peixes entre o período 2002 – 2014

Na Tabela 5 apresentam-se os dados recolhidos de diversos estudos para o VM e VLM em peixes produzidos em aquacultura.

Em 18 amostras de truta, 10 enguias e 20 salmões provenientes da Holanda as concentrações de VLM variaram entre 1,3 – 14,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 13 amostras de trutas, entre 1,5 – 9,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 5 amostras de enguia e concentrações entre 0,2 – 2,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 3 amostras de salmão ^[39].

Em 2013, em Itália, Conti *et al.* detetaram a presença de VM em 15 amostras de robalo e 15 amostras de dourada. A concentração média detetada foi de 0,48 µg/kg), apresentando um teor máximo de 1,21 µg/kg ^[39].

Na Croácia foram analisadas 42 amostras de carpa e 30 amostras de truta para detetar a presença de resíduos de VM em 13 amostras, em valores inferiores ao LMDR de 2 µg/kg.

Segundo dados do último relatório de 2014 do RASFF, na Bélgica foi rejeitada a entrada de Peixe-gato (*Pangasius hypophthalmus*) contaminado com concentrações de VLM no valor de 44,40 µg/kg, com origem no Vietname. Na República Checa foram detetadas trutas com uma concentração média de VLM de 13,4 µg/kg, provenientes de Itália. Já na Holanda, surgiu um alerta sobre truta proveniente da Dinamarca, onde foram detetados valores de 5,9 µg/kg de VLM.

Em 2005, Portugal notificou, através do RASFF, a contaminação de filetes de *P. hypophthalmus* com VM (Notificação de alerta nº2005.549), tendo este peixe também sido notificado por contaminação bacteriana por *Listeria monocytogenes* em filetes descongelados ^[40].

Em 2005, Portugal notificou através do RASFF valores de 3,8 µg/kg de VM em peixe-gato com origem no Vietname.

Fallah e Barani (2014), analisaram 144 amostras de truta variando os valores de contaminação entre 0,3 a 146,1 µg/kg de VM com VLM em 49% das amostras e 33% no nível de LMDR ou superior. Isto indica claramente que as concentrações detetadas são proibidas, com a frequência de contaminação a ser superior para o VLM comparativamente com o VM.

Tabela 5 - Ocorrências de verde de malaquite e verde de leucomalaquite em peixes de aquacultura

Matriz (peixe)	Nº de amostras	País de origem	Frequência de contaminação	Intervalo das concentrações detetadas	Média das concentrações	Ano do estudo	Referências bibliográficas
Truta e carpa	72	Croácia	18% (13)	0,1 a 0,3 µg/kg	0,231 µg/kg	2009-2011	Bilandžić et al., (2012)
Robalo	15	Itália	Nf	Nf a 1,21 µg / kg	0,48 µg / kg	2013	Conti et al. (2015)
Dourada	15						
Trutas	144	Nf	49%	0,3 a 146,1 µg / kg	Nf	2011	Fallah e Barani, 2014
Truta	18	Holanda	72% (13)	1,3–14,9 µg / kg	Nf	2003	Bergwerff e Scherpenisse (2003)
Enguia	10		50% (5)	1,5–9,7 µg / kg			
Salmão	20		15% (3)	0,2–2,9 µg / kg			
Enguia	25	Alemanha	56%	0,053 a 0,765 µg / kg	Nf	Nf	Schuetze et al. (2008)

Legenda: Nf – Não facultado

Diversos estudos confirmam a presença do VM e do VLM como composto proibido devido à sua toxicidade, o que acarreta riscos para a saúde pública, indicando que muito provavelmente, não exista um forte controlo e fiscalização em qualquer parte do mundo.

2. Procedimento experimental

2.1 Reagentes, soluções e equipamentos

2.1.1 Reagentes e soluções

Os solventes utilizados foram o Acetonitrilo (ACN) e o N-hexano.

Na Figura 5 encontram-se todos os componentes do kit ELISA utilizados:

- *Extraction Buffer A*
- *Extraction Buffer B*
- *Extraction Buffer C*
- MG/CV Clean Up Mix
- Stop Buffer
- Wash Solution
- Streptadivin HRP

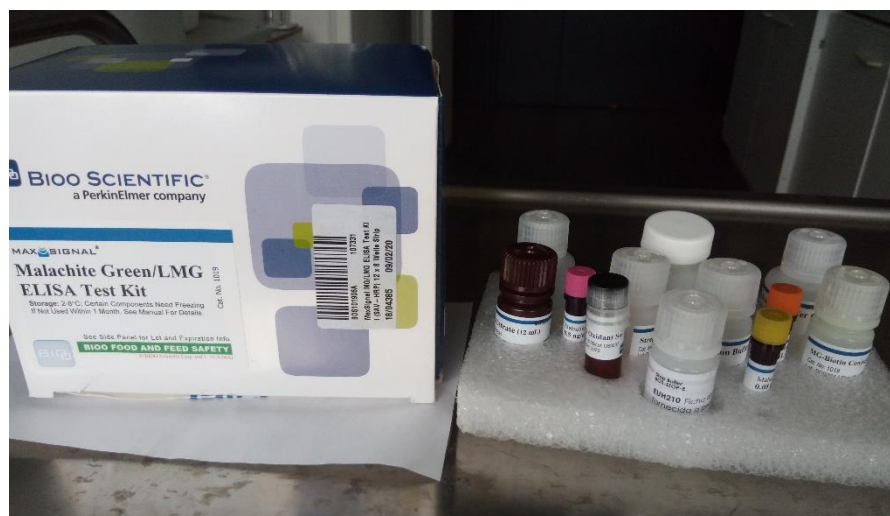


Figura 5 - Constituintes do kit ELISA

2.1.2 Equipamento utilizado

Neste procedimento experimental, foram utilizados diversos materiais de laboratório, tais como: espátulas, micropipetas Gilson de volume variável, papel de alumínio, pinças metálicas, viais de plástico e tubos de ensaio.

Foi também utilizada uma a balança analítica de precisão Mettler Toledo PB 303-S/Fact (Colombus, Ohio, EUA) (Figura 6).



Figura 6 - Balança analítica de precisão

Uma trituradora Krups modelo GVA2 Speedy Pro Plus (Nieuwegein, Holanda) (Figura 7).



Figura 7 - Trituradora para moagem das amostras

Um agitador vortex mixer Velp ZX3 (Itália).

Uma Centrífuga refrigerada Sigma 3-16k (St. Louis, E.U.A) (Figura 8).



Figura 8 - Centrífuga Sigma 3-16k

Outros equipamentos utilizados foram evaporador Block Heater marca Stuart modelo SBH 200D/3 conectado a uma botija de azoto comprimido e um Leitor de microplacas – Espectrofotómetro – optic ivymensystem 2100-C.

2.2 Amostragem

A amostragem foi efetuada durante os meses de novembro e dezembro de 2018 e janeiro de 2019, abrangendo as regiões Centro e Norte de Portugal Continental.

A aquisição das amostras foi feita maioritariamente em grandes superfícies de retalho alimentar, apenas uma amostra foi adquirida num mercado municipal. No total, foram adquiridas quarenta e duas (42) amostras de peixe provenientes de aquacultura, nomeadamente: 11 douradas (26%), 9 salmões (21%), 8 robalos (19%), 4 trutas (10%), 4 corvinas (10%), 2 trutas salmonadas (5%), 2 peixe-gato (5%), 1 pargo (2%) e 1 linguado (2%). Os peixes têm como origem a Grécia (24%), Portugal (22%), Noruega (20%), Espanha (17%), Turquia (10%), Vietname (5%) e Chile (2%) (Tabela 6). Após a aquisição e filetagem, as amostras foram congeladas à temperatura -18°C até à análise.

Tabela 6 - Lista de amostras

Tipo de Peixe	Origem
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Turquia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Portugal
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Portugal (Ilha Madeira)
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Espanha
Pargo (<i>Pagrus pagrus</i>)	Grécia
Peixe-gato (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	Vietname
Peixe-gato (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	Vietname
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Turquia
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Chile
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal

2.3 Metodologia analítica

Para este trabalho de investigação foi utilizado o ensaio ELISA colorimétrico competitivo, utilizando o kit MaxSignal Malachite Green/LMG projetado para triagem de rotina do VM e do VLM em peixes. O meio sólido usado nesta técnica é uma placa de micro titulação (ou microplaca), com 96 compartimentos individuais (poços) dispostos em linhas e colunas, formando uma matriz 2:3. As amostras ficam dispostas na matriz formada pelos poços da microplaca. Este kit oferece um ensaio quantitativo rápido de alto rendimento.

2.3.1 ELISA - Extração

Antes de começar a extração em si, efetuou-se a lavagem e desinfecção do material de laboratório a utilizar e posteriormente colocou-se a secar em estufa de forma a minimizar significativamente qualquer contaminação das amostras.

Após a descongelação das amostras, procedeu-se à sua trituração até obter-se uma textura pastosa. Foram pesadas 2 g de cada amostra (Figura 9), num tubo de centrífuga já devidamente tarado e identificado. Adicionou-se 1 mL de *Sample Extraction Buffer A* (SEB-A) e 0,4 mL de *Sample Extraction Buffer B* (SEB-B) a todas as amostras, agitando de seguida no vortex durante 15 segundos, obtendo-se uma amostra branca acinzentada. Adicionou-se a cada amostra 6 ml de acetonitrilo (ACN), procedeu-se a nova agitação no vortex durante 15 minutos. Depois, centrifugação a 4000 g durante 15 minutos, a 4° C e transferiu-se 2 mL da fase superior de ACN para um tubo com 300 mg de *MG Clean Up Mix*. Agitou-se no vortex durante 1 minuto. As amostras foram incubadas durante 3 a 5 minutos e agitou-se no vortex durante 30 segundos e centrifugação durante 10 minutos. De seguida, com recurso a micropipetas de 1 mL, retirou-se 1 ml de cada amostra, colocando em vials de plástico a secar com azoto a 50° C. Adicionou-se 0,1 mL de 1x solução oxidante e agitou-se no vortex cada amostra durante 30 segundos, sanicou-se 30 segundos e voltou ao vortex 30 segundos para sofrer agitação. Incubaram-se novamente as amostras durante 15 minutos, adicionou-se 400 µL de *Sample Extraction Buffer C* (SEB- C) e n-hexano, agitou-se no vortex entre 1 a 2 minutos e centrifugou-se novamente 10 a 15 minutos. De seguida, com uso de pipeta, “aspirou-se” a fase superior do n-hexano, deixando o vial aberto. Por fim, retirou-se 90 µL da fase aquosa, a única que se encontrava nos tubos de centrífuga.

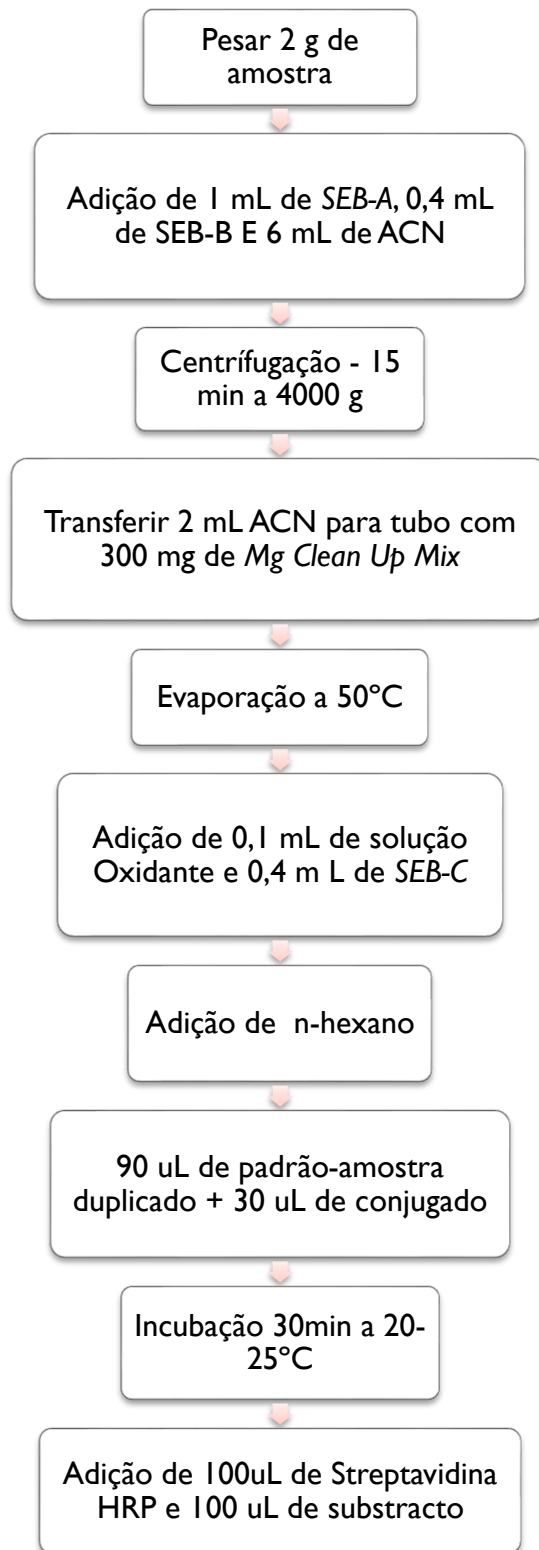


Figura 9 - Processo sequencial de extração

2.3.2 ELISA - Deteção

Para esta segunda fase sequencial do ensaio competitivo de ELISA, realizaram-se o passo da competição e por fim o passo para desenvolver a coloração do ensaio tendo-se realizado todos os ensaios em duplicado. Assim, adicionou-se 90 μL de padrão (0; 0,05; 0,50; 1,50 e 4,50 ng/mL) ou amostra e 30 μL de conjugado, com pré-incubação da placa com os extratos de amostra durante 30 minutos sem a presença de luz solar, utilizando papel de alumínio, e a uma temperatura entre 20-25°C. Após o passo de incubação, os poços foram esvaziados e procedeu-se à lavagem dos mesmos em 3 ciclos usando solução de água e água destilada. Após lavagem, a placa foi desenvolvida pela adição de 100 μL de Streptavidina HRP e voltou-se a fazer uma nova incubação com duração de 15 minutos à temperatura ambiente. Para finalizar a reação, adicionou-se 100 μL de solução STOP dando origem à mudança de cor permitindo a leitura a um comprimento de onda de emissão de 450 nm (Figura 10), isto é, iniciou-se o procedimento de visualização direta dos poços e colocou-se a placa no leitor de microplacas – espectrofotómetro – onde se fez a leitura dos resultados obtidos, onde se converte as diferentes intensidades da cor resultantes em valores numéricos, os chamados valores de absorvância.



Figura 10 - Fase de deteção

3. Apresentação e discussão de resultados

Como já referido anteriormente, este estudo pretendeu identificar e quantificar a presença de VM e VLM em amostras de peixe provenientes de aquacultura, através da técnica analítica ELISA para triagem.

Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo com indicações do fabricante, contidas no manual que acompanha o kit ELISA. Para esta técnica foi seguida, de forma muito rigorosa, o manual de apoio às diferentes etapas.

3.1 Validação da metodologia analítica

Estando esta metodologia previamente validada pela marca que disponibiliza o kit ELISA, este trabalho apenas se debruçou sobre alguns parâmetros relacionados com a validação como a linearidade, o limite de deteção instrumental (LDI) e o limite de quantificação instrumental (LQI).

3.1.1 Linearidade

Para o parâmetro da linearidade, estudou-se a linearidade dos padrões (0; 0,05; 0,50; 1,50 e 4,50 ng/ml), através da sua absorvância a 450 nm.

A curva de calibração (CC) foi determinada por análise de regressão, relacionando a concentração (eixo das abcissas) com a absorvância (eixo das ordenadas).

A relação é tanto maior quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação (r^2) de 1. Verificando a Figura 11, observa-se uma reta com o coeficiente de correlação (R^2) de 0,9944, muito próximo de 1, revelando uma boa linearidade entre as concentrações 0 e 4,5 ng/ml.

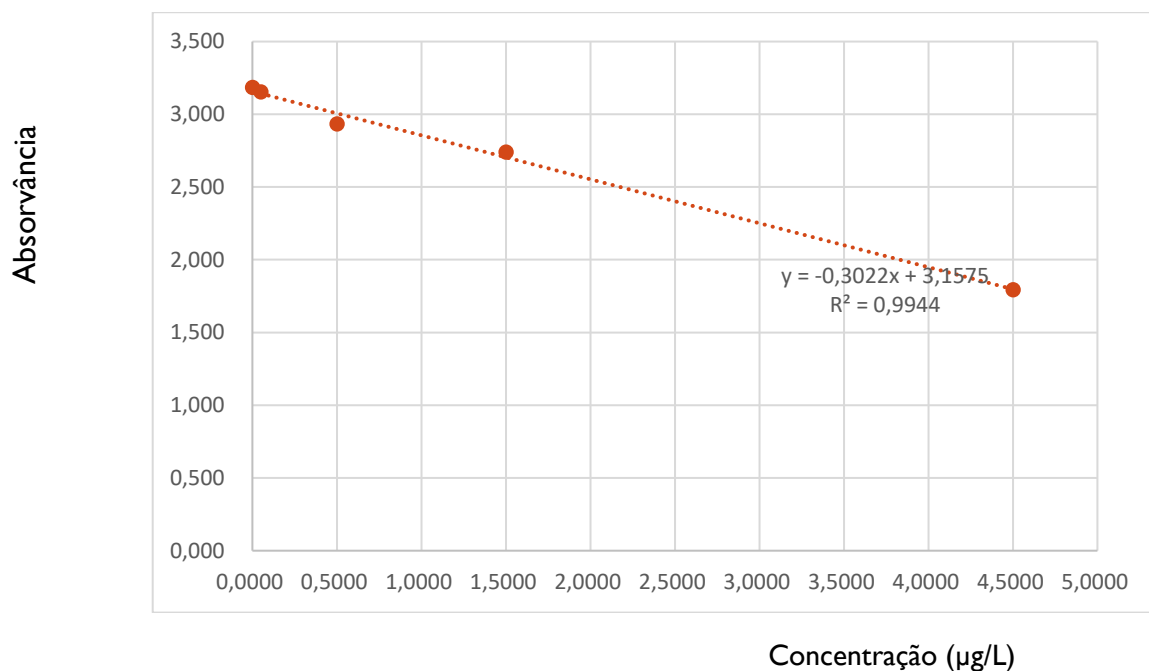


Figura 11 - Curva de calibração dos padrões

Através da equação obtida na CC, calculou-se as concentrações das amostras.

3.1.2 Limites de detecção e quantificação instrumental

Para este estudo que envolve padrões e solventes, após ser calculada a linearidade, avaliaram-se mais dois parâmetros necessários para o método ELISA, como o limite de detecção instrumental (LDI) e o limite de quantificação instrumental (LQI).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC,) o LDI define-se como a menor concentração ou quantidade absoluta em analito, para o erro-padrão à reta e ao declive ($m=3,1575$). O LQI é a menor concentração de mensurando que pode ser determinado com um nível aceitável de precisão e veracidade da repetibilidade.

O IDL e IQL foram calculados com base em parâmetros da curva analítica. Para o limite de detecção utilizou-se:

Limite de detecção = $3,3 \times (s/S)$, onde s é o desvio padrão das amostras à reta e S o declive da reta analítica.

Para o limite de quantificação = $10 \times (s/S)$, em que s e S são os mesmos utilizados no limite de detecção.

Este estudo caracteriza-se pelo início em matriz sólida, as amostras de peixe, onde se identificou e quantificou a presença do analito numa matriz líquida, analisando a metodologia analítica conclui-se que houve um fator de diluição de 1,5 que foi utilizada para corrigir as concentrações detetadas.

LDI	0,908827	µg/kg
LQI	2,75402	ng/g

Através destes resultados, verifica-se que o IDL e o IQL são superiores ao limite de deteção de 0,1 µg/kg apresentado no manual do kit ELISA. Apesar de estes valores serem superiores aos apresentados pela marca que comercializa este kit ELISA continua a cumprir com a legislação que estabelece qual o limite mínimo (2µg/kg) exigido para a identificação e quantificação de VM e do seu metabolito.

O LMDR estipulado pela legislação europeia em vigor é de 2µg/kg, isto é, não existindo um LMR para os analitos em estudo, estabeleceu-se um LMDR para as metodologias analíticas sendo o valor indicado supracitado

3.2 Ocorrência de VM e VLM nas amostras

Das 41 amostras analisadas, verifica-se que todas se encontram contaminadas com a presença de resíduos de VM e/ou VLM (Tabela 7). Na tabela abaixo estão representadas as concentrações de VM e VLM encontradas nas amostras, por espécie de peixe e origem dos mesmos.

Os valores encontrados nas amostras são ilegais e elevados, tendo em conta que o VM não é permitido em aquacultura.

Através da Tabela 7 constata-se que 10 amostras analisadas, que representam 25% das amostras totais, ultrapassam o valor de 10 µg/kg, sendo este valor atingido praticamente em todas as espécies estudadas. O valor mais elevado foi observado (12,23 µg/kg) numa amostra de salmão com origem na Noruega. O valor mais baixo pertenceu a uma amostra de corvina oriunda de Espanha (6,91 µg/kg). Através da Figura 12, as concentrações médias mais altas foram encontradas na truta salmonada (n=2) ambas com origem em Portugal, enquanto para a

corvina, obteve-se a o menor valor médio de concentrações, cerca de 8 µg/kg com origens em Espanha (n=3) e Turquia (n=1). Para o pargo com origem na Grécia, e sendo apenas uma amostra recolhida e analisada, a concentração detetada foi de 11,41 µg/kg. Entre os 7 países (origem), não houve diferenças estatisticamente significativas.

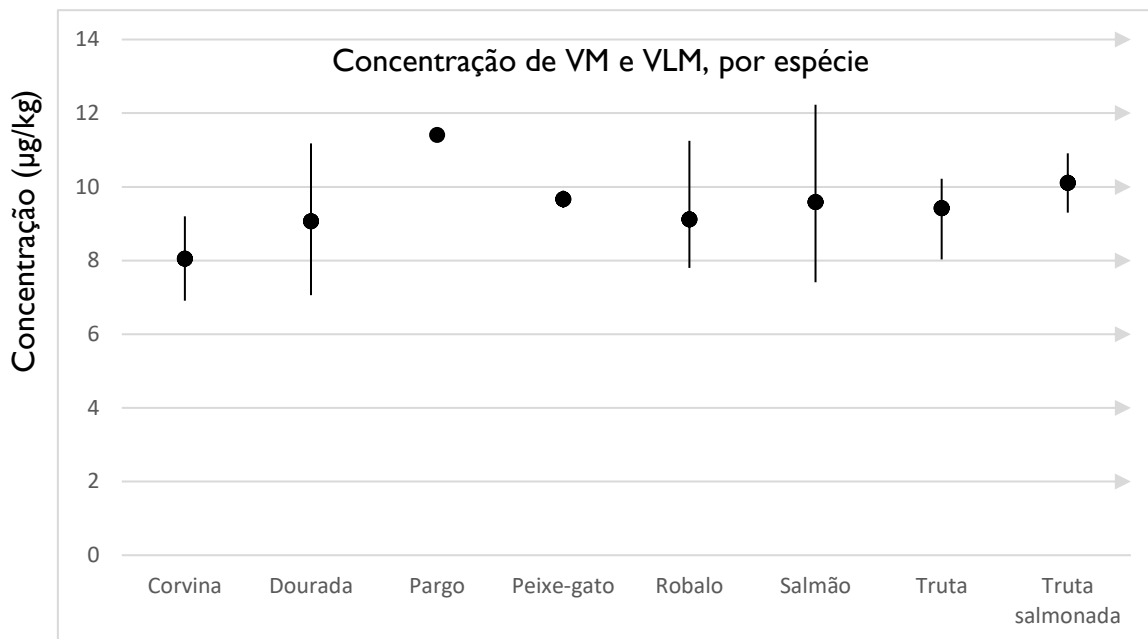
Tabela 7 - Concentrações de VM e VLM

Tipo de Peixe	Origem	Concentração de VM e de VLM (µg/kg)
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha	8,60
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha	7,50
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Espanha	6,91
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Turquia	9,20
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	11,18
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	9,47
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	9,00
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	10,08
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Grécia	9,00
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Portugal	8,48
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Portugal (Ilha Madeira)	7,77
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	9,36
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	7,06
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Turquia	8,45
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	Espanha	9,87
Pargo (<i>Pagrus pagrus</i>)	Grécia	11,41
Peixe-gato (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	Vietname	9,43
Peixe-gato (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	Vietname	9,90
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha	8,81
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha	10,25
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Espanha	7,80
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	8,98
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	8,88
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	7,80
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Grécia	9,20
Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Turquia	11,25
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Chile	9,54

Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	8,03
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	7,41
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	9,71
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	8,77
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	10,68
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	9,89
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	12,23
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	Noruega	10,02
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal	10,22
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal	10,01
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal	8,03
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Portugal	9,42
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal	9,30
Truta Salmonada (<i>Oncorhynchus clarkii clarkii</i>)	Portugal	10,91

Seria espectável observar contaminações elevadas em peixes de aquacultura oriundos de países asiáticos, o que vai ao encontro da literatura científica. Constatou-se que os níveis de contaminação por VM e VLM são elevados tanto em peixes com origem europeia como em países asiáticos (Figura 12), apesar de nestes últimos, só serem recolhidas e analisadas 2 amostras de peixe, levantando preocupações para os consumidores de peixe.

Contudo, sendo ELISA um método de triagem, este estudo carece de uma confirmação, nomeadamente por LC-MS/MS, com a vantagem das amostras poderem ser usadas diretamente para este método de confirmação, onde os resultados são de alta fiabilidade deixando desta forma em aberto uma possível continuidade deste estudo.



Legenda: Corvina - *Argyrosomus regius*; Dourada - *Sparus aurata*; Pargo - *Pagrus pagrus*; Peixe-gato - *Pangasius hypophthalmus*; Robalo - *Dicentrarchus labrax*; Salmão - *Salmo salar*; Truta - *Oncorhynchus mykiss*; Truta Salmonada - *Oncorhynchus clarkii clarkii*

Figura 12 – Ocorrência de VM e de VLM (Médias, mínimos e máximos de concentrações) em diversas espécies de peixes

Através das concentrações calculadas, e com estudos publicados e divulgados anteriormente, pode-se provar que os valores obtidos são alarmantes e violativos, dando mais força à utilização do VM e do VLM de forma ilegal no sector da aquacultura, sendo a sua utilização indiferenciada pela espécie piscícola ou origem dos mesmos, de maneira intensiva e a grande escala no pescado.

4. Conclusão

Foi aplicada uma metodologia ELISA para a determinação de VM e VLM em tecido muscular de 41 peixes de aquacultura adquiridos em Portugal.

Os resultados revelaram uma frequência de deteção de 100%, sendo que todas as concentrações foram superiores ao valor limite máximo (LMDR) estabelecido pela Decisão 2002/657 / CE da Comissão de 14 de agosto de 2002.

Assim, torna-se necessário não só uma sensibilização a todos os intervenientes que estejam envolvidos, de forma direta e indiretamente, para eliminar esta prática ilegal, que põe em causa a vida do pescado, dos consumidores e do meio ambiente. Será também importante uma maior vigilância e rigorosa fiscalização por parte das entidades nacionais e europeias envolvidas no mundo da aquacultura, tendo como princípio base um controlo rigoroso destes dois compostos, de forma assegurar a segurança alimentar e a qualidade de vida do consumidor. A EFSA deve apostar em programas adicionais de vigilância com um número maior de amostras de músculos de peixes para melhorar a avaliação de risco. Este trabalho pode ter continuidade para confirmação dos resultados e melhorar a avaliação dos níveis contaminados por VM e VLM em peixes para consumo humano, uma vez que estão em causas a Saúde Pública e a saúde ambiental.

Outra questão importante será a identificação da presença do VM entre peixes produzidos em regime de aquacultura e peixes capturados através da pesca em zonas próximas onde se pratique a aquacultura, pois é sabido que este antisséptico é largado e arrastado pela água, podendo chegar ao meio aquático selvagem onde existem milhões de toneladas de peixes. Neste sentido, salienta-se a importância de novos estudos da presença ou não do VM em tecido muscular de peixes capturados por pesca. Posto isto, será importante perceber se os peixes capturados por pesca possuem concentrações residuais do VM e de VLM no tecido muscular e a frequência encontrada nos mesmos.

5. Referências Bibliográficas

- 1 FAO (2018) , The state of world fisheries and aquaculture. , *Food and Agriculture Organization of the United States*. Available: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>. [Accessed: 04-nov-2018].
- 2 Sousa, M.M. de (2015) , Análise dos Hábitos Alimentares e de Consumo de Pescado das Populações de Leiria e Peniche. , Instituto Politécnico de Leiria.
- 3 Santos, L. and Ramos, F. (2016) Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 52, 16–30.
- 4 Direcção-Geral de Recursos Naturais, S. e S.M. (2014) , Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014 - 2020.
- 5 Allsopp, M. et al. (2008) Challenging the Aquaculture Industry on Sustainability, Second edi.
- 6 ASAE (2012) Riscos e Alimentos - Pescado. *J. Exp. Psychol. Gen.* at <<http://www.asae.gov.pt/espaco-publico/publicacoes/riscos-e-alimentos/riscos-e-alimentos-2012-2011.aspx>
- 7 ASAE Benefícios nutricionais do consumo de peixe.
- 8 Cláudia Isabel Medeiros Afonso (2009) , Produtos Da Pesca Capturados Na Costa Portuguesa: Benefícios E Perigos Associados Ao Seu Consumo. , Universidade de Lisboa.
- 9 Comissão Europeia (2013) Orientações estratégicas para o desenvolvimento sustentável na aquicultura na eu.
- 10 Gastalho, S.C. (2013) , Avaliação da resistência antimicrobiana de *Aeromonas* sp . e *Enterobacteriaceae* em robalo e dourada provenientes de sistemas de aquicultura. , Universidade de Coimbra.
- 11 Agência Portuguesa do Ambiente (2018) , Produção em aquicultura | Relatório do Estado do Ambiente. Available: <https://rea.apambiente.pt/content/produção-em-aquicultura>. [Accessed: 26-nov-2018].
- 12 FAO (2018) Impacts of climate change on fisheries and aquaculture - Synthesis of current knowledge, adaptation and mitigation options.
- 13 Gomes, H. (2012) , Desenvolvimento de métodos rápidos para deteção de drogas no meio aquático. , Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- 14 Silva, C. (2017) , Formas de produção aquícola. Available: <http://www.terradoiro.pt/formas-producao-aquicola/>. [Accessed: 10-dec-2018].
- 15 Martins, P.T. (2016) , Caracterização molecular de comunidades microbianas na aquicultura. , Universidade de Aveiro.
- 16 Sousa, A.F.D. (2008) Factores que Afectam a Qualidade dos Produtos de Aquicultura: efeito da dieta na qualidade final de dourada.

- 17 Guardiola, F.A. et al. (2012) Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 1541–1560.
- 18 Justino, C. et al. (2016) Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination. *Trends Anal. Chem.* 80, 293–310.
- 19 Pereira, A.M.P.T. et al. (2015) Fluoroquinolones and Tetracycline Antibiotics in a Portuguese Aquaculture System and Aquatic Surroundings: Occurrence and Environmental Impact. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 78, 959–975.
- 20 Hashimoto, J.C. et al. (2011) Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: A review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 20, 273–294.
- 21 Plakasi, S.M. et al. (1999) DISPOSITION AND METABOLISM OF MALACHITE GREEN AND OTHER THERAPEUTIC DYES IN FISH.
- 22 Sudova, E. et al. (2007) Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review, 52.
- 23 Astray, G. et al. (2011) Dyes and biomimetic systems : detergency and food industry. *J. Food* 9, 252–256.
- 24 Juan Manuel Perez Ramos (2018) Estudo e aplicação de processos oxidativos avançados e ecotoxicológicos no tratamento de efluente contendo verde malaquita.
- 25 Catusa de Marco (2015) , Preparação , caracterização e aplicação de um compósito ferromagnético na remoção do corante verde de malaquita em meio aquoso. , Universidade de Caxias do Sul.
- 26 JECFA (2008) Collection and pre-selection of available data to be used for the risk assessment of malachite green residues by JECFA.
- 27 Cháfer-Pericás, C.A.M.R.P.L.C.J.M.A.M. (2014) Resumo das características do medicamento. *Nat. Publ. Gr.* 15, 215–217.
- 28 Srivastava, A.K. and Roy, D. (2015) Effects of malachite green (Triarylmethane dye) and Pyceze (Bronopol) on the hematological parameters of a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2, 119–122.
- 29 Apolônio, L.F. (2015) , Desenvolvimento de método para pré-concentração e determinação de leuco verde malaquita e verde malaquita adsorvente.
- 30 EFSA Journal (2013) Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPA) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal. *EFSA J.* 11.
- 31 Oplatowska, M. et al. (2011) Development and validation of a fast monoclonal based disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of triphenylmethane dyes and their metabolites in fish. *Anal. Chim. Acta* 698, 51–60.
- 32 Li, L. et al. (2017) Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film. *Food Chem.* 229, 403–408.
- 33 Jacob, J.A.M. (2013) , Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel. , Universidade Nova de Lisboa.

- 34 Cardoso, S.J. (2016) , Desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA para pesquisa de *Legionella pneumophila* em suporte de papel utilizando a tecnologia Lab-on-Paper. , Universidade Nova de Lisboa.
- 35 Menana, M. (2017) , Implementação e validação do método de quantificação de Ácido Propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria. , Universidade Nova de Lisboa.
- 36 Barani, A. and Tajik, H. (2017) Malachite green residue in farmed fish in north- west part of Iran. *Int. J. Food Prop.* 20, 580–585.
- 37 Hipólito, A.S.M. (2017) , Detecção e quantificação de leite pelo método ELISA no Laboratório SGS. , Universidade Nova de Lisboa.
- 38 Matos, R.L. (2017) Contaminação de Peixes de Aquacultura por Tetraciclina.
- 39 EFSA (2016) Malachite green in food EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* 14, 80.
- 40 Direcção de Avaliação dos Riscos na Cadeia Alimentar (2009) , Esclarecimento sobre panga ou peixe-gato. , *Jornal Online da ASAE*, 2.