



Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

**Desenvolvimento de um método de preparo de
amostras para determinação de Cr, Cu, Pb e Zn em
espécies de peixes oriundas do Canal São Gonçalo,
Pelotas/RS utilizando planejamento experimental**

Marcelo Möller Alves

Pelotas, julho de 2016

Marcelo Möller Alves

Desenvolvimento de um método de preparo de amostras para determinação de Cr, Cu, Pb e Zn em espécies de peixes oriundas do Canal São Gonçalo, Pelotas/RS utilizando planejamento experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. (Área de concentração: Química Analítica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Antunes Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Pelotas, julho de 2016

A banca examinadora, abaixo assinada, a Tese de Doutorado intitulada “**Desenvolvimento de um método de preparo de amostras para determinação de Cr, Cu, Pb e Zn em espécies de peixes oriundas do Canal São Gonçalo, Pelotas/RS utilizando planejamento experimental**”, de autoria de Marcelo Möller Alves.

Banca examinadora:

.....

Prof^a. Dr^a. Mariana Antunes Vieira (Orientadora)

.....

Prof^a.Dr^a. Tatiana DillenburgSaint’Pierre (PUC-Rio)

.....

Dr.Alexandre de Jesus (UFRGS)

.....

Dr^a. Aline Lisbôa Medina (UFPel)

Ao Lucas, meu filho amado, que
com seus constantes sorrisos e
gestos de carinho foi incentivo e
alento nas horas difíceis, minha
gratidão eterna.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser tão presente em minha vida e me agraciar constantemente.

À prof^a. Dr^a. Mariana Antunes Vieira que sempre me orientou com zelo, solicitude, confiança e paciência, me ensinou e motivou o estudo na área de química analítica.

Ao prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, pela co-orientação e ensinamentos, sobretudo na técnica de espectrometria atômica.

À Dra. Aline Medina, que foi mais que uma amiga durante a realização desse trabalho contribuindo significativamente com todo seu conhecimento.

À Ane Martiele que foi incansável em todo procedimento de coleta e preparo das amostras.

Aos meus colegas do LabMeQui que desde o início de meu doutorado contribuíram com seus conhecimentos e parceria, e em especial, àqueles que se tornaram amigos pra toda vida.

Aos meus colegas do IFSul, em especial, Pedro Sanches, que foi o provocador do tema estudado nesse trabalho.

À ECOCELL por proporcionar a coleta dos peixes nas estações climáticas previstas.

À Renata pelo incentivo inicial e pelas vezes que cuidou de nosso filho para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Aos meus pais e meu irmão pela torcida de que mais uma etapa fosse vencida.

À todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a concretização dessa conquista.

À todos vocês minha eterna gratidão.

RESUMO

Título: Desenvolvimento de um método de preparo de amostras para determinação de Cr, Cu, Pb e Zn em espécies de peixes oriundas do Canal São Gonçalo, Pelotas/RS utilizando planejamento experimental

A poluição dos recursos hídricos tem sido uma constante preocupação na sociedade contemporânea e muitas são as maneiras de identificá-la, tais como o uso de peixes como bio-indicadores ambientais. Entre os poluentes mais comuns nos peixes, os metais e seus compostos são citados e, dependendo da concentração em que se encontram, podem apresentar toxicidade. Neste trabalho, foi desenvolvido um método de preparo de amostra para determinação de metais em peixes, usando a decomposição ácida com sistema de refluxo. As melhores condições de decomposição foram obtidas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). As amostras de peixes foram decompostas na presença de 5 mL de HNO_3 e de 2 mL de H_2O_2 , durante 2 horas a 150°C no bloco digestor. As técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) foram utilizadas para as determinações dos analitos. A exatidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado de peixe e os valores encontrados foram concordantes com o valor certificado. Os limites de quantificação obtidos ($0,9 \text{ mg kg}^{-1}$; $1,9 \text{ mg kg}^{-1}$; $57,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e $69,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para Cu, Zn, Cr e Pb, respectivamente) ficaram abaixo dos limites previstos na legislação. Após otimização, o método foi aplicado para o preparo das amostras de peixe. As seguintes espécies de peixes foram analisadas: *Micropogonias furnieri* (corvina), *Pimelodus clarias* (pintado), *Cyphocharax voga* (biru) e *Loricariichthys anus* (viola) coletadas nas regiões estuarina e límnic do Canal São Gonçalo, em Pelotas, nas estações outono, inverno e primavera do ano de 2013, e no verão de 2014. Os níveis de concentração de Cu encontrados ficaram no intervalo de $6,7$ a 12 mg kg^{-1} ; de Zn, entre $1,8$ e $23,6 \text{ mg kg}^{-1}$; de Pb, entre 37 e $487 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$; e de Cr variaram de 40 a $1268 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. As maiores concentrações de Cu, Zn e Pb

foram observadas nos peixes coletados nos pontos pertencentes à região estuarina. Porém, o Cr apresentou altos índices especialmente na região límnic. As amostras da espécie *Loricariichthys anus* (viola) foram as que apresentaram maiores concentrações de todos os analitos avaliados. As concentrações de Zn e Cu permaneceram abaixo dos limites máximos de toxicidade enquanto os altos teores de Pb e Cr indicaram que a região estuarina do Canal sofre impacto da ação antrópica, em especial do despejo doméstico, resíduos de construção e demolição e efluentes de indústrias, como as de curtimento de couro. Diante dos resultados, sugere-se um monitoramento contínuo da biota do Canal São Gonçalo, já que esta região é de fundamental importância econômica, social e ecológica para a população local.

Palavras-chave: Metais, Peixes, Decomposição Ácida, Planejamento Experimental, Espectrometria de Absorção Atômica, Canal São Gonçalo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado em Química

Pelotas, Julho de 2016.

ABSTRACT

Title: Development of a sample preparation method for the determination of Cr, Cu, Pb and Zn in fish species from São Gonçalo channel, Pelotas/RS using experimental design

The concern with the pollution of water resources has been a constant in contemporary society and there are many ways to identify it, such as the use of fish as environmental biomarkers. Among the most common pollutants in fish, metals and their compounds are cited and, depending on the concentrations in which they are, can cause toxicity. In this work, was developed a sample preparation method for the determination of metals in fish, using the acid decomposition with reflux system. The best conditions of decomposition were obtained through a central composite design (CCD). Fish samples were decomposed in the presence of 5 mL of HNO_3 and 2 mL of H_2O_2 during 2h at 150°C in the digester block. The techniques flame atomic absorption spectrometry (F AAS) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) were used for the determination of analytes. The accuracy of method was evaluated by analysis of certified reference materials of fish and the results obtained were in agreement with the certified value. The limits of quantification obtained (9.6 mg kg^{-1} ; 1.9 mg kg^{-1} ; $57.0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ and $69.2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ for Cu, Zn, Cr and Pb, respectively) were below the limits of the established by legislation. After optimization, the method was applied for fish sample preparation. The analyzed fish species were: *Micropogonias furnieri* (corvina), *Pimelodus clarias* (pintado), *Cyphocharax voga* (biru) and *Loricariichthys anus* (viola) which was collected in estuarine and limnic regions of São Gonçalo channel, in Pelotas, in seasons autumn, winter and spring of 2013 and summer of 2014. The levels of concentration found for the analytes investigated ranged between 6.7 at 12 mg kg^{-1} for Cu; 1.8 at 23.6 mg kg^{-1} for Zn; 37 at $487 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ for Pb and 40 at $1268 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ for Cr. The highest concentrations of Cu, Zn and Pb, were observed in fish collected in the points belonging to the estuarine region. However, Cr showed high levels, especially in limnic region. The samples of specie *Loricariichthys anus* (viola) showed the highest concentrations of all analytes evaluated. The Zn concentrations and Cu

remained below the maximum established while high levels of Pb and Cr indicated that the estuarine region of the channel suffers the impact of human activities, in particular, the domestic, construction and demolition waste and waste industries such as leather tanning. Given the results suggest a continuous monitoring of the biota of the São Gonçalo channel, as this region is important economic, social and ecological for the local population.

Keywords: Metals, Fish, Acid Decomposition, Experimental Design, Atomic Absorption Spectrometry, São Gonçalo channel.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Doctoral Thesis in Chemistry

Pelotas, July 2016.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Instrumentação básica para a técnica de absorção atômica.....	8
Figura 2	Desenho esquemático de (A) dedo frio, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com dedo frio.....	13
Figura 3	Diagrama esquemático do sistema de refluxo (dedo frio) acoplado ao tubo digestor.....	15
Figura 4	Canal São Gonçalo e Eclusa	17
Figura 5	<i>Cyphocharax voga</i> (Biru)	19
Figura 6	<i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina)	20
Figura 7	<i>Pimelodus clarias</i> (Pintado)	21
Figura 8	<i>Loricariichthys anus</i> (Viola)	21
Figura 9	Pontos de coleta das amostras de peixe no Canal São Gonçalo em Pelotas/RS	26
Figura 10	Diagrama de Pareto obtido do DCCR na determinação de Cu em peixes.....	35
Figura 11	Diagrama de Pareto obtido do DCCR para a determinação de Cr em peixes.....	35
Figura 12	Diagrama de Pareto obtido do DCCR para a determinação de Zn em peixes.....	36
Figura 13	Diagrama de Pareto obtido do DCCR para a determinação de Pb em peixes.....	36
Figura 14	Superfície de resposta para volume de H ₂ O ₂ versus tempo de decomposição para a determinação de Zn em peixes.....	39
Figura 15	Superfície de resposta para volume de H ₂ O ₂ versus tempo de decomposição para a determinação de Pb em peixes.....	39

Figura 16	Níveis de concentração de cobre nas amostras de peixes.....	47
Figura 17	Níveis de concentração de zinco nas amostras de peixes.....	49
Figura 18	Níveis de concentração de chumbo nas amostras de peixes.....	51
Figura 19	Níveis de concentração de cromo nas amostras de peixes.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos de preparo de amostras de peixes para determinação de diferentes analitos.....	11
Tabela 2	Programa de temperatura doGF AAS para determinação de Pb e Cr em peixes.....	24
Tabela 3	Descrição e georreferências dos pontos coletados.....	26
Tabela 4	Variáveis e valores utilizados no DCCR.....	27
Tabela 5	Relação entre a concentração do analito e o desvio-padrão relativo.....	30
Tabela 6	Matriz do planejamento experimental DCCR.....	31
Tabela 7	Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Cu.....	32
Tabela 8	Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Cr.....	33
Tabela 9	Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Pb.....	33
Tabela 10	Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Zn.....	34
Tabela 11	Análise de variância (ANOVA) para os teores de Zn e Pb em peixes.....	38
Tabela 12	Parâmetros de mérito para a determinação de Cu e Zn por FAAS e Cr e Pb por GF AAS em peixes.....	41
Tabela 13	Resultados de concentração, em mg kg^{-1} , para Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes CRM.....	42
Tabela 14	Concentrações de Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes espécies de peixes do Canal São Gonçalo nos Pontos 1 e 2.....	44

Tabela 15	Concentrações de Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes espécies de peixes do Canal São Gonçalo nos Pontos 3 e 4.....	45
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
C	Concentração média das recuperações obtidas para n repetições
C _{CRM}	Concentração certificada
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>Certified reference material</i>
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com vapor frio, do inglês <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
F AAS	Espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
NRCC	National Research Council of Canada
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão

PTFE	Politetrafluoretileno
R	Coeficiente de correlação da curva de calibração
R%	Recuperação em porcentagem
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
S	desvio-padrão
X	Concentração média

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Toxicidade de metais.....	3
2.1.1 Cobre e Zinco.....	3
2.1.2 Chumbo e Cromo.....	5
2.2 Determinação de metais em peixes.....	6
2.2.1 Espectrometria de absorção atômica.....	7
2.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).....	8
2.2.1.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite(GF AAS).....	9
2.3 Preparo de amostra: decomposição ácida com sistema de refluxo.....	9
2.4 Delineamento Composto Central.....	16
2.5 O Canal São Gonçalo.....	17
2.6 Espécies de peixes analisadas.....	19
2.6.1 <i>Cyphocharax voga</i> (Biru).....	19
2.6.2 <i>Micropogonias furnieri</i> (Corvina).....	19
2.6.3 <i>Pimelodus clarias</i> (Pintado).....	20

2.6.4	<i>Loricariichthys anus</i> (Viola).....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo Geral.....	22
3.2	Objetivos Específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Instrumentação.....	23
4.2	Materiais e Reagentes.....	24
4.3	Amostras.....	25
4.4	Planejamento Estatístico Experimental.....	27
4.5	Método de preparo das amostras: decomposição ácida com sistema de refluxo.....	28
4.6	Validação Analítica.....	28
4.6.1	Limites de detecção e quantificação.....	29
4.6.2	Linearidade.....	29
4.6.3	Precisão.....	29
4.6.4	Exatidão.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1	Otimizações: delineamento estatístico experimental– DCCR.....	31
5.2	Parâmetros de mérito.....	41
5.3	Avaliação sazonal do teor de metais nos peixes oriundos do Canal São Gonçalo.....	43
6	CONCLUSÃO.....	56
7	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Um das mais importantes fontes de proteína para muitas pessoas são os peixes. Além disso, seu consumo é crescente por ser também uma saudável fonte de ácidos graxos ômega-3 que reduzem o risco de desenvolvimento de doenças (BURGER; GOCHFELD, 2005; STORELLI, 2008). No entanto, os peixes, por serem consumidores e pertencerem ao nível superior da cadeia alimentar aquática, podem acumular poluentes persistentes tornando-se assim vulneráveis à poluição, principalmente, por elementos tóxicos (KARADEDE; OYMAKB; ÜNLÜ, 2004).

Dessa forma, dados científicos indicam que eles são, potencialmente, as principais fontes de exposição humana a vários poluentes ambientais, tais como os metais tóxicos. Esses compostos estão naturalmente presentes em ambientes aquáticos e chegam através de vários processos geoquímicos, fontes antropogênicas, como as águas industriais, agrícolas e esgotos urbanos (CHAHID; HILALI; BENLHACHIMI; BOUZID, 2014).

Por sua vez, a biota aquática é capaz de concentrar os metais em várias ordens de grandeza acima das concentrações encontradas na coluna d'água, e a ciclagem biológica dos metais no ambiente marinho passa, portanto, a desempenhar um papel importante na dinâmica desses poluentes. Os poluentes acumulados em organismos aquáticos podem ser subsequentemente transferidos para o homem, por meio da cadeia alimentar. Os metais têm sido relatados como potencialmente causadores de efeitos letais ou subletais em diversos componentes da biota, como o fitoplâncton, o zooplâncton, as comunidades bentônicas, os peixes e demais vertebrados aquáticos, as aves marinhas e, finalmente, o ser humano (CARMO; ABESSA; NETO, 2011).

Nesse sentido, é possível utilizar peixes como bio-indicadores de contaminação ambiental, uma vez que os organismos aquáticos são capazes de concentrar elementos traço em quantidades bem superiores às observadas no meio ambiente (BARROS *et al.*, 2010).

Em se tratando de metais, uma vez que os mesmos se acumulam nos tecidos do organismo, esta concentração expressa uma medida integrada do tempo ao qual o animal ficou efetivamente exposto ao elemento. Determinar as concentrações dos contaminantes na biota significa monitorar os níveis de

fração “biodisponível” destes nos ecossistemas. A toxicidade de metais em organismos aquáticos e seu equilíbrio são influenciados por alguns fatores limnológicos, tais como pH, alcalinidade, dureza, matéria orgânica, sólidos totais e cargas de sedimentação (SANCHES FILHO; FONSECA; HOLBIG, 2013).

Os ambientes estuarinos possuem características de variação de salinidade, elevada concentração de nutrientes e de sedimentos, proporcionando o desenvolvimento de espécies adaptadas às peculiaridades desse ecossistema. No litoral brasileiro as áreas estuarinas são amplamente utilizadas por comunidades pesqueiras. A ocupação urbana desordenada e os fortes impactos ambientais atrelados ao desenvolvimento de atividades humanas e indústrias desenvolvidas às margens dos estuários, constituem uma ameaça para esses ambientes. A grande carga de poluentes lançados nos estuários e seus arredores vêm diminuindo o estoque pesqueiro, o que reflete negativamente e de forma acentuada nas condições de vida das populações ribeirinhas (PAIVA; SILVA; FERNANDES, 2009).

Por essas razões, torna-se importante determinar as concentrações de metais em peixes a fim de avaliar o possível risco no seu consumo para a saúde humana (KARADEDE; OYMAKB; ÜNLÜ, 2004).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Toxicidade de metais

Todos os metais e seus compostos possuem algum grau de toxicidade, dependendo da concentração, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. O fator-chave é o grau de exposição que pode afetar o organismo. A exposição está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição. Os efeitos dos metais potencialmente tóxicos e dos seus compostos são determinados pelo índice e o alcance com que estes se convertem em uma forma biodisponível. (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Dentre os metais, existem os denominados essenciais (Fe, Ca, Zn, Cu,...), que desempenham papel importante no metabolismo quando em determinadas faixas de concentração; e os não essenciais (Cd, Hg, Pb,...), que geralmente são tóxicos e não desempenham nenhuma função biológica conhecida. O aumento da concentração dos elementos essenciais acarreta em melhoria no desenvolvimento do organismo, que passa de deficiente para saudável. Entretanto, acima de determinadas faixas de concentração, estes elementos passam a exercer uma ação tóxica ao organismo, influenciando, portanto, em seu desenvolvimento e, acima de um limite de concentração, tornam-se letais para o organismo. Para os elementos não essenciais, há uma faixa de concentração em que o organismo tolera a sua presença. Entretanto, acima de determinados limites de concentração, estes se tornam tóxicos e em seguida letais para o organismo (LIMA; MERÇON, 2011).

2.1.1 Cobre e Zinco

Metais como o Cu e o Zn são elementos classificados como essenciais. Ambos são necessários para uma variedade de enzimas e outros componentes celulares que têm funções vitais e são cuidadosamente regulados por mecanismos fisiológicos na maioria dos organismos.

O elemento Cu é vital para a transferência biológica de elétrons, para a síntese de hemoglobinas do sangue e para a preservação da estrutura e função do sistema nervoso. O valor da ingestão diária recomendada para o cobre baseado no peso corporal para um adulto médio (60 kg) é cerca de 3 mg, enquanto que o limite de ingestão desse elemento é de 5 a 8 mg (SILVA, 2016). Alguns alimentos fontes desse metal são mexilhões, as ostras cruas ou cozidas, os cereais integrais, o caju, o amendoim, a amêndoa, as nozes e o chocolate. No entanto, ele pode estar presente nos demais alimentos devido à contaminação do meio ambiente, como por exemplo, a aplicação de pesticidas no combate às pragas em diversas culturas (BILANDZIC *et al.*, 2012; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

O Zn, além de atuar como cofator de enzimas distribuídas pelo corpo humano, é importante para o bom funcionamento do sistema imunológico, auxiliando na cicatrização de ferimentos e na síntese de proteínas, sendo importante para manter o equilíbrio ácido-base no organismo e manter em ordem as percepções de sabor e odor. Além disso, a deficiência de Zn pode provocar problemas de crescimento, perda de cabelo, diarreia, impotência sexual, depressão, lesões oculares e de pele e perda de peso. Para uma alimentação rica em Zn, devem-se ingerir carnes vermelhas, aves, germe de trigo, semente de abóbora, ovo, mostarda em pó e nozes. O valor de ingestão diária recomendada de zinco é de cerca de 15 mg e o limite tolerável é de 40 mg. (MEDEIROS, 2012).

No entanto, estes dois elementos em altas concentrações são considerados como perigos potenciais que podem pôr em risco a saúde humana e animal. A ingestão excessiva de Zn irá causar intoxicação, náuseas, dores de estômago agudas, diarreia, febre, etc. O excesso de Cu pode causar a doença de Wilson, alergias, irritações nos olhos, nariz e boca, além de náuseas e diarreias. Cabe ressaltar que os sintomas podem piorar se a ingestão for via oral, através da água e do alimento, podendo causar danos ao fígado e aos rins e, em casos extremos, levar o indivíduo à morte (PAPAGIANNIS *et al.*, 2004; QIAO-QIAO; GUANG-WEI; LANGDON, 2007; ATSDR, 2004).

Trabalhos anteriores apresentaram dados que revelaram concentrações de Zn (DURAL; GÖKSU; ÖZAK, 2007; LEUNG *et al.*, 2014; MENDIL *et al.*, 2010;

OLMEDO *et al.*, 2013; QIAO-QIAO; GUANG-WEI; LANGDON, 2007; SOUZA *et al.*, 2009; VICENTE-MARTORELL *et al.*, 2009) e Cu (BILANDZIC *et al.*, 2012; LEUNG *et al.*, 2014; OLMEDO *et al.*, 2013; VICENTE-MARTORELL *et al.*, 2009) acima dos limites de intoxicação em diferentes peixes e organismos aquáticos. O conhecimento das suas quantidades em peixes é, portanto, importante, tanto no que diz respeito à gestão da natureza, quanto ao consumo do pescado.

2.1.2 Chumbo e Cromo

Alguns metais com natureza perigosa comprovada, como o Pb e Cr (VI), devem ser completamente excluídos em alimentos para consumo humano. (SIVAPERUMAL; SANKAR; VISWANATHAN NAIR, 2007).

O elemento Pb é um dos principais contaminantes presentes no meio ambiente e ocorre naturalmente em rochas, solos e na hidrosfera. No entanto, é também um metal amplamente utilizado e a indústria contribui consideravelmente com uma quantidade que é encontrada no ambiente natural (BOSCH *et al.*, 2016).

Uma vez no meio aquático, o Pb é facilmente absorvido na corrente sanguínea do peixe e acumulado nos tecidos do corpo, ossos, guelras, rins, fígado e escamas. Assim, pode entrar no corpo humano através da dieta e acumular-se, especialmente quando o consumo é regular (BOSCH *et al.*, 2016).

A intoxicação por Pb, ou saturnismo, é geralmente associada com a exposição ocupacional ao metal e atinge principalmente os sistemas circulatórios, renais e nervoso central do corpo. Ele tem demonstrado ser um agente cancerígeno, além de produzir retardo mental e distúrbios do sistema reprodutor humano. Algumas fontes antropogênicas de contaminação por chumbo incluem indústrias extrativas, óleo, baterias, tintas e corantes, cerâmica, cabos, tubulações e munições. O chumbo não tem sido utilizado na gasolina automotiva desde 1993, no entanto, a gasolina usada em aviões no Brasil contém chumbo como aditivo. Salienta-se ainda que o Pb atinge o sistema aquático também por causa da erosão do solo superficial e deposição

atmosférica (CASTRO-GONZÁLEZ; MÉNDEZ-ARMENTA, 2008; FERRON *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013).

O elemento Cr tem considerável importância ambiental e geológica e, no ambiente, ocorre principalmente como Cr(III) ou Cr(VI). As funções bioquímicas e os efeitos do cromo são dependentes de seu estado de oxidação, pois enquanto o Cr(VI) é tóxico por ser um agente carcinogênico, o Cr(III) é considerado um nutriente essencial para os humanos. As maiores fontes de Cr(VI) são antropogênicas, originando-se principalmente de indústrias têxteis, de refinarias de petróleo e de galvanizações, e este é transferido ao ambiente por meio de emissões pelo ar ou pela água. Já o Cr(III) aparece difundido em baixas concentrações na natureza (SUSSULINI; ARRUDA, 2006).

A maior parte do Cr liberado na água deposita-se nos sedimentos e apenas uma pequena porcentagem pode estar presente na água na forma solúvel e insolúvel. As formas solúveis encontram-se como Cr(VI) e complexos de Cr(III). Em fase aquosa, o Cr(III) ocorre como partícula sólida adsorvida a materiais argilosos, orgânicos ou óxido de ferro (ATSDR, 2012).

No ambiente aquático, o Cr existe como cromato e é assimilado pelo fitoplâncton. O cromato está no estado de oxidação hexavalente e sob condições reduzidas de oxigênio pode ser transformado em Cr(III). Contudo, o Cr(VI) é a espécie predominante em águas marinhas por ser geralmente estável devido às condições elevadas de oxidação do meio, sendo acumulado nas espécies aquáticas por difusão passiva. Dessa maneira, no ambiente aquático pode ocorrer a bioacumulação desse metal, onde esse elemento dissolvido, suspenso na água ou contido no sedimento é absorvido pelos organismos, particularmente os peixes (músculos, brânquias e do trato digestivo) (MIRANDA FILHO *et al.*, 2011).

2.2 Determinação de metais em peixes

A quantificação de metais em peixes pode ser feita por meio de técnicas instrumentais que são bastante difundidas e consolidadas hoje, tanto na pesquisa acadêmica, como nos laboratórios de análise. Dentre as principais técnicas citam-se: espectrometria de absorção atômica com chama

(FAAS)(DALMAN; DEMIRAK; BALCI, 2006; IMYIM *et al.*, 2007; KARADEDE; OYMAKB; ÜNLÜ, 2004; SIVAPERUMAL; SANKAR; VISWANATHAN NAIR, 2007; SOUZA *et al.*, 2009), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) (BEGUM; HARIKRISHNA; KHAN, 2009; BURGER; GOCHFELD, 2005; DALMAN; DEMIRAK; BALCI, 2006; HOO FUNG *et al.*, 2013; MENDIL *et al.*, 2010; OLMEDO *et al.*, 2013; PAPAGIANNIS *et al.*, 2004; PEREIRA; WINDMÖLLER; DA SILVA, 2011), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (DJEDJIBEGOVIC *et al.*, 2012; GUÉRIN *et al.*, 2011; LEUNG *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2012; NOËL *et al.*, 2013; QIAO-QIAO; GUANG-WEI; LANGDON, 2007; VICENTE-MARTORELL *et al.*, 2009), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado(ICPOES) (BARROS *et al.*, 2010; KEHRIG *et al.*, 2009; QIAO-QIAO; GUANG-WEI; LANGDON, 2007; VIANA *et al.*, 2012; VICENTE-MARTORELL *et al.*, 2009; YILMAZ *et al.*, 2007).

A seguir, será dada ênfase às técnicas de F AAS e GF AAS que foram utilizadas neste trabalho.

2.2.1 Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica analítica utilizada na determinação de elementos em concentrações na ordem de partes por milhão (mg kg^{-1}) até partes por bilhão ($\mu\text{g kg}^{-1}$) que estão presentes em diversas amostras nos diferentes estados físicos. Esta técnica envolve radiação eletromagnética que pode ser absorvida pelas espécies atômicas neutras, não excitadas, em estado gasoso dos constituintes químicos das amostras. Ela é baseada na quantificação de espectros de linhas finas que surgem da transição eletrônica, envolvendo a camada mais externa do átomo. A amostra a ser analisada é decomposta por intenso calor, produzindo átomos livres capazes de absorver radiação eletromagnética, em comprimentos de ondas característicos de cada analito, produzindo espectros atômicos. Cada elemento químico tem seu conjunto de níveis de energia característico e, portanto, o seu conjunto único de espectros de absorção e emissão. A região ultravioleta/visível do espectro eletromagnético é a região usada na espectrometria atômica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; WELZ; SPERLING, 1999).

A instrumentação básica para a técnica de absorção atômica (Figura 1) exige uma primeira fonte de luz, que emite o espectro do elemento de interesse, normalmente usa uma lâmpada de cátodo oco ou uma lâmpada de descarga sem eletrodo; um atomizador (chama ou forno de grafite, principalmente), no qual os átomos da amostra são produzidos; um monocromador, para isolar o comprimento de onda da luz a ser utilizado, um detector para medir a intensidade da luz, transformar o sinal luminoso em sinal elétrico e o amplificar e um registrador, que registra e mostra a leitura depois do sinal ser processado (PERKINELMER, 2000).

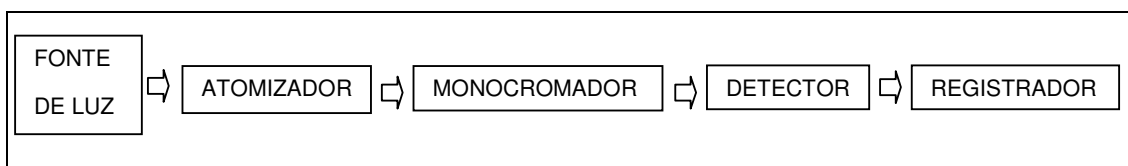


Figura 1 - Instrumentação básica para a técnica de absorção atômica.

A técnica de AAS apresenta algumas vantagens quando comparada às outras técnicas analíticas, tais como menor custo do equipamento, menor custo operacional, facilidade de operação, além do reduzido número de linhas espectrais, que acarreta uma possibilidade bem menor de interferência por sobreposição de linhas. Quanto às desvantagens, esta técnica apresenta faixa linear de trabalho relativamente pequena, menor frequência analítica quando se utiliza a atomização eletrotérmica e, principalmente, é considerada uma técnica mono-elementar, fato que é reconhecido como a maior desvantagem (AMORIN *et al.*, 2008). A precisão e a exatidão das técnicas de espectrometria atômica são dependentes fundamentalmente das etapas de atomização e do sistema de introdução da amostra na região de atomização.

2.2.1.1 Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)

Na FAAS, o atomizador é uma chama formada pela combinação de diferentes combustíveis e oxidantes; e seu equipamento é relativamente barato e simples de operar, além de pouca interferência. No entanto, alguns elementos refratários não podem ser determinados com boa sensibilidade, porque as

temperaturas da chama frequentemente não são suficientemente quentes para provocar a atomização completa. Além disso, é uma técnica relativamente lenta e mais usada quando se deseja determinar um ou poucos elementos de uma amostra. Quando se requer medições de um grande número de elementos, outras técnicas podem ser substancialmente mais rápidas (BROWN; MILTON, 2005)

2.2.1.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)

A técnica de GF AAS difere da de FAAS pelo uso de fornos de grafite aquecidos eletricamente como atomizadores que podem alcançar temperaturas maiores que a chama (até 3000K). Seus limites de detecção são de 10 a 100 vezes melhores do que os obtidos por F AAS. Apesar disso os elementos refratários ainda podem ser de difícil determinação com precisão aceitável e a técnica também é essencialmente mono-elementar. No entanto, quantidades relativamente pequenas de amostras sólidas e líquidas podem ser analisadas e muitas das interferências passíveis de ocorrência, principalmente associadas à matriz da amostra, podem ser superadas com a combinação de corretores de fundo e modificações na matriz (BROWN; MILTON, 2005). Se comparada com a F AAS, esta técnica é substancialmente mais sensível e versátil, face à configuração do tubo de grafite e ao seu caráter duplo: reator químico e atomizador. A GF AAS também é susceptível a alterações instrumentais e operacionais: variações na temperatura e na taxa de aquecimento do tubo de grafite, no volume injetado de amostra, na radiação emitida da fonte, nas diluições, na estrutura do atomizador, são alguns exemplos de parâmetros que podem afetar o desempenho analítico (FERNANDES *et al.*, 2003).

2.3 Preparo de amostra: decomposição ácida com sistema de refluxo

Para a determinação elementar em amostras de peixes e pescados, a literatura apresenta uma variedade de métodos de preparo de amostras, tais

como a decomposição ácida em blocos de digestão e em sistemas de micro-ondas.

A decomposição por via úmida, em geral, implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado (HNO_3 , H_2SO_4 ou HClO_4); uma mistura de ácidos oxidantes; ou uma mistura de um ácido oxidante com H_2O_2 . Assim, torna-se possível oxidar completamente a maioria das amostras, deixando os analitos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise (KRUG, 2010). No entanto, o emprego dos ácidos levam a uma diluição da concentração do analito na amostra (em sua forma final), ocasionando perda em sensibilidade no procedimento analítico; além de induzir a riscos de contaminação quando não são utilizados reagentes químicos de alta pureza.

Em geral, as decomposições com ácidos em sistemas abertos convencionais ocorrem em tempo excessivo, podendo assim levar a riscos de contaminações por adsorção e perdas do analito por volatilização. Além disso, não permite o uso de altas temperaturas devido ao baixo ponto de ebulição de alguns ácidos que são comumente utilizados e a decomposição pode ser incompleta. Os métodos de decomposição úmida em sistema fechado do tipo micro-ondas são bastante empregados, pois oferecem maior velocidade na preparação da amostra e redução do risco de contaminação e perdas por volatilização (MATUSIEWICZ; STANISZ, 2010). No entanto, os equipamentos para decomposição assistida por radiação micro-ondas ainda apresentam alto custo para uma grande parte de laboratórios de análise.

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que realizaram a determinação elementar em amostras de peixes e os principais métodos de preparo de amostra que foram utilizados.

Tabela 1 – Métodos de preparo de amostras para determinação de diferentes analitos em peixes

Método	Analitos	Técnica de Quantificação	Referência
Decomposição em bloco digestor	Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn	FAAS	Souza <i>et al.</i> 2009
	Cd, Cr, Ni e Pb	FAAS	Mendil <i>et al.</i> 2009
	Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	ICP OES	Begum <i>et al.</i> 2009
	Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn	FAAS	Yilmaz <i>et al.</i> 2007
Decomposição em forno demicro-ondas	As, Cd, Cr, Hg e Pb	GF AAS	Burger <i>et al.</i> 2005
	Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn	FAAS	Karadede <i>et al.</i> 2004
	Cd, Cr, Cu, Pb e Zn	ICP-MS	Qiao-Qiao <i>et al.</i> 2007
	Cu e Zn	GF AAS	Papagiannis <i>et al.</i> 2004
	Cd, Cu, Pb e Zn	FAAS e GF AAS	Dalman <i>et al.</i> 2006
	As, Cd, Hg, Pb e Sn	GF AAS e HG AAS	Olmedo <i>et al.</i> 2013
	Co, Cu, Fe, Li, Mn, Pb, Se e Zn	ICP-MS	Guérin <i>et al.</i> 2011
	As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn	ICP-MS	Leung <i>et al.</i> 2014
	As, Cd, Cu, Pb e Zn	ICP OES e ICP-MS	Vicente <i>et al.</i> 2009
	Cd, Cu, Hg e Pb	ICP-MS	Djedjibegovic <i>et al.</i> 2012
	As, Cd, Hg e Pb	ICP-MS	Nöel <i>et al.</i> 2013
Decomposição em bloco digestor e em micro-ondas	Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	GF AAS	Carmo <i>et al.</i> 2011

Alguns destes trabalhos apresentaram condições de análise não muito favoráveis e que justificam o emprego do método que aqui será proposto. Por exemplo, Karadede, Oymakb e Ünlü (2004) usaram massa de 4 g de amostra,

fator esse que é limitante dependendo da massa de amostra disponível para a realização de todas as análises; quanto ao tempo de decomposição Mendil *et al.* (2010) e Carmo, Abessa e Neto (2011), usaram um intervalo de 4 e 10h, respectivamente no bloco digestor o que se torna desfavorável quando leva-se em consideração o consumo de energia e a adição constante de ácido para evitar a secura do recipiente. O volume de HNO_3 gasto na decomposição foi consideravelmente elevado por Yilmaz *et al.* (2007) que realizou adição contínua do ácido usando sistema de decomposição aberto em placa de aquecimento. Salienta-se ainda os trabalhos de Carmo, Abessa e Neto (2011) e Souza *et al.* (2009) que usaram ácido perclórico, além de ácido nítrico na decomposição das amostras de peixes.

A Química Analítica continuamente vem introduzindo novas estratégias de decomposição de amostras para determinação de elementos em uma variedade de matrizes.

Em uma recente revisão, Ferreira *et al.* (2013) apresentaram uma alternativa promissora aos métodos convencionais de decomposição ácida: a utilização do sistema de refluxo com dedo frio para a decomposição de amostras, especialmente para a determinação de elementos voláteis. O "dedo-frio" é um tubo de vidro em forma de dedo que é colocado dentro do tubo digestor durante os procedimentos de decomposição ácida, com aquecimento. Diante desse aquecimento o(s) ácido(s) empregado(s) na decomposição vaporizam e ao encontrar com o "dedo-frio" condensam, dessa forma retornam ao tubo evitando a perda por volatilização e garantindo um aproveitamento da quantidade de ácido(s) empregada. A Figura 2 ilustra o sistema de decomposição com o dedo frio.

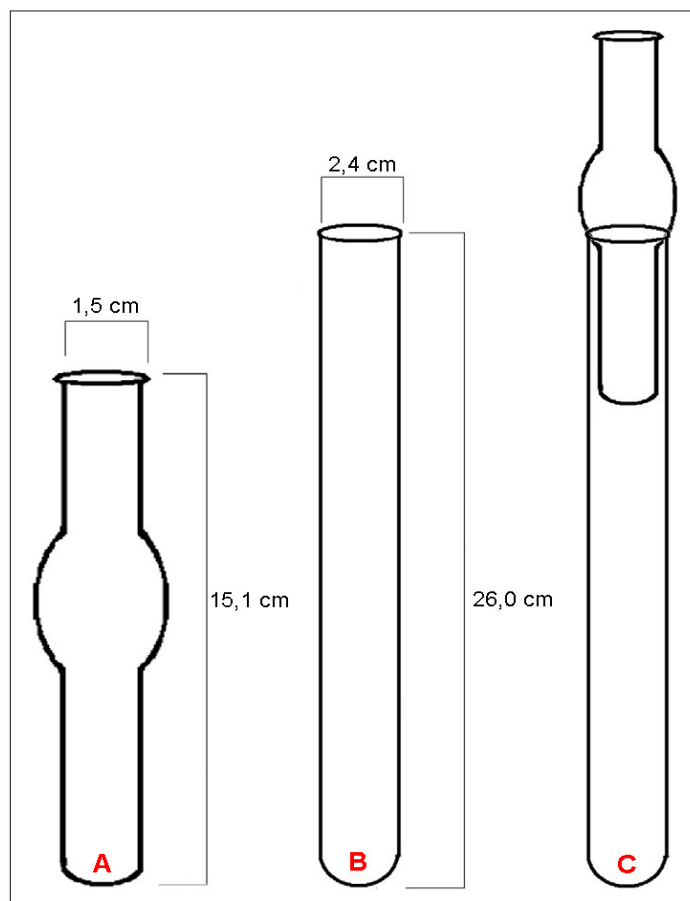


Figura 2– Desenho esquemático de (A) dedo frio, (B) tubo de digestão e (C) sistema de digestão com dedo frio. Adaptado de Ferreira *et al.* 2013.

Contudo, com uma observação detalhada do sistema apresentado na Figura 2, alguns pontos chamam atenção: o dedo frio não permite uma recirculação de água, o que ao longo do tempo pode aumentar a temperatura e se tornar um recipiente com água em um estado indesejável, ou seja, um “dedo morno”; a condensação pode acumular nos contatos superiores e escorrer pela lateral do tubo; o alívio de pressão pode ocasionar saltos no dedo e dependendo do nível de água, pode projetar para fora desse recipiente. Ou seja, embora simples pode não ser prático e a eficiência pode se reduzir principalmente nos métodos que necessitam de elevados tempos e temperatura para uma decomposição.

Visando melhorar o sistema inicial proposto por Ferreira *et al.* 2013 e contornar alguns dos inconvenientes observados, o grupo de pesquisa LabMeQui da UFPel desenvolveu um novo desenho para o dedo frio, apresentado na Figura 3. O “dedo-frio” é um tubo de vidro em forma de dedo que é colocado dentro do tubo digestor durante a decomposição com aquecimento. O tubo de “dedo-frio” é assim chamado porque contém água no seu interior que acaba por arrefecer a parte superior do tubo digestor. Dessa forma ocorre uma condensação dos vapores da mistura de ácido e água ao longo do “dedo-frio” e na parte superior do tubo formando como que uma “película” de uma solução absorvedora dos metais dificultando assim a saída dos analitos por vaporização. Além disso, a condensação proporciona um refluxo dos ácidos utilizados diminuindo a necessidade de adição constante dos mesmos, evitando a secura no tubo digestor e consequentemente diminuindo o risco de contaminação.

Salienta-se ainda que o sistema não é completamente fechado pois apresenta uma ranhura lateral na tampa de PTFE que serve como um sistema de purga aliviando a pressão causada pelos gases (CO_2 , NO_x , ...) gerados na decomposição evitando assim uma projeção do “dedo-frio” para fora do sistema e consequente perda de material decomposto. Mesmo com a purga a perda de material decomposto e ácido é mínima visto que se observa que ao final do processo de decomposição a quantidade de ácido permanece praticamente constante.

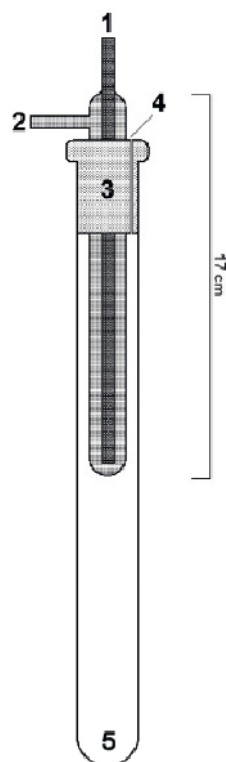


Figura 3 - Diagrama esquemático do sistema de refluxo (dedo frio) acoplado ao tubo digestor 1: entrada de água; 2: saída de água; 3: tampa de PTFE; 4: ranhura para alívio de pressão; 5: tubo digestor (ORESTE *et al.*, 2013).

A desvantagem do sistema de refluxo é que as soluções residuais produzidas nos processos de decomposição, normalmente têm uma concentração elevada de ácido. Porém, este inconveniente, quando possível, tem sido resolvido através da diluição da solução final obtida no processo de decomposição (FERREIRA *et al.*, 2013).

A decomposição ácida com o sistema de refluxo tem sido empregada com sucesso para diferentes amostras: determinação de Hg em amostras biológicas (ORESTE *et al.* 2013); Cd, Pb e Sn em carne (ORESTE *et al.* 2013); Ca, Cu, Fe, K e Na, em leite em pó (ORESTE *et al.*, 2015); Ca, Cu, K, Mg, Na e Zn em goma xantana (ROSA *et al.*, 2016); As, Cd, Pb, e Se em arroz (OLIVEIRA *et al.* 2016) e Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn em erva-mate (PEREIRA *et al.* 2016). Essa diversidade demonstra a amplitude de possibilidades da decomposição com sistema de refluxo.

2.4 Delineamento Composto Central

Frequentemente, as variáveis em um experimento podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para cada uma delas pode depender do valor da outra. Diante disso, o uso de um planejamento de experimentos com variação de fatores de um processo é de extrema importância, já que fornece informações seguras referentes às variáveis, fundamentada na teoria estatística. Do ponto de vista de uma análise química, o planejamento reduz o número de experimentos, minimiza o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro, os fatores são analisados simultaneamente, permitindo otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES; IEMMA, 2005). As informações obtidas pelo delineamento composto central (DCCR) em trabalhos de otimização de metodologias analíticas são de natureza quantitativa. Delineamentos compostos centrais permitem fazer interpretações de significância dos fatores por meio de gráficos de superfícies de resposta, que informam qual o nível crítico de um fator significativo. As respostas obtidas nos ensaios feitos com o DCCR são referentes à combinação de fatores e níveis estudados, cuja condição ótima pode ser aplicada posteriormente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Pereira-Filho *et al.* (2002) em seu trabalho apontaram que o uso do delineamento (DCCR) como alternativa na otimização de curvas de pirólise e atomização de metais como Al, Cd, Mo e Pb, com uma diminuição efetiva do número de experimentos e, ainda, mantendo-se ou melhorando-se as massas características relativas àquelas determinadas pelo fabricante. Brasil *et al.* (2007) aplicaram o planejamento estatístico para otimização das condições de bioissorção de Cu (II) em batelada utilizando-se de cascas de nozes pecã como bioissorvente e obtiveram um número significativamente reduzido de experimentos, além é claro, do cruzamento real das variáveis para a obtenção da resposta.

2.5 O Canal São Gonçalo

A área de estudo deste trabalho, o Canal São Gonçalo (Figura 4), fica localizado no complexo lagunar Patos-Mirim localizado na planície costeira do Rio Grande do Sul (Região Sul do Brasil) e apresenta uma extensão de aproximadamente 75 km, 200 a 500 m de largura e 6 m de profundidade que periodicamente sofre mudanças na direção de fluxo através da Barragem da Eclusa (BURNS *et al.*, 2006).

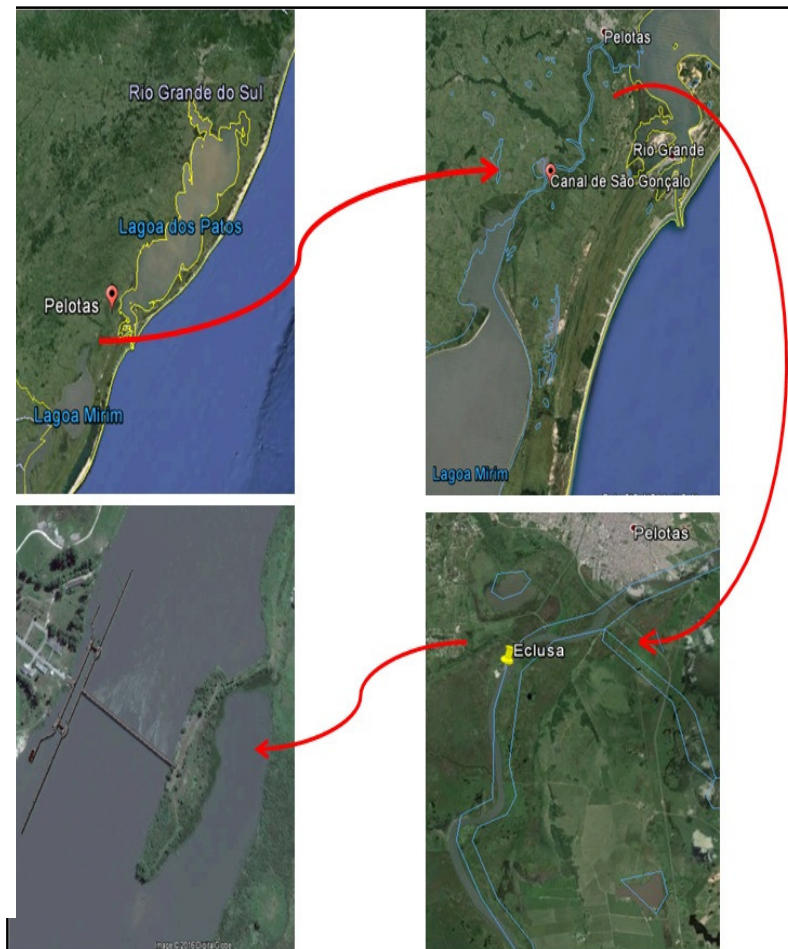


Figura 4 – Canal São Gonçalo e Eclusa. *Fonte: Google Earth*

Esse canal que liga as lagoas dos Patos (região estuarina) e Mirim (região límnic) é de grande importância para as cidades de Pelotas e Rio Grande por ter a possibilidade de fornecer água para o abastecimento das mesmas, ser fonte de sustento para muitas famílias que sobrevivem da pesca, além de

contribuir com a irrigação das lavouras de arroz e navegação local. (MACHADO, 2001)

As lavouras de arroz irrigado estão presentes nas suas duas margens, sendo um significativo recurso hídrico utilizado pelos orizicultores da região de Pelotas, que o utilizam para captação de água com fins à irrigação de suas lavouras. É também para este canal que converge a devolução da água utilizada nas lavouras de arroz, podendo, assim, receber resíduos de agrotóxicos. De um lado se delimita pelo município de Rio Grande e, do outro lado, pelos municípios de Pelotas, Capão do Leão, Pedro Osório e Arroio Grande. (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008)

Infelizmente o Canal tornou-se também destino principal de três arroios que banham a cidade de Pelotas, além do Rio Piratini. Esses arroios atravessam áreas urbanas densamente ocupadas por estabelecimentos residenciais, comerciais, industriais e de atividade agrícola que contribuem para uma série de contaminantes para as águas do mesmo. (MACHADO, 2001)

Em 1977, foi construída uma eclusa com o objetivo de evitar a entrada de água salgada, proveniente do estuário da Lagoa dos Patos, para o interior da Lagoa Mirim. Estudos mostraram uma descontinuidade abrupta na distribuição da salinidade e dos peixes ao longo da área de estudo. Estações de coleta abaixo da barragem tiveram valores de salinidade acima de zero, enquanto os valores foram iguais à zero nas estações acima da barragem durante o período amostrado. Peixes marinhos e estuarinos não foram capturados acima da barragem. Caso entrassem em abundância na Lagoa Mirim, tais espécies poderiam contribuir positivamente para os desembarques da pesca artesanal nessa região. Peixes estuarinos, como a corvina, que antes habitavam a lagoa Mirim, hoje permanecem na região marinha. (BURNS *et al.*, 2006)

Dentro do complexo lagunar Patos-Mirim, o Canal São Gonçalo mostrou ser a região com maior abundância e riqueza de espécies de peixes, tais como a corvina (*Micropogonias furnieri*), o pintado (*Pimelodus clarias*), o biru (*Cyphocharax voga*) e viola (*Loricariichthys anus*) que são amplamente comercializadas por muitos pescadores que fazem da pesca seu meio de subsistência na região. Verifica-se assim que é altamente relevante avaliar o teor

de metais, principalmente os potencialmente tóxicos nesses animais que servem também de bioindicadores das condições ambientais dos recursos hídricos.

A seguir, serão apresentadas algumas características das espécies de peixes analisadas neste trabalho.

2.6 Espécies de peixes analisadas

2.6.1 *Cyphocharax voga* (Biru)

Espécie pertencente à Família Curimatidae (Figura 5), é encontrada nos sistemas Lagunar Patos-Mirim e Lagunar Costeiro. Apresenta o corpo revestido por escamas prateadas, com pequenas manchas negras no dorso, mais visíveis nos exemplares juvenis. Quando jovem, possui diminutos dentes cônicos com os quais se alimenta de algas; na fase adulta, perde estes e passa a nutrir-se do conteúdo orgânico existente no lodo. A desova ocorre entre novembro e janeiro em marginais alagadiços formados após períodos de chuvas. (KOCH; MILANI; GROSSER, 2000)



Figura 5-*Cyphocharax voga* (Biru). Fonte: Marcelo Alves

2.6.2 *Micropogonias furnieri* (Corvina)

Espécie pertencente à Família Sciaenidae (Figura 6), é encontrada no sistema Lagunar Patos-Mirim e, também, ocorre desde o México até a Argentina. Espécie costeira e demersal, encontrada até pouco mais de 100m de profundidade. Ocorre em regiões estuarinas. Os juvenis utilizam estes ambientes como zonas de crescimento onde se alimentam de crustáceos e moluscos,

enquanto a dieta dos adultos inclui pequenos peixes e algas. No sul do Brasil, desova na região adjacente à Lagoa dos Patos e áreas próximas das desembocaduras de rios, mais intensamente durante a primavera. Apresenta corpo alongado e comprimido, pode atingir até 75cm de comprimento total, 4,5kg de peso total e 40 anos de vida(Figura 6). Possui coloração de prateado a dourado, mais escuros no dorso e amarelado a esbranquiçado no ventre. Geralmente com estrias escuras oblíquas no dorso e laterais. Exemplos de grande porte têm dorso dourado ou enegrecido (FISCHER; PEREIRA; VIEIRA, 2004).



Figura 6—*Micropogonias furnieri* (Corvina).Fonte: Marcelo Alves

2.6.3*Pimelodus clarias* (Pintado)

Espécie pertencente à Família Pimelodidae (Figura 7), é encontrada no sistema Lagunar Patos-Mirim e, também, habita quase todos os rios do Brasil, Argentina, Uruguai e Bolívia, além de ocorrer na Venezuela, Colômbia e Peru. É um dos bagres mais comuns nos rios, encontrados eventualmente em ambientes estuarinos. É um peixe omnívoro, alimentando-se principalmente de insetos e restos vegetais. Atinge cerca de 50 cm de comprimento total e 2,5kg de peso(Figura 7). Possui coloração de marrom amarelado a cinza claro e ventre esbranquiçado. Apresenta manchas arredondadas pardas ou negras, dispostas em fileiras horizontais nas laterais do corpo. Nadadeiras variam do amarelo ao branco, com pigmentos negros esparsos ou formando manchas arredondadas (FISCHER; PEREIRA; VIEIRA, 2004).



Figura 7–*Pimelodus clarias*(Pintado).*Fonte: Marcelo Alves*

2.6.4*Loricariichthys anus* (Viola)

Espécie pertencente à Família Loricariidae(Figura 8). É encontrada no sistema Lagunar Patos-Mirim e, nas regiões costeiras do sul do Brasil e no Uruguai e nas bacias do baixo Rio Paraná. É um peixe aliófago-omnívoro que se alimenta de sedimento, além dos organismos de origem animal e vegetal (ALBRECHT; SILVEIRA, 2001).



Figura 8 -*Loricariichthys anus*(Viola). *Fonte: Marcelo Alves*

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Com intuito de avaliar o grau de contaminação do Canal São Gonçalo em Pelotas/RS, o presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um método para a determinação de Cu, Zn, Pb e Cr em peixes por técnicas de Espectrometria Atômica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Realizar a amostragem de diferentes espécies de peixes (*Cyphocharax voga*, *Micropogonias furnieri*, *Pimelodus clarias* e *Loricariichthys anus*) ao longo do canal São Gonçalo nas estações de outono, inverno e primavera de 2013 e verão de 2014;
- Preparar e acondicionar as amostras para posterior análise;
- Desenvolver um método de preparo de amostra usando a decomposição ácida com sistema de refluxo;
- Através de um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), obter as melhores condições para a decomposição das amostras de peixes;
- Estabelecer as melhores condições de análise para a determinação por técnicas de F AAS (Cu e Zn) e GF AAS (Pb e Cr);
- Avaliar a exatidão do método desenvolvido através da análise de materiais de referência certificado de peixes;
- Determinar as concentrações de Cu, Zn, Pb e Cr nas amostras de peixes coletadas em diferentes períodos e avaliar a influência sazonal na presença dos metais, para que os peixes possam ser utilizados como bioindicadores da qualidade ambiental do Canal São Gonçalo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

As medidas de Cu e Zn foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com chama AAnalyst 200 (Perkin Elmer, Waltham, EUA) equipado com lâmpada de deutério para correção do sinal de fundo. Lâmpada de cátodo de Zn (Perkin Elmer, Part No. N305-0191, Waltham, EUA), operando a 15 mA com largura de fenda de 0,7 nm e em comprimento de onda de 213,86 nm, e lâmpada de cátodo de Cu (Perkin Elmer, Part No. N305-0121, Waltham, EUA), operando a 15 mA com largura de fenda de 0,7 nm e em comprimento de onda de 324,75 nm, foram utilizadas. O acetileno com 99,7% de pureza foi usado como gás combustível (Linde, Jundiaí, Brasil) com vazão de 2,50 Lmin⁻¹. A vazão do gás oxidante (ar comprimido) foi de 10 Lmin⁻¹.

As medidas de Pb e Cr foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite PinAAcle 900z (Perkin Elmer, Waltham, EUA), equipado com um amostrador automático (modelo AS 900 (Perkin Elmer, Waltham, EUA) e correção de fundo baseado no efeito Zeeman. Lâmpadas de cátodo de Pb (Perkin Elmer, Part No. N305-0157, Waltham, EUA), operando a 10 mA, com largura de fenda de 0,7 nm e em comprimento de onda de 283,31 nm, e de Cr (Perkin Elmer, Part No. N305-0119, Waltham, EUA), operando a 25 mA, com largura de fenda de 0,7 nm e em comprimento de onda de 357,87 nm, foram utilizadas. O argônio com 99,99% de pureza (Linde, Jundiaí, Brasil) foi usado como gás de purga, com uma vazão de 250 mLmin⁻¹. Tubos de grafite pirolítico com aquecimento transversal e plataforma integrada (Perkin Elmer, Part No. B3 000641, Waltham, EUA) foram usados nos estudos. Foram injetados 20 µL de solução da amostra, e como modificadores químicos utilizou-se 15 µg de Mg para as determinações de Cr e 3 µg de Mg + 5 µg de Pd para as determinações de Pb. A Tabela 2 apresenta o programa de tempo e temperatura utilizado para as determinações de Cd e Pb nas amostras de peixe.

Tabela 2 - Programa de tempo e temperatura para determinação de Pb e Cr em peixes.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Vazão de Ar (mL min ⁻¹)
Pré-secagem	110	10	30	250
Secagem	130	10	30	250
Pirólise	1500 ^a ; 1000 ^b	10	20	250
Atomização	2300 ^a ; 1800 ^b	0	5	-
Limpeza	2600 ^a ; 2200 ^b	1	3	250

^aCr; ^bPb

Para o preparo das amostras de peixe pelo método proposto, foi utilizado um bloco digestor convencional modelo MA-4025 (Marconi, Piracicaba, Brasil). Aos tubos de digestão, foram acoplados sistemas de refluxo (dedo frio) com um encaixe de PTFE que apresenta uma ranhura lateral para alívio de pressão. O sistema citado tem circulação interna de água com temperatura controlada de 15 °C através de um banho termostatzado modelo Q-214M2 (Quimis, Diadema, Brasil). Esse sistema de refluxo foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa e descrito por Oreste *et al.* 2013. A Figura 3apresenta a ilustração do sistema de refluxo utilizado para o preparo das amostras. Todas as amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica Ohaus Adventurer modelo AR 2140 (Pine Brook, NJ, EUA) com uma resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g.

4.2 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água deionizada empregada no preparo das soluções foi obtida a partir de um sistema de destilação de vidro (MA078/5, Marconi, Brasil) e posteriormente eluída em um deionizador CS1800 Evolution (Permuton, Curitiba, Brasil). Foram utilizados HNO₃65% (m/m)(Synth, Diadema,Brasil)o qual foi purificado a partir de um sistema de destilação de sub-ebulição de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, Brasil) e H₂O₂ 29% (m/m) (Synth, Diadema, Brasil). Para as curvas de

calibração, as soluções padrão de Cu, Zn, Pb e Cr foram preparadas em HNO₃ 2% (v/v) a partir da diluição de soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) de cada analito. Como modificadores químicos para as análises por GF AAS foram empregadas soluções padrão de Pd (1011 mg L⁻¹) e de Mg (1000 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Para a avaliação da exatidão do método proposto foram utilizados os materiais de referência certificados (CRM) TORT-2 (fígado e pâncreas de lagosta) do *National Research Council of Canada* (NRCC), ERM-BB422 (músculo de peixe) do *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) e SRM 2976 (tecido de mexilhão) do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Os recipientes de plástico e as vidrarias foram mantidos imersos em solução de HNO₃ 10% (v/v) por 48h, em seguida rinsados várias vezes com água deionizada e secos à temperatura ambiente. A solução de limpeza do pipetador automático do amostrador do forno de grafite foi preparada pela mistura de Triton[®] X-100 0,1% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e HNO₃ 0,2% (v/v).

4.3 Amostras

Os peixes analisados foram pescados em 4 pontos distintos do Canal São Gonçalo e chamados de Pontos 1, 2, 3 e 4, em diferentes estações: outono, inverno e primavera do ano de 2013, e no verão de 2014, totalizando 4 campanhas amostrais e 138 amostras de 4 espécies diferentes, cada uma em triplicata. As espécies coletadas foram *Cyphocharax voga* (Biru), *Micropogonias furnieri* (Corvina), *Pimelodus clarias* (Pintado) e *Loricariichthys anus* (Viola).

Todos os pontos de coleta foram devidamente identificados com o auxílio de um GPS (Global Positioning System) modelo Garmin Etrex Vista[®] H, os quais estão definidos na Tabela 3 e identificados na imagem apresentada na Figura 9.

Para a coleta dos peixes foram utilizadas redes de pesca com malha de 18 mm. Após a coleta, os peixes foram colocados em sacos de polietileno devidamente identificados; armazenados em caixa térmica com gelo para o transporte até o laboratório onde foram limpos, medidos e pesados; abertos com

um corte na região abdominal para retirada das vísceras, separando-se para análise os músculos que foram triturados e homogeneizados manualmente com auxílio de talheres plásticos sob tábua de vidro, armazenados em sacos plásticos e mantidos sob congelamento em torno de -16 °C até o momento das análises.

Tabela 3 - Descrição e georreferências dos pontos coletados

	Descrição dos pontos	Latitude	Longitude
P 1	Próximo à região da Balsa de Pelotas	31°78'25.02"	52°31'89.03"
P 2	Entre o Porto de Pelotas e a ponte que atravessa a BR 392	31°79'11.84"	52°34'86.73"
P 3	Próximo a barragem Eclusa do São Gonçalo	31°82'03.16"	52°39'27.52"
P 4	Próximo a fazenda Paineira, antes do rio Piratini	31°90'81.14"	52°38'12.98"



Figura 9 - Pontos de coleta dos peixes no Canal São Gonçalo em Pelotas-RS.

Fonte: Google Earth

Na etapa de otimização do método, foram utilizadas amostras de peixe corvina (*Micropogonias furnieri*) adquiridas no Mercado Público de Pelotas, Rio

Grande do Sul. Os peixes foram limpos e obtidos apenas os filés, que foram triturados e homogeneizados com talheres de plástico, armazenados em saco plástico e mantidos congelados a -16 °C até o momento do uso. Foi necessário contaminar artificialmente as amostras com os analitos em estudo, já que a concentração dos metais presentes nos peixes coletados não era suficiente para produzir sinal analítico de intensidade adequada aos objetivos do estudo. As concentrações dos analitos adicionados foram 0,05 mg de Cu; 0,025 mg de Zn; 0,0005 mg de Cr e 0,0025 mg de Pb a partir da diluição de soluções estoque (1000 mg L^{-1}) de cada metal em 0,25 g de amostra.

4.4 Planejamento Estatístico Experimental

A otimização do método de decomposição ácida com sistema de refluxo foi realizada através de um planejamento estatístico experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), considerando as seguintes variáveis: temperatura, tempo de decomposição e volume de H_2O_2 (Tabela 4). O volume de HNO_3 foi fixado em 5 mL e a massa de amostra em 0,25 g. As faixas das variáveis independentes foram baseadas em experimentos realizados anteriormente. As variáveis dependentes foram os sinais de absorvância de Cu, Zn, Cr e Pb. Foi realizado um DCCR 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios. Para a análise dos dados foi utilizado o software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA).

Tabela 4 - Variáveis e níveis utilizados no DCCR.

Variáveis independentes	Níveis				
	- 1,68	-1	0	+ 1	+ 1,68
Tempo de decomposição (h)	0,32	1	2	3	3,7
Temperatura de decomposição(°C)	100	120	150	180	200
Volume de H_2O_2 (mL)	0,32	1	2	3	3,7

Para a realização dos ensaios do planejamento estatístico foram utilizadas as condições sugeridas pelo fabricante dos equipamentos. Após a observação das leituras de absorvância e escolhida a melhor condição de decomposição das

amostras através do DCCR, foi realizado um estudo de otimização das temperaturas de pirólise e atomização do GF AAS em meio aquoso e meio de matriz, utilizando a condição otimizada de decomposição. O programa de tempo e temperatura do forno de grafite otimizado está apresentado na Tabela 2.

4.5. Método de preparo das amostras: decomposição ácida com sistema de refluxo

Alíquotas de 0,25g de amostras de peixe *in natura* foram descongeladas, pesadas diretamente nos tubos de digestão e, posteriormente adicionaram-se 5 mL de HNO_3 . Em seguida o sistema de refluxo foi acoplado aos tubos de digestão, e então os tubos foram levados ao aquecimento no bloco digestor por 2 horas a 150 °C. Passados $\frac{3}{4}$ do tempo de decomposição previsto, retirou-se os tubos do bloco digestor, esperou-se esfriar para então adicionar 2mL de H_2O_2 , retornando ao bloco para o término da decomposição. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, a solução resultante foi transferida de forma quantitativa para frascos volumétricos de polipropileno e avolumadas a 10,0 mL com água deionizada. Todas as amostras foram decompostas em triplicata e os brancos analíticos foram preparados da mesma forma.

4.6 Validação Analítica

Os parâmetros de mérito avaliados para a validação do método desenvolvido foram: limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Todos os cálculos empregados estão baseados nas orientações do guia de validação do INMETRO (2011).

4.6.1 Limites de detecção e quantificação

As curvas analíticas empregadas para os analitos foram de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹ para Cu; 0,25 a 1,0 mg L⁻¹ para Zn; 1 a 13 µg L⁻¹ para Cr e de 10 a 50 µg L⁻¹ para Pb. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações 1 e 2, respectivamente:

$$LD = 3(S/a) \quad (1)$$

$$LQ = 10(S/a) \quad (2)$$

onde S é a estimativa de desvio-padrão de 10 leituras do branco analítico da curva de calibração e a é a inclinação da curva de calibração.

4.6.2 Linearidade

Este parâmetro de mérito foi avaliado pelo cálculo do coeficiente de correlação da curva analítica (R). Foram consideradas como satisfatórias as curvas com valores de R maiores ou iguais a 0,99.

4.6.3 Precisão

A estimativa do desvio-padrão relativo das leituras (RSD) foi calculada pela Equação 3 e permitiu a avaliação da precisão.

$$RSD(\%) = (S/X) \cdot 100 \quad (3)$$

onde S é igual a estimativa de desvio-padrão das medidas, X é igual a concentração média. Foram usados como valores de referência aceitáveis, os descritos na Tabela 5 (AOAC,2012).

Tabela 5 - Relação entre a concentração do analito e o desvio padrão relativo

Concentração do analito	RSD(%)
10 ppm	7,3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

4.6.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da realização de ensaios com material de referência certificado utilizando os valores de recuperação e através do teste Z score. Os valores de recuperação foram calculados com auxílio da equação 4:

$$R\% = (C/C_{CRM}).100 \quad (4)$$

onde C é a concentração média das recuperações obtidas para n repetições e C_{CRM} é a concentração certificada. Considerou-se o intervalo de recuperação de 80 a 120% como suficiente para aceitação da exatidão da metodologia empregada.

Para o teste Z score foi aplicada a equação 5:

$$Z = (X_{lab} - X_{ref}) / DP_{ref} \quad (5)$$

onde X_{lab} é a média dos valores encontrados nas determinações, X_{ref} é a média do valor certificado e DP_{ref} é o desvio padrão do valor certificado. Os valores obtidos no teste Z Score foram avaliados da seguinte maneira:

$|Z| \leq 2$, os resultados são satisfatórios;

$2 < |Z| \leq 3$, os resultados são questionáveis;

$|Z| > 3$, os resultados são insatisfatórios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimizações: delineamento estatístico experimental (DCCR)

De modo a estabelecer as melhores condições da decomposição ácida com sistema de refluxo para o preparo das amostras de peixe *in natura* foi realizada uma otimização, na qual o volume de HNO_3 foi fixado em 5 mL, a massa em 0,25 g e variaram-se o tempo e a temperatura de decomposição e o volume de H_2O_2 , conforme os níveis apresentados na Tabela 4. A matriz do DCCR contendo os resultados de absorvância dos analitos Cu, Zn, Cr e Pb obtidos a partir dos 17 ensaios realizados é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 -Matriz do planejamento experimental DCCR. Variáveis: A) Volume de H_2O_2 (mL) B) Tempo de decomposição (h); C Temperatura de decomposição ($^{\circ}\text{C}$).

Ensaio	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes			
	A	B	C	Absorvância			
				Cu	Zn	Cr	Pb
1	1	1	120	0,096	0,168	0,184	0,086
2	3	1	120	0,093	0,168	0,256	0,080
3	1	3	120	0,095	0,159	0,194	0,089
4	3	3	120	0,097	0,167	0,245	0,086
5	1	1	180	0,103	0,176	0,174	0,087
6	3	1	180	0,100	0,164	0,205	0,100
7	1	3	180	0,102	0,167	0,173	0,099
8	3	3	180	0,104	0,167	0,214	0,102
9	0,32	2	150	0,103	0,155	0,156	0,092
10	3,7	2	150	0,104	0,156	0,182	0,099
11	2	0,32	150	0,107	0,146	0,136	0,115
12	2	3,7	150	0,110	0,159	0,207	0,098
13	2	2	100	0,109	0,186	0,183	0,110
14	2	2	200	0,117	0,188	0,178	0,108
15	2	2	150	0,111	0,187	0,209	0,123
16	2	2	150	0,109	0,180	0,199	0,123
17	2	2	150	0,109	0,179	0,204	0,123

Os pontos centrais (ensaios 15 a 17) apresentaram uma variação pequena, com desvio-padrão relativo entre 1,0 e 2,5% para as respostas, indicando boa repetitividade do método.

As tabelas 7, 8, 9 e 10 apresentam, respectivamente, os coeficientes de regressão do DCCR para Cu, Cr, Pb e Zn.

Tabela 7 -Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Cu

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	0,110132	0,004	29,315	<0,0001
(1) Volume (mL) (L)	0,000007	0,002	0,004	0,9970
Volume(mL) (Q)	-0,004105	0,002	-2,113	0,0723
(2) Tempo (h) (L)	0,000634	0,002	0,359	0,7298
Tempo(h) (Q)	-0,002474	0,002	-1,274	0,2432
(3) Temperatura(°C) (L)	0,002994	0,002	1,697	0,1334
Temperatura(°C) (Q)	-0,000981	0,002	-0,505	0,6288
1L, 2L	0,001250	0,002	0,542	0,6044
1L, 3L	0,000167	0,002	0,072	0,9443
2L, 3L	0,000028	0,002	0,012	0,9907

Tabela 8 -Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Cr.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	0,201900	0,018	29,315	<0,0001
(1)Volume(mL) (L)	0,017869	0,008	0,004	0,9970
Volume(mL) (Q)	-0,004712	0,009	-2,113	0,0723
(2)Tempo(h) (L)	0,009399	0,008	0,359	0,7298
Tempo(h) (Q)	-0,003899	0,009	-1,274	0,2432
(3)Temperatura(°C) (L)	-0,009261	0,008	1,697	0,1334
Temperatura(°C) (Q)	-0,000770	0,009	-0,505	0,6288
1L, 2L	-0,000775	0,011	0,542	0,6044
1L, 3L	-0,007100	0,011	0,072	0,9443
2L, 3L	0,000600	0,011	0,012	0,9907

Tabela 9 -Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Pb.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	0,123763	0,006	20,26	<0,0001
(1)Volume(mL) (L)	0,001431	0,003	0,49	0,6331
Volume(mL) (Q)	-0,012231	0,003	-3,87	0,0061
(2)Tempo(h) (L)	-0,000385	0,003	-0,13	0,8968
Tempo(h) (Q)	-0,008324	0,003	-2,64	0,0335
(3)Temperatura(°C) (L)	0,003122	0,003	1,09	0,3124
Temperatura(°C) (Q)	-0,007370	0,003	-2,33	0,0522
1L, 2L	-0,000775	0,004	-0,21	0,8420
1L, 3L	0,003225	0,004	0,86	0,4179
2L, 3L	0,000525	0,004	0,14	0,8925

Tabela 10 -Coeficientes de regressão do planejamento experimental DCCR para Zn.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	0,181722	0,003	62,13	<0,0001
(1)Volume(mL) (L)	-0,000234	0,001	-0,17	0,8693
Volume(mL) (Q)	-0,008689	0,001	-5,78	0,0007
(2)Tempo(h) (L)	0,000328	0,001	0,24	0,8181
Tempo(h) (Q)	-0,009700	0,001	-6,42	0,0004
(3)Temperatura(°C) (L)	0,001155	0,001	0,84	0,4281
Temperatura(°C) (Q)	0,002419	0,001	1,59	0,1536
1L, 2L	0,002375	0,002	1,32	0,2273
1L, 3L	0,002458	0,002	-1,37	0,2130
2L, 3L	0,000403	0,002	0,22	0,8288

De acordo com os dados das Tabelas 7 a 10, verificou-se que foram significativos os termos quadráticos para volume de H_2O_2 (V) e tempo de decomposição (T) ($p < 0,05$) para Zn e Pb enquanto que para Cr e Cu nenhuma variável se apresentou estatisticamente significativa a 95% de confiança.

Na sequência, foi realizada uma análise estatística dos dados e foram obtidos os Diagramas de Pareto para cada analito, os quais são mostrados nas Figuras 10 para o Cu, Figura 11 para o Cr, Figura 12 para o Zn e Figura 13 para o Pb.

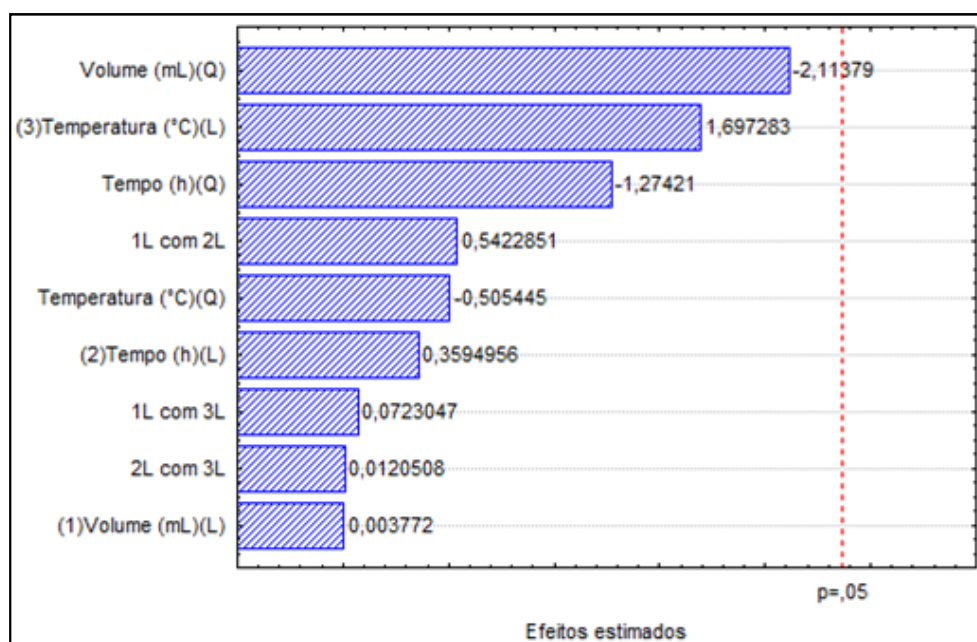


Figura 10 – Diagrama de Pareto obtido do DCCR na determinação de Cu em peixes

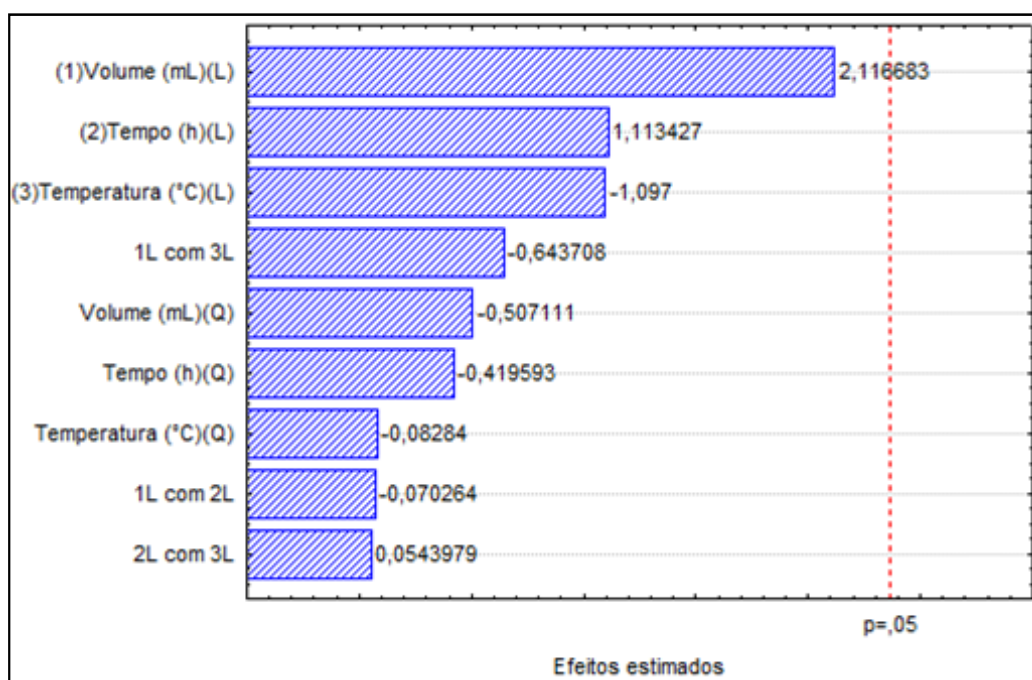


Figura 11 – Diagrama de Pareto obtido do DCCR na determinação de Cr em peixes

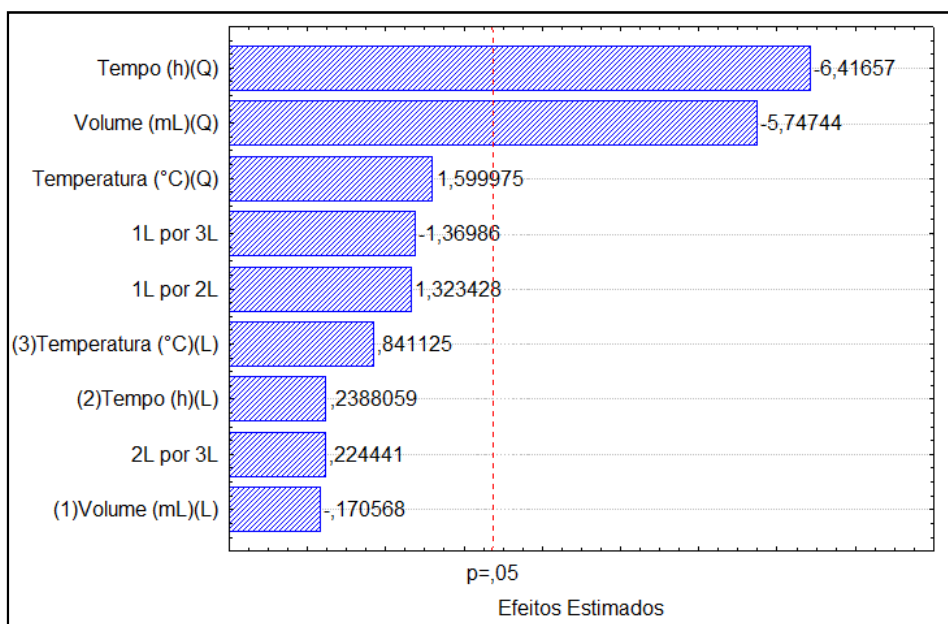


Figura 12 -Diagrama de Pareto obtido do DCCR na determinação de Zn em peixes.

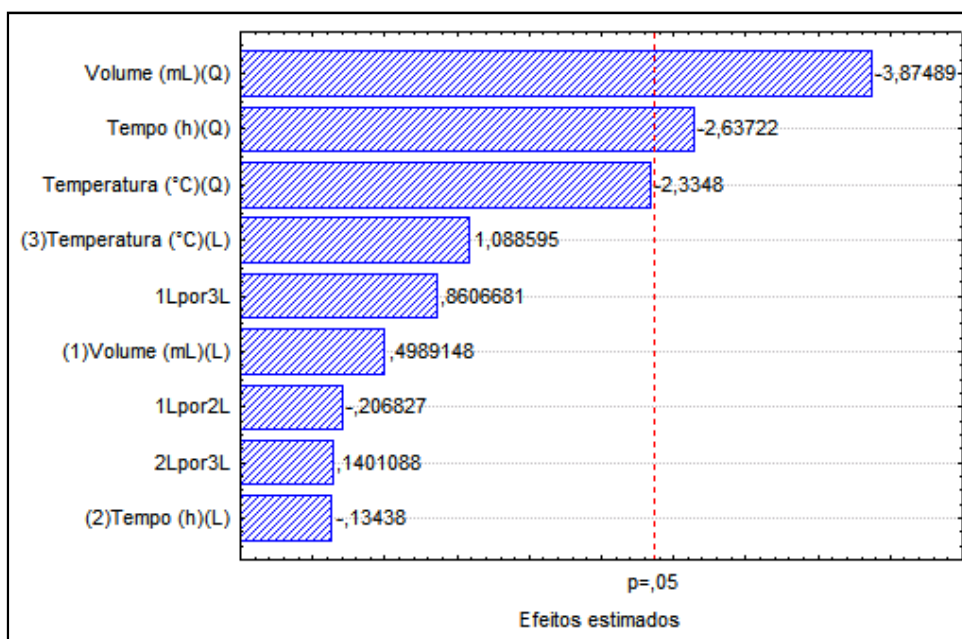


Figura 13 -Diagrama de Pareto obtido do DCCR na determinação de Pb em peixes.

De acordo com o Diagrama de Pareto, apresentado na Figura 12, é possível observar que há efeito negativo para ambas variáveis em relação ao Zn, ou seja, ao aumentar os valores das variáveis, há uma diminuição da resposta analítica, fato que se repete para ao Pb, que pode ser verificado no Diagrama de Pareto apresentado na Figura 13.

Após a parametrização foram obtidas as equações do modelo para Zn e Pb que apresentaram como variáveis o volume de H₂O₂ quadrático (V²) e o tempo de decomposição quadrático (T²). Essas equações estão descritas abaixo (equações 6 e 7), respectivamente.

$$Y = 0,184813 - 0,009403V^2 - 0,010415T^2 \quad (6)$$

$$Y = 0,114345 - 0,010054V^2 - 0,006147T^2 \quad (7)$$

Considerando somente os termos significativos, a Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) para Zn e Pb. O modelo é significativo e adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta, como fica evidente pelo valor do F calculado (38,34 e 15,24).

Tabela 11 -Análise de variância (ANOVA) para os teores de Zn e Pb

Analitos	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
Zn	Regressão	0,001983	2	0,009915	38,34
	Resíduos	0,000362	14	$2,586 \times 10^{-6}$	
	Total	0,002345	16	0,000146	
Pb	Regressão	0,001442	2	0,000721	15,24
	Resíduos	0,001652	14	0,000118	
	Total	0,003094	16	6,11	

$$F_{0,05; 2; 14} = 3,74$$

Como apenas os parâmetros volume de H_2O_2 e tempo de decomposição foram significativos, foi possível gerar uma superfície de resposta para cada analito e estas são apresentadas nas Figuras 14 e 15. A análise de ambas as superfícies de resposta indica que o maior valor de absorvância foi obtido quando foram usadas as seguintes condições: 2 h de decomposição e 2 mL de H_2O_2 (ponto central).

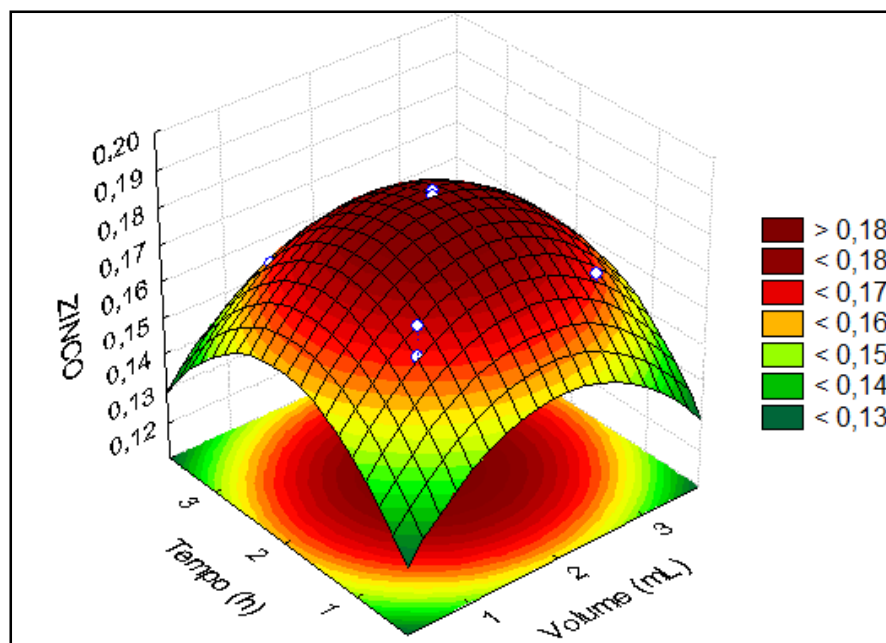


Figura 14-Superfície de resposta para volume de H_2O_2 versus tempo de decomposição para a determinação de Zn em peixes.

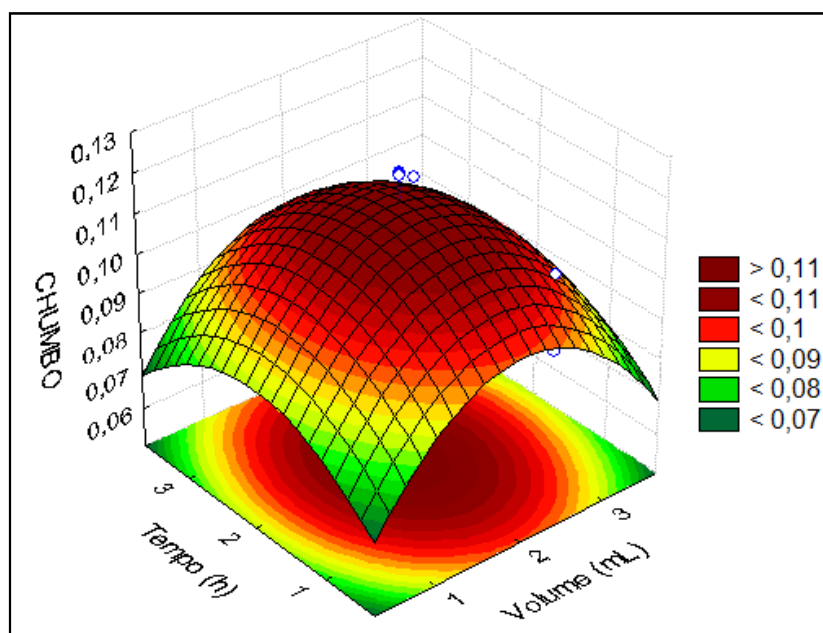


Figura 15-Superfície de resposta para volume de H_2O_2 versus tempo de decomposição para a determinação de Pb em peixes.

Portanto, as condições escolhidas para a decomposição das amostras foram: tempo total de 2 horas de decomposição em bloco digestor aquecido à 150°C com a adição de 2 mL de H₂O₂ passados ³/₄ do início do processo.

Em geral, um tempo mais longo permite alcançar melhores resultados na decomposição da amostra. Em relação ao tempo de decomposição, quando as decomposições foram realizadas em menos de 2 horas, foi observada uma decomposição incompleta e após as medidas analíticas, não foi possível realizar a determinação do teor total do analito investigado.

O volume de 2 mL de H₂O₂ foi necessário para a oxidação ocorrer após a ação de HNO₃, permitindo a obtenção de uma solução límpida, pronta para ser analisada em espectrômetro de absorção atômica.

A variável temperatura não foi estatisticamente significativa para qualquer analito. Deste modo, decidiu-se utilizar a temperatura de 150 °C para assegurar o ponto de ebulição do ácido nítrico, e também para garantir a quebra das ligações entre o analito e proteínas que ocorrem em peixes, no caso de Zn, Cu e Pb (KPEE; OZIOMA; IHUNWO, 2009) ou com lipídeos, tais como Cr (JUNIOR *et al.*, 2002), permitindo que os analitos ficassem livres em solução.

Como não houve variáveis estatisticamente significativas para Cu e Cr, foram utilizadas as mesmas condições de decomposição ácida empregadas para Zn e Pb, afim de padronizar o método no bloco digestor com o dedo frio como sistema de refluxo.

Dessa forma, o método foi validado conforme os parâmetros mencionados na parte experimental e a exatidão para os 4 analitos investigados foi avaliada com o uso de material de referência certificado de peixes, conforme será descrito a seguir.

5.2 Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito obtidos para as determinações de Cu, Zn, Cr e Pb estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Parâmetros de mérito para a determinação de Cu e Zn por FAAS e Cr e Pb por GF AAS em peixes.

	Cu	Zn	Cr	Pb
Faixa de trabalho*	0,5 – 2,5	0,25 – 1	1 – 13	10 – 50
Inclinação	0,1252	0,4456	0,0540	0,0011
LD instrumental*	0,004	0,002	0,43	0,52
LD método**	0,3	0,6	17,1	20,8
LQ**	0,9	1,9	57,0	69,2
R	0,999	0,998	0,997	0,997
RSD (%)	1,8	2,4	7,9	6,2

*mg L⁻¹ para Cu e Zn; µg L⁻¹ para Pb e Cr. ** mg kg⁻¹ para Cu e Zn; µg kg⁻¹ para Pb e Cr

Avaliando-se os parâmetros de mérito obtidos apresentados na Tabela 12, pode-se observar que os valores de coeficiente de correlação (R) foram maiores que 0,99 atestando a boa linearidade do método na faixa de concentração empregada. Os valores de inclinação obtidos mostram também a boa sensibilidade do método para os analitos investigados. Os valores de desvio padrão relativo (RSD) foram inferiores a 7,3 e 15% conforme estabelecido pela AOAC (2012), indicando boa precisão do método.

Os limites de quantificação alcançados são adequados à proposta de trabalho. Para efeito de comparação dos limites máximos de alguns elementos em amostras de pescado, utilizou-se os limites permitidos para contaminantes químicos em alimentos, fixados pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL) na Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998 que foi parcialmente revogada pela Resolução nº 42 de 29 de agosto de 2013. No Brasil,

o decreto nº 55.871 da ANVISA, publicado em 26 de março de 1965, padroniza limite máximo de tolerância para alguns metais em alimentos, considerando seu peso úmido.

Para o Cu, por exemplo, o valor de $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ é inferior ao valor de 30 mg kg^{-1} que é a concentração máxima permitida pelo Decreto 55.871 da ANVISA (1965) para a presença desse metal em peixes. O mesmo ocorre com Zn e Cr que apresentam, respectivamente, os seguintes limites máximos permitidos de concentração: 50 mg kg^{-1} e 100 µg kg^{-1} enquanto que o valor para Pb é de 300 µg kg^{-1} (alterado pela Resolução nº 42 da ANVISA de 29/8/2013), possibilitando o monitoramento da concentração destes com o método desenvolvido.

Para avaliar a exatidão do método, diferentes materiais de referência certificados foram analisados e os resultados estão apresentados na Tabela 13. Todos apresentaram boa concordância entre os valores medidos com os valores certificados, recuperação no intervalo de 80 a 120% e valores do teste Z score menores que 2 indicando que os resultados foram satisfatórios, provando a exatidão do método para todos os analitos investigados.

Tabela 13 - Resultados de concentração, em mg kg^{-1} , para Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes CRM.

CRM		Analito			
		Cu ^a	Zn ^a	Cr ^b	Pb ^b
TORT-2	Certificado	106 ± 10	180 ± 6	$0,77 \pm 0,15$	ni
	Encontrado	$97,4 \pm 1,7$	$176,5 \pm 4$	$0,70 \pm 0,13$	<LD
BB422	Certificado	$1,67 \pm 0,16$	$16,0 \pm 1,1$	ni	ni
	Encontrado	< LD	$15,1 \pm 0,8$	<LD	<LD
2976	Certificado	ni	ni	ni	$1,19 \pm 0,18$
	Encontrado	<LD	<LD	<LD	$1,34 \pm 0,04$

^aFAAS; ^bGF AAS; ni: não informado.

Em relação ao processo de decomposição com o dedo frio, o mesmo é seguro, eficaz na decomposição orgânica, sem perdas de analitos por volatilização e com valores ótimos de sensibilidade e limites de detecção.

5.3 Avaliação sazonal do teor de metais nos peixes oriundos do Canal São Gonçalo

Os resultados obtidos para as determinações dos analitos nas amostras de peixe investigadas são apresentados nas Tabelas 14 e 15, divididos por pontos de coleta e com a aplicação do Teste de Tukey com 95% de confiança. Os resultados apresentaram grande variação nas concentrações nas diferentes estações do ano, pontos de coleta e espécies de peixes.

As maiores concentrações de Cu, Zn e Pb foram observadas nos peixes coletados nos pontos 1 e 2 pertencentes à região estuarina. Já era esperado que esses pontos fossem os mais poluídos do Canal São Gonçalo com relação a todos os metais, por se tratarem de regiões urbanas, sujeitas ao deságue de outros canais que circulam pela cidade que servem de locais de despejo de efluentes de indústrias de curtimento, alimentos e metalomecânicas, além de serem locais de deposição de materiais de construção e lixo urbano. Porém, o Cr apresentou altos índices ao longo de toda área do recurso hídrico investigado, mas especialmente na região límnic (pontos 3 e 4), que se esperava ser a região menos poluída. Considerando as espécies de peixes, os exemplares de *Loricariichthys anus* (viola) foram os que apresentaram maiores concentrações de todos os analitos investigados.

Tabela 14 – Concentrações de Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes espécies de peixes do Canal São Gonçalo nos Pontos 1 e 2.

	Espécie	Estação	Cu*	Zn*	Cr**	Pb**
Ponto 1	A	Outono	10,7 ± 0,01 ^{adf}	2,6 ± 0,1 ^{ace}	253± 5,5 ^{ac}	242± 12 ^{af}
		Inverno	9,5 ± 0,9 ^{ab}	10,4 ± 0,6 ^{bd}	470± 30 ^b	416± 26 ^{bg}
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	Outono	10,5 ± 0,04 ^{aefs}	2,2 ± 0,1 ^{ae}	219± 23 ^{ah}	145± 5,0 ^{ceo}
		Inverno	10,1 ± 0,6 ^{aelqs}	10,6 ± 1,3 ^b	243± 18 ^{ac}	123± 14 ^{cmo}
		Primavera	9,4 ± 0,03 ^{abg}	4,1 ± 0,1 ^{acdej}	332± 39 ^{cg}	487± 2,0 ^d
		Verão	8,1 ± 0,7 ^{bghn}	5,6 ± 0,2 ^{acdgh}	40± 3,6 ^d	220 ± 1,0 ^{ah}
	C	Outono	10,5 ± 0,3 ^{aefs}	6,2 ± 0,7 ^{cdgih}	184± 20 ^{af}	202 ± 10 ^{ae}
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	8,1 ± 0,2 ^{bghn}	6,7 ± 0,4 ^{dghil}	61± 5,3 ^d	306± 0,4 ^{fj}
	D	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	10,3 ± 0,1 ^{acels}	12,5 ± 0,3 ^b	<LD	306± 9,5 ^{fj}
		Primavera	8,8 ± 0,01 ^{bcgh}	1,8 ± 0,01 ^e	832± 0,01 ^e	379± 18 ^b
		Verão	11,4 ± 0,7 ^{defj}	12,8 ± 1,9 ^b	89± 4,1 ^{df}	480± 80 ^{dg}
Ponto 2	A	Outono	10,6 ± 0,2 ^{aef}	3,2 ± 0,3 ^{acdej}	218± 28 ^{ah}	189 ± 10 ^{ae}
		Inverno	8,2 ± 0,01 ^{bghn}	5,1 ± 0,01 ^{acdeh}	221± 0,01 ^{ah}	426± 40 ^{bd}
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	12,0 ± 0,1 ^{fl}	23,6 ± 2,7 ^f	228± 16 ^{ah}	177± 17 ^{ceh}
		Primavera	8,2 ± 0,4 ^{bghn}	8,7 ± 2,4 ^{bgh}	455 ± 33 ^{bj}	163± 1,0 ^{ceho}
		Verão	7,9 ± 0,4 ^{ghint}	11,5 ± 2,1 ^b	373± 90 ^{bgn}	167± 28 ^{ceh}
	C	Outono	10,5 ± 0,1 ^{afnt}	5,5 ± 0,6 ^{aegm}	190± 16 ^{af}	129 ± 4,0 ^{cen}
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	7,7 ± 0,4 ^{hir}	2,8 ± 0,2 ^{acej}	465± 2,2 ^{bj}	37 ± 1,7 ⁱ
		Verão	8,4 ± 0,3 ^{bip}	11,3 ± 0,7 ^b	61 ± 0,1 ^d	200± 7,8 ^{ahl}
	D	Outono	10,5 ± 0,3 ^{afj}	7,6 ± 0,1 ^{bdg}	319± 14 ^{chg}	313± 1,2 ^j
		Inverno	11,1 ± 1,3 ^{flm}	20,8 ± 0,2 ^f	396 ± 47 ^{bg}	367 ± 0,2 ^{bj}
		Primavera	7,3 ± 0,2 ^{hin}	5,6± 0,3 ^{acdgm}	338± 11 ^{cgi}	49 ± 4,9 ^{iq}
		Verão	8,3 ± 0,4 ^{bi}	9,8 ± 1,0 ^{bi}	77± 10 ^d	139± 22 ^{celr}

A: *Cyphocharax voga* (biru); B: *Pimelodus clarias* (pintado); C: *Micropogonias furnier*; (corvina), D: *Loricariichthys anus* (viola); n.d.: não disponível;

*mg kg⁻¹; **µg kg⁻¹

Letras iguais da mesma coluna não diferem estatisticamente a 95% de confiança.

Tabela 15 – Concentrações de Cu, Zn, Cr e Pb em diferentes espécies de peixes do Canal São Gonçalo nos Pontos 3 e 4.

	Espécie	Estação	Cu*	Zn*	Cr**	Pb**
Ponto 3	A	Outono	10,3 ± 0,7 ^{acjm}	6,0 ± 0,6 ^{cgmoq}	753 ± 57 ^e	226 ± 5,7 ^{ah}
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	Outono	6,7 ± 0,3 ^{no}	6,5 ± 0,6 ^{ghijlo}	436 ± 44 ^{bi}	165 ± 15 ^{ceho}
		Inverno	9,6 ± 0,3 ^{abm}	8,1 ± 0,7 ^{bgcho}	447 ± 12 ^{bjo}	267 ± 34 ^{afj}
		Primavera	7,5 ± 0,6 ^{hinr}	5,1 ± 0,5 ^{egm}	362 ± 42 ^{gijn}	119 ± 11 ^{cmo}
		Verão	7,9 ± 0,2 ^{giou}	10,1 ± 1,2 ^{bl}	42 ± 1,2 ^d	60,6 ± 8,1 ^{cin}
	C	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	D	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	9,5 ± 0,1 ^{ab}	4,3 ± 0,5 ^{aceg}	255 ± 14 ^{ac}	380 ± 42 ^b
		Primavera	7,7 ± 0,3 ^{hinr}	8,0 ± 0,1 ^{bgcho}	1268 ± 17 ^l	69 ± 4,4 ^{cin}
		Verão	7,9 ± 0,4 ^{ginu}	10,1 ± 0,6 ^{bl}	1100 ± 2,9 ^m	59 ± 1,6 ^{imn}
Ponto 4	A	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	Outono	9,9 ± 0,6 ^{acdmvp}	4,0 ± 0,5 ^{aceg}	271 ± 13 ^{acm}	73 ± 4,8 ^{imn}
		Inverno	10,7 ± 0,2 ^{af}	8,1 ± 0,1 ^{bhmo}	818 ± 51 ^e	102 ± 5,0 ^{noqr}
		Primavera	8,9 ± 0,9 ^{bcgqr}	2,7 ± 0,1 ^{ace}	205 ± 7,7 ^{ah}	247 ± 3,0 ^{af}
		Verão	8,0 ± 0,3 ^{bgcho}	11,1 ± 2,8 ^b	346 ± 33 ^{cgio}	66,3 ± 1,7 ^{imn}
	C	Outono	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Inverno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Primavera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Verão	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	D	Outono	8,3 ± 0,6 ^{bi}	7,6 ± 0,9 ^{bdg}	220 ± 30 ^a	272 ± 3,8 ^{afj}
		Inverno	9,0 ± 0,5 ^{bjrstuv}	4,8 ± 0,1 ^{adeo}	741 ± 60 ^e	169 ± 1,4 ^{ceh}
		Primavera	7,3 ± 0,5 ^{hin}	11,7 ± 1,3 ^b	966 ± 67 ^p	152 ± 6,8 ^{ceho}
		Verão	7,9 ± 0,4 ^{giou}	9,5 ± 1,0 ^{biq}	117 ± 0,6 ^{dth}	59 ± 5,0 ^{imn}

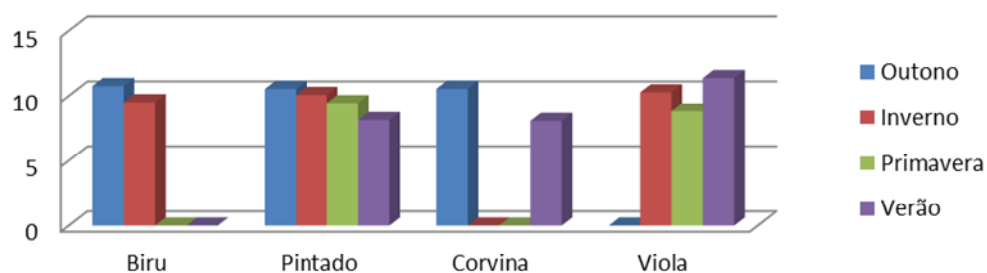
A: *Cyphocharax voga* (biru); B: *Pimelodus clarias* (pintado); C: *Micropogonias furnieri* (corvina); D: *Loricariichthys anus* (viola); n.d.: não disponível

*mg kg⁻¹; **µg kg⁻¹

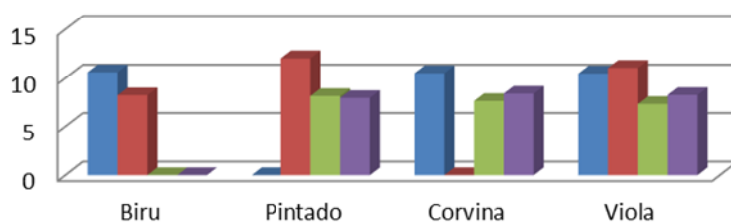
Letras iguais da mesma coluna não diferem estatisticamente a 95% de confiança.

Os níveis de concentração de Cu encontrados segundo o Teste de Tukey a 95% de confiança apresentaram variação significativa entre as espécies de peixes, estações e pontos de coleta, no entanto, seus valores ficaram compreendidos no intervalo de 6,7 a 12,0 mg kg⁻¹ nas estações do outono e inverno respectivamente, ambas para peixes da espécie *Pimelodus clarias*(pintado), como mostra a Figura 16. O valor máximo se aproximou aos encontrados por Bugallo, Segade e Gomez (2007) e Souza *et al.* (2009) que foram de 12 mg kg⁻¹ e 11,9 mg kg⁻¹, respectivamente. Souza *et al.* (2009) analisaram musculatura e vísceras de peixes das espécies Tilápia, Lambari, Piau e Catfish oriundos de um pesqueiro da cidade de Umuarama/PR encontrando diferentes valores de Cu, dentre os quais o citado anteriormente e concentrações que chegaram a 40 mg kg⁻¹ nas vísceras. Segundo os autores como a água do lago estava levemente ácida (pH = 6,5) favoreceu a sua solvatação, tornando o Cu biodisponível para os peixes, propiciando um acúmulo principalmente nas vísceras, onde este elemento se liga à metalotioneína, servindo como um mecanismo de desintoxicação do peixe. No entanto, foram reportados valores maiores que esses, tais como 16,1 mg kg⁻¹ por Djedjibegovic *et al.* (2012) em peixes das espécies Cyprinidae, Salmonidae e Mugilidae habitantes do Rio Neretva (Bosnia - Herzegovina), 24 mg kg⁻¹ por Sivaperumal, Sankar e Viswanathan Nair (2007) e 32,9 mg kg⁻¹ por Bilandzic *et al.* (2012) em peixes comprados em mercado público da Índia e Croácia, respectivamente. Níveis de concentração menores também foram detectados por Olmedo *et al.* (2013) na ordem de 0,069 a 4,73 mg kg⁻¹ em amostras obtidas no mercado público de Granada/Espanha e por Leung *et al.* (2014) na ordem de 0,79 e 2,26 mg kg⁻¹ em 11 diferentes espécies de peixes do Rio das Pérolas na China. Os valores encontrados em nosso trabalho foram maiores nos pontos 1 e 2 (regiões de maior atividade antropogênica) e durante o inverno, isso provavelmente por ser o período de reprodução dos peixes. No entanto, as concentrações obtidas ficaram todas abaixo do limite máximo permitido pela ANVISA (1965) de 30 mg kg⁻¹ de Cu em pescados e, desta forma, não foi encontrado registro de contaminação por Cu nos peixes analisados do canal.

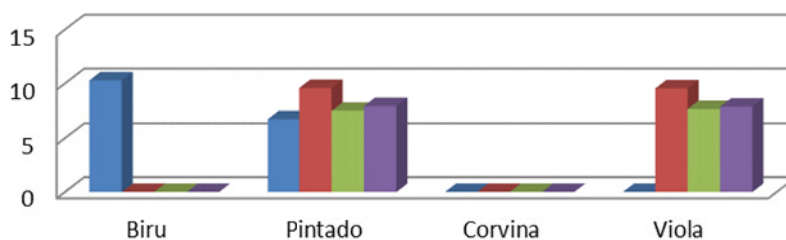
Ponto 1



Ponto 2



Ponto 3



Ponto 4

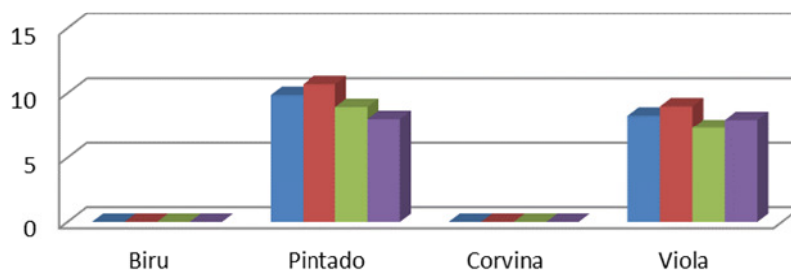


Figura 16 – Concentrações de Cu (em mg kg⁻¹) nas amostras de peixes.

O intervalo das concentrações de Zn nas amostras de peixes analisados ficaram entre 1,8 a 23,6 mg kg⁻¹. Conforme a figura 17, as maiores

concentrações foram observadas nas coletas de inverno nos pontos 1 e 2, provavelmente devido ao fenômeno da lixiviação de materiais solúveis do solo que é maior nesta estação pelo acúmulo de chuvas e nos peixes Pintado e Viola que possivelmente sofrem o fenômeno da biomagnificação.

Saei-dehkordi e Fallah (2011) avaliaram as concentrações de alguns metais, dentre eles o zinco, em peixes do Golfo Pérsico considerando a influência sazonal concluindo que diferentes fatores tais como a temperatura da água, dietas e ciclos reprodutivos dos peixes são importantes nas quantidades disponíveis de metais potencialmente tóxicos. Nesse trabalho eles encontraram altos valores de zinco no inverno e também relacionaram a precipitação considerável e consequente processo de lixiviação de resíduos.

Sivaperumal, Sankar e Viswanathan Nair (2007) e Olmedo *et al.* (2013) detectaram níveis de concentração menores, $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ em peixes oriundos do mercado público da Índia e $1,24 \text{ mg kg}^{-1}$ em peixes adquiridos no comércio de Granada (Espanha), respectivamente. Além deles, Medeiros *et al.* (2012), encontraram concentração média de $3,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de zinco em peixes da espécie *Micropogonias furnieri* pescados na região de Niterói (RJ).

Souza *et al.* (2009) quantificaram zinco em peixes criados em um pesqueiro na região de Umuarama-Paraná encontrando valores acima do tolerado na musculatura (parte comestível) da tilápia e do lambari ($55,1$ e $73,7 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente), indicando que este peixe estaria impróprio para o consumo humano e justificam que tal fato pode ter ocorrido principalmente por esta ser uma região agrícola, pois sabe-se da necessidade de aplicação de insumos, os quais podem ser levados pela água das chuvas, contaminando as lagoas do pesqueiro.

Mendil *et al.* (2010) também realizaram um estudo de um recurso hídrico (Rio Yesilirmak da Turquia) através da concentração de Zn em 5 diferentes espécies de peixes encontrando valores de $11,6\text{--}63,5 \text{ mg kg}^{-1}$ relacionando essas concentrações diretamente às diferentes indústrias presentes naquela região.

Em suma, os trabalhos citados ratificam a hipótese de influência direta das estações climáticas, sobretudo do fenômeno da lixiviação de poluentes. Salienta-se ainda que o limite máximo de Zn permitido em pescados é de 50 mg kg^{-1} e

que esse valor não foi alcançado por nenhuma das espécies de peixes do canal que foram analisadas.

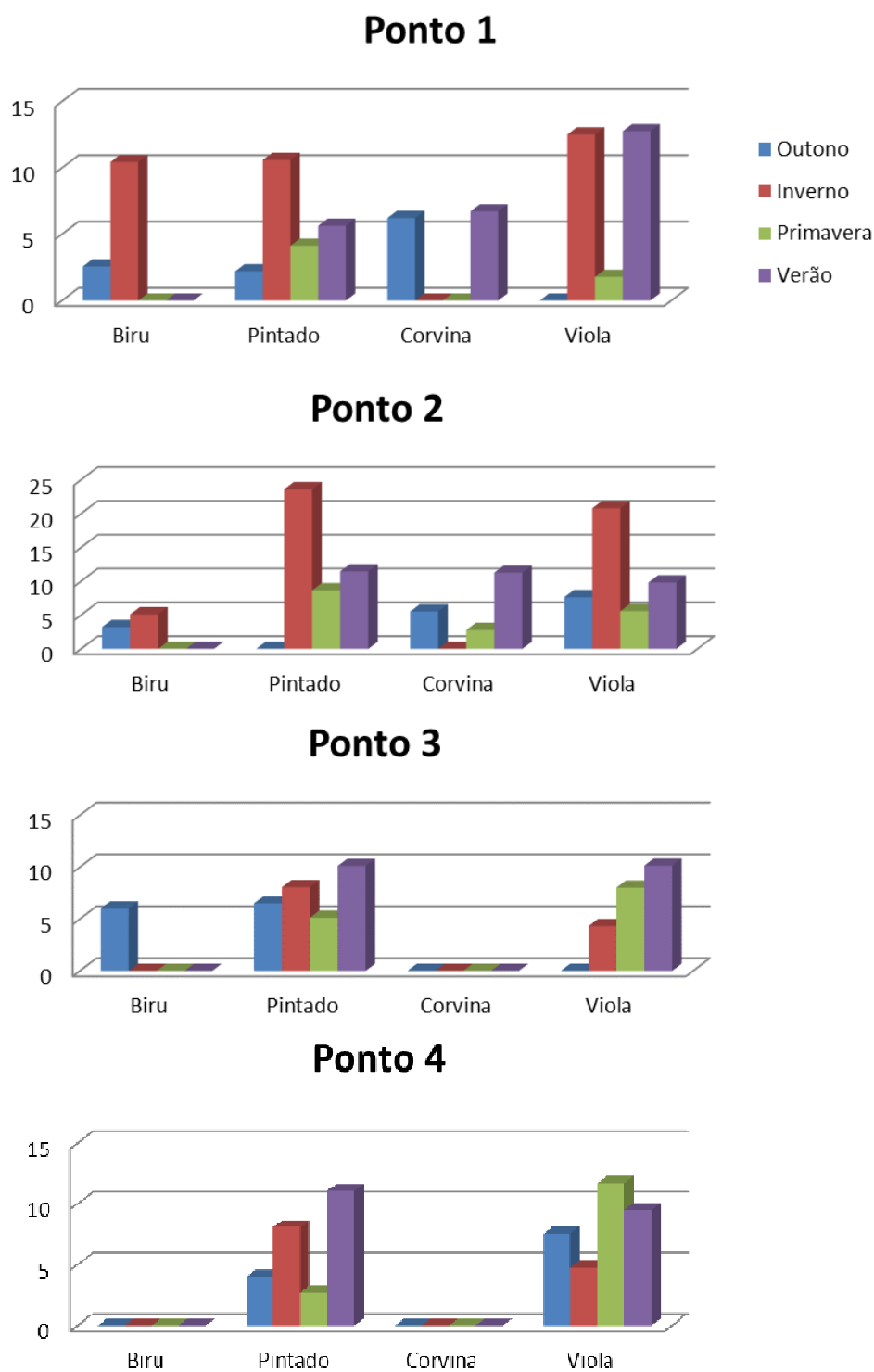


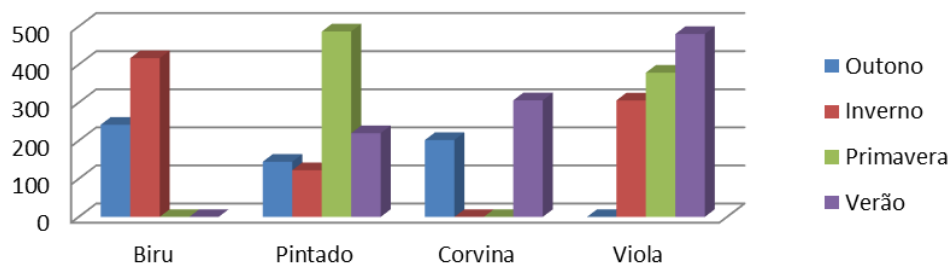
Figura 17 – Concentrações de Zn (em mg kg⁻¹) nas amostras de peixes.

Os teores de Pb nas amostras de peixes analisadas, de acordo com a Figura 18, ficaram dentro do intervalo de 37 a 487 $\mu\text{g kg}^{-1}$ semelhante ao intervalo de concentrações encontrado por Morgano *et al.*(2011) que foi de 26 a 481 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de peixes usados na culinária japonesa comercializados em São Paulo e por Saei-Dehkordi e Fallah(2011) que foi de 57 a 471 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em peixes coletados no Golfo Pérsico.

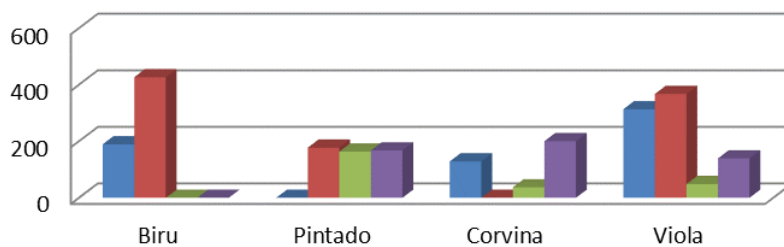
No entanto Guérin *et al.* (2011) que selecionaram frutos do mar da costa francesa e Chahid *et al.* (2014) que coletaram peixes em portos do sudeste do Reino de Marrocos, encontraram valores inferiores de chumbo: 11 e 13 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Valores superiores também foram determinados em outros trabalhos que avaliaram peixes coletados em locais com atividade antrópica: 2560 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (REPULA *et al.*, 2012) e 5400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SANTOS *et al.*, 2013). Repula *et al.* (2012) analisaram peixes de água doce de espécies abundantes (*Tilapia rendalli*, *Ciprinus carpio Linnaeus* e *Bagre marinus*) na região de Guarapuava/PR que foram amostrados no ambiente exposto às emissões da indústria de couro e também em um local de referência não afetado por atividades industriais encontrando valores acima do permitido pela legislação no ambiente que sofreu ação antropogênica, fato esse que se assemelha ao encontrado por Santos *et al.* (2013) ao estudar peixes obtidos no município de São Francisco do Conde/BA que possui um complexo industrial.

Os maiores teores de Pb e que extrapolaram o limite permitido em pescados que é de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram detectados em diferentes espécies de peixes e estações, porém concentrando-se nos pontos de coleta 1 e 2, onde existe uma grande atividade antropogênica (industrial e pesqueira), muitos moradores e deságue de efluentes domésticos e águas altamente contaminados oriundos de diferentes bairros da cidade de Pelotas assim como concluíram Repula *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2013).

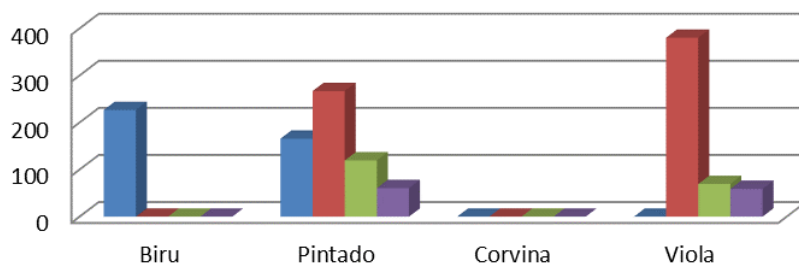
Ponto 1



Ponto 2



Ponto 3



Ponto 4

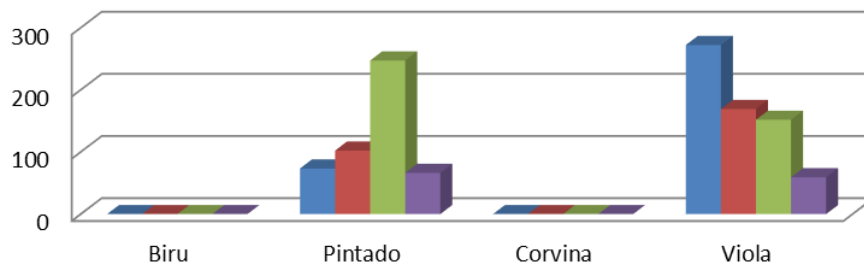


Figura 18 – Concentrações de Pb (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) nas amostras de peixes.

Por fim, para o Cr, as concentrações variaram entre 40 a 1268 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e seus maiores valores foram encontrados nos peixes viola, nos pontos 3 e 4 durante as coletas de primavera de 2013 e verão de 2014, conforme pode ser observado na Figura 19.

Os maiores valores de cromo no verão e na primavera podem estar relacionados com o baixo volume de chuvas nessas estações e o aumento da temperatura que favorece a solubilização de compostos formados por esse analito dessa forma aumentando a concentração do Cr no Canal São Gonçalo e consequentemente nos peixes analisados.

Morgano *et al.* (2011) encontraram baixos valores (30 a 908 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ao avaliar a concentração de cromo em peixes da espécie Salmão (*Salmo salar*) obtidos em mercado de São Paulo/SP. Já o valor máximo de concentração de Cr encontrado vai de encontro ao determinado por Repula *et al.* (2012) que foi de 1300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ao analisar peixes das espécies Tilápia e Bagre de um ambiente aquático de Guarapuava/PR que recebe efluente de curtume. Justificativa essa que também se aplica como hipótese do porquê de cerca de 80% dos resultados obtidos pelo presente trabalho apresentarem concentrações de Cr acima do limite máximo em pescados, que é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em praticamente todos os pontos, espécies de peixes e estações do ano avaliadas. Essa hipótese de contaminação se baseia no fato da região de Pelotas apresentar vários curtumes cujos efluentes que deságuam no canal São Gonçalo serem ricos em cromo e na propriedade acumulativa desse metal nos ambientes e organismos em que se encontra.

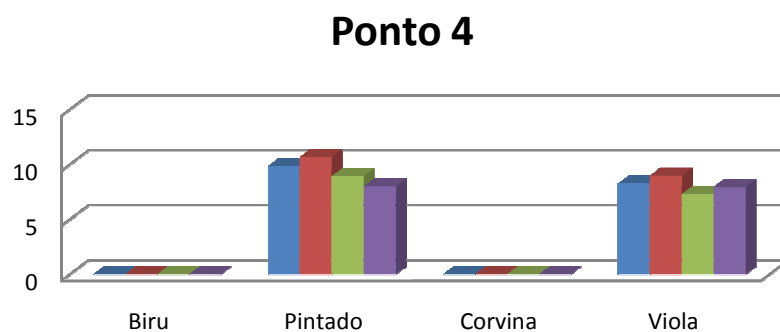
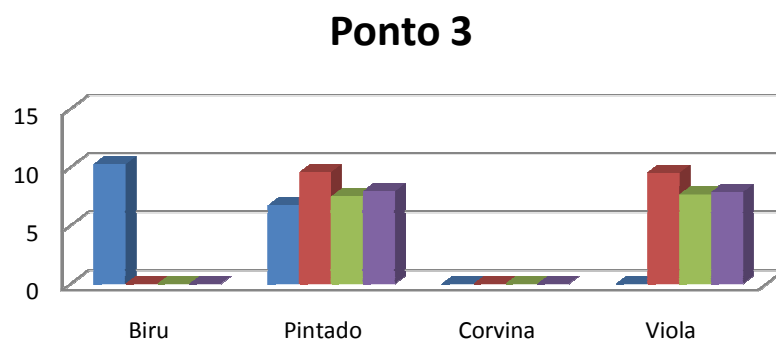
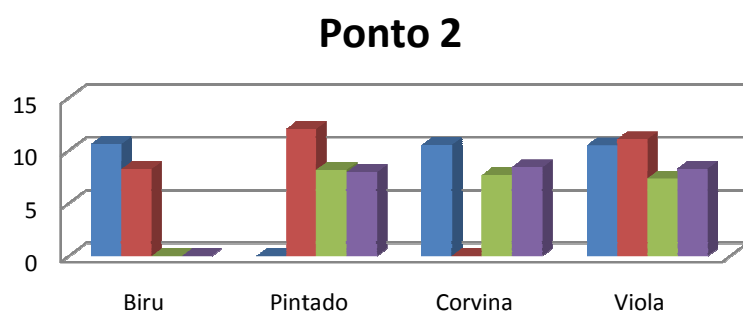
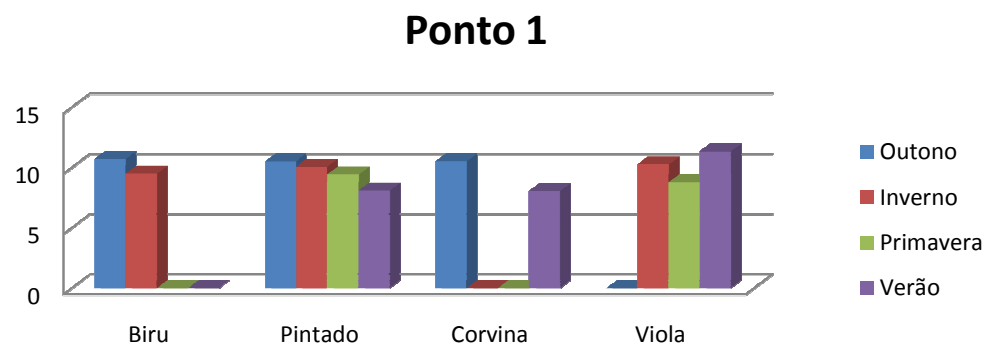


Figura 19 – Concentrações de Cr (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) nas amostras de peixes.

Através da análise de todos os dados obtidos, é possível perceber que o Canal São Gonçalo apresenta diversidade quanto ao grau de contaminação no que se refere aos analitos avaliados nesse trabalho.

Os teores de Zn e Cu permaneceram abaixo dos limites máximos de toxicidade enquanto as altas concentrações de Pb indicaram que a região estuarina do Canal sofre impacto da ação antrópica, em especial, do despejo doméstico oriundo de vários pontos da cidade de Pelotas, tais como: o Arroio Pelotas, o Canal Santa Bárbara, o Canal de Drenagem, o Canal do Pepino, além daqueles oriundos das residências fixadas às margens do Canal São Gonçalo. Além disso, Tessaro, Sá e Scremin (2012) detectaram altas quantidades de resíduos de construção e demolição ao longo das margens do Canal e seus afluentes, representando um grave problema ambiental, pois, além de deteriorar a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, contribui para as inundações da área urbana e para a proliferação de doenças.

Como já citado, os índices de Cr foram acima do permitido pela legislação em todos os pontos do Canal, mas, sobretudo na região límnic que se caracteriza por alta atividade agrícola, mais especificamente, a orizicultura. Salienta-se novamente que a região de Pelotas apresenta indústrias de curtimento de couro, alguns deste já desativados, cujos efluentes são ricos nesse metal.

Um fato também importante a se considerar é que como o Canal São Gonçalo é formado por duas porções distintas de água, uma estuarina (mais salgada) e outra límnic (mais doce), a distribuição dos peixes pescados ao longo do trajeto de coleta também variou, de forma que a Corvina, que é uma espécie marinha, fosse praticamente ausente nos pontos de coleta 3 e 4 pertencentes a porção de água doce. Os demais peixes avaliados nesse trabalho são espécies de água doce e estavam presentes ao longo de todo o Canal.

As altas concentrações de Zn e Cu encontradas nos peixes da espécie Pintado podem estar atribuídas ao fato de ser um peixe onívoro alimentando-se de algas e de pequenos peixes, favorecendo assim o fenômeno da biomagnificação. Esse fenômeno consiste na transferência de uma substância química de um nível trófico inferior para um superior.

Além da biomagnificação, existe o fenômeno da bioacumulação que trata da capacidade de acumular uma substância, através do meio circundante ou de seus alimentos por um dado organismo, desse modo, ambos os fenômenos favorecem o uso de peixes como indicadores biológicos da qualidade ambiental de determinado recurso hídrico justificando assim o uso desses animais no presente estudo.

Salienta-se ainda que os peixes Viola que também apresentaram altas concentrações dos analitos avaliados são peixes iliófagos-onívoros que se alimentam de algumas algas, peixes menores, crustáceos e de sedimentos, além de habitarem as profundezas da água e não a região superficial, indicando assim uma possível relação com os metais presentes nos sedimentos do Canal.

Quanto à influência sazonal pode-se observar que ela de fato ocorre, mas relacionada a cada espécie de peixe e metal avaliado, dificultando assim uma caracterização do grau de contaminação no recurso hídrico segundo as diferentes estações climáticas do ano.

O conhecimento de concentrações de metais, principalmente os tóxicos em peixes, é importante tanto com relação à gestão da natureza quanto à saúde humana (DURAL *et al.*, 2007). Por isso, deve-se atentar aos prejuízos causados pela contaminação por Cr, que em altos níveis podem causar danos às vias respiratórias, estômago e intestinos, anemia e levar ao câncer; e a intoxicação por Pb, ou saturnismo, que atinge principalmente os sistemas circulatórios, renais e nervoso central do corpo. O Pb foi demonstrado ser um agente cancerígeno, além de produzir retardo mental e distúrbios do sistema reprodutor humano (SANTOS *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÃO

O emprego da decomposição ácida com sistema de refluxo como método de preparo de amostra de peixes *in natura* para a determinação de metais mostrou-se adequado e prático, pois se trata de um sistema semi-aberto que reduz o tempo de decomposição (se comparado ao sistema aberto convencional) e o volume de ácido utilizado; diminui as perdas de analito por volatilização e o risco de contaminação por adsorção; e é economicamente mais viável que um sistema de decomposição com micro-ondas.

O delineamento composto central rotacional (DCCR) é um procedimento rápido e eficiente para otimizar as condições de preparo das amostras assinalando que nessas condições apenas as variáveis volume de peróxido de hidrogênio e tempo de decomposição foram estatisticamente significativas para os analitos Zn e Pb.

O método desenvolvido apresenta uma boa exatidão e precisão, atestada pela análise de material de referência certificado. Os valores de limite de quantificação para todos os metais investigados foram adequados aos limites máximos permitidos pela legislação brasileira para peixes (pescados), possibilitando assim o emprego do método no monitoramento destes analitos.

Os níveis de concentração dos quatro elementos avaliados demonstraram teores de Pb e Cr acima da legislação vigente para pescados, diferentemente de Zn e Cu que embora presentes em toda extensão do Canal São Gonçalo, não atingiram os limites impostos pela legislação.

As concentrações de Pb foram superiores na região estuarina nas diferentes espécies de peixes e estações. Já os valores de Cr foram altos em toda a extensão do recurso hídrico, sobretudo na região límnic. No entanto como o resultado do cromo refere-se ao Cr total, sugere-se estudo de especiação desse elemento, a fim de saber em qual estado de oxidação ele se encontra no local de estudo.

Acredita-se que os teores elevados dos elementos avaliados estão diretamente relacionados aos resíduos urbanos e industriais, bem como pela atividade agrícola da região.

Diante dos resultados sugere-se um monitoramento contínuo da biota do Canal São Gonçalo, já que esta região é de fundamental importância econômica, social e ecológica para a população local.

7 REFERÊNCIAS

- AKOTO, O.; BISMARCK ESHUN, F.; DARKO, G.; ADEI, E. Concentrations and health risk assessments of heavy metals in fish from the Fosu Lagoon. **International Journal of Environmental Research**, n.8, p.403-410, 2014.
- ALBRECHT, M. P. & SILVEIRA, C. M. Alimentação de *Loricariichthys anus* (Teleostei; Loricariidae) nas Lagoas Marcelino e Peixoto, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 13, n. 2, p. 79-85, 2001.
- AMORIN, K. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1784-1790, 2008.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC (US). AOAC Official methods of analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Washington: AOAC, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.
- BARROS, B. C. V.; PEREIRA, S. F. P.; PALHETA, D. C.; SILVA, C. S. Determinação de Cd, Cr e Al em tecidos de peixes provenientes do Rio Gelado/APA, Floresta de Carajás/PA. **Holos Environment**, v.10, n.2, p.195, 2010.
- BEGUM, A.; HARIKRISHNA, S.; KHAN, I. Analysis of Heavy metals in Water, Sediments and Fish samples of Madivala Lakes of Bangalore, Karnataka. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n.2, p.245-249, 2009.
- BILANDZIC, N.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; VARENINA, I.; KOLANOVIC, B.S.; ORAIC, D.; ZRNCIC, S. Determination of copper in food of animal origin and fish in Croatia. **Food Control**, n.27, p.284-288, 2012.
- BOSCH, A. C.; O'NEILL, B.; SIGGE, G. O.; KERWATH, S. E.; HOFFMAN, L. C. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.96, p.32-48, 2016.

BRASIL, J.L.; VAGHETTI, J. C. P.; ROYER, B.; SANTOS, A. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bio sorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bio sorvente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/DECRETO%2BN%25C2%25BA%2B55.871%252C%2BDE%2B26%2BDE%2BMAR%25C3%25870%2BDE%2B1965.pdf/59b8704c-52f4-481d-8baa-ac6edadf6490>.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/PORTARIA%2BN%25B%25C2%25BA%2B685%252C%2BDE%2B27%2BDE%2BAGOSTO%2BDE%2B1998.pdf/e32ca664-9059-495d-97ba-22ecf60da353>.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.pdf.

- BROWN, R. J. C.; MILTON, M. J. T. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.3, 2005.
- BUGALLO, R. A.; SEGADE, S. R.; GOMEZ, E. F. Comparison of slurry sampling and microwave-assisted digestion for calcium, magnesium, iron, copper and zinc determination in fish tissue samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, n.72, p.60-65, 2007.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. **Environmental Research**, n.99, p.403-412, 2005.
- BURNS, M. D. M.; GARCIA, A. M.; VIEIRA, J. P.; BEMVENUTI, M. A.; MARQUES, D. M. L. M.; CONDINI, V. Evidence of habitat fragmentation affecting fish movement between the Patos and Mirim coastal lagoons in southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, n.4, p.69-72, 2006.
- CARMO, C. A.; ABESSA, D. M. S.; NETO, J. G. M. Metais em águas, sedimentos e peixes coletados no estuário de São Vicente-SP, Brasil. **O Mundo da Saúde**, v.35, n.1, p.64-70, 2011.
- CASTRO-GONZÁLEZ, M. I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n.26, p.263–271, 2008.
- CELIK, U. & OEHLenschläger, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, n.87, p.343–347, 2004.
- CHAHID, A.; HILALI, M.; BENLHACHIMI, A.; BOUZID, T. Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, n.147, p.357-360, 2014.
- DALMAN, Ö.; DEMIRAK, A.; BALCI, A. Determination of heavy metals (Cd, Pb) and trace elements (Cu, Zn) in sediments and fish of the Southeastern Aegean Sea (Turkey) by atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, n.95, p.157–162, 2006.
- DE OLIVEIRA, R. M.; ANTUNES, A. C. N.; VIEIRA, M. A.; MEDINA, A. L.; RIBEIRO, A. S. Evaluation of sample preparation methods for the

- determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, n.24, p.402-409, 2016.
- DJEDJIBEGOVIC, J.; LARSEN, T.; SKRBO, A.; MARJANOVIC', A.; SOBER, M. Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Food Chemistry**, n.131, p.469–476, 2012.
- DURAL, M.; GÖKSU, M. Z. L.; ÖZAK, A. A. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. **Food Chemistry**, n.102, p.415–421, 2007.
- FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; NETO, J. A. G.; NOBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Padronização interna em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v.26, n.2, p.249-252, 2003.
- FERREIRA, S. L. C.; JESUS, R. M.; MATOS, G. D.; ANDRADE, J. B.; BRUNS, R. E.; SANTOS, W. N. L.; CAVALCANTE, D. D.; VALED, M. G. R.; DESSUYD, M. B. Multivariate Optimization and Validation of an Analytical Method for the Determination of Cadmium in Wines Employing ET AAS **Journal the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.4, p.788-794, 2009.
- FERREIRA, S. L. C.; PORTUGAL, L. A.; MATOS, G. D.; SILVA, D. G.; JESUS, R. M.; BRITO, G. B. Aluminium as chemical modifier for the determination of lead in sugar cane spirits using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, n.3, p.1168-1171, 2011.
- FERREIRA, S. L. C.; SILVA, L. O. B.; SANTANA, F. A.; JUNIOR, M. M. S.; MATOS, G. D.; SANTOS, W. N. L. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, n.106, p.307–310, 2013.
- FERRON, M. M.; LIMA, A. K.; SALDIVA, P. H. N.; GOUVEIA, N. Environmental lead poisoning among children in Porto Alegre state, Southern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v.46, n.2, p.226-233, 2012.
- FISCHER, L. G.; PEREIRA, L. E. D.; VIEIRA, J. P. **Peixes estuarinos e costeiros**. Rio Grande: Ecoscientia, 2004. 139p.

- GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.6, p.632-637, 2008.
- GUÉRIN, T.; CHEKRI, R.; VASTEL, C.; SIROT, V.; VOLATIER, J.; LEBLANC, J.; NOËL, L. Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market. **Food Chemistry**, n.127, p.934–942, 2011.
- GUILHEN, S. N.; PIRES, M. A. F.; DANTAS, E. S. K.; XAVIER, F. V. Validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio total em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). Estudo de caso. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1285-1290, 2010.
- HOO FUNG, L. A.; ANTOINE, J. M. R.; GRANT, C. N.; BUDDO, D. S. A. Evaluation of dietary exposure to minerals, trace elements and heavy metals from the muscle tissue of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus 1758). **Food and Chemical Toxicology**, n.60, p.205–212, 2013.
- IMYIM, A.; MANUTSEWEE, N.; AEUNGMAITREPIROM, W.; VARANUSUPAKUL, P. Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction. **Food Chemistry**, n.101, p.817–824, 2007.
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – BR (INMETRO), Coordenação Geral de Acreditação, Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, 2011.
- KARADEDE, H.; OYMAKB, S. A.; ÜNLÜ, E. Heavy metals in mullet, *Liza abu*, and catfish, *Siluristius ostegus*, from the Ataturk Dam Lake (Euphrates), Turkey. **Environment International**, n.30, p.183-188, 2004.
- KEHRIG, H. A.; PALERMO, E. F. A.; SEIXAS, T. G.; SANTOS, H. S. B.; MALMA, O.; AKAGIB, H. Methyl and Total Mercury Found in Two Man-Made Amazonian Reservoirs. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.6, p.1142-1152, 2009.

- KOCH, W. R.; MILANI, P. C.; GROSSER, K. M. **Guia ilustrado; peixes Parque Delta do Jacuí**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2000. 91p.
- KPEE, F.; OZIOMA, E.; IHUNWO, L. Seasonal variation of Cd, Ni, Cu and Pb in catfish, sediment and water samples from ipo stream in Ikwerre District of Rivers State, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v.13, n.2, 2009.
- KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1 ed. rev. Piracicaba, 2010.
- LEUNG, H. M.; LEUNG, A. O. W.; WANG, H. S.; MAA, K. K.; LIANG, Y.; HO, K. C.; CHEUNG, K. C.; TOHIDI, F.; YUNG, K. K. L. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China. **Marine Pollution Bulletin**, n.78, p.235–245, 2014.
- LIMA, R. G. D. S. ; ARAÚJO, F. G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. D. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental research**, v.89, n.2, p.171-179, 2002.
- LIMA, V. F.; MERÇON, F. Metais pesados no Ensino de Química. **Química Nova na Escola**, v.33, n.4, p.199-205, 2011.
- MACEDO, S. M.; DOS SANTOS, D. C.; JESUS, R. M.; ROCHA, G. O.; FERREIRA, S. L.; ANDRADE, J. B. Development of an analytical approach for determination of total arsenic and arsenic (III) in airborne particulate matter by slurry sampling and HG-FAAS. **Microchemical Journal**, v.96, n.1, p.46-49, 2010.
- MACHADO, G. Identificação dos principais efluentes (afluentes) do canal de São Gonçalo / Rio Grande do Sul – Brasil. **Encontro de Geógrafos de America Latina**, n.8, p.45-46, 2001.
- MATUSIEWICZ, H.; STANISZ, E. Evaluation of high pressure oxygen microwave-assisted wet decomposition for the determination of mercury by

- CVAAS utilizing UV-induced reduction. **Microchemical Journal**, n.95, p.268–273, 2010.
- MEDEIROS, M.A. Zinco. **Química Nova na Escola**, v.34, n.3, p.159-160, 2012.
- MEDEIROS, R. J.; SANTOS, L.M.G.; FREIRE, A. S.; SANTELLI, R.E.; BRAGA, A. M. C. B.; KRAUSS, T. M.; JACOB, S. C. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. **Food Control**, n.23, p.535-541, 2012.
- MENDIL, D.; ÜNAL, Ö. F.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. Determination of trace metals in different fish species and sediments from the River Yesilirmak in Tokat, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, n.48, p.1383–1392, 2010.
- Ministério da Saúde (BR): Portaria nº 885 de 27 de agosto de 1998. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965.
- MIRANDA FILHO, A. L.; MOTA, A. K. M.; CRUZ, C. C.; MATIAS, C. A. R.; FERREIRA, A. P. Cromo hexavalente em peixes oriundos da Baía de Sepetiba no Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação de risco à saúde humana. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v.6, n.3, p.200-209, 2011.
- MORGANO, M. A.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; MIYAGUSKU, L.; BALIAN, S. C. Assessment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). **Food Control**, n.22, p.778-785, 2011.
- MUNIZ, D.H.F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.4, n.1/2, p.83-100, 2006.
- NOËL, L.; CHEKRI, R.; MILLOUR, S.; MERLO, M.; LEBLANC, J.; GUÉRIN, T. Distribution and relationships of As, Cd, Pb and Hg in freshwater fish from five French fishing areas. **Chemosphere**, n.90, p.1900–1910, 2013.
- OLMEDO, P; HERNÁNDEZ, A. F.; PLA, A.; FEMIA, P.; NAVAS-ACIEN, A.; GIL, F. Determination of essential elements (copper, manganese, selenium and zinc) in fish and shellfish samples. Risk and nutritional assessment and

- mercury–selenium balance. **Food and Chemical Toxicology**, n.62, p.299–307, 2013.
- ORESTE, E. Q.; JESUS, A.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, M. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, n.109, p.5–9, 2013.
- ORESTE, E. Q.; OLIVEIRA, R. M.; NUNES, A. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. **Analytical Methods**, n.5, p.1590-1595, 2013.
- ORESTE, E. Q.; SOUZA, A. O.; PEREIRA, C. C.; LISBOA, M. T.; CIDADE, M. J. A.; VIEIRA, M. A.; CADORE, S.; RIBEIRO, A.S. Evaluation of Sample Preparation Methods for the Determination of Ca, Cu, Fe, K, and Na in Milk Powder Samples by ICP-OES. **Food Analytical Methods**, v.9, n.3, p. 777-784, 2016.
- PAIVA, M. V. C.; SILVA, J. B.; FERNANDES, J. G. Estuário do rio Timbó - PE: territorialidade da pesca e impactos ambientais. **Revista de Geografia**, v.26, n.2, p.185-199, 2009.
- PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, n.30, p.357– 362, 2004.
- PEREIRA, C. C.; SOUZA, A. O.; ORESTE, E. Q.; CIDADE, M. J.; CADORE, S.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. Acid decomposition of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using a reflux system for the evaluation of Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb and Zn contents by atomic spectrometric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.27, n.4, p.685-693, 2016.
- PEREIRA, L. A.; WINDMÖLLER, C. C.; DA SILVA, J. B. B. Solubilização alcalina de peixes e otimização multivariada para determinação de chumbo e

- manganês usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1167-1172, 2011.
- PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v.25, n.2, p.246-253, 2002.
- Perkin Elmer Instruments. **Guide to Atomic Spectroscopy Techniques and Applications**, USA, 2000.
- QIAO-QIAO, C.; GUANG-WEI, Z.; LANGDON, A. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. **Journal of Environmental Sciences**, n.19, p.1500-1504, 2007.
- REPULA, C. M. M.; CAMPOS, B. K.; GANZAROLLI, E. M.; LOPES, M. C.; QUINÁIA, S. P. Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. **Química Nova**, v.35, n.5, p.905-909, 2012.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUES, M.A.; SILVA, P.P.; GUERRA, W. Cobre. **Química Nova na Escola**, v.34, n.3, p.161-162, 2012.
- ROSA, M. B. D.; ORESTE, E. Q.; BÖNEMANN, D. H.; RODRIGUES, A. A.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; RIBEIRO, A. S.; NUNES, A. M. Evaluation of the Use of a Reflux System for Sample Preparation of Xanthan Gum and Subsequent Determination of Ca, Cu, K, Mg, Na and Zn by Atomic Spectrometry Techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n.5, v.27, p.919-924, 2016.
- SAEI-DEHKORDI, S. S. & FALLAH, A. A. Determination of copper, lead, cadmium and zinc content in commercially valuable fish species from the Persian Gulf using derivative potentiometric stripping analysis. **Microchemical Journal**, n.98, p.156–162, 2011.

- SANCHES FILHO, P. J.; FONSECA, V. K.; HOLBIG, L. Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, n.8, p.105-111, 2013.
- SANTOS, L. F. P.; TRIGUEIRO, I. N. S.; LEMOS, V. A.; FURTUNATO, D. M. N.; CARDOSO, R. C. V. Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. **Food Control**, n.33, p.193-199, 2013.
- SILVA, D. G.; JUNIOR, M. M. S.; SILVA, L. O. B.; PORTUGAL, L. A.; MATOSAB, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminum as permanent modifier. **Analytical Methods**, n.3, p.2495-2500, 2011.
- SILVA, E.; COSTA, F. N.; SOUZA, T. L.; VIANA, Z. C. V.; SOUZA, A. S.; KORN, M. G. A.; FERREIRA, S. L. C. Assessment of trace elements in tissues of fish species: multivariate study and safety evaluation. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v.00, n.00, p.1-12, 2016.
- SIVAPERUMAL, P.; SANKAR, T.V.; VISWANATHAN NAIR, P.G. Heavy metal concentrations in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. **Food Chemistry**, n.102, p.612–620, 2007.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, São Paulo: Bookman, 2002.
- SOUZA, G. R.; GARCEZ, M. A. P.; SANTOS, V. C. G.; SILVA, D. B.; CAETANO, J.; DRAGUNSKI, D. C. Quantificação de metais pesados em peixes de um pesqueiro localizado na cidade de Umuarama – PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.12, n.1, p.61-66, 2009.
- STORELLI, M. M. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: Estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs) **Food and Chemical Toxicology**, n.46, p.2782-2788, 2008.

- SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré concentração no ponto nuvem. **Eclética Química**, v.31, n.1, p.76-80, 2006.
- TESSARO, A. B.; SÁ, J. S.; SCREMIN, L. B. Quantificação e classificação dos resíduos procedentes da construção civil e demolição no município de Pelotas, RS. **Ambiente Construído**, n.12, p.121-130, 2012.
- Toxicological profile for chromium. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2012.
- Toxicological profile for copper. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2004.
- VIANA, Z. C. V.; SILVA, E.; FERNANDES, G. B.; KORN, M. G. A.; SANTOS, V. L. C. S. Estudo da absorção de elementos químicos no músculo de peixes do litoral da Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.1, p.27-34, 2012.
- VICENTE-MARTORELL, J. J.; GALINDO-RIAÑO, M. D.; GARCÍA-VARGAS, M.; GRANADO-CASTRO, M. D. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. **Journal of Hazardous Materials**, n.162, p.823–836, 2009.
- WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3.ed., Germany: Wiley-VCH, 1999.
- YILMAZ, F.; ÖZDEMİR, N.; DEMIRAK, A.; TUNA, A. L. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. **Food Chemistry**, n.100, p.830–835, 2007.