



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Darlan da Silva Santil

Determinação de Elementos Maiores e Traço em Tecidos de
Moluscos Bivalves por Espectrometria de Emissão Óptica
com Plasma Indutivamente Acoplado.

Salvador

2010

Darlan da Silva Santil

Determinação de Elementos Maiores e Traço em Tecidos de
Moluscos Bivalves por Espectrometria de Emissão Óptica
com Plasma Indutivamente Acoplado.

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Química, Departamento de
Química Analítica, Instituto de Química,
Universidade Federal da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Química.**

Orientadora: Vanessa Hatje

Salvador

2010

"Não precisamos nos dirigir para algum local muito distante para atingir o estado de Buda nem temos de nos tornar algum tipo de pessoa especial. Podemos entrar numa comunhão dinâmica com o Universo no local onde nos encontramos exatamente agora e em nossa atual forma e revelar completamente o brilho de nosso "verdadeiro aspecto" interior — isto é, nosso verdadeiro eu como uma entidade do Nam-myoho-rengue-kyo. Essa é a função do Gongyo e o mundo da fé. Ao fundirmos nossa vida com o Universo, podemos extrair de dentro de nós a sabedoria, a coragem e a benevolência da Lei Mística. Por isso, não temos absolutamente nada a temer."

Daisaku Ikeda

Agradecimentos

- Aos meus pais, pelo amor, constante apoio e esforços empreendidos para desenvolvimento da minha educação.
- A minha irmã Daiane Santil, que sempre apoiou nos meus estudos e sempre esteve do meu lado nos momentos difíceis da minha vida.
- Sou eternamente grato a minha namorada, Laira Yamamura, por ter me mostrado o verdadeiro significado da vida ao me ensinar o Budismo, e por todo apoio e nobre amor que me dá.
- Aos meus amigos Gabriel Luiz, Geovani Brandão e José Tiago pela sincera amizade que eles têm por mim.
- A professora Vanessa pelo projeto e ao amigo Manuel Macedo, por ter coletado boa parte das amostras e por ter feito as etapas de tratamento de amostras comigo.
- Ao meu querido amigo Rodrigo “Inuyasha” que teve um papel muito importante no meu interesse pelo aprendizado da música.
- A CAPES por ter concedido a bolsa, ao CNPq e FAPESB por financiarem os estudos.
- Aos membros da banca examinadora, Walter e Letícia pelas suas correções e valiosas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.
- A professora Zênis Rocha pelo apoio que ela me deu no mestrado
- Ao Sensei Daisaku Ikeda, a Soka Gakkai ao Buda e a Lei!

Resumo

O presente estudo propõe a determinação de elementos maiores e traço em invertebrados marinhos por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) após um procedimento assistido por radiação ultrassom e centrífuga, empregando ácidos diluídos. Um planejamento Doehlert de três fatores foi aplicado para otimizar a extração dos elementos nas amostras de bivalves (*Mytella guyanensis*, *Anomalocardia brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae*). Os fatores foram: concentração da mistura ácida (HCl + HNO₃ + H₃CCOOH; 1-3 mol L⁻¹), tempo de centrifugação (10-40 min.), e velocidade de rotação (6000-10000 rpm). A eficiência de extração expressa em percentual foi escolhida como resposta analítica no processo de otimização. Além disso, todos os experimentos foram realizados analisando o material de referência certificado NIST 1566b (tecido de ostra). O percentual de recuperação obtida nas amostras de material de referência certificado pela matriz Doehlert variou de 45-95, 8-52, 35-71, 67-102, 38-78, 61-92, 58-100, 39-85 e 51-91%, respectivamente, para Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr, e Zn. Todavia, ponto de máximo não foi obtido. Portanto, a resposta múltipla foi escolhida para obtenção dos valores máximos de extração dos metais. As seguintes condições experimentais da resposta múltipla foram selecionadas: 20 min de tempo de extração, 9000 rpm de velocidade de rotação e 1,0 mol L⁻¹ da mistura ácida. A fim de avaliar o efeito do ultrassom na extração dos elementos, uma porção de tecido de ostra certificado foi sonicada por 15 min em um banho de ultrassom à temperatura ambiente e a solução foi centrifugada nas condições otimizadas. Os resultados mostraram que o uso da sonicação antes da centrifugação promoveu um aumento na porcentagem de recuperação dos elementos estudados. A repetitividade do procedimento auxiliado por centrífuga e ultrassom foi avaliada pela determinação de elementos maiores e traço em 10 replicatas do material certificado. Os desvios padrões relativos (RSD) para o procedimento proposto variam entre 1,8 a 4,7. A exatidão do método foi confirmada pela análise de tecido de ostra certificado (NIST 1566b) e por comparação de método analítico de referência com procedimento de digestão ácida para o tratamento das amostras (microondas com cavidade). Os resultados da análise da exatidão de alguns elementos estudados mostraram que não havia diferenças significativas (p<0,05) entre o método proposto e o método de referência. Concomitantemente ao desenvolvimento do método analítico, as concentrações dos elementos menores e maiores em amostras dos bivalves coletados ao longo da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil foram determinadas por ICP OES após o procedimento de digestão ácida em bombas Parr. Os resultados da determinação revelaram que as concentrações de As, Cu e Zn nos bivalves estavam acima dos limites máximos estabelecidos pela ANVISA e por agências especializadas em saúde internacionais. Esses valores de concentração sugerem que deve ser feita uma análise de risco a saúde principalmente nas comunidades que coletam mariscos como uma atividade de subsistência.

Palavras chave: metais traço, ICP OES, bivalves, extração ácida assistida por ultrassom, matriz Doehlert

Abstract

The present study proposes the determination of major and trace elements in marine invertebrates by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP OES) after a procedure assisted by ultrasound radiation and centrifugal, employing diluted acids. A three factor Doehlert design was applied to optimize the extraction of elements in bivalves (*Mytella guyanensis*, *Anomalocardia brasiliiana* and *Crassostrea rhizophorae*). The factors were: concentration of acid mixture (HCl + HNO₃ + H₃CCOOH; 1-3 mol L⁻¹), centrifugation time (10-40 min.), and rotation velocity (6000-10000 rpm). The extraction efficiency, expressed as a percentage, was chosen as the analytical response in the optimization process. In addition, all experiments were performed by analyzing the certified reference material NIST 1566b (oyster tissue). The percentage of recovery obtained in the samples of certified reference material by Doehlert varied from 45-95, 8-52, 35-71, 67-102, 38-78, 61-92, 58-100, 39-85 and 51-91%, respectively, for Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr, and Zn. However, maximum point wasn't obtained. So, the multiple response was chosen to obtain the maximum extraction of the metals. The following experimental conditions of multiple response were selected: 20 min of extraction time, 9000 rpm of the speed centrifuge and 1.0 mol L⁻¹ of the acid mixture. In order to evaluate the ultrasound effect on the extraction of trace elements a portion of the certified oyster tissue sample was sonicated for 15min in an ultrasonic bath at ambient temperature, and then the solution was centrifuged at the optimized conditions. Results showed that the use of the sonication prior to the centrifugation promoted an increase in the percentage of recovery for most studied elements. The repeatability of the centrifugation and ultrasound assisted procedure was evaluated by the determination of trace and major elements in 10 replicates of the oyster tissue certified material. The relative standard deviations (RSD) for the centrifugation and ultrasound assisted procedure varied between 1.8 and 4.7%. The accuracy of the method was confirmed by analysis of the certified oyster tissue (NIST 1566b) and by reference analytical method comparison with acid digestion procedure for the sample treatment (microwave cavity). The results of the analysis of the accuracy of some elements studied showed that there were no significant differences ($p < 0.05$) between the proposed method and the reference method. Concurrent with the development of the acid extraction procedure, the major and trace concentrations of elements in mussel, oyster and clams samples collected from along coastal the zones of Todos os Santos Bay were determined by ICP OES after Parr acid digestion bombs. The results of determination showed that concentrations of As, Cu and Zn in the bivalves were above the limits established by ANVISA and international agencies specializing in health. These concentration values suggest that must be a health risk analysis mainly in the communities that collect the shellfish as a subsistence activity.

Keywords: trace metals, ICP OES, bivalves, ultrasound assisted acid extraction, Doehlert matrix

Lista de Figuras

Figura 1. O ciclo dos elementos traços no ambiente marinho (modificado de Hill, 2009).....	3
Figura 2. A tabela periódica mostrando os metais essenciais e não essenciais aos humanos (Adaptado de Aras e Ataman, 2006)	6
Figura 3. Estações estudadas da Baía de Todos os Santos, Brasil	44
Figura 4. Conchas de exemplar de <i>Mytella guyanensis</i>	46
Figura 5. Conchas de exemplar de <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	46
Figura 6. Concha de exemplar de <i>Crassostrea rhizophorae</i>	47
Figura 7. Fonte de plasma indutivamente acoplado (Adaptado de Linde, 2010)	49
Figura 8. Nebulizador concêntrico (adaptado de Boss e Freeden, 1997).....	51
Figura 9. Câmara ciclônica (retirado de folheto informativo da empresa Varian).....	51
Figura 10. ICP OES modelo Vista Pro (retirada do folheto informativo da Varian)	53
Figura 11. Centrífuga modelo 5804 (retirada do folheto informativo da Eppendorf).....	54
Figura 12. Banho de ultrassom modelo VWR 75D (Corland)	54
Figura 13. Liofilizador Modulyo D (retirada do folheto informativo da Thermo Scientific).....	55
Figura 14. Moinho de bolas 8000M (retirada do folheto informativo da Spex Sampleprep).....	55
Figura 15. Forno de microondas Ethos EZ (retirada do folheto informativo da Milestone).....	56
Figura 16. Bombas de digestão ácida Parr 4745 (Parr Instrument Company)	56
Figura 17. Cuboctaedro mostrando a localização de 13 experimentos para três tipos de fatores codificados (p.ex., X_1 , X_2 e X_3) (figura criada no programa Poly 1.1 [®] adaptada com programa Photofiltre 6.4 [®]).....	59
Figura 18. Peças da bomba de digestão ácida Parr (adaptado do manual da Parr Instrument Company).....	68
Figura 19. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização da velocidade de rotação e tempo de centrifugação na extração ácida com centrífuga.....	80

Figura 20. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização da velocidade de rotação e concentração da mistura ácida na extração ácida com centrífuga..	81
Figura 21. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização do tempo de centrifugação e concentração da mistura ácida na extração ácida com centrífuga.	81
Figura 22. Concentrações de alumínio nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES	96
Figura 23. Concentrações de arsênio nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.	97
Figura 24. Concentrações de cálcio nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.	98
Figura 25. Concentrações de cobre nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.	100
Figura 26. Concentrações de ferro nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES	101
Figura 27. Concentrações de potássio nos tecidos moles de bivalves da BTS (mg g^{-1} de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.	102
Figura 28. Concentrações de manganês nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES	103
Figura 29. Concentrações de zinco nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.	104

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações de elementos maiores presentes nos tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades.....	18
Tabela 2. Concentrações de elementos traço presentes em tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades.....	19
Tabela 3. Concentrações de outros elementos traço presentes em tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades.....	22
Tabela 4. Trabalhos que visaram o desenvolvimento de técnicas instrumentais para determinação elementar em mariscos.....	38
Tabela 5. Nome das localidades de amostragem	45
Tabela 6. Parâmetros operacionais usados no ICP OES com visão axial.....	52
Tabela 7. Matriz Doehlert (3, 5, 7) com os fatores nos seus valores reais e codificados	59
Tabela 8. Exemplo de aplicação de teste t de Student pareado	65
Tabela 9. Programa de aquecimento do forno de microondas com cavidade.	67
Tabela 10. Matriz Doehlert da extração ácida com centrífuga empregando tecido de ostra certificado NIST 1566b.	70
Tabela 11. Resultados dos elementos individuais e da resposta múltipla obtidos com o planejamento Doehlert.....	71
Tabela 12. Avaliação dos limites de detecção e quantificação obtidos da extração ácida com centrífuga e extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco).	83
Tabela 13. Concentrações dos elementos maiores e traço em tecido de ostra certificado (NIST 1566b) determinadas por ICP OES após a extração ácida com centrífuga e extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom.....	84
Tabela 14. Dados do teste t de Student pareado para avaliação do ultrassom na extração ácida.....	85
Tabela 15. Comparação das medidas de concentração de cálcio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3).....	86

Tabela 16. Comparação das medidas de concentração de cádmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	87
Tabela 17. Comparação das medidas de concentração de cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	87
Tabela 18. Comparação das medidas de concentração de potássio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	88
Tabela 19. Comparação das medidas de concentração de manganês ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	88
Tabela 20. Comparação das medidas de concentração de estrôncio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	89
Tabela 21. Comparação das medidas de concentração de zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)	89
Tabela 22. Precisão do método proposto com somente a centrífuga e do método proposto com centrífuga associada ao ultrassom no tratamento de amostras de invertebrados marinhos.	90
Tabela 23. Média (\pm desvio padrão, n=3) das concentrações de elementos maiores e traço ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em moluscos bivalves coletados em diversas localidades da Baía de Todos os Santos.....	94

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAS – Atomic Absorption Spectrometry

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica (do inglês: Atomic Fluorescence Spectrometry)

ANOVA – Análise de Variância (do inglês: Analysis of Variance)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANFZA – Autoridade em Alimentação da Austrália e Nova Zelândia (do inglês: Australia New Zealand Food Authority)

BEC – Concentração equivalente de fundo (do inglês: Background Equivalent Concentration)

BTS – Baía de Todos os Santos

CCD – Dispositivo de Carga Acoplada (do inglês: Charged Coupled Device)

CID – Dispositivo de Injeção de Carga (do inglês: Charge Injection Device)

CG – Cromatografia Gasosa (do inglês: Gas Chromatography)

CIA – Centro Industrial de Aratu

CMP – Concentração Máxima Permitida

Conc. – Concentração

Copec – Complexo Petroquímico de Camaçari

CVAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (do inglês: Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry)

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (do inglês: Deoxyribonucleic Acid)

DPASV – Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial (do inglês: Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry)

DPCSV – Voltametria de Redissolução Catódica com Pulso Diferencial (do inglês: Pulse Cathodic Stripping Voltammetry)

ECD – Detector por Captura de Elétrons (do inglês: Electron Capture Detector)

EDXRF – Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (do inglês: Energy Dispersive X-Ray Fluorescence)

ENDEF - Estudo Nacional de Despesa Familiar

EPS – Sonicação com Sonda na Presença de Enzimas (do inglês: Enzymatic probe sonication)

UK EVM – Grupo Especialista em Vitaminas e Minerais do Reino Unido (do inglês: United kingdom Expert Group on Vitamins and Minerals)

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês: Flame Atomic Absorption Spectrometry)

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês: Food and Agriculture Organization)

FI – Injeção em Fluxo (do inglês: Flow Injection)

FID – Detector por Ionização em Chama (do inglês: Flame Ionization Detector)

FNB – Comitê de Alimentação e Nutrição dos Estados Unidos (do inglês, Food and Nutrition Board).

FSA – Agência de norma alimentar do Reino Unido (do inglês, Food Standard Agency)

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (do inglês: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer)

HG – Geração de Hidretos (do inglês: Hydride Generation)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: High Performance Liquid Chromatography)

I.C. – Índice de Condição (do inglês: Index Condition)

IC – Cromatografia de Íons (do inglês: Ion Chromatography)

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia e Estatística

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry)

JECFA – Comitê Especialista da Junta FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (do inglês: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)

LOD – Limite de Detecção (do inglês: Limit of Detection)

LOQ – Limite de Quantificação (do inglês, Limit of Quantification)

MRC – Material de Referência Certificado

NAA – Análise por Ativação por Nêutrons (do inglês: Neutron Activation Analysis)

NAZ – Zona Analítica Normal (do inglês: Normal Analytical Zone)

NIST – National Institute of Standards and Technology

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação

NRCC – National Research Council Canada

NRC-US – National Research Council United States

OMS – Organização Mundial da Saúde

PIXE – Espectrometria de Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (do inglês: Proton-Induced X-Ray Emission)

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

p. – Página

PTFE – Politetrafluoretileno (do inglês: Polytetrafluoroethylene)

PVC – Cloreto de Polivinila (do inglês: Polyvinyl Chloride)

R.M – Resposta Múltipla

Ref. – Referência

RLAM – Refinaria Landulpho Alves

rpm – Rotações por minuto

RSD – Desvio Padrão Relativo (do inglês: Relative Standard Deviation)

TXRF – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (do inglês: Total Reflection X-ray Fluorescence)

UV-VIS – Ultravioleta/Visível

v/v – Volume por volume

VR - Velocidade de Rotação

Sumário

1.0 Introdução	1
1.1 Definições dos metais em estudos químicos, biológicos e ambientais	1
1.2 Metais e outros elementos no ambiente marinho	2
1.4 Bioacumulação de metais e outros elementos traços em invertebrados marinhos.....	4
2.0 Objetivos	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3. Revisão bibliográfica	9
3.1 Estudos ambientais com moluscos bivalves	9
3.2 Procedimentos de preparo das amostras	24
3.3 Técnicas instrumentais de análise	34
3.3.1 Técnicas Hifenadas.....	35
3.3.2 Resumo das técnicas empregadas para determinação elementar em mariscos.....	36
4. Materiais e Métodos	42
4.1 Área de Estudo	42
4.2 Estações de Amostragem	43
4.3 Espécies estudadas	45
4.3.1 <i>Mytella guyanensis</i>	46
4.3.2 <i>Anomalocardia brasiliana</i>	46
4.3.3 <i>Crassostrea rhizophorae</i>	47
4.4 Material de referência certificado (MRC)	47
4.5 Limpeza do material.....	48
4.6 Reagentes e Soluções	48

4.7 Instrumentação.....	48
4.7.1 Técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)....	48
4.7.2 Outros equipamentos empregados.....	53
4.8 Tratamento das amostras coletadas na BTS.....	57
4.9 Otimização da extração ácida auxiliada por centrífuga seguida da determinação multi-elementar por ICP OES.....	57
4.10 Validação de método.....	61
4.10.1 Precisão.....	61
4.10.2 Exatidão.....	62
4.10.3 Limite de Detecção (LOD).....	63
4.10.4 Limite de Quantificação (LOQ).....	63
4.11 Avaliação do uso do ultrassom na extração ácida empregando ácidos diluídos e centrifugação.....	64
4.12 Procedimentos de digestão ácida seguidos da determinação multi-elementar em ICP OES.....	66
4.11.1 Digestão ácida assistida por radiação microondas.....	66
4.11.2 Digestão ácida com bombas Parr.....	67
5. Resultados e discussão	70
5.1 Otimização da extração ácida empregando ácidos diluídos e centrifugação.....	70
5.2 Validação do método analítico proposto	82
5.2.1 Limite de detecção e quantificação.....	82
5.2.2 Exatidão e precisão.....	84
5.3 Considerações sobre o desenvolvimento do método analítico proposto	91
5.4 Determinação multi-elementar em amostras de bivalves da BTS empregando ICP OES após a digestão ácida com bombas Parr.....	91
5.5 Avaliação das concentrações dos elementos maiores e traço em peso úmido nos tecidos moles de bivalves da BTS obtidas da determinação por ICP OES após digestão ácida com bombas Parr.....	95
5.5.1 Alumínio	95
5.5.2 Arsênio	96
5.5.3 Cálcio.....	97

5.5.4 Cobre	99
5.5.5 Ferro	100
5.5.6 Potássio	101
5.5.7 Manganês	102
5.5.8 Zinco	103
6. Conclusões	105
Referências Bibliográficas	107

1. Introdução

1.1 Definições dos metais em estudos químicos, biológicos e ambientais

Muitas publicações, trabalhos e legislações com foco ambiental empregam definições ou termos relacionados aos metais de forma contraditória. Segundo Brady e Humiston (2000) os metais podem ser definidos pelas propriedades físicas no seu estado elementar, como elementos químicos que têm normalmente pontos de fusão elevados, brilho característico, elevada condutividade elétrica e térmica, ductilidade (capacidade de ser estirado em fios) e maleabilidade (capacidade de ser forjado em folhas finas). Os principais termos empregados em diversos estudos são descritos a seguir:

- Metais essenciais. são metais que a evolução natural incorporou as funções essenciais à vida e que desempenham vários papéis importante no metabolismo dos seres vivos, interagindo ou se ligando com moléculas biológicas como proteínas, enzimas, DNA e O₂ (Duffus, 2002; Beraldo, 2005). No caso dos metais essenciais tanto a deficiência quanto o excesso podem provocar efeitos deletérios aos organismos (Rainbow e Luoma, 2008).
- Metais não essenciais. são elementos potencialmente tóxicos sem função bioquímica conhecida que têm a mesma afinidade dos metais essenciais por moléculas biológicas de importância crítica nos organismos (Rainbow e Luoma, 2008). Esses metais podem, por exemplo, ligarem-se a grupos sulfidríla (-SH), que freqüentemente constituem os sítios ativos de muitas enzimas, importantes para o fornecimento de energia ou transporte de oxigênio na célula (Benite *et al.*, 2007).
- Metais Pesados. um termo impreciso usados livremente para se referir tanto ao elemento quanto aos seus compostos. Baseia-se na categorização por densidade. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) recomenda não utilizar esse termo (Duffus, 2002).
- Metais tóxicos. termo impreciso. O grau de toxicidade dos elementos varia muito de elemento para elemento e de organismo para organismo. Tanto a toxicidade quanto a essencialidade são definidos empiricamente (Duffus, 2002).

- Metais traço. elementos cuja concentração é menor que 0,01 % m/m (também expressa como 100 partes por milhão, $\mu\text{g g}^{-1}$ ou mg kg^{-1}) de um organismo (Rainbow e Luoma, 2008).
- Elementos traço. termo usado frequentemente pela literatura para nomear um grupo de metais e outros elementos químicos associado ao risco toxicológico (risco de exposição humana às substâncias tóxicas) e ecotoxicológico (risco que a flora e fauna sofrem devido à presença de substâncias tóxicas antrópicas no sistema natural) (Rainbow e Luoma, 2008).

1.2 Metais e outros elementos traço no ambiente marinho

Do ponto de vista geoquímico os elementos traço são gerados naturalmente pela lixiviação lenta do solo e rochas (Rainbow *et al.*, 1993). A água oceânica é considerada a última etapa do ciclo hidrológico dos elementos traço aonde chega por três vias: contribuição continental pelos rios, entrada atmosférica e fontes hidrotermais (Galvão *et al.* 2009). Porém as atividades de origem antrópica têm mobilizado estes elementos em proporções maiores que as fontes naturais (Rainbow, 2000). Os elementos traço diferem de outros agentes tóxicos, porque em muitos casos são ubíquos no ambiente humano. Logo, independentemente de como seguro esses elementos são usado nos processos industriais e nos produtos, algum nível de exposição humana é inevitável. Além disso, o uso dos metais e outros elementos pelos humanos podem também alterar a sua forma química ou especiação contribuindo para um potencial impacto tóxico (Goyer *et al.* 1995).

Os metais Cd, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Te, Ti o semi-metal As e o não metal Se, são os elementos químicos de maior utilização industrial e, por isso, são os mais estudados do ponto de vista toxicológico (Tavares e Carvalho, 1992). As principais fontes antropogênicas destes elementos no ambiente marinho incluem: descarga de efluentes não tratados, combustão de carvão e óleo, emissão veicular, atividades da metalurgia e galvanoplastia, indústria química de papel, pesticidas e fertilizantes, mineração e fundição. Além disso, a aquicultura intensiva e atividades portuárias são também responsáveis por parte da carga antropogênica na água e sedimentos ao longo de estuários e baías (Reis, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

No ambiente marinho, os elementos traço são adsorvidos em partículas que, eventualmente se acumulam nos sedimentos e quando estes elementos excedem o limite

de solubilidade da água se precipitam como fase sólida. Os elementos traço podem também formar compostos voláteis devido à atividade biológica ou por mudanças das condições redox da água do mar e dos sedimentos. Adicionalmente a biota marinha pode bioacumular os elementos nos seus tecidos e lançá-los parcialmente de volta ao meio através da depuração (Sadiq, 1992).

A tendência dos elementos traço participarem desses processos biológicos e geoquímicos representados no ciclo depende da especiação em que cada um deles ocorre no ambiente marinho (Driscoll *et al.*, 1994). Cada forma físico-química pode exibir diferente toxicidade, efeito no grau de adsorção e dessorção em partículas em suspensão, taxa de transferência em sedimentos, transporte e tendências em bioacumulação nos organismos marinhos (Sadiq, 1992; Adams *et al.*, 2003). A Figura 1 mostra as principais fontes antropogênicas dos metais e outros contaminantes e as interações que esses elementos sofrem ao entrarem no ambiente marinho.

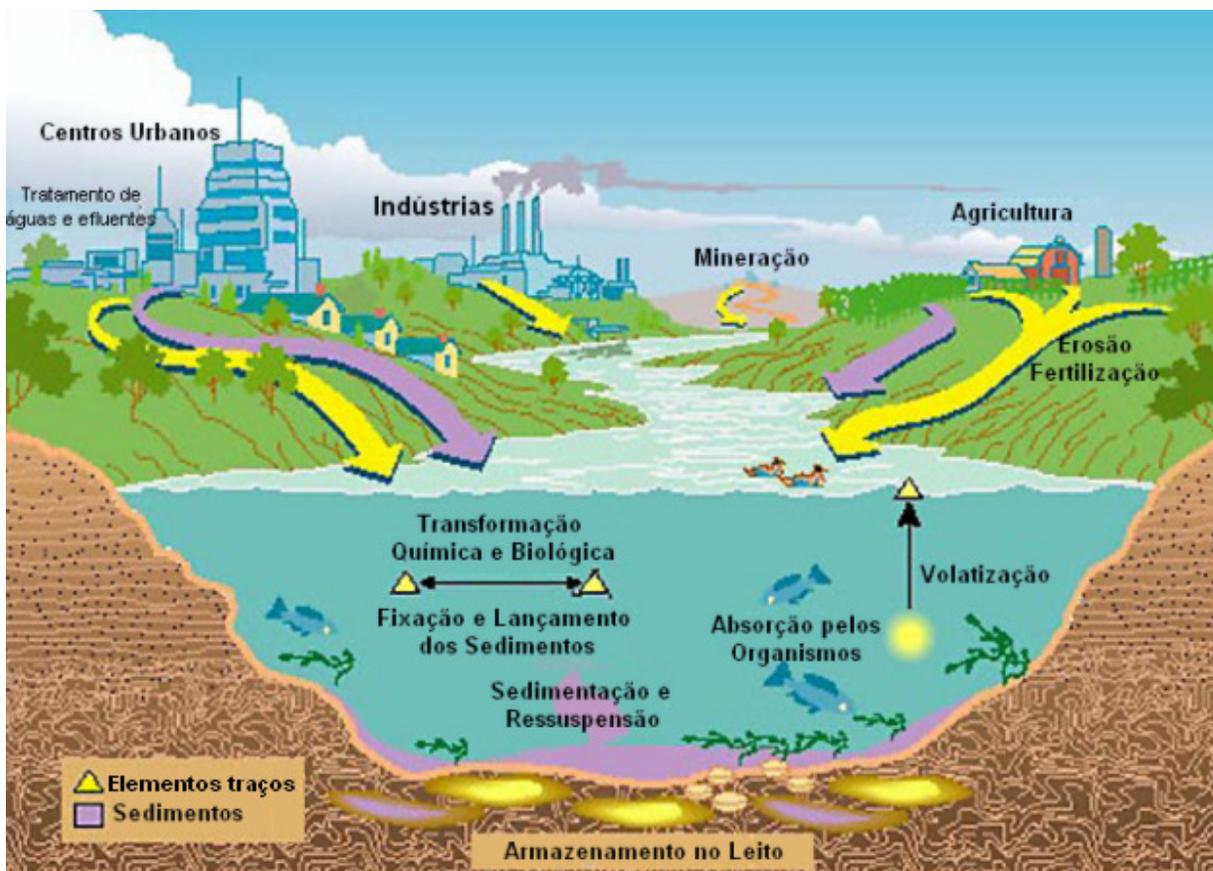


Figura 1. O ciclo dos elementos traço no ambiente marinho (adaptado de Hill, 2009).

1.3 Bioacumulação de metais e outros elementos traços em invertebrados marinhos

Cada vez mais tem sido dada atenção à ocorrência da contaminação de metais e outros elementos traço no ambiente marinho. Foi observado que as interações dos elementos químicos com os organismos marinhos têm as seguintes características (Riley, 1971):

- (i) Os metais Na e Mg têm fatores de concentração na ordem de 1;
- (ii) Os elementos traço (metais e semi-metais) são fortemente concentrados nos tecidos dos organismos marinhos. Eles podem conter concentrações tão elevadas quanto 10^6 vezes que as concentrações presentes na água do mar;
- (iii) Em geral, os elementos mais pesados em um grupo particular da tabela periódica são mais fortemente concentrados que os mais leves.

Os organismos marinhos possuem mecanismos de estocagem e detoxificação que envolvem o acúmulo de altas concentrações de metais em grânulos fosfato-metálicos no espaço extracelular e intracelular (lâmina basal e lisossomos) e a complexação com as metalotioneínas (Carvalho *et al.*, 1993; Marigomez *et al.*, 2002). Na estocagem o organismo faz um investimento metabólico para regular a concentração de alguns metais (denominados reguláveis), conforme sua demanda metabólica de um dado elemento, e sua disponibilidade no ambiente (Depledge e Rainbow, 1990).

O processo de bioacumulação de metais e outros elementos traço de qualquer organismo em qualquer habitat dependem do balanço entre a absorção e depuração (Rainbow e Luoma, 2008). Wang e Rainbow (2008) citam um modelo biocinético simples que descreve esse processo:

$$\frac{dCt}{dt} = Kw.Cw + AE.IR.Cf - (Ke + g).Ct$$

Onde Ct é a concentração do elemento traço no organismo marinho (fitoplâncton, invertebrados ou peixes) no tempo t; kw é a taxa de absorção da fase dissolvida; Cw é a concentração do elemento na fase dissolvida ($\mu\text{g L}^{-1}$); AE é a eficiência de assimilação da dieta; IR é a taxa de ingestão do organismo; Cf é a concentração na fase de dieta ($\mu\text{g g}^{-1}$); Ke é a constante da taxa de efluxo e g é constante da taxa de crescimento do animal.

Nesse modelo, os elementos são acumulados através da absorção nas fases dissolvida e dieta, e ambas as rotas são consideradas aditivas. Adicionalmente, o processo de bioacumulação além de ser influenciado pela especiação química de cada elemento, também é influenciado pelas características fisiológicas dos organismos (Rainbow *et al.*, 2002).

As concentrações dos elementos traço em muitos organismos marinhos fornecem uma medida integrada no tempo do suprimento do contaminante ao longo de diversos períodos de tempo, conforme a espécie de organismo analisada. De forma complementar, o contaminante acumulado na biota é uma medida integrada no tempo da fração biodisponível dos elementos e não da quantidade total encontrada no ambiente. Ou seja, a fração de direta relevância toxicológica e ecotoxicológica são medidas de forma inequívoca. Tais organismos são biomonitores e são amplamente utilizados para estabelecer as variações geográficas e/ou temporais das concentrações biodisponíveis dos elementos traços nas águas costeiras e estuarinas (Rainbow, 1995).

Dentre os organismos biomonitores de elementos traços, os moluscos bivalves, se destacam. Os bivalves são muito usados como biomonitores, pois possuem vários atributos importantes que lhe tornam melhores para avaliar as concentrações de elementos potencialmente tóxicos (Goldberg *et al.* 1995; Goldberg e Bertine, 2000). A maioria tem vida sedentária, o que não lhes permite escapar da poluição se deslocando para outras áreas; eles possuem tempo de vida razoavelmente longo, o que permite estudos de longo prazo; os bivalves são cosmopolitas, o que facilita a intercomparação dos dados obtidos de regiões diferentes; possuem capacidade de acumular elevados níveis de contaminantes sem morrer e a maioria das espécies tem hábito alimentar filtrador, que permite que os tornem suscetíveis à incorporação de contaminantes, tanto pelo que eles ingerem como pela fração solúvel na água (Rainbow, 2002; Galvão *et al.*, 2009). Essas características fazem desses organismos um importante foco de estudo para pesquisas. Adicionalmente estes bivalves são muito consumidos, pelos seres humanos principalmente por aqueles que habitam áreas costeiras, que estão sujeitas muitas vezes a impactos antrópicos.

Do ponto de vista nutricional, os moluscos são fontes importantes de proteínas e vitaminas como a niacina, tiamina e riboflavina (Cheong e Lee, 1984). Um estudo epidemiológico no Japão demonstrou que os moluscos forneciam a maior parte das vitaminas B6 (16 – 23% da ingestão total) e B12 (77 – 84%) em uma dieta (Yoshino *et al.*, 2005). Adicionalmente já foram discutidos os efeitos benéficos dos ácidos graxos Omega-

3 provenientes dos moluscos em doenças cardíacas coronarianas (Schmidt *et al.*, 2006). A ingestão desses ácidos graxos varia consideravelmente entre as populações, sendo elevada em populações de esquimós (10-14 g dia⁻¹), baixa na maioria das populações ocidentais (<0,2 g dia⁻¹) e intermediária nas áreas como Japão e Noruega, países com maior consumo de frutos do mar (1-3 g dia⁻¹) (Schmidt *et al.*, 2005)

Esses alimentos contribuem também para a ingestão de metais essenciais que são requeridos para várias funções fisiológicas e bioquímicas dos seres humanos (Nardi *et al.*, 2009). A Figura 2 resume os metais considerados essenciais e não essenciais para os humanos. Ao se determinar as concentrações de metais nos tecidos dos bivalves marinhos, pode-se avaliar de forma direta a exposição humana a esses e outros elementos químicos, além de informar quanto à distribuição destes contaminantes ao ambiente (Galvão *et al.* 2009).

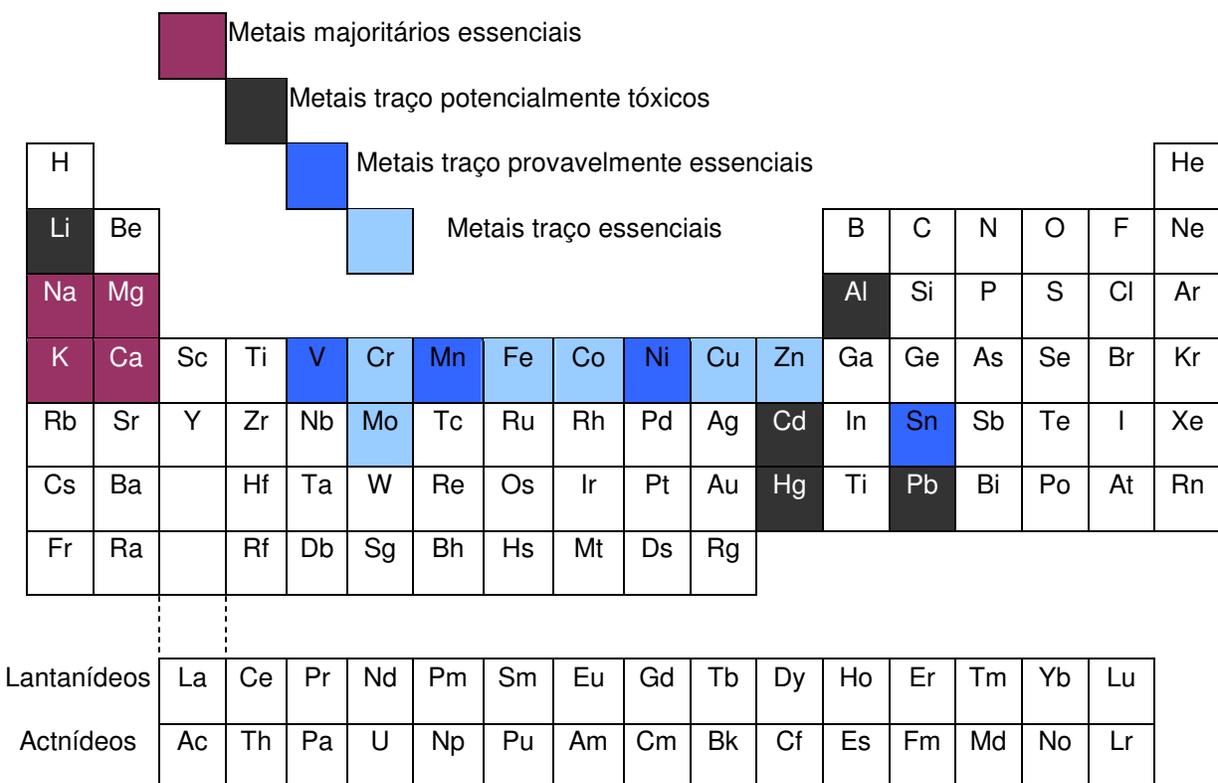


Figura 2. A tabela periódica mostrando os metais essenciais e não essenciais aos humanos (Adaptado de Aras e Ataman, 2006).

Adicionalmente, o risco que o consumo desses moluscos oferece depende primeiramente da fração biodisponível do metal (a fração que é realmente assimilada

através da comida e que pode atingir a circulação sistêmica de um organismo), que depende da especiação do metal dentro dos tecidos moles dos frutos do mar. Antes de 1990, assumia-se que a fração biodisponível era avaliada seguramente pela fração cistosólica (solúvel) nas células (Wallace e Lopez, 1996). Em estudos posteriores a biodisponibilidade dos metais se focaram na fração insolúvel das células, que mostrava que o uso da fração cistosólica sozinha subestimava a fração dos metais e que era biodisponível para níveis tróficos mais altos. Atualmente, é considerado que os metais contidos em ambas as frações (cistosólicas e organelas) refletem a fração biodisponível (Wallace e Luoma, 2003).

Amiard *et al.* (2008), por exemplo, aplicaram uma série de métodos gastrointestinais *in-vitro* para medida da bioacessibilidade de Ag, Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de moluscos bivalves coletados em locais considerados contaminados e não contaminados. Eles usaram abordagens que simulavam os hábitos alimentares, como: mastigar o alimento, engolir diretamente, comer cru ou ingerir os moluscos com aditivos (vinagre e limão). Os resultados demonstraram que na maior parte das amostras as concentrações bioacessíveis estavam maiores que aquelas permitidas pelos limites de segurança alimentar. Além disso, eles verificaram que o hábito de cozinhar o gastrópode *Buccinum undatum* diminuía a bioacessibilidade de todos os metais, exceto Ag. Adicionalmente, os autores observaram que o ato de adicionar vinagre à ostra (*Crassostrea gigas*) ingerida crua causou um decréscimo na bioacessibilidade de Ag, Cu e Pb e acréscimo na bioacessibilidade de Cd. A adição de vinagre não alterou significativamente a bioacessibilidade de Zn e o ato de mastigar e adicionar limão as ostras não influenciou significativamente nas concentrações bioacessíveis dos metais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar as concentrações de elementos maiores e traço em tecidos moles de moluscos bivalves marinhos empregando a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um procedimento de preparo de amostras de moluscos bivalves auxiliado por ultrassom e centrifuga com ácidos diluídos, visando rapidez, baixo custo de análise e baixa geração de resíduos.
- Avaliar a contaminação inorgânica nos moluscos bivalves *Anomalocardia brasiliiana*, *Mytella guyanensis* e *Crassostrea rhizophorae*, coletados em diferentes locais de mariscagem da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil, através da determinação multi-elementar por ICP OES após digestão ácida das amostras com bombas Parr.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Estudos ambientais com moluscos bivalves

O uso de moluscos bivalves tem desempenhado um papel fundamental em programas de biomonitoramento de metais e outros elementos químicos no ambiente marinho. O Professor Goldberg, da Instituição Scripps de Oceanografia em La Jolla, Califórnia, propôs o programa de monitoramento “Mussel Watch” para avaliar a contaminação em estuários e zonas costeiras. Este é um programa de monitoramento em escala global baseado no conceito de “organismo sentinela”, que é capaz de detectar as tendências de concentrações de vários contaminantes marinhos (Goldberg *et al.*, 1995; Goldberg e Bertine 2000).

Existem diversos trabalhos publicados sobre o uso de organismos aquáticos como biomonitores da disponibilidade dos elementos traço. Os primeiros programas de biomonitoramento no começo dos anos 60 concentraram-se nos radionuclídeos lançados dentro do rio Columbia e nas águas costeiras da Califórnia (Phillips e Rainbow, 1994). Mais tarde nos anos 70, os programas de biomonitoramento também investigaram a disponibilidade de isótopos estáveis de metais traço (Goldberg *et al.*, 1983). O biomonitoramento de elementos traço fornece a variação no tempo e espaço das concentrações dos elementos químicos que estão disponíveis no biomonitor. Deste modo o biomonitoramento busca identificar diferenças significativas na acumulação de metais e outros elementos entre amostras de diferentes localidades (Rainbow e Luoma, 2008).

Nesses monitoramentos biológicos nem sempre a determinação da concentração total de um elemento químico é suficiente para os propósitos clínicos e ambientais, pois a toxicidade é uma propriedade dependente da espécie (Pivetta *et al.*, 2001). Assim, o conhecimento das concentrações relativas de todas as espécies químicas presentes em um determinado meio são muito mais relevantes para avaliação da exposição do que sua concentração total (Driscoll *et al.*, 1994; Moreira e Moreira, 2004, Vieira *et al.*, 2009). É necessário também identificar e quantificar as diversas espécies químicas sob as quais o elemento de interesse está presente e/ou transformado em um determinado meio para compreender e avaliar o mecanismo de interação entre elementos e alvos biológicos (Pivetta *et al.*, 2001).

Os programas de biomonitoramento continuaram em vários outros países, tais como o estudo de Jeng *et al.* (2000) que se basearam no conceito do Mussel Watch para

determinar a concentração de elementos traço em organismos marinhos, coletados ao longo da costa oeste de Taiwan de 1991 até 1998, onde estão localizadas áreas de cultivo de ostra e grande parte das indústrias. A concentração de Cu, Zn, Pb Cd, As e Hg nas ostras *Crassostrea gigas* foi determinada por técnicas espectrométricas de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS). Eles verificaram que as ostras tinham habilidade de concentrar mais Cu e Zn do que outros organismos, e que por isso o risco potencial de consumo era mais alto do que outros mariscos. Esse resultado indicou que a introdução de Cu pelas indústrias nas localidades estudadas era responsável por deixar as ostras verdes, cujas concentrações do referido metal encontram-se acima de $500 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco) no tecido dos bivalves. Também foi discutido que a remoção dos sedimentos contaminados em algumas partes dos rios poderia deixar as concentrações dos metais semelhantes àquelas observadas nos limites de segurança estabelecido pelos órgãos públicos de outros países.

Odzack *et al.* (2000) estudaram a concentração de mercúrio e metilmercúrio na Baía Kaštela situada na costa oeste do Mar Adriático empregando a Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS). Segundo os autores, a região tinha sofrido contaminação de uma planta de cloro-álcali durante 40 anos. As coletas das amostras do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* iniciaram-se em 1997, seguindo os mesmos critérios de idade e tamanho no período do verão e no segundo mês do inverno. Os resultados obtidos no período de biomonitoramento com os moluscos transplantados ao longo da região sugeriram que os níveis de mercúrio e metilmercúrio estavam abaixo dos limites aceitáveis para consumo humano, entretanto os autores ressaltaram que o consumo deve ser cuidadosamente controlado.

Silva *et al.* (2001) apresentaram um trabalho de biomonitoramento de metais traço no estuário de Potengi, situado em Natal, RN, Brasil, empregando ostras *Crassostrea rhizophorae* como biomonitores. O trabalho visou à investigação da situação da contaminação do estuário, que sofreu forte atividade humana desde a década de 90. As concentrações de Zn, Cu e Pb, determinadas pela técnica FAAS, estavam elevadas oferecendo, portanto, risco a saúde humana.

Conti e Cecchetti (2002) determinaram Cd, Cr, Cu, Pb e Zn em vários tecidos de organismos marinhos biomonitores empregando FAAS e GFAAS. Este estudo demonstrou que a área escolhida como controle não tinha diferença significativa dos teores de metais das estações estudadas. Os autores apoiaram a hipótese de que a área costeira do golfo de Gaeta tem importantes níveis de contaminação basal, porém com

níveis abaixo de áreas contaminadas relatadas em outros estudos. Através da análise de variância (ANOVA) não foi possível mostrar se havia diferença significativa na contaminação em diferentes áreas.

Wagner e Boman (2004) investigaram a contaminação de As, Ba, Be, Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mn, Ni, P, Pb, Rb, S, Se, Sr, Ti e Zn no norte do Vietnã empregando o molusco *Plethophus swinhoei* como biomonitor. Os resultados obtidos pela Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF), demonstraram que a maior parte das concentrações dos elementos estudados estava na mesma ordem de magnitude de outros estudos que usavam o mesmo molusco. Esses autores observaram que as concentrações biodisponíveis dos elementos não refletiam o elevado nível de fontes antropogênicas que as amostras estavam sujeitas como tráfego de rodovias, combustão de carvão e fertilizantes.

Bellotto *et al.* (2005) realizaram um estudo de biomonitoramento em um emissário submarino de uma Planta industrial de beneficiamento de aço, localizado na Ilha de São Francisco, em Santa Catarina. Foram investigadas as concentrações de Cu, Zn, Ni, Sn, Fe, Cr, Cd e Zn em amostras dos moluscos *Perna perna*. Os resultados obtidos pela Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) indicaram que a biodisponibilidade de Cu, Zn, Ni, Sn, Fe, Cd e Zn no meio não estava sendo ampliada pelas atividades industriais e que as concentrações encontradas não causavam efeitos deletérios nos invertebrados marinhos. Os autores constataram que as concentrações de cromo estavam acima do limite permitido para consumo humano pela legislação brasileira (ANVISA, decreto nº 55871, de 26/03/1965). Foi discutido que mesmo em áreas isentas de poluição o cromo encontrava-se com elevados teores devido ao seu forte fator de acumulação no molusco bivalve *Perna perna*.

Liu e Kueh (2005) monitoraram durante seis anos os níveis de contaminação por metais traço. Eles relataram concentrações elevadas de Cd, Pb Hg, Cu, V, Mn e Ni nas localidades perto de áreas industriais e portuárias. Entretanto as concentrações desses metais não excediam os limites recomendados pela legislação.

Orescanin *et al.* (2006) avaliaram a concentração de elementos traço (Pb, Mn, As, Cr, Fe, Ni, Cu e Zn) no tecido mole do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* durante dois anos de monitoramento na Costa oeste do mar Adriático. A análise quantitativa foi realizada empregando a técnica de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF). Segundo esse estudo, os valores mais altos foram obtidos em regiões expostas a indústrias e atividades portuárias.

Liu *et al.* (2006) realizaram estudos de biomonitoramento para avaliar o risco associado à ingestão de ostras possivelmente contaminadas com compostos de arsênio. Foram analisados Arsênio total, As(V) (arseniato), As(III) (arsenito), MMA (mono-metilarsênico) e DMA (dimetilarsenico) em amostras da espécie *Crassostrea gigas* durante 1 ano. O arsênio total foi analisado usando Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite com Geração de Hidretos (HG-GFAAS). Eles verificaram que o consumo de 18,6 e 56 g dia⁻¹ dessas ostras tem potencial risco carcinogênico.

Liu *et al.* (2007) determinaram concentrações de arsênio inorgânico em lambretas da espécie *Meretrix lusoria* cultivadas no Sudoeste de Taiwan onde ocorreu a doença do pé preto, um tipo de insuficiência vascular periférica em forma de gangrena. O arsênio foi determinado por HG-GFAAS. Os autores verificaram que as concentrações de arsênio inorgânico eram altas o suficiente para oferecer risco à saúde humana, utilizando diferentes taxas de ingestão média adequada. Foi estimado um consumo médio de 0,18 g dia⁻¹ para uma ingestão segura nessas áreas.

Um outro estudo de biomonitoramento foi conduzido por Seixas *et al.* (2007), que avaliaram a concentração total de selênio em vários organismos marinhos, incluindo mexilhões na Baía de Guanabara, Brasil. A metodologia analítica aplicada neste estudo baseou-se no emprego da GFAAS para determinação do referido elemento. Foi constatado que o estuário não estava sendo afetado por lançamentos de selênio devido à atividade humana, pois a biota marinha apresentava concentrações de selênio semelhantes a áreas não impactadas.

Lewis e Chancy (2008) determinaram a concentração total de mercúrio em várias amostras biológicas, incluindo bivalves de água doce e ostras coletadas em regiões costeiras do México, empregando CVAAS. Esses autores verificaram que os bivalves do Rio Escambia continham concentrações elevadas de mercúrio devido ao escoamento de cinzas leves e deposição de mercúrio de uma planta de geração de energia elétrica nas proximidades. A espécie de ostra analisada demonstrou concentrações significativamente altas em áreas com escoamento agrícola. Os autores concluíram que o consumo dessas espécies ofereceria alto risco à saúde humana.

As concentrações de metais acumulados no molusco bivalves são também influenciadas por diversos fatores biológicos e físico-químicos. Esses fatores incluem tamanho, idade, sexo, estações do ano, interações dos contaminantes, salinidade e temperatura da água (Rainbow 1993; Rainbow *et al.*, 2002). Tais fatores são amplamente investigados em diversos estudos, como os de Wang *et al.* (1996), que estudaram o

processo de bioacumulação de seis elementos traço (Ag, As, Cd, Co, Se e Zn) no molusco *Mytilus edulis*. Os pesquisadores buscavam parâmetros fisiológicos necessários para construir um modelo da cinética de bioacumulação dos referidos metais.

Os pesquisadores Amiard e Berther (1996) estudaram o efeito sazonal em ostras da espécie *Crassostrea Gigas* sobre o acúmulo dos metais Cu, Pb, Zn e Cd nos tecidos moles empregando um método analítico com a técnica FAAS para a determinação elementar. Os autores observaram nos resultados que existia uma diminuição da concentração dos metais no final da primavera e início do verão com o aumento do peso e dos tecidos nessa espécie. Esses autores atribuíram as flutuações das concentrações dos metais nos organismos às mudanças das estações do peso seco associadas à maturidade sexual.

Augusto *et al.* (2006) também estudaram aspectos relativos à acumulação de metais Zn, Cu, Cd, Fe, Mn e Ni em moluscos bivalves de vários estuários brasileiros. Os resultados das concentrações dos metais, determinadas pela técnica FAAS, demonstraram que os organismos com forte bioacumulação representavam as melhores discriminações entre biodisponibilidade dos elementos traço entre as estações. As ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* foram recomendadas como biomonitoras neste estudo, devido a seu forte padrão de acumulação para muitos metais traços e seu tamanho, facilitando sua coleta e manuseio.

García-Luque *et al.* (2007) estudaram a bioacumulação de Zn, Cd, Pb e Cu no molusco bivalve *Scrobicularia Plana*. Foram feitos experimentos simulando um estuário hipotético, controlando continuamente a entrada de metais com um gradiente de salinidade. As concentrações dos metais foram obtidas empregando a Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso diferencial (DPASV). Os mecanismos de bioacumulação de Zn e Cd mostraram ser mais eficiente com aumento de salinidade. Os metais Cu e Pb mostraram ter bioacumulação dependente da proximidade do ponto de entrada dos metais e baixa salinidade.

España *et al.* (2007) investigaram as concentrações dos elementos Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Se e Cd nos moluscos bivalves *Mytilus chilensis* e *Perunytitus purpuratus*, empregando a FAAS como técnica de determinação para a avaliação da influencia do comprimento da concha e peso úmido dessas espécies. Segundo o estudo, com exceção do Cd, a concentração dos elementos era menor com o aumento do peso e maior nas amostras cujo tamanho era pequeno. Com o Cd foi observado o fenômeno inverso. Eles salientaram que o consumo de 100 g desses moluscos contribuía para um alto

fornecimento desses elementos traços e minerais à dieta diária, principalmente Fe, Zn, Mg e Se no molusco *Perunytitus purpuratu* e Cd nas duas espécies de bivalves estudados.

Richards e Chaloupka (2009) fizeram estudo para avaliar a dependência da temperatura na bioacumulação do cobre nos tecidos dos moluscos bivalves em águas subtropicais, onde existe forte variação de temperatura nas estações. Eles investigaram a absorção e dinâmica de acumulação do metal no molusco da espécie *Saccostrea glomerata*, coletados durante 12 meses na Baía Moreton, localizada na Austrália. Os resultados obtidos após determinação por ICP OES mostraram que, dependendo da época do ano, a absorção do cobre varia drasticamente, o que poderia resultar em uma superestimação ou subestimação da concentração do elemento no molusco. Eles concluíram que se deve levar em conta a incerteza e variabilidade, quando se faz uma avaliação de risco ambiental, especialmente em águas costeiras, onde existem fortes variações sazonais.

Ozden *et al.* (2009) avaliaram as concentrações de Hg, Cd, Cu, Zn, As, Fe, Co, Al, Mn, Ni, Sn e Cr nas amostras de bivalves das espécies *Chamelea gallina* e *Donax trunculus*, coletadas no nordeste do mar da Marmara, Turquia após determinação por ICP-MS. O estudo de biomonitoramento conduzido no período de um ano revelou altas concentrações de Pb, Cu, Zn, Al, Mn e Ni no molusco *Chamelea gallina*, contaminação por Hg e Cd, indicada pelo molusco *Donax trunculus* e elevados teores de As por ambas as espécies. Apesar desses resultados, os autores ressaltaram que as duas espécies não oferecem risco à saúde humana, quando consumidas com moderação.

Hedge *et al.* (2009) avaliaram a variabilidade no acúmulo de metais Cd, Cr, Cu, Pb, Sn e Zn causada pela ressuspensão dos sedimentos, através da análise com as técnicas ICP OES e ICP-MS. Nesse estudo, eles implantaram amostras do molusco *Saccostrea glomerata* em várias áreas no Porto Kemble, situado na Austrália, que sofre de intensa atividade industrial. Adicionalmente, os autores implantaram as amostras também em dois estuários de referência. O biomonitoramento realizado mostrou que as concentrações de Zn, Cu, Cd e Sn estavam altas durante o período de dragagem ocorrido no porto, em relação às ostras implantadas nos estuários de referência. Os autores verificaram que as concentrações de Pb encontradas eram altas independentemente do período de dragagem. Com esse estudo, os autores demonstraram que as atividades de dragagem podem provocar aumentos em grande escala na contaminação, devido à ressuspensão dos sedimentos contaminados.

Geralmente a concentração dos metais nos tecidos moles mostra uma maior variabilidade do que nas conchas, devido às mudanças sazonais de peso (associadas com condições fisiológicas e estado reprodutivo) e, conseqüentemente, as conchas podem fornecer uma indicação mais realística do grau de contaminação ou poluição. (Cravo *et al.*, 2002) A concha apresenta importantes vantagens práticas (Protasowicki *et al.*, 2008) relacionadas aos tecidos moles para o monitoramento da contaminação por metais em ambientes aquáticos, pois:

- 1- Apresenta menor variabilidade;
- 2- Integra a acumulação de metais durante toda vida do animal;
- 3- Não precisa ser congelada, sendo facilmente estocada;
- 4- Preserva os metais depois da morte do indivíduo fornecendo subsídios para estimar concentrações pretéritas.

Yap *et al.* (2003) realizaram um estudo comparativo dos níveis de Zn, Pb e Cd em tecidos moles e conchas da espécie *Perna viridis* utilizando FAAS como técnica de determinação dos metais. Os resultados indicaram que as conchas podem acumular esses metais na seguinte ordem: Pb>Cd>Zn. Nos tecidos moles essa ordem foi: Zn>Pb>Cd. Os autores discutiram que provavelmente esse fato ocorre devido à estrutura cristalina da concha ter alta capacidade de incorporação de Cd e Pb. Os autores concluíram que as conchas da espécie estudada servem como material de biomonitoramento para Cd e Pb melhor do que os tecidos moles.

Saavedra *et al.* (2004) estudaram o efeito do comprimento da concha, sobre o teor de Hg, Cd, Pb, Cr, Ni, As, Cu e Zn em amostras do molusco *Mytilus galloprovincialis*, cultivadas em enseadas da Galícia, Espanha após determinação em FAAS e GFAAS e Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio acoplado a um sistema de Injeção em Fluxo (FI-CVAAS). Esses autores observaram uma relação positiva entre comprimento da concha e a concentração dos elementos traço nas conchas.

Cevik *et al.* (2007) avaliaram as concentrações de Cu, Zn e Pb nos tecidos moles do molusco *Mytilus galloprovincialis*, proveniente de uma região da Turquia que sofria de atividades de mineração. Eles empregaram um método analítico com EDXRF para a análise quantitativa dos analitos. Os resultados obtidos mostraram que os tecidos moles continham K, Ca, Fe, Cu e Zn, enquanto que as conchas possuíam Ca, Cu e Sr. Porém eles verificaram que a concentração média de Cu e Zn estavam dentro dos limites

permitidos pela agência reguladora da Turquia e da FAO (Food and Agriculture Organization). As informações obtidas desse estudo permitiram concluir que o acúmulo dos metais nos tecidos moles seguia a seqüência: Zn > Cu > Mn > Pb > Ni > Cd > Cr. Esses autores concluíram que os tecidos moles acumularam mais eficientemente os elementos traço do que as conchas.

Protasowicki *et al.* (2008) fizeram um estudo de campo, para avaliar o grau de contaminação por metais nas conchas do molusco *Mytilus edulis*. Nesse trabalho os metais traço Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni, Fe, Mn, V, Li e Al foram investigados em amostras coletadas em doze locais da costa da Polônia, no mar Báltico, que sofriam intensa atividade industrial. Os resultados da determinação dos elementos realizada por ICP OES e GFAAS revelaram que não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração dos metais em diferentes comprimentos de concha.

Alguns autores, quando consideram as concentrações nos tecidos moles dos moluscos, optam em correlacioná-las elas com o peso da concha e peso do tecido mole na forma de um índice, denominado de índice de condição (I.C.) (Crosby e Gale, 1990). Este índice é dado pela fórmula:

$$I.C. = \frac{\text{peso seco do tecido mole (Kg)}}{\text{peso total - peso seco da concha (g)}}$$

O índice de condição é um parâmetro de relevância ecofisiológica e econômica, que mede a saúde aparente e qualidade comercial dos bivalves. Sabe-se, porém, que esse índice é afetado por uma variedade de fatores extrínsecos e intrínsecos, tais como temperatura da água, salinidade, disponibilidade de comida, ciclo reprodutivo, que pode influenciar na qualidade da carne e composição bioquímica dos moluscos bivalves (Orban *et al.*, 2002).

O trabalho de Mubiana *et al.* (2006), por exemplo, usou o I.C. para estudar o teor de uma ampla faixa de elementos traço em bivalves da espécie *Mytilus edulis*. Esses autores analisaram a importância dos fatores: tamanho do corpo, a condição fisiológica do animal (através do índice de condição) e altura das marés. Esse estudo realizou a coleta dos invertebrados marinhos em uma área da costa alemã considerada contaminada. Os resultados obtidos da análise por ICP-MS mostraram que o peso corporal tinha uma relação inversamente proporcional com a concentração dos metais Cd, Mn, Pb e Zn. O estudo do índice de condição mostrou uma relação inversa à concentração dos elementos estudados, com exceção do Mn, As e Fe. Além disso, os autores verificaram que a altura das marés influenciou positivamente a concentração de As, Cd e Zn, e negativamente

para Cu, Fe e Mn. Os teores dos metais Co, Cr, Ni e Pb foram independentes da altura das marés.

Cardellicchio *et al.* (2008) determinaram os elementos traço Cd, Cu, Pb, Zn, Fe e As por GFAAS, FAAS e Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (HG AAS). Eles analisaram amostras de mariscos da espécie *Mytilus galloprovincialis* originados de duas áreas com atividades industriais localizadas no Golfo de Tarento (península italiana). Esses autores observaram que as concentrações dos elementos estavam mais altas entre o final do inverno e início da primavera e mais baixas durante o verão. O uso do índice de condição nesse trabalho permitiu reduzir a forte variação nas informações devido à diferença de tamanhos e permitiu um melhor estudo do período reprodutivo. Esse estudo sugeriu que os programas de monitoramento de metais e outros elementos, que usam os moluscos bivalves, devem adotar critérios de coletar ao final do ciclo reprodutivo (verão).

As Tabelas 1, 2 e 3 resumem as concentrações dos elementos maiores e traço dos trabalhos citados até o presente momento que visaram o estudo ambiental e/ou estudo do processo de bioacumulação nos moluscos bivalves. Alguns desses trabalhos utilizaram outros tipos de biomonitores, como crustáceos e peixes para comparar a concentração dos contaminantes marinhos (elementos maiores e traço) nos tecidos moles dos bivalves.

Tabela 1. Concentrações de elementos maiores presentes nos tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades

Espécie(s)	Local	Al	Ca	K	Mg	Na	Ref.
<i>Perna perna</i>	Ilha de Santana, Sergipe, Brasil	1418	-	-	-	-	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
<i>Pletholophus swinhoei</i>	Norte do Vietnam	-	3200 - 15000	2300 - 4200	-	-	Wagner e Boman (2004)
<i>Perna viridis</i>	Costa de Hong Kong	407 - 840	-	-	-	-	Liu e Kueh (2005)
(1) <i>Mytilus chilensis</i> , (2) <i>Perunytitus purpuratus</i>	Estreito de Magalhães, Chile.	-	(1)1180 ^a (2)1480 ^a	(1)2010 ^a (2)1700 ^a	(1)850 ^a (2)1120 ^a	(1)2980 ^a (2)3190 ^a	España <i>et al.</i> (2007)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Negro, Turquia.	-	4100 - 33540	3860 - 8900	-	-	Cevik <i>et al.</i> (2007)
<i>Mytilus edulis</i>	Mar Báltico, Polônia.	119 - 214	-	-	-	-	Protasowicki <i>et al.</i> (2008).
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	4,3 - 5,3	-	-	-	-	Amado-Filho <i>et al.</i> (2008)
(1) <i>Chamelea gallina</i> (2) <i>Donax trunculus</i>	Mar Marmara, Turquia.	(1) 29.7 - 295.6 (2) 82,8 - 1190,1	-	-	-	-	Ozden <i>et al.</i> (2009)

a – Concentração em peso úmido

Tabela 2. Concentrações de elementos traço presentes em tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades

Espécie(s)	Local	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ref.
<i>Anomalocardia brasiliiana</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	0,02	-	-	-	-	-	Toledo <i>et al.</i> (1983)
<i>Crassostrea gigas</i>	Baía de Bougneuf, França.	-	5,6	-	284	-	-	-	Amiard e Berther (1996)
(1) <i>Crassostrea gigas</i> (2) <i>Mytilus smarrangdinus</i> (3) <i>Perna viridis</i>	Costa Hsiangshan, Taiwan.	(1)10,8 (2)2,21 (3)3,42	(1)1,21 (2)0,39 (3)1,76	-	(1)13,7 (2)3,69 (3)229	-	(1)0,056 (2)0,210 (3)0,270	-	Jeng <i>et al.</i> (2000)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Baía Kastela, Croácia.	-	-	-	-	-	0,5 - 2,0	-	Odzack <i>et al.</i> (2000)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	2,95 - 4,13	-	1150 - 1984	-	-	-	Wallner-Kersanach (2000)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Potengi, Brasil.	-	0,7 - 1,5	0,4 - 5,1	14 - 234	146 - 875	-	6 - 38	Silva <i>et al.</i> (2001)
<i>Perna perna</i>	Ilha de Santana, Brasil	-	0,38	1,25	5,1	567	-	8,2	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Tirreno, Itália.	-	0,33 - 0,49	0,46 - 1,31	5,51 - 11,50	-	-	-	Conti e Cecchetti (2002)
(1) <i>Tagelus dombeii</i> , (2) <i>Semelle sólida</i>	Golfo de Ancud, Chile.	-	(1)5,8 (2)4,2	-	-	-	-	-	Bruhn <i>et al.</i> (2002)
Vários bivalves	Costa de Galícia, Espanha.	-	-	-	-	-	-	2,8 - 15,8	Yebra <i>et al.</i> (2003)
<i>Crassostrea</i>	Praia de Boa Viagem, Recife, Brasil	-	-	-	15,2	300	1344	20,6	Cavalcanti (2003)

(Continuação da Tabela 2)

Espécie(s)	Local	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ref.
(1) <i>Anomalocardia brasiliiana</i> (2) <i>Mytella guyanensis</i>	Baía de Sepetiba, Brasil	-	-	(1) 42,7 (2) ^a	(1) 27,6 (2) 15,9	(1) 381 (2) 1478	(1) 0,57 (2) 0,42	(1) 183 (2) 82,0	Coimbra (2003)
<i>Pletholophus swinhoei</i>	Norte do Vietnam	2,3 - 6,6	0,0011 - 0,16	0,041 - 0,27	1,5 - 9,2	220 - 3200	-	280 - 3700	Wagner e Boman (2004)
<i>Perna perna</i>	Enseada da Armação de Itapocoroy, Brasil.	-	1,22 - 1,68	0,94 - 1,47	6,94 - 12,14	109,68 - 220,74	-	-	Belloto <i>et al.</i> (2005).
<i>Perna viridis</i>	Costa de Hong Kong	10,3 - 16,0	0,18 - 1,40	0,4-27	9,8 - 45	320 - 1278	0,05 - 0,34	26,6-93,8	Liu e Kueh (2005).
(1) <i>Chamelea gallina</i> , (2) <i>Donax trunculus</i> , (3) <i>Scrobicularia plana</i> ,	Costa da Andaluzia, Espanha.	-	-	-	-	-	(1)0,03 ^b , (2)0,06 ^b , (3)0,05 ^b	-	Gómez-Ariza <i>et al.</i> (2005).
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Adriático, Croácia.	4 - 30	-	1-29	3,7-11,1	53,4 - 719	-	2 - 13	Orescanin <i>et al.</i> (2006).
(1) <i>Anomalocardia brasiliiana</i> (2) <i>Crassostrea rhizophorae</i> (3) <i>Mytella guyanensis</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	(1)0,99 - 8,15 (2)3,9 - 8,11 (3)0,1 - 0,97	-	(1)8,9 - 24,6 (2)31,8 - 100 (3)13,9 - 68,1	-	-	-	Gonçalves (2006).
<i>Crassostrea gigas</i>	Sudoeste de Taiwan	22,90 ^c	-	-	-	-	-	-	Liu <i>et al.</i> (2006).
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Natal, Brasil.	-	1,34 - 2,48	-	16,9-39,0	152 - 509	-	28,1 - 60,9	Augusto <i>et al.</i> (2006).
<i>Meretrix lusoria</i>	Sudoeste de Taiwan	1,31 ^d	-	-	-	-	-	-	Liu <i>et al.</i> (2007).

a – Não determinado

b – Estações de concentrações mais elevadas de Hg total (CH₃Hg⁺ + Hg (II))

c – Estação de maior concentração de As total (As III + As V + Ácido monometil Arsênico + Ácido dimetil Arsênico)

d – Estação de maior concentração de As total (As III + As V + Ácido monometil Arsênico + Ácido dimetil Arsênico + Arsenobetaina)

(Continuação da Tabela 2)

Espécie(s)	Local	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ref.
<i>Perna Perna</i>	Baía de Guanabara, Brasil.	0,16 ^d	-	-	-	-	-	-	Seixas <i>et al.</i> (2007).
(1) <i>Mytilus chilensis</i> , (2) <i>Perunytitus purpuratus</i>	Estreito de Magalhães, Chile.	-	(1) 0,168 ^e (2) 0,399 ^e	-	(1) 0,67 ^e (2) 1,52 ^e	(1) 63,1 ^e (2) 89,5 ^e	-	(1) 2,85 ^e (2) 3,28 ^e	España <i>et al.</i> (2007)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Negro, Turquia.	-	0,6 - 6,2	1,2 - 7,2	60 - 362	660 - 4700	-	11 - 117	Cevik <i>et al.</i> (2007).
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Golfo de Tarento, Itália.	0,63 - 5,32	0,23 - 0,95	-	6,35 - 14,62	181 - 987	-	-	Cardellicchio <i>et al.</i> (2008)
<i>Crassostrea virginica</i>	Golfo do México	-	-	-	-	-	0,417 ^f	-	Lewis e Chancy (2008)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	2,71 - 8,29	4,5 - 5,9	276,1 - 526,1	330 - 924	-	16,4 - 17,1	Amado-Filho <i>et al.</i> (2008)
<i>Mytilus edulis</i>	Mar Báltico, Polónia.	-	0,009 - 0,1	-	2,45 - 4,17	0,57 - 23,85	0,002 - 0,008	23,4 - 74,4	Protasowicki <i>et al.</i> (2008)
(1) <i>Chamelea gallina</i> (2) <i>Donax trunculus</i>	Mar Marmara, Turquia.	(1) 2,3 - 3,5 (2) 1,1 - 5,1	(1) 0,2 - 0,4 (2) 0,02 - 0,2	-	(1) 0,6 - 3,5 (2) 1,4 - 2,7	(1) 51,4 - 163,7 (2) 145,4 - 525,7	(1) 0,05 - 0,3 (2) 0,007 - 0,2	(1) 1,5 - 4,4 (2) 4,2 - 16,7	Ozden <i>et al.</i> (2009)
(1) <i>Crassostrea rhizophorae</i> (2) <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	Rio Pacoti, Ceará, Brasil	-	-	-	(1) 7,3 - 9,6 (2) 3,9 - 14,8	-	-	-	Torres (2009)

d – Se total (peso úmido)
e – Concentração em peso úmido
f – Hg total (orgânicos + inorgânico)

Tabela 3. Concentrações de diversos elementos traço presentes em tecidos moles de moluscos bivalves (médias ou faixa das médias, $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) em várias localidades

Espécie(s)	Local	Ni	Pb	Se	Sr	Zn	Outros	Ref.
<i>Crassostrea gigas</i>	Baía de Bougneuf, França.	-	3,6	-	-	3924	-	Amiard e Berther (1996)
(1) <i>Crassostrea gigas</i> (2) <i>Mytilus smarrangdinus</i> (3) <i>Perna viridis</i>	Costa Hsiangshan, Taiwan	-	(1) <LOD (2) 0,09 (3) 0,446	-	-	(1) 78,3 (2) 47,7 (3) 19,8	-	Jeng <i>et al.</i> (2000)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	0,49 - 0,69	-	-	2231 - 3781	-	Wallner-Kersanach (2000)
<i>Perna perna</i>	Ilha de Santana, Brasil	8,9	1,8	-	-	83	-	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Potengi, Brasil.	0,4 - 3,2	0,6-7,8	-	-	431 - 3949	0,4 - 8,4 (Ag)	Silva <i>et al.</i> (2001)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Tirreno, Itália.	-	1,73-2,49	-	-	123 - 178	-	Conti e Cecchetti (2002)
<i>Crassostrea</i>	Praia de Boa Viagem, Recife, Brasil	-	-	-	-	1334	-	Cavalacanti (2003)
(1) <i>Anomalocardia brasiliana</i> (2) <i>Mytella guyanensis</i>	Baía de Sepetiba, Brasil	-	-	-	-	(1) 155 (2) 89,8	-	Coimbra (2003)
<i>Pletholophus winhoei</i>	Norte do Vietnam	0,28 - 1,60	0,2-1,6	>LD - 0,89	11 - 62	77 - 240	<LD - 35 (Ti)	Wagner e Boman (2004)
<i>Perna perna</i>	Enseada da Armação de Itapocoroy, Brasil.	12,08 - 16,44	-	-	-	125,33 - 221,13	0,34 - 0,5 (Sn)	Belloto <i>et al.</i> (2005)
<i>Perna viridis</i>	Costa de Hong Kong	1,7-16,5	2,1-16,0	-	-	69,0 - 143,3	1,0-5,8(V)	Liu e Kueh (2005)

(Continuação da Tabela 3)

Espécie(s)	Local	Ni	Pb	Se	Sr	Zn	Outros	Ref.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Adriático, Croácia.	0,8-5	2-7	-	-	59,1 - 273	-	Orescanin <i>et al.</i> (2006)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Natal, Brasil.	0,54 - 2,08	-	-	-	967 - 2028	-	Augusto <i>et al.</i> (2006)
(1) <i>Anomalocardia brasiliiana</i> (2) <i>Crassostrea rhizophorae</i> (3) <i>Mytella guyanensis</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	-	(1) 0,14 - 2,07 (2) 0,25 - 0,99 (3) 0,477 - 3,75	-	-	(1) 60,5 - 66,9 (2) 1141 - 1863 (3) 49,9 - 78,5	-	Gonçalves (2006)
(1) <i>Mytilus chilensis</i> , (2) <i>Perunytitus purpuratus</i>	Estreito de Magalhães, Chile.	-	-	(1)0,095 ^a (2)0,141 ^a	-	(1)15,7 ^a , (2)18,4 ^a	-	España <i>et al.</i> (2007)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mar Negro, Turquia.	3,3-17,9	9,7 - 45,9	-	44 - 230	120 -1204	-	Cevik <i>et al.</i> (2007)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Baía de Todos os Santos, Brasil.	531,8 - 1990,9	4,5 - 6,6	-	-	2099 - 4733	-	Amado-Filho <i>et al.</i> (2008)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Golfo de Tarento, Itália.	-	1,31 - 3,35	-	-	69 - 107	-	Cardellicchio <i>et al.</i> (2008)
<i>Mytilus edulis</i>	Mar Báltico, Polônia.	1,8 - 2,18	0,011-0,432	-	-	2,24 - 10,27	0,29 - 3,48 (Li) 0,98 - 136 (V)	Protasowicki <i>et al.</i> (2008)
(1) <i>Chamelea gallina</i> (2) <i>Donax trunculus</i>	Mar Marmara, Turquia.	(1) 0,7 - 1,6 (2) 1,1 - 7,5	(1) 0,2 - 1,3 (2) 0,3 - 1,3	-	-	(1) 7,6 - 12,9 (2) 9,3 - 25,9	(1) 0,6 - 3,6 (2) 0,02 - 0,09 (Sn) (1)0,14 - 0,9 (2) 0,4 - 1,1 (Co)	Ozden <i>et al.</i> (2009)
(1) <i>Crassostrea rhizophorae</i> (2) <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	Rio Pacoti, Brasil	-	(1) 1,6 - 2,86 (2) 3,2 - 12,7	-	-	-	-	Torres (2009)

a – Concentração com base em peso úmido

3.2 Procedimentos de preparo das amostras

Uma das primeiras etapas para iniciar a análise química consiste em submeter amostra a um tratamento adequado, visando o progresso na seqüência analítica, que consiste na definição do problema, escolha do método analítico, amostragem, preparo da amostra, medida, avaliação e ação. O preparo das amostras é uma das etapas mais crítica da análise química. Essa etapa pode governar a precisão e exatidão dos resultados obtidos, o tempo total e os esforços envolvidos na análise (Krug, 2002). Além disso, nesta etapa existe a possibilidade de cometer mais erros e ela pode apresentar maior custo na análise (Arruda e Santelli, 1997; Kubrakova, 1997).

Muitos procedimentos de preparo das amostras podem estar sujeitos à contaminação ou perda de um ou mais analitos da amostra. Isso ocorrer devido os materiais usados nas etapas de preparo, composição ou propriedades físico-químicas dos frascos da própria amostra ou o reagente químico empregado (IUPAC, 1997; Hoenig e Kersabiec, 1996). Adicionalmente, a grande maioria das técnicas espectrométricas utilizadas para determinação elementar requer que amostra seja introduzida na fonte de excitação na forma de solução, frequentemente solução aquosa (Skoog, 2009). Dessa forma, o preparo de amostras tem se tornado um campo crescente de estudo.

Usualmente a transferência do analito para a fase líquida pode ser realizada por dissolução ou lixiviação da amostra. Existem diversas maneiras de dissolver um sólido dos qual a suspensão em um solvente com agitação é a mais simples (Priego-Capote e Castro, 2007). A IUPAC define a digestão ácida como um processo químico que permite solubilizar um material, com o auxílio do aquecimento e na presença de reagentes químicos com ou sem auxílio da pressão (IUPAC, 1997).

A digestão com um ácido adequado ou uma combinação de ácidos pode não só ser útil para dissolver o material como também para remover os constituintes por volatilização seletiva. Os materiais orgânicos podem ser decompostos usando oxidantes como o ácido nítrico, sulfúrico ou perclórico (IUPAC, 1997). Não obstante, tais procedimentos geralmente levam muitas horas e utilizam reagentes concentrados, que produzem fumos ácidos tóxicos. Além disso, o consumo de reagentes e os volumes de resíduos gerados são grandes (Bermejo-Barrera *et al.*, 2000, 2001; Manutsewee *et al.*, 2007). A redução do tempo necessário para digestão veio com a utilização dos frascos fechados de aço inox, conhecidos como “bombas de digestão ácida” ou somente “bombas”. Esse sistema consiste de um recipiente de PTFE, contido em um cilindro de

ção. As bombas possibilitam uma digestão mais vigorosa para materiais que são difíceis de dissolver a pressão atmosférica. Contudo, o sistema tem desvantagens relativas à segurança e ao tempo gasto para o conteúdo dos frascos ser resfriado e a pressão interna ser reduzida a um nível seguro antes de sua abertura (Burguera e Burguera, 1998). Essas dificuldades parecem ter impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias de digestão de amostras.

O emprego da radiação microondas em digestões ácidas se tornou popular a partir dos anos 80. As microondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes que provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em que o campo eletromagnético se alterna. Como resultado desse mecanismo de stress induzido, produzido pela interação entre as microondas e as moléculas do material (ácidos minerais, solventes orgânicos, reagentes, misturas aquosas), é produzido o aquecimento, acelerando reações químicas (Arruda e Santelli, 1997, Krug 2000).

A grande quantidade de tempo que os procedimentos de digestão ácida convencional exigiam, foi encurtada (Bermejo-Barrera *et al.*, 2001). Além disso, os sistemas de microondas são aplicáveis a amostras de diferentes naturezas, são simples, relativamente seguros para o uso e fornecem uma diminuição nos valores de branco, reduzindo o risco de contaminação e perdas do(s) analito(s) por volatilização. Entretanto, esse procedimento é sensível a vários fatores, como a massa da amostra, tipo de ácido, proporções dos reagentes, temperatura, pressão e tempo de aquecimento (Nano *et al.*, 2009). Os sistemas de digestão ácida assistida por microondas são os sistemas com cavidade (forno de microondas) e os sistemas com radiação focalizada (Krug, 2000).

A lixiviação é um princípio específico da extração sólido-líquido pela solubilização dos analitos em fase aquosa. A porção extraída pode corresponder ao analito presente ou ligada em uma forma particular (IUPAC, 1997). A extração é desejável sempre que possível, uma vez que fornece um líquido menos complexo e a possibilidade de evitar interferências, ou seja, é mais seletiva que a digestão, porque mantém a maior parte dos interferentes da matriz no sólido (Priego-Capote e Castro, 2007).

Recentemente vários procedimentos rápidos, seguros e eficientes têm sido propostos para determinação das concentrações dos metais, em níveis traço, em amostras biológicas ou de alimentos. Por isso, várias aplicações de digestões e extrações ácidas ambas assistidas por radiação microondas ou ultrassom podem ser encontradas na literatura.

Alguns estudos tratam especificamente da avaliação ou desenvolvimento de preparo de amostras de mariscos. Por exemplo, Deaker e Maher (1997) desenvolveram um método para determinação de cinco espécies de selênio (Selenito, Selenato, Selenometionina, Selenocistina, Selenocistamina) em tecidos biológicos marinhos, empregando digestão ácida assistida por microondas como pré-tratamento de amostra e GFAAS como técnica de determinação. As condições otimizadas de tempo e potência do programa de digestão (600 W, 2 min; 0 W, 2 min; 450 W, 45 min) para digestão de massas de amostra entre 0,025 a 0,1 g (peso seco) permitiram recuperações completas das espécies adicionadas aos materiais certificados de referência estudados.

Lavilla *et al.* (2007) propuseram um procedimento de digestão ácida assistida por microondas para determinação de selênio em peixes e moluscos por HG AAS. O método foi estudado em etapas: (I) sem H₂O₂ e sem aquecimento (II) sem H₂O₂ e com aquecimento, (III) com aquecimento e sem H₂O₂ (IV) com H₂O₂ e sem aquecimento (V) com uso de energia ultravioleta. Nas quatro primeiras etapas foi feita uma pré-redução térmica de Se (VI) a Se (IV) com uso de HCl 6M e aquecimento em 90°C. No quinto sistema de tratamento, eles testaram a irradiação do ultravioleta que reduziu o Se (VI) em Se (IV) que possibilitou a eliminação da matéria orgânica. Eles verificaram que esse último sistema de digestão trouxe benefícios em relação aos outros testados.

Yang e Swami (2007) desenvolveram um procedimento assistido por radiação microondas com cavidade para determinação de um grande número de elementos em organismos marinhos, usando CVAAS e ICP-MS. Neste trabalho o procedimento de digestão foi realizado em duas etapas: Primeiramente as amostras foram aquecidas à temperatura 110°C durante 20 min em uma potência de 600W, seguida de um aquecimento de 110°C por 5 min. Logo depois as amostras foram removidas do forno e foram resfriadas em um congelador a -20°C por 1 hora. A etapa seguinte teve um aquecimento de 200°C por 10 min e aplicação de uma potencia de 1200 W, seguido de um aquecimento de 200° por 10 min. Posteriormente, as amostras foram novamente resfriadas em um congelador à -20°C durante 1h. O estudo utilizou a mistura HNO₃, H₂O₂ e HF para a digestão de 0,15 g de amostra liofilizada. Os resultados mostraram que a presença de HF contribuiu para um aumento das recuperações de Al, Cu e Zn e uma diminuição das recuperações de Ca. Os resultados obtidos com a análise do material certificado de tecido de ostra NIST 1566b mostram que as recuperações foram completas (90 a 110%) com valores de RSD que variavam entre 1 a 23%.

Reis *et al.* (2008) desenvolveram um método analítico que incluía o uso do

procedimento de um forno de microondas doméstico com bombas Parr para digestão ácida de amostras de frutos do mar, visando à determinação de Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V e Zn por GFAAS e CVAAS. O procedimento otimizado realizava a digestão em ácido HNO₃ e H₂O₂ em apenas duas etapas (potência 340W; tempo 4 min), que segundo os autores, prevenia a perda dos analitos por volatilização. Os resultados demonstraram que as maiorias dos valores de concentrações obtidas estavam concordantes com os valores certificados, no nível de confiança de 95%. Eles observaram que o procedimento não era adequado para análise de Cd e Hg, pois foram obtidos valores mais altos do que os certificados. Os autores justificaram afirmando que a concentração muito baixa de Hg estava próxima do limite de detecção e que o valor de Cd obtido foi influenciado pela manipulação da amostra, devido a diluições realizadas.

Costa *et al.* (2009) avaliaram as perdas de As, Cd, Pb, Se e Zn por volatilização em amostras de moluscos bivalves usando os sistemas de microondas com radiação focalizada e com cavidade empregando o ICP OES como detecção. Os resultados sugeriram que o sistema de microondas com cavidade é o procedimento mais adequado para determinação desses elementos, já que o sistema com radiação focalizada apresentou perdas por volatilização dos elementos estudados (perdas acima de 12%), principalmente para o Pb. Os resultados da validação dos sistemas de digestão empregando o tecido de ostra (NIST 1566b) mostraram valores de concentração concordantes com os valores certificados, no nível de confiança de 95%.

Nano *et al.* (2009) desenvolveram um procedimento de digestão por bloco digestor para determinação de Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, V e Zn em tecidos de ostra, por ICP OES. Eles avaliaram a proporção da mistura dos oxidantes HNO₃ e H₂O₂ juntamente com o ácido HCl, através do planejamento estatístico de misturas simplex centróide. Os resultados mostraram que As, Co e V apresentaram boas recuperações nas proporções otimizadas das soluções comerciais dos reagentes estudados (21,4% de HCl; 30,8% de HNO₃; 47,8% de H₂O₂). Adicionalmente, as recuperações de Al e Ba foram independentes das proporções da mistura obtidas. As recuperações dos elementos com o procedimento de digestão otimizado no tecido de ostra (NIST 1566b) tiveram resultados entre 84 a 110% no nível de confiança de 95%.

Ashoka *et al.* (2009) compararam seis procedimentos de digestão ácida para determinação de 40 elementos em tecidos de organismos marinhos empregando ICP-MS com sistema de colisão octopolo. Os procedimentos de digestão foram comparados de acordo com os reagentes usados e mecanismos de aquecimento. Esses procedimentos

estudados pelos autores incluíram: digestão com HNO₃ e HCl em banho-maria a 85°C; digestão com HNO₃ e H₂O₂ em banho-maria à 85°C; digestão em microondas doméstico com HNO₃ e H₂O₂; digestão em microondas com cavidade com HNO₃ e H₂O₂; calcinação seguida de tratamento com ácido HNO₃; digestão com HF. Os resultados não indicaram um procedimento ideal para a determinação dos elementos com ICP-MS, contudo, o procedimento com microondas doméstico forneceu valores de concentração mais próximos dos valores certificados de referência. Apesar disso, esse procedimento ofereceu uma melhor precisão do que exatidão para alguns elementos, como Cr e Ni. Os autores recomendam usá-lo para obter perfis de elementos traços ao invés de estabelecer as concentrações totais.

Dentre os procedimentos de preparo de amostras recentemente desenvolvidos a lixiviação ácida que usa a energia do ultrassom tem se destacado, pois ela tem apresentado um potencial para acelerar e simplificar a análise química com mínima contaminação, o baixo consumo de reagentes e geração mínima de resíduos (Kazi *et al.*, 2009). Estes procedimentos baseiam-se no uso de ácidos diluídos, tendo como princípio a quebra das ligações químicas entre os elementos traço e os constituintes da matriz da amostra com o auxílio da radiação ultrassom (Moreno-Cid *et al.*, 2002). A sonicação induz a cavitação acústica causando um aumento no transporte de analito das partículas sólidas para a fase líquida. O fenômeno da cavitação envolve a geração, o crescimento, oscilações e o colapso de bolhas transientes, denominadas de bolhas de cavitação. Como resultado da implosão dessas bolhas, libera-se energia que favorece a extração das espécies químicas em amostras sólidas, pela melhora da solubilidade do(s) analito(s) e difusividade do solvente no interior das partículas sólidas (Calle *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2009). Além disso, o fenômeno da cavitação acústica permite a geração de radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio no meio e a fragmentação das partículas sólidas. A primeira condição ajuda na oxidação da matriz orgânica, e a segunda aumenta a área superficial da amostra (Bermejo-Barrera *et al.*, 2000).

Diversas publicações científicas tratam da avaliação ou desenvolvimento da extração. Bermejo-Barrera *et al.* (2000) buscaram avaliar os parâmetros qualitativos como segurança, tempo e economia da extração ácida assistida por ultrassom e outros procedimentos de preparo de amostras. A determinação das concentrações de Cu, Fe, Mg, Zn, As, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb e Se foi feita empregando GFAAS ou FAAS. Foi observado pelos autores que os procedimentos de preparo das amostras, extração ácida assistida por microondas e ultrassom, juntamente com a técnica de amostragem de suspensão,

demandam um tempo menor do que a digestão ácida assistida por radiação microondas e hidrólise enzimática. Não foram constatadas extrações quantitativas utilizando a hidrólise enzimática para maioria dos elementos. Eles concluíram que as extrações ácidas ofereceram simplicidade e baixo custo.

Um outro estudo semelhante foi conduzido por Bermejo-Barrera *et al.* (2001). Eles propuseram a extração ácida auxiliada por um banho de ultrassom, para determinação de As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, Se e Zn em amostras de mariscos empregando Espectrometria de Absorção Atômica (FAAS, GFAAS e CVAAS). O planejamento experimental Plackett–Burman realizado pelos autores forneceu as seguintes condições otimizadas da extração ácida: tempo de 20 min de extração, tamanho de partícula de 300 μm ; massa de amostra de 0,2 g; volume da mistura ácida (HCl e HNO_3) de 6 ml. As concentrações otimizadas dos ácidos foram obtidas para cada elemento. Foram encontradas recuperações quantitativas (>90%) para todos os elementos analisados nos materiais de referência certificados (tecidos de peixe DORM-1, DOLT-1 e TORT-1) da National Research Council of Canada (NRCC). Os valores do RSD ficaram entre 0,8 a 9,0%.

Méndez *et al.* (2002) desenvolveram uma metodologia para determinação de Se em mariscos empregando GFAAS e fazendo o uso da extração ácida assistida por ultrassom como tratamento de amostra. A extração foi realizada utilizando uma sonda por 3 min em uma amplitude de 50%. Uma massa de 20 mg de amostra foi suspensa em 1,5 μL em 0,5% v/v de HNO_3 para análise. O método proposto possibilitou a omissão da fase de pirólise. Adicionalmente o procedimento permitiu um rápido tratamento de amostra com uma redução do tempo de análise e uso de padrões aquosos. Foi possível a obtenção de recuperações quantitativas (>90%) do Se nas amostras e MRC.

Capelo *et al.* (2005) desenvolveram um método de extração ácida assistida por ultrassom para determinação de metais em amostras ambientais e biológicas por GFAAS. Foram estudadas diferentes variáveis nesse trabalho, como o mecanismo de ultrassom (sonda e banho), tamanho de partícula, concentração dos ácidos, tempo, amplitude de sonicação, massa de amostra e tipo de matriz. Esses autores ressaltam que os parâmetros do ultrassom tais como: potência, frequência, temperatura, a geometria, o tamanho e a espessura dos recipientes sempre devem ser levados em conta. Quando é usado o banho de ultrassom deve se especificar o volume de água e posição da amostra, opção de termostato, tempo e amplitude de sonicação. Os autores afirmam que com o uso do ultrassom com sonda obtiveram melhores resultados que o banho, além de

consumir menos tempo.

Manutsewee *et al.* (2007) propuseram um método analítico que emprega a extração ácida assistida por ultrassom como procedimento de preparo de amostras e o ICP OES como técnica de determinação dos metais Cd, Cu e Zn em amostras de mariscos. Nesse método desenvolvido os autores usaram 6 ml de uma mistura ácida ternária 1:1:1 HNO₃ (4M): HCl (4M): H₂O₂ (0,5M), 500mg de massa de amostra seca e uma sonicação de 30 min em um banho de ultrassom operando em uma temperatura de 56° C. O método proporcionou extrações dos metais no MRC DORM-2 (tecido muscular de peixe) na faixa de 80 a 87,2%.

As aplicações analíticas com o procedimento de extração ácida até então envolveram dois sistemas de ultrassom: sonicação com sonda e banho. Contudo, a sonicação com um reator “cup-horn” surgiu como um procedimento alternativo para lixiviação de amostras biológicas e ambientais.

Calle *et al.* (2009) descreveram o sistema como: I) sem o risco de contaminação que a sonicação com sonda oferece; II) sem restrição de uso de solventes que ambos os sistemas têm, isto é, ácidos concentrados ou não; iii) potência de sonicação maior do que a do banho, resultando em rápidas extrações em misturas de ácidos diluídos; IV) Todas as amostras são igualmente sonicadas. Os resultados obtidos da determinação por FAAS e GFAAS mostraram uma eficiente extração de Cd, Pb, Mn e Ni em tecidos de animais, plantas, algas e sedimentos com valores de recuperações quantitativas (acima de 90%) para maioria dos elementos nos materiais certificados de referência avaliados.

A radiação ultrassom tem sido aplicada também para o tratamento de amostras por hidrólise enzimática. Esse tratamento é denominado sonicação com sonda na presença de enzimas (EPS). Ele consiste na hidrólise de certas proteínas ou lipídios da amostra usando enzima (hidrólise enzimática). As enzimas catalisam a reação introduzindo água em ligações específicas do substrato causando a ruptura das macromoléculas orgânicas. Depois da quebra das moléculas grandes, uma fração variável de metal fica livre em solução e pode ser medida depois de uma etapa de centrifugação (Bermejo-Barrera *et al.*, 2004). O procedimento oferece certas vantagens como prevenção da perda do elemento por volatilização e a grande seletividade, porque as enzimas agem somente em certas ligações químicas e podem distinguir entre frações de metais ligados em diferentes componentes da matriz da amostra. As condições moderadas de temperatura e pH do procedimento favorecem a análise de especiação (Maduro *et al.*, 2006).

No trabalho de Krishna e Arunachalam (2004) a capacidade da sonicação com sonda para extração multi-elementar em amostras biológicas, incluindo moluscos, com o uso de HNO₃ e HCl, foi avaliada. Os elementos estudados incluíam Na, K, Ca, Mg, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Ag, Cd, In, Sb, Cs, Ba, Pb e Bi. Os diversos parâmetros do ultrassom, tais como, composição da mistura ácida, amplitude de sonicação e tempo, foram avaliados. Eles obtiveram recuperações quantitativas (>90%) para maioria dos elementos utilizando material certificado e tempo de extração de 14 min (4 min para sonicação e 10 min para centrifugação). O método analítico empregando o ICP-MS e ICP OES permitiu uma alta frequência analítica de 30-35 amostras por 8h de trabalho em comparação a digestão ácida assistida por microondas que era realizada em 4 min com uma etapa de resfriamento de 90-120.

Maduro *et al.* (2006) estudaram a amostragem em suspensão, extração ácida assistida por ultrassom e sonicação com sonda na presença de enzimas. Os metais estudados Cd e Pb foram determinados por ET AAS em amostras de referência de material biológico. Os melhores resultados foram obtidos com o procedimento de suspensão. Obtiveram-se boas extrações de Cd e Pb para as amostras com uso da extração ácida assistida por ultrassom. Com uso da EPS foram obtidas extrações quantitativas apenas para Cd em tecido de ostras, enquanto que para chumbo foi necessária uma etapa adicional de centrifugação.

Vale *et al.* (2007) apresentaram um trabalho descrevendo uma aplicação para sonicação com sonda na presença de enzimas para determinação de selênio total por GFAAS em materiais biológicos. Foram realizados ensaios de atividade e eficiência de extração com as enzimas protease XIV, subtilisina e tripsina. Adicionalmente, foi feito um estudo dos modificadores químicos Ni(NO₃)₂ e Pd(NO₃)₂ em conjunto com H₂O₂. Os resultados demonstraram que o uso do peróxido aumentou o tempo de vida útil do tubo de grafite em 66% evitando a formação de resíduos de carbono. Esses autores verificaram também que a Protease XIV fornecia melhores extrações de selênio e que poderia ser usada para o preparo de amostras biológicas por EPS, porém eles observaram que o melhor uso dessa enzima foi quando ela ainda estava fresca.

A extração ácida também tem sido desenvolvida com o auxílio das microondas. Trabalhos como o de Bermejo-Barrera *et al.* (2000) tem surgido empregando esse tipo de procedimento de preparo de amostras de invertebrados marinhos para determinação de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, e Zn por FAAS, GFAAS e CVAAS. Nesse estudo foi realizado um planejamento experimental Plackett-Burman e otimização por

planejamento composto central que indicaram respectivamente as variáveis mais significantes e concentrações ideais de HNO₃, HCl, H₂O₂ com os melhores tempos de exposição da energia das microondas para extração. As concentrações dos ácidos nítrico e clorídrico nas faixas de 4,1 - 5,3 e 2,8 - 3,8, respectivamente, com 5,0 mol L⁻¹ de H₂O₂ e tempos de exposição na faixa de 1,2 - 2,2 min proporcionaram recuperações quantitativas para maioria dos elementos.

Seco-Gesto *et al.* (2007) desenvolveram um procedimento de extração ácida assistida por radiação microondas para determinação de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, V e Zn em invertebrados marinhos empregando ICP OES. As variáveis mais importantes e suas condições otimizadas foram obtidas através dos planejamentos experimentais Plackett-Burman e composto central. Os autores validaram o método com as seguintes condições experimentais: 3 min de exposição das microondas, potência de 600W do forno de microondas, temperatura de 65°C, 2,5 mol L⁻¹ de HNO₃, 3,0 mol L⁻¹ e 0,5% (m/v) de H₂O₂. Os autores ressaltaram que essas condições são menores que aquelas requeridas por um sistema convencional de digestão ácida com auxílio das microondas. Foram obtidas recuperações dos metais no MRC acima de 90% com essas condições experimentais.

Uma outra opção de tratamento de amostras de mariscos que tem sido empregada é a amostragem em suspensão. A introdução da suspensão combina vantagens da amostragem de líquidos e sólidos, além de evitar problemas associados à amostragem direta de sólidos, tais como: interferências espectrais (espalhamento de radiação pelas partículas sólidas da matriz); o estabelecimento de uma curva analítica com padrões sólidos; problemas referentes à pesagem (Magalhães, 1998).

Nesse procedimento não há riscos de contaminação ou perda do analito durante o tratamento e há possibilidade da mudança da concentração da suspensão por diluição, em uma limitada extensão. Além disso, a curva analítica pode ser obtida, em muitos casos, com emprego de soluções-padrão aquosas do analito. (Bermejo-Barrera *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2002). Por outro lado, a amostragem em suspensão, não está livre de problemas. As figuras de mérito, precisão e exatidão, por exemplo, dependem da homogeneidade da distribuição dos sólidos na suspensão, bem como do tempo de sua estabilização (Tokman, 2007).

Bermejo-Barrera *et al.* (2000) desenvolveram um procedimento de amostragem em suspensão para determinação de Cd em mexilhões, atum e outros mariscos por GF AAS. Os reagentes: modificador químico (NH₄)₂HPO₄ e agente dispersante Triton X-100

foram otimizados com os valores respectivamente de 50 mg L⁻¹ e do 0,2% v/v na mistura aquosa. Os autores verificaram que houve apenas o efeito de matriz nas amostras de mexilhões, através da comparação das curvas aquosas e com adição de analito. Este efeito foi atribuído à presença do colesterol que é maior nessas amostras. Para os outros tipos de amostra a calibração por soluções aquosas mostrou-se adequada. O método proposto possibilitou resultados precisos e exatos na determinação de Cd, confirmados pela concordância dos valores obtidos do referido método com material de referência certificado.

Silva *et al.* (2008) propuseram um procedimento de amostragem em suspensão combinada com moagem criogênica, para determinação de Cu, Mn e Fe em amostras de moluscos bivalves. As condições otimizadas do procedimento (80 mg de massa de amostra moída; diluição usando 1,0 mol L⁻¹ da mistura HCl e HNO₃; sonicação de 30 min ;10 ml de volume da suspensão) permitiram que o procedimento realizasse uma determinação rápida e com baixo risco de contaminação. Além disso, eles conseguiram obter valores de concentrações mais precisos, devido à moagem criogênica, que homogeniza melhor as amostras com sua redução eficiente de tamanho de partícula. Os valores de RSD variaram entre 2,9 a 3,8%. Já os resultados do teste de recuperação, aplicado para avaliar a exatidão do método, mostraram-se concordantes com o material certificado de referência analisado (tecido de ostra, NIST 1566b), no nível de confiança de 95%.

Alguns tipos de preparo de amostras promissores surgiram recentemente, como o trabalho de Mesko *et al.* (2006) que estudaram um procedimento de digestão de materiais biológicos baseado na combustão da amostra assistida por microondas. Neste procedimento a combustão da amostras orgânicas em tubos de quartzos pressurizados com oxigênio, tem ignição realizada pela radiação microondas, que completa a combustão/digestão em segundos. Eles observaram que houve uma diminuição nos interferentes e resíduos gerados. Além do mais, verificaram que o procedimento proposto pode ser aplicado mesmo em altas quantidades de massa (500 mg) e para vários tipos de amostras.

Priego-Capote e Castro (2007) fizeram uma extensa revisão do emprego da digestão ácida assistida por ultrassom em amostras biológicas. Segundo os autores, o campo de aplicação desse procedimento é pequeno em comparação aos procedimentos convencionais de digestão ácida, devido ao conhecimento escasso dos químicos analíticos sobre as vantagens que a energia do ultrassom fornece na digestão ácida.

Segundo eles, a energia do ultrassom aumenta lentamente a temperatura em um valor de equilíbrio. Essa característica faz o procedimento ideal para tratamentos onde a temperatura é um fator chave, tais como uma digestão enzimática, que tem um aumento na seletividade e não tem a atividade da enzima perdida com o ultrassom. Eles concluíram que o procedimento pode ser empregado em análises bioquímicas.

Kazi *et al.* (2009) estudaram a digestão ácida com auxílio de ultrassom para determinação dos metais Cd, Cr, Ni e Pb em amostras ambientais e biológicas, empregando GFAAS. Eles desenvolveram o procedimento investigando os parâmetros: tempo de pré-sonicação; tempo de sonicação; temperatura do banho de ultrassom; diferentes misturas de ácidos. O procedimento otimizado permitiu a redução do tempo em comparação à digestão ácida em placa de aquecimento, aumentar a vida-útil do tubo de grafite, baixar o custo da análise e obter frequência analítica de 12-60 amostras por hora. Eles obtiveram recuperações nas faixas de 96,2 a 102% e 96,3 a 98,6% para amostras ambientais e biológicas, respectivamente, e valores de RSD entre 3,5 a 8,2%.

3.3 Técnicas instrumentais de análise

Várias técnicas analíticas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas para determinações de metais, seus compostos organometálicos e outros elementos químicos em frutos do mar. Muitos trabalhos citados até o momento e alguns que serão enfatizados a partir desse tópico utilizaram técnicas espectrométricas atômicas ópticas ou de massas, tais como FAAS, GFAAS, CVAAS, HGAAS e por último a ICP OES. A Espectrometria de Absorção Molecular e PIXE (Espectrometria de emissão de raios-X induzida por partículas) também são relatadas na determinação de metais em invertebrados marinhos.

Além dessas técnicas espectrométricas para análise elementar ou multi-elementar, a literatura apresenta o uso de técnicas de separação cromatográficas como HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), CG (Cromatografia Gasosa) e IC (Cromatografia de Íons); técnicas eletroanalíticas, como a DPASV (Voltametria de Redissolução Anódica com Pulso Diferencial) e DPCSV (Voltametria de Redissolução Catódica com Pulso diferencial). Por fim, métodos radioquímicos como a NAA (Análise por Ativação por Nêutrons) também têm sido usados para estudos elementares em amostras de invertebrados marinhos.

3.3.1 Técnicas Hifenadas

As metodologias analíticas que propõem o estudo da especiação de elementos traços necessitam de uma técnica que seja seletiva (capaz de discriminar entre diferentes espécies de certo elemento) e sensível, já que as espécies de interesse normalmente representam apenas uma pequena fração da concentração total do elemento (geralmente abaixo de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$) (Szpunar, 2000). Segundo recomendação da IUPAC, o termo especiação é definido como a distribuição de espécies químicas de um elemento em um sistema, enquanto que a análise de especiação denota a medida da quantidade de uma ou mais espécies químicas em uma amostra (IUPAC, 1997). As análises de especiação de elementos traços são amplamente utilizadas em estudos ambientais para a investigação da toxicidade potencial de um elemento particular em um determinado ecossistema.

As técnicas de espectrometria atômica sozinhas não são adequadas para a determinação das diferentes espécies metálicas, uma vez que o pequeno tempo de residência no caminho ótico e a elevada temperatura dos atomizadores podem criar problemas para diferenciar as diferentes formas químicas do analito (Das *et al.*, 1995). Analogamente, as técnicas cromatográficas HPLC com detector UV, e CG com detector por ionização em chama (FID) ou com detectores por captura de elétrons (ECD) são insuficientes para análise de especiação em termos de especificidade e sensibilidade (Szpunar e Lobinsk, 2003). O termo técnicas hifenadas refere-se à combinação em linha de uma técnica de separação cromatográfica ou eletroforética com um detector de alta sensibilidade e especificidade (normalmente um espectrômetro de absorção, emissão atômica ou espectrômetro de massas) (Szpunar e Lobinsk, 2003). Estas técnicas permitem separar e quantificar as espécies químicas simultaneamente, produzindo resultados analíticos superiores aos obtidos pelas técnicas individuais (Skoog *et al.*, 2009). Embora essas técnicas sejam indubitavelmente promissoras para a análise de especiação, poucos laboratórios as empregam para as determinações elementares, devido ao alto custo de aquisição e manutenção dos instrumentos (Capelo *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas hifenadas utilizadas em metodologias analíticas para determinação elementar em amostras de invertebrados marinhos se destacam, entre outras, a técnica ICP-MS, HG-ICP OES (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado com Geração de Hidretos em modo contínuo), HPLC-HG-AAS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Absorção Atômica

com Geração de Hidreto). Adicionalmente a hifenação pode ser realizada com sistemas de análise em fluxo (FI). A Injeção em fluxo é uma técnica de introdução de amostras automatizada que demonstra benefícios como alta frequência analítica com baixo consumo de amostra, redução de problemas de contaminação, e melhora nas figuras analíticas de mérito. Outra característica importante dessa técnica é realizar manipulações de amostras em linha como pré-concentração, separação de matriz, adições padrões e diluições (Harrington *et al.*, 1999).

3.3.2 Resumo das técnicas empregadas para determinação elementar em mariscos

Uma compilação das técnicas instrumentais será apresentada. Foram escolhidos trabalhos a partir do ano de 1996, devido ao grande número de estudos relatados deste ano até 2009. Os estudos serão descritos com base na avaliação das suas figuras de mérito, suas inovações e resultados (Tabela 4). Parte dos autores desses estudos buscou a otimização operacional das técnicas e outros propuseram novas metodologias para a determinação dos elementos. As aplicações dos trabalhos que serão citados foram restritas as análises de amostras de frutos do mar (moluscos bivalves ou peixes).

Tabela 4. Trabalhos que visaram o desenvolvimento de técnicas instrumentais para determinação elementar em mariscos

Técnica(s)	Analito(s)	Justificativa	Amostra/ Espécie/ MRC	Características/ Inovações/ Resultados	Limite(s) de Detecção	RSDs (%)	Ref.
HG-ICP OES	As e Se	Diminuir a quantidade de gases gerados da geração de hidreto sem extinguir o plasma	Águas de rios, tecido de ostra (NIST 1566b)	Usa uma bobina de mistura e um separador gás-líquido que é selado por uma válvula de pressão eletromagnética	0,3 ng ml ⁻¹ (As), 0,6 ng ml (Se)	-	Narasaki e Cao (1996)
NAA, HG AAS	Espécies de As	Estudo de especiação de compostos de arsênio para análise ambiental	Moluscos, (<i>Mytilus edulis</i> e <i>Mytilus galloprovincialis</i>), tecido de ostra (NIST 1566b)	As técnicas mostraram boa seletividade e sensibilidade, porém não quantificou o metilarsonico.	-	-	Slejkovec <i>et al.</i> (1996)
HPLC-HG-AAS	Metilarsonico (MMA) Dimetilarsonico (DMA)	Desenvolver um método para determinar compostos de As em mariscos	Mariscos, tecido muscular de peixe (NRCC DORM -1)	Boa seletividade e baixo custo	791 ng g ⁻¹ (DMA), 54 ng g ⁻¹ (MMA)	3,0 (MMA), 2,0 (DMA)	Vélez <i>et al.</i> (1996)
HPLC - MO - HG-AAS	Arsenobetaina	Desenvolver o sistema acoplado às microondas	Mariscos, tecido muscular de peixe (NRCC DORM -1)	A técnica com a oxidação por microondas (MO), teve melhores recuperações que outros métodos relatados na literatura.	2,72 ng g ⁻¹	4,0	Vélez <i>et al.</i> (1997)
ICP-MS	Lantanídeos	Estudos farmacocinéticos e biodistribuição	Amostras biológicas, tecido de ostra (NIST 1566b)	Melhorou os limites de detecção para as amostras reais e recuperações	1-20 fg g ⁻¹	-	Buseth <i>et al.</i> (1998)
CI	Cd, Co, Cu, Mn, Zn	Desenvolver um método com pré-concentração empregando resina de quelante	Amostras ambientais e biológicas, tecido de ostra (NIST 1566b)	A resina amino-butiro-hidroxiato permitiu, maior seletividade e baixos limites de detecção, porém a custo de tempo de análise.	0,3 a 2,0 ng ml ⁻¹	-	Liu <i>et al.</i> (1998)
DPASV,	Cu, Pb, Cd e Zn	Avaliar o método para estudos de biomonitorios	Amostras ambientais, tecido de ostra (NIST 1566b)	Melhorias na sensibilidade e seletividade para determinação multi-elementar	0,010 – 0,100 µg g ⁻¹	3,0 a 5,0	Locatelli <i>et al.</i> (1999)

(Continuação da Tabela 4)

Técnica(s)	Analito(s)	Justificativa	Amostra/ Espécie/ MRC	Características/ Inovações/ Resultados	Limite(s) de Detecção	RSDs (%)	Ref.
FI-ICP-MS	Al, V, Cr, B, As, Sr, Mo, Cd, Sn, Ba e Pb	Desenvolver um método com análise de injeção em fluxo (FI)	Amostras de alimentos, tecido de ostra (NIST1566b)	O método combinou a seletividade e sensibilidade do ICP-MS e o FI, que evita manipulação de amostra, e melhoras nas figuras de mérito.	1,46 (Al), 1,36(Cr), 0,15 (Co), 0,59 (Ni), 0,89 (As), 0,44 (Mo), 0,16 (Cd), 0,39 (Sn), 0,07 (Ba) e 0,027 (Pb) em ng g ⁻¹	1,0 a 5,0	Harrington <i>et al.</i> (1999)
ICP-MS	As, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn Pb, Se, Sn, Sr, Th, U, V e Zn	Estudar as figuras de mérito de um ICP-MS do tipo quadrupolo com célula de colisão hexapolo (HEX)	Amostras biológicas, tecido de ostra (NIST1566b)	Os dois analisadores de massa em série permitiram uma significativa melhora nos limites de detecção dos íons afetados pela interferência espectral.	0,0014-28 ng L ⁻¹ em nebulizador ultrassônico, que teve melhores resultados	-	Boulyga <i>et al.</i> (2001)
DPASV DPCSV	As(III), Se(IV), Cd (II), Zn(II) e Mn (II)	Aplicar as técnicas voltamétricas para análise multi-elementar, resolvendo problemas associados a fortes interferências mútuas da matriz	Sedimentos, peixes, mexilhões, tecido de mexilhão (BCR 278)	Eletrodos de trabalho de Hg e Pt, com eletródo de Ag AgCl KCl e a solução tampão NH ₄ Cl +NH ₃ .como eletrólito suporte. Emprega o método de adição padrão.	Ao redor de 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ para todos os elementos	>5,0	Locatelli e Torsi (2001)
FI-FAAS	Cd	Desenvolver uma metodologia de baixo custo utilizando a injeção em fluxo	Amostras de alimentos, tecido de ostra (NIST1566b)	O sistema de injeção em fluxo e com o FAAS teve um a frequência de amostra de 63 h ⁻¹ e evita interferentes graves.	0,7 mg L em pré-concentração 30s; 0,4 mg L em pré-concentração 60s.	5,0	Bruhn <i>et al.</i> (2002)
NAA, PAA, SNAAs	Ag, As, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Rb, Se, Sr, Zn	Estudar os metais ligados as Metalotioneínas	Amostras ambientais, tecido de ostra (NIST1566b)	Quase todas as concentrações dos elementos estavam de acordo com valores certificados.	-	-	Fukushima <i>et al.</i> (2003)

(Continuação da Tabela 4)

Técnica(s)	Analito(s)	Justificativa	Amostra/ Espécie/ MRC	Características/ Inovações/ Resultados	Limite(s) de Detecção	RSDs (%)	Ref.
NAA, PIXE	Ag, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, Zn	Estudar os metais ligados as Metalotioneínas	Amostras biológicas, tecido de ostra (NIST 1566b)	A técnica proporcionou alta sensibilidade para determinação simultânea. O método empregando PIXE também foi recomendado para análise multi-elementar	-	-	Fukushima <i>et al.</i> (2003)
ICP OES	As, Sb, Se	Otimiza as condições operacionais de um nebulizador de geração direta de hidretos (DHGN)	Tecido de ostra (NIST 1566b)	Obtiveram-se melhores relações sinal/ruído, LODs e RSDs para As, Sb e Se do que os sistemas de introdução convencionais. Podem-se determinar outros metais com menos sensibilidade e precisão	DHGN- 0,4 (As), 2,0 (Sb), 0,1 (Se); Cross-flow - 45 (As), 50 (Sb), 63 (Se); Ultrassônico – 5 (As), 6 (Sb), 5 (Se); todos ng ml ⁻¹	0,4 (As), 0,7 (Sb), 0,2, (Se)	Rojas <i>et al.</i> (2003)
FAAS	Mn	Desenvolver um método com extração continua assistida por ultrassom (CUES), acoplado a injeção em Fluxo	Mariscos, hepatopâncreas de lagosta (NRCC TORT-1)	Usa ácidos diluídos, não requer uma etapa de centrifugação. Houve uma redução da contaminação de amostra e perda de analitos, bem como menor consumo de reagentes e frequência de amostra de 60 h ⁻¹	0,4 µg g ⁻¹ para 30 mg de amostra	0,9	Yebra e Moreno-Cid (2003)
GFAAS	Be	Desenvolver um método que utilize menor quantidade de amostra e tenha um tempo de digestão e quantidade de reagentes menores	Amostras ambientais, tecido muscular de peixe (NRCC DORM – 1)	O Be reage com acetilacetona na presença de um tampão. Obtiveram-se boas recuperações nos organismos estudados	4,6 ng g ⁻¹	3,0	Hsu <i>et al.</i> (2004)

(Continuação da Tabela 4)

Técnica(s)	Analito(s)	Justificativa	Amostra/ Espécie/ MRC	Características/ Inovações/ Resultados	Limite(s) de Detecção	RSDs (%)	Ref.
GFAAS, FAAS	Cd, Cr, Cu, Pb e Zn	Desenvolver um método simples empregando AAS, para determinar frações de ligados as metalotioneínas	Amostras ambientais Moluscos bivalves cultivados em Ria de Arousa (Galicia Espanha)	Utiliza um sistema novo de homogeneização (Stomacher) onde as amostras são mantidas em sacos descartáveis esterilizados, eliminando a contaminação.	0,7 (Cd), 3,0 (Cr), 6,6 (Pb) em ng g^{-1} 0,05 (Cu), 0,01 (Zn) em $\mu\text{g g}^{-1}$	-	Santamaría-Fernández <i>et al.</i> (2004)
CG-AFS	Hg (II), CH_3Hg^+	Desenvolvimento de um método robusto, sensível e reprodutível para especiação de Hg em monitoramento biológico.	Moluscos bivalves, (<i>Chamelea gallina</i> , <i>Donax trunculus</i> e <i>Scrobicularia plana</i>), tecido de ostra (NIST 2977)	O método utiliza um detector de fluorescência atômica modificado, que inclui uma célula de fluxo de quartzo dentro do detector, que aumenta a concentração de Hg e melhorar a sensibilidade.	225 pg g^{-1} (Hg total)	6,2 Hg total	Gómez-Ariza <i>et al.</i> (2005)
HR CS AAS	Pb	Desenvolver um método que evite dificuldades na correção de fundo, calibrações complexas e interferências espectrais.	Amostras biológicas, tecido muscular de peixe (NRCC DORM -1)	Utiliza a amostragem direta de sólidos e Ru como modificador químico permanente. O Emprego da fonte continua resultou em um método facilitado devido à visibilidade espectral e capacidade de processamento do software	0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$	<10,0	Borges <i>et al.</i> (2006)
ICP OES	As, Se, Hg, Sb	Explorar os benefícios do sistema de introdução de amostras dual para geração de hidretos	Tecido de ostra (NIST 1566b)	Dois nebulizadores pneumáticos que permitem a geração de hidretos, e determinação de outros elementos que não formam compostos voláteis, com a sensibilidade um pouco mais baixa em relação aos sistemas de introdução convencionais.	Dual – 3 (As), 19 (Sb), 10 (Se), 0,1 (Hg) (sem NaBH_4) Crossflow – 26 (As), 517 (Sb), 28 (Sb), 5 (Hg) Ultrassônico – 70 (As), 2 (Sb), 116 (Se), 81 (Hg) todos $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 a 1,25	Gómez <i>et al.</i> (2006)

(Continuação da Tabela 4)

Técnica(s)	Analito(s)	Justificativa	Amostra/ Espécie/ MRC	Características/ Inovações/ Resultados	Limite(s) de Detecção	RSDs (%)	Ref.
Espectrometria UV-VIS	Cd e Pb	Desenvolver um método que utilize o potencial do VIS, que tem vantagens de baixo custo, facilidade e acessibilidade.	Amostra de alimentos, moluscos. (<i>M. galloprovincialis</i>)	Usa a espectrometria VIS combinada à regressão parcial dos mínimos quadrados, para uma rápida determinação de Cd e Pb.	0,05 (Cd), 0,003(Pb) mg kg ⁻¹	4,43 (Cd), 2,0 (Pb)	Font <i>et al.</i> (2007)
FI-HG-GFAAS	Espécies de As	Aplicar o método em estudos de especiação do As para análises de biomonitoramento	Tecido de ostra (NIST 1566b) e outros MRCs de organismos marinhos.	Emprega o hidróxido de tetra-metil-amônio como solução de extração das espécies por microondas a 50°C por 30 min	0,5 a 1, 2 mg kg ⁻¹	5 a 15	Karadjova <i>et al.</i> (2007)
DGT	Cd, Cu, Ni e Pb	Avaliar a utilidade da técnica com estudos de biomonitoramento.	Moluscos bivalves, (<i>M. galloprovincialis</i>), tecido de ostra (NIST 1566b)	Mede as espécies lábeis quantitativamente <i>in situ</i> , e é capaz de pré-concentrar metais traço dissolvidos.	-	-	Schintu <i>et al.</i> (2008)
DMA-80	CH ₃ Hg ⁺	Desenvolver um método de determinação do analito empregando a técnica Direct Mercury Analyser (DMA-80) para estudos ambientais	Tecidos de Organismos marinhos (NIST 2979) e (NIST 2977)	Emprega a queima por oxigênio do amálgama de ouro, usando DMA depois de extração completa do analito. Faz determinações em amostras biológicas sem a necessidade de uma etapa de pré-tratamento, e aplicável em amostras líquidas e outras amostras sólidas.	1,5 ng g ⁻¹	>1,0	Maggi <i>et al.</i> (2009)

4. Materiais e Métodos

4.1 Área de Estudo

A Baía de Todos os Santos, localizada no estado da Bahia é a segunda maior baía costeira do Brasil, com uma área de 1.233 km². Ela se encontra entre a latitude de 12°50' S e a longitude de 38°38' W e possui contingente populacional no seu entorno superior a três milhões de habitantes (Hatje e Andrade, 2009). A maior parte da baía apresenta uma topografia de fundo relativamente plano, com profundidade média de 6 m. Profundidades máximas de até 100 m são observadas no Canal de Salvador, que é o maior responsável pela troca de água entre a baía e o oceano. Três grandes bacias de drenagem convergem para a BTS: Rios Paraguaçu, Jaguaribe e Subaé (Lima e Lessa, 2002; Cirano e Lessa, 2007). A geologia da Baía de Todos os Santos foi determinada, em grande parte, pela atividade tectônica da separação entre a América do Sul e a África, ocupando uma área delimitada pelas falhas geológicas de Salvador e de Maragojipe (Hatje e Andrade, 2009).

O início da impactação antrópica da Baía de Todos os Santos data do século XVI, com a construção da cidade de Salvador na entrada norte da baía, construção naval e com a cultura da cana do açúcar nesse período, cuja produção chegava a 1.750 toneladas anuais para comercialização (Schwartz, 2005; Hatje e Andrade, 2009). Entretanto, a aceleração do processo de alteração ambiental ocorreu na metade dos anos 50, quando a região metropolitana de Salvador experimentou um processo de industrialização com a instalação da refinaria Landulpho Alves (RLAM), da Petrobrás, do Centro Industrial de Aratu (CIA), do Complexo Petroquímico de Camaçari (Copec) (Hatje e Andrade, 2009).

A refinaria Landulpho Alves, localizada no município de São Francisco do Conde, na Bahia, começou a se construir em 1949, e está diretamente ligada à descoberta dos primeiros poços de petróleo no País, precisamente no Recôncavo Baiano. Sua construção formou uma classe operária egressa do trabalho com a pesca e a agricultura, e inaugurou um novo ciclo econômico, com a atividade industrial do refino virando a página da até então reinante agroindústria da cana-de-açúcar. Com uma capacidade instalada de 323.000 barris dia⁻¹, tem como principais produtos o propano, propeno, iso-butano, gás de cozinha, gasolina, nafta petroquímica, querosene, querosene de aviação, parafinas, óleos combustíveis e asfaltos (Petrobras, 2009).

O Centro industrial de Aratu (CIA), o primeiro grande complexo industrial planejado do país, foi fundado em 1967. Este complexo industrial situa-se numa área que abrange

os municípios de Candeias e Simões Filho, entre o Pólo Petroquímico de Camaçari. Em sua área, encontram-se empreendimentos dos seguintes segmentos: químico, metal-mecânico, calçadista, alimentos, metalurgia, minerais não metálicos, plásticos, fertilizantes, eletro-eletrônicos, bebidas, logística, moveleiro, têxtil, serviços e comércio (Pimentel, 2002; Sudic, 2009).

O Complexo Petroquímico de Camaçari (Copec), por sua vez, está localizado no município do mesmo nome, a 35 km de Salvador. Criado no final dos anos 1970 constitui-se num grande complexo industrial. Atualmente, 72 unidades industriais operam no COPEC, destacando-se os gêneros de produtos químicos, petroquímicos, termoplásticos, metalurgia, papel e celulose, cerveja e fertilizantes. Atualmente, o Pólo tem se expandido e diversificado a sua produção industrial. Assim, os maiores empreendimentos recentemente implantados na Bahia, se localizaram em Camaçari, como o da Ford, que aí instalou uma fábrica para produzir veículos, e o da Monsanto para produzir matérias-primas para herbicidas (Jacob *et al.*, 2006; BNB, 2009).

Na Baía de Todos os Santos, está situado o complexo Portuário que abrange os Portos de Aratu e Salvador além de terminais privativos. O Porto de Aratu, situado em Candeias, é especializado em granéis, possuindo terminais para gases, sólidos e líquidos, movimentando principalmente a produção do Pólo Petroquímico de Camaçari (Jacob *et al.*, 2006).

A intensa exploração das fontes de recursos naturais e o crescimento industrial têm submetido à Baía de Todos os Santos à contaminação ambiental. Dentre os principais contaminantes ubíquos nessa região e outras regiões costeiras, destacam-se os metais que são naturalmente encontrados em baixas concentrações no ambiente, como componentes de minerais e rochas (Hatje e Andrade, 2009).

4.2 Estações de Amostragem

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas em regiões impactadas da Baía de Todos os Santos onde ocorrem intensas coletas de mariscos para o consumo e comercialização (Figura 3). A Tabela 5 mostra os nomes das localidades e coordenadas geográficas de cada uma dessas estações.

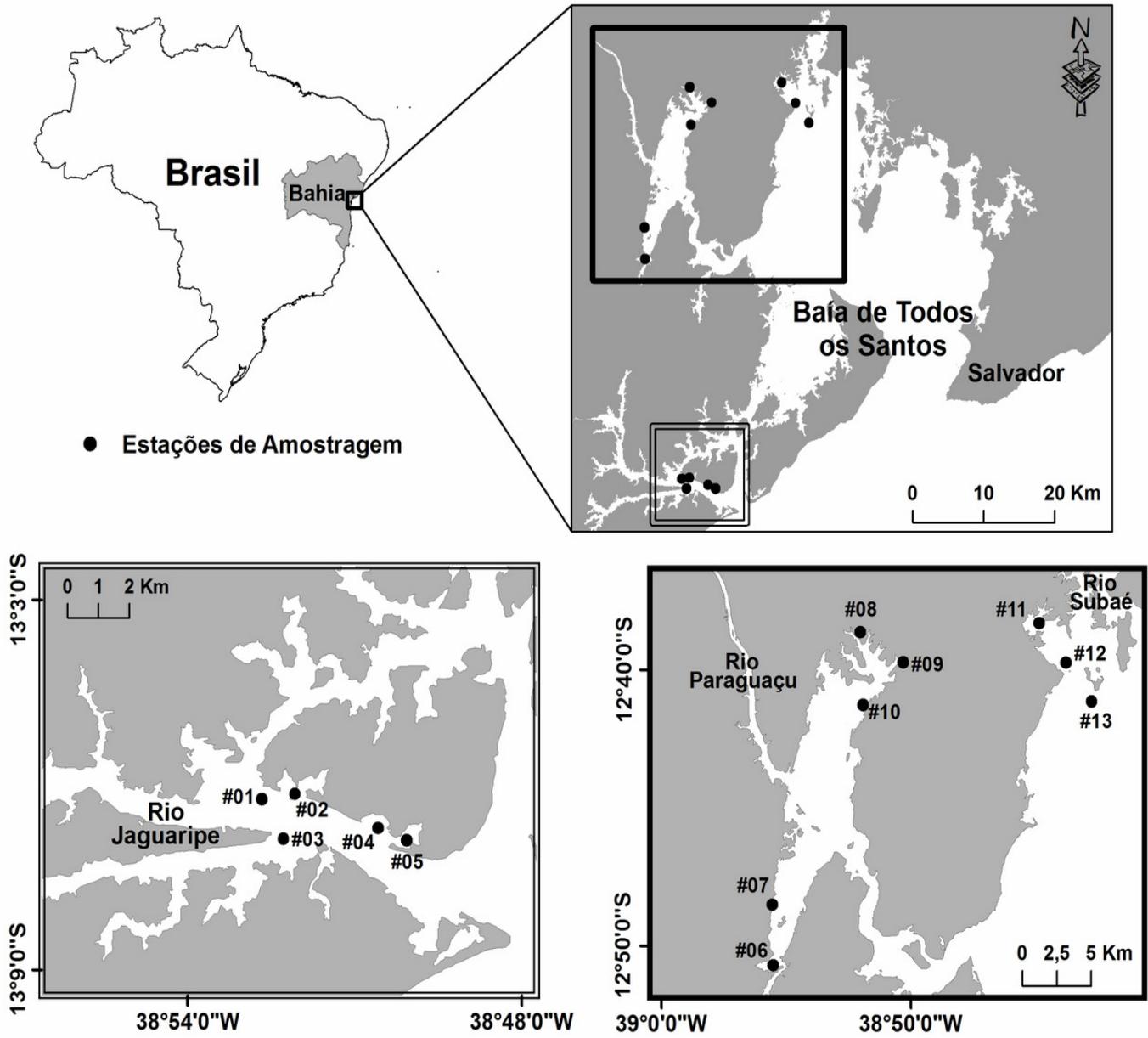


Figura 3. Estações estudadas da Baía de Todos os Santos, Brasil.

Tabela 5. Nome das localidades de amostragem

Estação	Latitude	Longitude	Organismo	Localidade
1	513242,4050	8551389,517	Ostra e Sururu	Rio Mucujê
2	514313,7968	8551530,899	Ostra e Sururu	Rio das Vergas
3	513937,3480	8550209,573	Ostra e Sururu	Rio da Estiva
4	516996,3270	8550604,640	Chumbinho	Enseada do Calabar
5	517901,5620	8550208,302	Chumbinho	Enseada da Barra
6	508080,2460	8579987,253	Ostra	Capanema
7	507990,5000	8584024,048	Ostra	Dendê
8	514406,2440	8602263,090	Ostra	Engenho da ponte
9	517522,4620	8600246,715	Ostra	Calolé
10	514589,5510	8597405,456	Ostra	Santiago do Iguape
11	527390,4654	8602845,857	Ostra e sururu	Ilha de São Gonçalo
12	529341,2811	8600202,169	Sururu	Coroa da Tarioba do Acupe
13	531210,9724	8597623,239	Chumbinho	Ilha da Coroa Branca

4.3 Espécies estudadas

4.3.1 *Mytella guyanensis*

Nomes populares: Mexilhão do mangue, Sururu, Mussel (EUA).

Essa espécie, conhecida na Baía de Todos os Santos como sururu (Figura 4) é um dos bivalves mais consumidos pela população local. Como a espécie é pertencente à família *Mitilydae*, são também chamados de mexilhões. Este molusco bivalve é característico de áreas tropicais (América do Sul e central) e habitam águas salobras. No Brasil, esses moluscos ocorrem em mangue e estuários desde o Amapá até Santa Catarina. São animais que se adaptam facilmente às mais diversas condições ambientais, podendo inclusive povoar locais bastante poluídos, fixando-se em grande número sobre pilastras de portos, cascos de embarcações, bóias e qualquer material submerso ou flutuante que sirva como substrato. Durante a maré cheia, esses bivalves filtram a água, alimentando-se principalmente do plâncton (Marques, 1998). Essas características permitem que eles acumulem contaminantes em seus tecidos.



Figura 4. Conchas de exemplar de *Mytella guyanensis*

4.3.2 *Anomalocardia brasiliana*

Nomes populares: Chumbinho, Berbigão, Papa-fumo, Vôngoli, Maçuí, Senambitinga, Marisco, Marisco pedra, Clam (EUA), Amêijoia (Europa).

Os indivíduos desta espécie (Figura 5) costumam se enterrar superficialmente no sedimento. Geralmente estabelecem populações numerosas em áreas protegidas ricas em sedimentos lamosos. O chumbinho alimenta-se do plâncton ou matéria orgânica em suspensão na água, trazida da superfície para dentro da cavidade do manto (Souto e Martins, 2009). Ocorre dentro de baías ou estuários, principalmente na região intramareal. A espécie é explorada como alimento e pode produzir a pérola negra. É uma das espécies mais abundantes e estudadas da costa brasileira (Amaral *et al.*, 2006).



Figura 5. Conchas de exemplar de *Anomalocardia brasiliana*

4.3.3 *Crassostrea rhizophorae*

Nomes populares: Ostra, Ostra do mangue, Ostra nativa, Oyster (EUA).

As ostras do mangue (Figura 6) representam importante grupo de moluscos bivalves empregados para o biomonitoramento de metais e outros elementos. Como os mexilhões, eles se alimentam através da filtração de material em suspensão na água e da microflora, sobretudo as diatomáceas (Souto e Martins, 2009). Entretanto, diferente dos mexilhões eles são fortes acumuladores de zinco (Rainbow, 1995). Possuem conchas irregulares e geralmente vivem fixados sobre os rizóforos de árvores localizadas em bosques de manguezais e formações rochosas, que ficam submersas durante a maré alta. É um molusco amplamente distribuído na costa brasileira e tem sido proposto como um relevante biomonitor de contaminação ambiental em sistemas tropicais (Silva *et al.*, 2001; Silva e Boehs, 2007). Esta espécie é freqüentemente ingerida crua ou parcialmente cozida.



Figura 6. Concha de exemplar de *Crassostrea rhizophorae*

4.4 Material de referência certificado (MRC)

O tecido de ostra certificado 1566b da National Institute of Standards Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA), foi empregado nas etapas de otimização e validação do método analítico proposto e no estudo ambiental para avaliação dos elementos possíveis de serem quantificados (recuperações quantitativas) nos tecidos dos bivalves coletados na BTS.

4.5 Limpeza do material

Todas as vidrarias e materiais destinados à manipulação ou acondicionamento das amostras foram previamente lavados em um banho de detergente Extran (Merck, Darmstadt, Alemanha) 2% v/v durante um período mínimo de 24 horas para em seguida, serem descontaminados em banho de HNO₃ (Merck) 10% v/v. Após os banhos de detergente e de ácido, o material foi lavado com água ultra-pura (resistividade de 18,2 MΩ cm) obtidas através de um sistema de purificação Milli-Q[®] acadêmico (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.6 Reagentes e soluções padrões

Todas as soluções foram preparadas com água deionizadas de alta pureza (18 MΩ cm), obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q[®]. Foram utilizados reagentes de grau analítico como HNO₃ (65%, 14,0 mol L⁻¹), HCl (37%, 12,0 mol L⁻¹), CH₃COOH (100%, 17,5 mol L⁻¹) e H₂O₂ (30% v/v, 12,4 mol L⁻¹) todos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Para obtenção da curva analítica multi-elementar com os elementos de interesse (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn) foram utilizadas soluções estoque de referência de 1000 mg L⁻¹ Titrisol (Merck, Darmstadt, Germany). A curva analítica continha os elementos traço (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sr e V) na faixa de 0,25 a 4,00 mg L⁻¹. Esta faixa de trabalho foi obtida através de diluições adequadas de uma solução “multi” de 50 mg L⁻¹ com 5% de HNO₃ (65% v/v), preparada das soluções estoque desses elementos. Adicionalmente os metais Ca, K, Mg e Zn foram adicionados à curva multi-elementar diretamente, através das soluções estoque de referência para as determinações nas faixas 10 a 250 (Na), 25 a 500 (K) e 10 a 100 mg L⁻¹ (Ca, Mg e Zn).

4.7 Instrumentação

4.7.1 Técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

Na técnica ICP OES os componentes da amostra são convertidos em átomos ou íons elementares no plasma de argônio, ou seja, em um gás eletricamente condutor que

contêm uma significativa concentração de íons argônio e elétrons (Skoog, 2009). No plasma produzido à pressão atmosférica são atingidas temperaturas tão altas quanto 10.000 K (Guiné, 1998). A fonte de plasma indutivamente acoplado, denominada tocha (Figura 7), consiste de três tubos de quartzo concêntricos através do qual passa um fluxo de gás argônio. Nesta fonte, a ionização do argônio que flui no interior da tocha é iniciada por uma bobina Tesla (Skoog, 2009). Os íons produzidos e seus elétrons resultantes atingem energia cinética elevada após serem acelerados com o campo magnético alternado (chamado H na Figura 6) gerado de uma fonte de radiofrequência localizada na parte superior da tocha (Guiné, 1998). A resistência dos íons e elétrons a este fluxo de cargas provoca então a formação do plasma (Skoog, 2009).

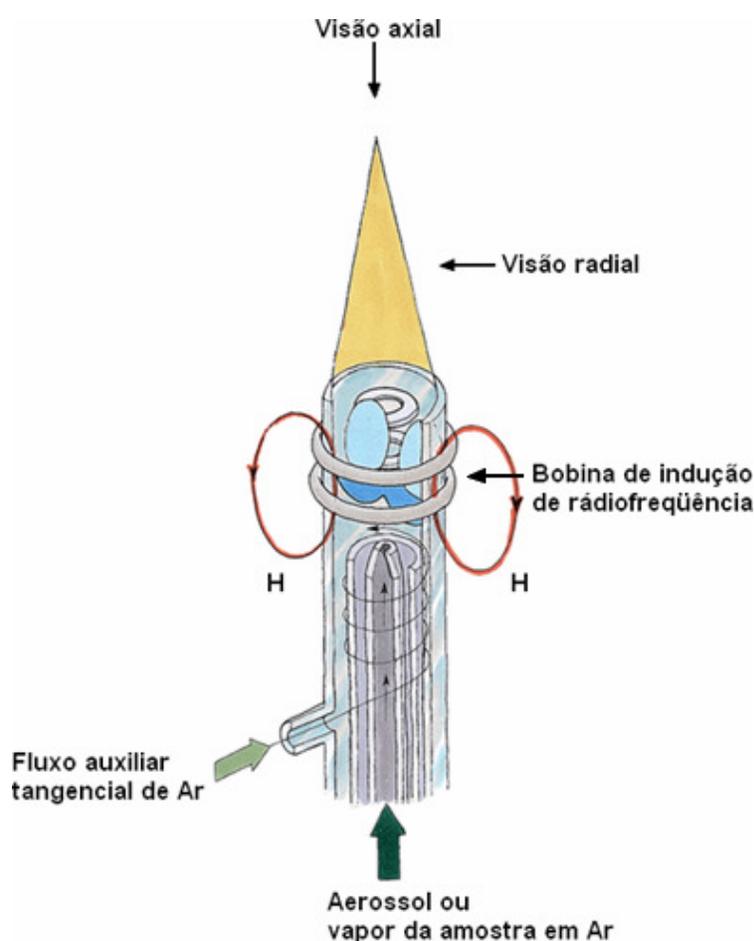


Figura 7. Fonte de plasma indutivamente acoplado (Adaptado de Linde, 2010)

Uma das vantagens mais importantes da técnica ICP OES é resultante das propriedades de excitação da fonte de plasma. Esta fonte pode preencher um grande número de diferentes níveis de energia para diferentes elementos. Todos os átomos e íons excitados podem emitir suas radiações características quase ao mesmo tempo. Isso

resulta em flexibilidade em escolher entre vários comprimentos de onda diferentes para um elemento e na capacidade de medir as emissões de vários elementos diferentes simultaneamente (Boss e Freedon, 1997). Entretanto, este grande número de linhas de emissão embora vantajoso, aumenta a probabilidade de interferências espectrais na análise quantitativa. Consequentemente a espectrometria de emissão óptica baseada em fontes de alta temperatura requer alta resolução (Skoog, 2009).

A região do plasma onde são feitas as medidas das radiações emitidas fica 15 a 20 mm acima da bobina de indução onde a temperatura é de 6.000 a 6.500 K. Nesta região, denominada zona analítica normal (NAZ) a radiação de fundo é livre de linhas de emissão do argônio e pode ser visualizada radialmente ou axialmente (Trevizan e Nobrega, 2007; Skoog, 2009). As visualizações da região analítica do plasma são indicadas na Figura 6 (p. 53). As vantagens da visualização axial sobre a radial, incluem: menores limites de detecção (5 a 10 vezes melhores que aqueles obtidos da visualização radial) e melhora na sensibilidade (devido ao aumento do caminho óptico, que produz mais emissões dos analitos) (Boss e Freedon, 1997). No entanto esse tipo de configuração da tocha pode aumentar interferências espectrais e interferências de matriz (Trevizan e Nobrega, 2007). Além disso, a configuração axial exige a remoção da cauda do plasma do caminho óptico por um tipo de gás (ar comprimido ou nitrogênio), em um ângulo de 90° em relação ao plasma, para evitar os efeitos de auto-absorção e da contaminação sobre a óptica do espectrômetro (Boss e Freedon; Skoog, 2009). A configuração axial é inadequada para análise de amostras contendo matrizes complexas. Porém essa configuração pode ser empregada quando o plasma é robusto (condições otimizadas de potência e vazão do argônio), onde a concentração da matriz não resulta em uma variação significativa no sinal do analito (Dubuisson *et al.*, 1997).

A separação das radiações emitidas pelas espécies excitadas em comprimentos de onda individuais é geralmente feita através de um policromador. A detecção das radiações emitidas pelas espécies é realizada normalmente através de um dispositivo de injeção de carga (CID) ou dispositivo de acoplamento de carga (CCD) (Skoog, 2009). A introdução da amostra líquida no plasma é normalmente realizada através de um nebulizador (Figura 8), que converte a solução líquida da amostra em um aerossol que pode ser transportado para o plasma (Boss e Freedon, 1997). Dentre os nebulizadores disponíveis para a técnica ICP OES, aqueles do tipo pneumático são mais comuns. Neste nebulizador, a solução líquida é introduzida através de um tubo capilar para uma região de vácuo (princípio de Venturi) criada por um gás fluindo rapidamente (Guiné, 1998). A baixa pressão e a alta velocidade do gás combinam-se, então, para quebrar a solução

líquida em um aerossol (Boss e Freedon, 1997). Os pequenos orifícios dos nebulizadores concêntricos permitem melhora na sensibilidade. No entanto podem ocorrer problemas de entupimentos em soluções contendo apenas 2% de sólidos dissolvidos (Boss e Freedon, 1997; Guiné, 1998).

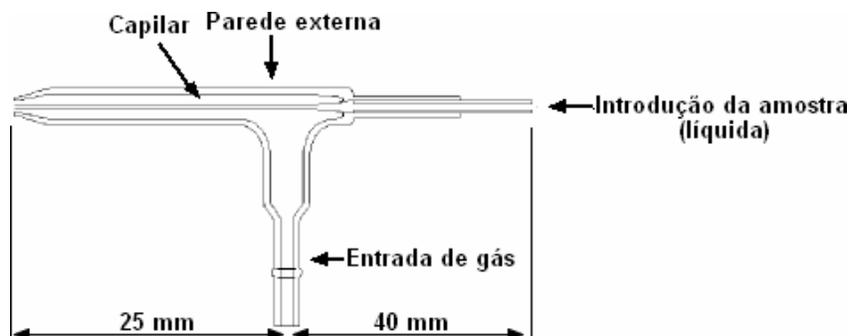


Figura 8. Nebulizador concêntrico (adaptado de Boss e Freedon, 1997)

Uma vez que o aerossol da amostra é criado pelo nebulizador, apenas pequenas gotículas são adequadas para introdução no plasma. Uma câmara de nebulização é colocada entre o nebulizador e da tocha. Nestes dispositivos de seleção do aerossol, as gotículas maiores são condensadas e descartadas e aquelas menores que formam uma nuvem mais homogênea são conduzidas para o plasma (Guiné, 1998). Uma câmara de nebulização típica é mostrada na Figura 9.

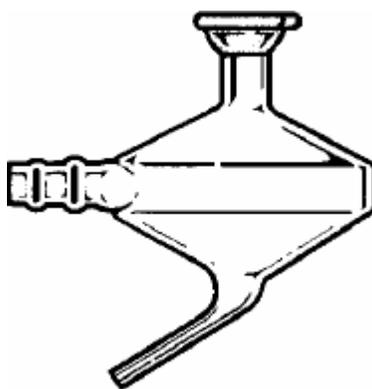


Figura 9. Câmara ciclônica (retirado de folheto informativo da empresa Varian)

Um ICP OES modelo Vista Pro (Varian, Mulgrave, Australia) com a configuração axial foi usado para determinação dos analitos (Figura 10). O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução multi-elementar $5,000 \text{ mg L}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Germany) e teve sua tocha alinhada com uma solução aquosa de $\text{Mg } 5 \text{ mg L}^{-1}$. O policromador foi termostaticado à 34°C e purgado com gás Ar. O programa do espectrômetro fornece as

concentrações dos metais nas amostras em mg L^{-1} , contudo no presente estudo estes valores foram expressos em função do peso seco, através do produto da concentração dos elementos pelo seguinte fator:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Volume final da solução (mL)}}{\text{massa de amostra (g)}}$$

O volume e massa nesse fator dependem do método analítico empregado, onde a unidade final de concentração é expressa por $\mu\text{g g}^{-1}$ que equivale a mg Kg^{-1} ou ppm. A seleção das linhas de emissão dos diversos analitos estudados foi feita através do software da Varian considerando a sensibilidade e possíveis interferências que poderiam surgir a partir de linhas de emissão de outros elementos que são muito próximas do comprimento de onda a ser medido. As condições experimentais utilizadas no estudo são mostradas a seguir, na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros operacionais usados no ICP OES com visão axial

Características	Condições
Sistema óptico	Echelle
Detector de estado sólido CCD	167-785 nm
Potência (W)	1300
Tempo de Leitura (min)	1,0
Replicatas	3,0
Vazão de argônio no plasma (L min^{-1})	15,0
Vazão de argônio no nebulizador (L min^{-1})	0,7
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	1,5
Atraso da aspiração da amostra (s)	30,0
Linhas de emissão (nm)	Al (I) 167,019; As (I) 188,98; Ca (I) 422,673; Cd (I) 214,439; Co (II) 238,992; Cu (I) 324,754; Fe (II) 238,20; K (II) 766,491; Mg (II) 279,553; Mn (II) 257,611; Na (I) 589,592; Ni (I) 230,299; Pb (II) 220,353; Sb (I) 217,582; Se (I) 196,026; Sr (II) 407,771; V (II) 292,401; Zn (I) 213,857

(I) e (II) linha de emissão atômica e iônica respectivamente



Figura 10. ICP OES modelo Vista Pro (retirada do folheto informativo da Varian)

4.7.2 Outros equipamentos empregados

Uma centrífuga, modelo 5804 da marca Eppendorf (Leitfaden, Alemanha) (Figura 11) e um banho de ultrassom modelo VWR 75D da marca Corland (Nova Iorque, EUA) (Figura 12) foram usados para a extração ácida dos metais. As amostras reais foram liofilizadas empregando um liofilizador da marca Thermo Scientific modelo Modulyo D (Nova Iorque, EUA) (Figura 13). Todas as amostras foram pesadas na balança analítica da marca Sartorius Ag (Göttingen, Alemanha) para o início dos estudos de otimização e determinação multi-elementar nos bivalves coletados na BTS. A cominuição das amostras reais foi realizada empregando um moinho de bolas modelo 8000M da Spex Sampleprep (Nova Iorque, EUA) com um recipiente de carbeto de tungstênio e bolas de mesmo material (Figura 14). O forno de microondas com cavidade modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália) foi utilizado para digestão ácida (Figura 15). Além disso, as amostras de bivalves coletadas na Baía de Todos os Santos foram digeridas empregando bombas Parr modelo 4745 (Parr Instrument Company, Illinois, USA) (Figura 16).



Figura 11. Centrífuga modelo 5804 (retirada do folheto informativo da Eppendorf)



Figura 12. Banho de ultrassom modelo VWR 75D (Corland)



Figura 13. Liofilizador Modulyo D (retirada do folheto informativo da Thermo Scientific)



Figura 14. Moinho de bolas 8000M (retirada do folheto informativo da Spex Sampleprep)



Figura 15. Forno de microondas Ethos EZ (retirada do folheto informativo da Milestone)



Figura 16. Bombas de digestão ácida Parr 4745 (Parr Instrument Company)

4.8 Tratamento das amostras coletadas na BTS

No campo, após a coleta manual, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos e mantidas em geladeiras de isopor até a chegada no laboratório, onde foram congeladas. No laboratório, as conchas dos organismos foram lavadas com água Milli-Q[®] e depois foram abertas com o auxílio de facas de aço-inox. Os tecidos moles foram retirados com o auxílio de uma pinça plástica e foram transferidos para copos de vidros descontaminados embalados depois, por filmes plásticos de PVC. As amostras foram então guardadas novamente no congelador até o processo de secagem no liofilizador. Após serem submetidas à liofilização, as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos e devidamente rotuladas. Logo depois, foi realizada a etapa de cominuição das amostras no um moinho de bolas. Para tanto, uma pequena quantidade de amostra foi transferida para o recipiente do moinho e utilizou-se a moagem em ciclos de 2 min. Ao término desse processo, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno. Os recipientes contendo as amostras secas e homogeneizadas foram então armazenados em dessecadores.

4.9 Otimização da extração ácida auxiliada por centrífuga seguida da determinação multi-elementar por ICP OES

A otimização do procedimento de preparo de amostras proposto foi realizada com planejamento de Doehlert de três fatores empregando amostra de material de referência certificado (tecido de ostra, NIST 1566b). A matriz Doehlert é um dos planejamentos experimentais de segunda ordem usados para modelagem e análise de sistemas nos qual a variável de resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis independentes (fatores) e cujo objetivo é otimizar a variável resposta (Barros *et al.* 2003; Teófilo e Ferreira, 2005).

O planejamento Doehlert é definido considerando o número de variáveis e seus valores codificados da matriz experimental (Ferreira *et al.*, 2004). A relação entre os valores reais e os valores codificados é dada por:

$$C_i = \left(\frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \beta$$

Onde C_i é o valor codificado para nível do fator i ; Z_i é valor real e Δz_i é a distância entre o valor real no ponto central e o real no nível superior ou inferior, β é o maior valor limite

codificado na matriz para cada fator e z_i^0 é o valor real no ponto central.

Neste planejamento o número total de experimentos (N) é igual a $N = k^2 + k + p.c.$, em que k é o número de fatores e $p.c.$ o número de experimentos no ponto central (Teófilo e Ferreira, 2005). Na matriz Doehlert de três fatores o domínio experimental é um planejamento constituído de 13 pontos uniformemente distribuídos na forma de um cuboctaedro (Figura 17) (Cataldi *et al.*, 2007). A função quadrática de um sistema com três variáveis independentes é dada por:

$$R = a + b(A) + c(B) + d(C) + e(A)^2 + f(B)^2 + g(C)^2 + h(A)(B) + i(A)(C) + j(B)(C)$$

Onde R é a resposta analítica e a é o termo constante, b , c e d são coeficientes do termo linear, e , f e g são coeficientes dos termos quadráticos e h , i , j coeficientes da interação entre os fatores (Ferreira *et al.*, 2004).

Uma vantagem deste planejamento em relação às outras metodologias de superfície de resposta é o seu alto valor de eficiência (ϕ), que é determinado pela divisão dos números de coeficientes da função quadrática (p) pelo o número de experimentos (N) (Santos *et al.*, 2003). De uma forma geral a matriz Doehlert é mais eficiente que o planejamento composto central e o planejamento Box-Behnken para a maioria dos valores de k (número de fatores) (Ferreira *et al.* 2004). Além disso, o planejamento Doehlert permite avaliar as variáveis consideradas mais importantes, isto é, aquelas que apresentam efeitos significativos mais pronunciados em um número maior de níveis (Teófilo e Ferreira, 2005).

Para este estudo os fatores estudados foram: concentração da mistura ácida (HCl + HNO₃ + H₃CCOOH), tempo de centrifugação e velocidade de rotação. O tempo de centrifugação foi avaliado em 7 níveis; a concentração da mistura ácida em 3 níveis e a velocidade de rotação foi estudada em 5 níveis (Tabela 7). Como resposta analítica foi considerada a eficiência de extração ou recuperação em percentual, ou seja, a quantidade de metal passível de ser quantificada. A fórmula da recuperação é dada a seguir:

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{\text{Concentração do analito encontrada no MRC}}{\text{Concentração real do analito no MRC}} \times 100$$

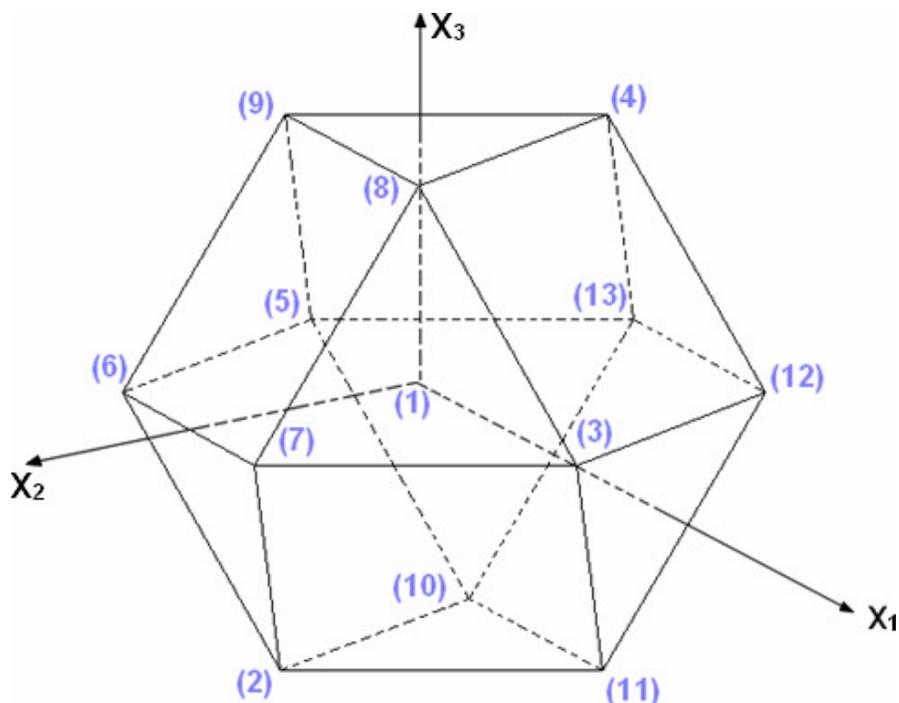


Figura 17. Cuboctaedro mostrando a localização de 13 experimentos para três tipos de fatores codificados (p.ex., X_1 , X_2 e X_3) (figura criada no programa Poly 1.1[®] adaptada com programa Photofiltre 6.4[®])

Tabela 7. Matriz Doehlert (3, 5, 7) com os fatores nos seus valores reais e codificados

Experimento	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Concentração (mol L ⁻¹)
1 (P.C.)	8000 (0)	25 (0)	2,0 (0)
2	10000 (1)	25 (0)	2,0 (0)
3	9000 (0,5)	40 (0,866)	2,0 (0)
4	9000 (0,5)	30 (0,289)	3,0 (0,817)
5	6000 (-1)	25 (0)	2,0 (0)
6	7000 (-0,5)	10 (-0,866)	2,0 (0)
7	7000 (-0,5)	20 (-0,289)	1,0 (-0,817)
8	9000 (0,5)	10 (-0,866)	2,0 (0)
9	9000 (0,5)	20 (-0,289)	1,0 (-0,817)
10	7000 (-0,5)	40 (0,866)	2,0 (0)
11	8000 (0)	35 (0,577)	1,0 (-0,817)
12	7000 (-0,5)	30 (0,289)	1,0 (0,817)
13	8000 (0)	15 (-0,577)	3,0 (0,817)

Obs: todos os experimentos realizados em duplicata; P.C. = ponto central (triplicata)

Para avaliar o comportamento dos metais em conjunto foi empregada uma recuperação normalizada conhecida como resposta múltipla. Logo, os valores obtidos de

recuperação para cada metal foram divididos pelo valor máximo correspondente a cada um deles.

$$R.M. = \frac{(R\% \text{ de A no ensaio } x)}{(\text{maior R\% de A em todos os ensaios})} + \frac{(R\% \text{ de B no ensaio } x)}{(\text{maior R\% de B em todos os ensaios})} + \dots$$

Onde R% é a recuperação em percentual, x é o número do ensaio e A e B são exemplos de elementos.

No início dos estudos de otimização, foram pesadas aproximadamente 250 mg de amostras do tecido de ostra certificado (NIST 1566b) diretamente em tubos de polipropileno (volume 50,0 ml). Logo em seguida, foram adicionados aproximadamente 10,0 ml da mistura ácida HNO₃, HCl e CH₃COOH na proporção de 1/3 (3,33 ml de cada ácido). Foram realizados 12 experimentos em duplicata e 3 replicatas no ponto central. A ordem dos experimentos foi aleatória, que segundo Barros *et al.* (2003) serve para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, ou seja, impedir que desvios atípicos estejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis. Os brancos foram tratados da mesma forma que as amostras de MRC e suas medidas analíticas foram realizadas em duplicata para cada condição ácida (1, 2, 3 mol L⁻¹). Posteriormente, as amostras foram levadas para determinação multi-elementar no ICP OES. A curva analítica de calibração do método em processo de desenvolvimento foi construída com a acidez de 2,0 mol L⁻¹ partindo das soluções dos ácidos concentrados. Dessa forma, foram utilizados aproximadamente 0,6, 0,5 e 0,4 ml de HCl, HNO₃ e CH₃COOH, respectivamente, na proporção de 1/3 de cada ácido, para obtenção dos padrões aquosos com volumes de 10,0 ml.

Após a análise, as recuperações dos analitos foram processadas no *software* STATISTICA 6.0[®] no módulo “Experimental Design – Central Composite” para concluir o planejamento experimental Doehlert. Para verificar se os modelos matemáticos dos elementos estudados obtidos com o planejamento de Doehlert possuíam pontos críticos máximos (regiões máximas) dentro do domínio experimental, empregou-se o critério de Lagrange. Segundo Ferreira *et al.* (2004), o critério de Lagrange permite identificar os pontos críticos, baseado no determinante de Hessian da equação de segundo grau. Quando o modelo matemático de um sistema de três fatores possui apenas um único ponto estacionário (A₀, B₀, C₀) quatro situações são possíveis:

1. Não existe nenhuma informação: $\Delta_2 = 0$
2. Máximo relativo: $\Delta_1 < 0; \Delta_2 > 0; \Delta_3 < 0$
3. Mínimo relativo: $\Delta_1 > 0; \Delta_2 > 0; \Delta_3 > 0$
4. Ponto de sela. Nenhuma das situações acima.

Onde:

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 A} \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 A} & \frac{\partial R}{\partial A \partial B} \\ \frac{\partial R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 B} \end{pmatrix} \quad \Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 A} & \frac{\partial R}{\partial A \partial B} & \frac{\partial R}{\partial A \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial B \partial A} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 B} & \frac{\partial R}{\partial B \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial A} & \frac{\partial R}{\partial C \partial B} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix}$$

4.10 Validação de método

A validação de métodos analíticos comprova através de evidências objetivas que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos (ABNT, 2001). Este processo determina o desempenho característico de um método partindo da avaliação de parâmetros analíticos conhecidos como figuras de mérito. No presente estudo, o método proposto para determinação de elementos maiores e traço em moluscos bivalves (extração ácida com centrifuga e ultrassom, seguida da detecção por ICP OES) foi validado através da avaliação da precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção. Cada um desses parâmetros será descrito mais adiante.

4.10.1 Precisão

Esse parâmetro é normalmente expresso como o desvio-padrão relativo de diversas medidas (Skoog, 2009). A fórmula empregada para o seu cálculo é a seguinte:

$$\text{RSD}(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Onde s é o desvio padrão das medidas e \bar{X} é o valor médio delas. Segundo Ribani *et al.* (2004) o critério de aceitação da precisão depende muito do tipo da análise. Estes autores citam que métodos que quantificam compostos em macro quantidades têm valores de RSD aceitos até 1 a 2% e métodos que quantificam elementos traços tem valores de RSD aceitos até 20%. A precisão do método analítico proposto foi estabelecida através do teste de repetitividade. Nesse estudo foram efetuadas 10 medidas independentes de

amostras de tecido de ostra certificado (NIST 1566b) para obtenção dos valores de RSD em percentual.

4.10.2 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre resultados individuais encontrados em um determinado ensaio com um valor de referência (INMETRO, 2003). Segundo Gonzáles *et al.* (1999) um dos métodos principais, propostos para o estudo da exatidão é o uso de material de referência certificado (MRC). A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto com os resultados alcançados por um método analíticos padrão nas mesmas faixas de concentração que se pretende realizar a validação (Ribani *et al.*, 2004).

A exatidão do método analítico proposto com o procedimento de extração ácida sob condições otimizadas foi confirmada através de 10 medidas independentes do tecido de ostra certificado (NIST 1566b). Após a obtenção dos resultados de concentração dos analitos foi realizado o teste de desvio de medidas analíticas recomendado pela NIST que avalia a exatidão dos métodos químicos. Este teste consiste em fazer uma série de medidas e comparar o valor médio com o valor certificado do material de referência. Se o valor medido não diferir significativamente do valor certificado ($p > 0,05$), pode-se concluir que os dados não estão distorcidos (NIST, 1992). Este teste calcula os seguintes parâmetros para um dado analito:

$$\Delta = \bar{X} - X_0$$

$$\Delta_c = t_{[\alpha; (n-1)]} \frac{s}{\sqrt{n}} + U$$

Onde Δ é a estimativa do desvio, que expressa a variação do dado medido em relação ao valor de referência; \bar{X} é a média das concentrações do analito obtidas; X_0 é concentração do analito certificada; Δ_c valor crítico; $t_{[\alpha; (n-1)]}$ é o valor da distribuição t de Student a um nível α de significância em $(n - 1)$ graus de liberdade; s é o desvio padrão da concentração do analito obtida; n é o número de medidas independentes do MRC e U a incerteza do analito no MRC calculada pela NIST. Caso $|\Delta| < \Delta_c$ o resultado para aquele analito é aceitável, isto é não há desvio detectado no nível de significância de 0,05.

Além disso, foram selecionadas as amostras de sete localidades de estudo (estações nº. 1, 2, 3, 4, 5, 11 e 13), para estudar a exatidão com a comparação dos resultados obtidos das concentrações dos metais com os valores de concentração encontrados em métodos analíticos com digestão ácida (digestão ácida com microondas com cavidade e digestão ácida com bombas Parr).

4.10.3 Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) é uma estimativa teórica da concentração mínima que pode ser detectada por um instrumento analítico para um dado analito em um nível de confiança específico. Esse limite depende da razão da magnitude do sinal analítico em relação à grandeza da flutuação estatística do sinal do branco (Rousseau, 2001; Skoog, 2009). Para o cálculo do limite de detecção em ICP OES é apropriado usar o parâmetro BEC, que é definido como a concentração requerida de um analito para produzir a mesma intensidade de sinal como do fundo (“background”) em um dado comprimento de onda (Schiavo *et al.*, 2009). Este parâmetro é considerado uma avaliação mais realística da detecção do analito em matrizes de amostras reais (principalmente em matrizes complexas), porque ele dá a indicação do nível de fundo definido como um valor de concentração (Thomsen, 2000). Além disso, a incorporação dos valores do BEC no cálculo do LOD permite uma avaliação de qualquer mudança nas condições operacionais (Schiavo *et al.*, 2009). A concentração equivalente de fundo (BEC) é calculada da seguinte maneira:

$$BEC = \frac{I_{\text{branco}}}{m}$$

Onde I_{branco} é a intensidade de emissão da solução de branco e m o coeficiente angular da curva de calibração. A equação empregada para o cálculo do LOD com o BEC é:

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times RSD_{\text{branco}}}{100}$$

No qual o RSD_{branco} é o desvio padrão relativo de 10 medidas da solução do branco.

4.10.4 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que

pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas. Normalmente é o ponto mais baixo da curva de calibração, excluindo o branco (Mermet, 2008). A determinação do LOQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa (Ribani *et al.* 2004). Nesse estudo, o limite de quantificação foi calculado através de uma fórmula semelhante a do Limite de detecção, ou seja:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{branco}}}{100}$$

4.11 Avaliação do uso do ultrassom na extração ácida empregando ácidos diluídos e centrifugação

O possível efeito que a radiação ultrassom teria sobre a extração ácida foi avaliado. Para tanto, aplicou-se 15 minutos de sonicação nas alíquotas de tecido de ostra certificado (NIST 1566b) no meio ácido com a concentração otimizada em um banho de ultrassom à temperatura ambiente. Após a sonicação, o líquido sobrenadante foi separado da fase sólida por centrifugação nas condições otimizadas de rotação e tempo de centrifugação. Em seguida, o líquido foi transferido para outro tubo de centrifuga de 15,0 ml para análise em ICP OES. Os brancos do procedimento foram preparados da mesma maneira. Esse experimento teve sua curva analítica construída com base no valor otimizado de concentração da mistura ácida.

Os resultados obtidos das 10 medidas independentes de MRC empregando o procedimento de extração ácida com uso da centrífuga e extração ácida com uso da centrífuga e ultrassom, ambos sob condições otimizadas, foram comparados usando o teste t de Student pareado, executado através do *software* STATISTICA 6.0[®] no módulo “Basic_Statistics/Tables – t-test dependent samples”. Magnusson e Mourão (2003) demonstram que o teste t de Student pareado (ou teste t para amostras dependentes) é usado para comparar a diferença média entre duas populações estatísticas ($\mu_{\text{Diferença}}$), onde cada observação (medida) da primeira população é pareada com uma observação da segunda população. Segundo Pátaro e Borgatto (2005) essa comparação é expressa pela seguinte fórmula:

$$t_{cal} = \left| \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\frac{sd}{\sqrt{n}}} \right| \sim t[\alpha; (n-1)]$$

Onde, $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ é a diferença das médias das medidas das populações estatísticas, n é o tamanho da população, $t[\alpha; (n-1)]$ é o valor tabelado (ou crítico), a um nível α de significância e $(n - 1)$ o grau de liberdade. O parâmetro sd é o desvio padrão dos desvios, ou seja, o desvio das diferenças entre as medidas das populações. A Tabela 8 mostra um exemplo da aplicação do teste t de Student pareado em duas populações estatísticas.

Tabela 8. Exemplo de aplicação de teste t de Student pareado

População estatística 1	População estatística 2
a1	b1
a2	b2
a3	b3

Obs. a e b são medidas

Assim, considerando a fórmula do teste t de Student pareado (t_{cal}), os parâmetros \bar{X}_1 , \bar{X}_2 e sd seriam calculados com as seguintes fórmulas:

$$\bar{X}_1 = \frac{a1+a2+a3}{3} \quad \bar{X}_2 = \frac{b1+b2+b3}{3} \quad sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 [(ai-bi) - (\bar{a}-\bar{b})]^2}{n-1}}$$

Onde:

$$\bar{(a-b)} = \frac{(a1-b1) + (a2-b2) + (a3-b3)}{3}$$

Se $t_{cal} > t_{tab}$ (valor de t calculado > valor de t tabelado) considera-se a diferença entre as médias populações como significativa. Em termos de valor de p (probabilidade) as hipóteses a serem testadas nesse teste são:

$H_0 : \mu_{Diferença} = 0$ (hipótese nula)

$H_A : \mu_{Diferença} \neq 0$ (hipótese alternativa)

Caso o valor de p seja menor que um determinado nível de significância (α) a

diferença estatística entre as médias populacionais (as medidas dos métodos analíticos) é estatisticamente diferente de zero, ou seja, a hipótese nula é rejeitada. Neste caso, no nível de significância estudado na comparação dos resultados obtidos do ICP OES com as extrações ácidas (centrífuga vs centrífuga + ultrassom), $\alpha = 0,05$, existiria menos que uma chance em 20 de que a diferença entre os dois métodos analíticos não exista.

4.12 Procedimentos de digestão ácida seguidos da determinação multi-elementar em ICP OES

4.12.1 Digestão ácida assistida por radiação microondas

O método foi aplicado para análise de amostras de sete áreas de estudo da BTS (estações nº. 1, 2, 3, 4, 5,11 e 13) com a finalidade de confirmar a exatidão do método analítico proposto. As comparações dos resultados de concentração dos analitos nas amostras com os dois métodos foram realizadas através do teste t de Student pareado, executado no STATISTICA 6.0®.

Para iniciar o procedimento de digestão ácida, foi pesada aproximadamente 250 mg de amostra (material certificado ou mariscos) nos recipientes de digestão TFM e foram adicionados 7,0 ml de HNO₃ concentrado, 1,0 ml de H₂O₂. Em seguida, os recipientes com mecanismo de alívio de pressão foram fechados e inseridos no rotor para a digestão. Cada amostra foi digerida em triplicata.

Ao término da digestão, os frascos foram retirados do forno de microondas e mantidos à temperatura ambiente para resfriamento. Após essa etapa, as amostras digeridas, incluindo o branco, foram transferidas para tubos plásticos e diluídos para 25,0 ml com água ultra-pura.

Para a determinação da acidez final dos digeridos, uma alíquota de 100 µl foi tomada e titulada com uma solução de NaOH 0,09972 mol L⁻¹, usando solução de fenolftaleína (1,0% m/v em etanol) como indicador. Os padrões da curva analítica de calibração foram preparados com a mesma concentração ácida dos digeridos. O programa de aquecimento do forno de microondas, pré-estabelecido para esse tipo de amostra é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Programa de aquecimento do forno de microondas com cavidade (Ethos EZ) com frascos fechados

Estágio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (W)	Descrição
1	4	90	1000	Pré-aquecimento
2	2	90	1000	Aquecimento
3	6	180	1000	Aquecimento
4	15	180	1000	Aquecimento
5	10	25	0	Resfriamento

4.12.2 Digestão ácida com bombas Parr

Simultaneamente ao desenvolvimento da extração ácida de elementos maiores e traço em bivalves, a digestão ácida por bombas Parr estava sendo empregada no preparo de amostras coletadas na Baía de Todos os Santos para a determinação de diversos elementos (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn) em ICP OES. Os elementos que tiveram recuperações acima de 90% no tecido de ostra certificado (NIST 1566b) foram utilizados nesse estudo. As bombas Parr compõem-se de sete peças para montagem: Disco do fundo, mola, corpo, tampa de rosca, placa de pressão superior e inferior e copo de PTFE (Poli-tetra-fluor-etileno). A Figura 18 mostra cada uma dessas peças.

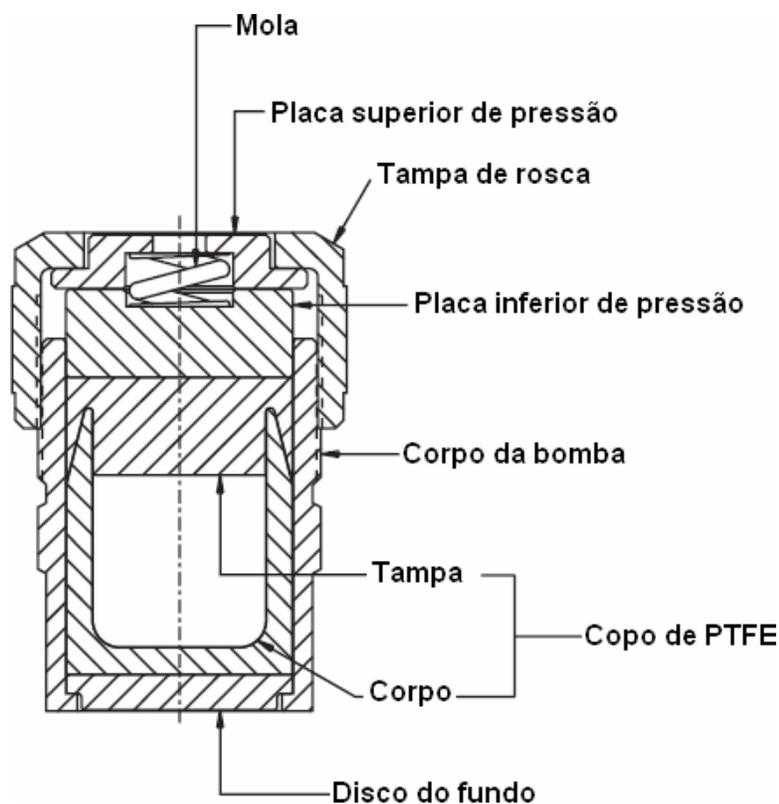


Figura 18. Peças da bomba de digestão ácida Parr (adaptado do manual da Parr Instrument Company)

Após a montagem do cilindro metálico (disco e corpo), a amostra (~0,25 g) e o ácido HNO₃ concentrado (2,0 ml) foram colocados no copo de PTFE. Em seguida, adicionou-se 2,0 ml de água Milli-Q e fechou-se o copo empurrando a tampa firmemente para baixo, com movimento de torção. O copo foi inserido no cilindro metálico, seguido da placa inferior de pressão, mola e placa superior de pressão. Logo depois, a tampa de rosca foi firmemente apertada. Já fechadas, as bombas foram levadas para uma estufa ventilada (Nova Ética, modelo 400/D) a uma temperatura de 120° C por 16h. Cada amostra foi digerida em triplicata.

Após o procedimento de decomposição, as bombas foram resfriadas por aproximadamente 20 min e cuidadosamente abertas em uma capela. A solução final foi avolumada para 20,0 ml com água Mill-Q para posterior determinação dos analitos por ICP OES. Os brancos foram tratados da mesma maneira. Para a determinação da acidez final dos digeridos, uma alíquota de 100 µL foi tomada e titulada com uma solução de NaOH 0,09972 mol L⁻¹, usando solução de fenolftaleína (1,0% m/v em etanol) como indicador. Os padrões da curva analítica de calibração foram preparados com a mesma concentração ácida dos digeridos.

Os dados de concentração obtidos foram comparados com as concentrações máximas permitidas pelas resoluções brasileiras (ANVISA 1965; 1998) e pelas agências especializadas em saúde de outros países (JECFA, FNB, UK EVM e ANFZA). Para realizar essa comparação, as concentrações dos analitos encontradas neste trabalho em peso seco foram convertidas para peso úmido, que é usado para expressar os limites máximos permitidos de contaminantes inorgânicos em alimentos pelas agências reguladoras. Essa forma de concentração é adotada principalmente para caracterizar a forma de ingestão dos alimentos. A conversão foi feita multiplicando o valor obtido em peso seco por um fator baseado no teor de água presente nos tecidos moles dos moluscos. Esse fator de conversão é calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{Fator (peso seco para peso úmido)} = \left(\frac{100 - P_{\text{água}}}{100} \right)$$

Onde $P_{\text{água}}$ é a percentagem de água no molusco bivalve. Segundo dados da literatura o fator de conversão para as espécies *Crassostrea rhizophorae*, *Mytella guyanensis* e *Anomalocardia brasiliiana* é 0,15, que corresponde aproximadamente a 85% de água nos tecidos moles desses bivalves (Silva *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2005).

5. Resultados e discussão

5.1 Otimização da extração ácida empregando ácidos diluídos e centrifugação

Os resultados dos ensaios do planejamento de Doehlert demonstraram que os elementos maiores (Ca, K, Mg e Na) e os metais traço (Cd, Cu, Mn, Sr e Zn) presentes no MRC (tecido de ostra, NST 1566b) foram os elementos possíveis de serem quantificados. Os elementos Al, As, Ba, Co, Ni, Fe, Pb, Sb, Se e V não foram recuperados nas condições experimentais estudadas. A matriz Doehlert com os valores reais e codificados das variáveis e as recuperações de Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn obtidas se encontram na Tabela 10.

Tabela 10. Matriz Doehlert da extração ácida com centrífuga empregando tecido de ostra certificado NIST 1566b.

Ensaio	V.R.	Tempo	Conc.	Recuperação dos analitos em MRC (%)									
				Ca	Cd	Cu	K	Mg	Mn	Na	Sr	Zn	R.M.
1	8000	25	2,0	80,9	41,0	63,9	91,8	89,5	67,8	83,0	70,8	79,8	8,0
2	10000	25	2,0	87,6	45,8	69,6	95,7	95,1	73,4	86,8	77,1	84,9	8,63
3	9000	40	2,0	65,0	23,4	47,4	85,2	75,5	52,4	75,8	56,0	66,8	6,45
4	9000	30	3,0	81,8	42,7	68,1	92,3	92,2	69,3	84,3	69,5	81,5	8,21
5	6000	25	2,0	82,5	42,4	66,5	92,3	90,4	69,4	83,6	72,2	80,8	8,19
6	7000	10	2,0	52,4	14,5	39,8	72,1	64,0	43,7	65,0	47,3	57,5	5,34
7	7000	20	1,0	88,9	47,3	66,1	98,2	94,9	73,2	88,6	78,9	86,5	8,70
8	9000	10	2,0	79,6	39,7	64,0	89,9	88,7	67,6	81,9	69,1	79,2	7,93
9	9000	20	1,0	90,9	50,8	68,9	99,6	97,1	76,0	90,5	84,2	88,7	9,02
10	7000	40	2,0	84,4	44,9	69,7	95,1	93,9	72,6	86,6	72,5	84,4	8,49
11	8000	35	1,0	89,8	46,5	65,6	100,2	95,0	73,4	90,0	82,9	86,5	8,78
12	7000	30	1,0	79,5	41,7	65,0	89,9	88,9	67,0	80,7	68,8	78,3	7,95
13	8000	15	3,0	73,3	35,6	61,1	86,8	85,6	62,7	79,7	62,6	75,8	7,46

Onde: V.R = velocidade de rotação, Conc.=concentração da mistura ácida

Na Tabela 11 são mostrados os modelos matemáticos obtidos com os dados processados no STATISTICA 6.0®.

Tabela 11. Resultados dos elementos individuais e da resposta múltipla obtidos com o planejamento Doehlert

Analitos	Modelos matemáticos	R ²
Ca	$R = 32,99 + 9,20t - 3,71 \times 10^{-3} VR - 55,47 C - 0,05 t^2 + 10,38 \times 10^{-7} VR^2 + 5,03 C^2 - 77,42 \times 10^{-5} VRt - 0,08 Ct + 3,93 \times 10^{-3} CVR$	0,845
Cd	$R = 28,34 + 8,90 t + 0,02 VR - 50,76 C - 0,05 t^2 + 7,63 \times 10^{-7} VR^2 + 5,09 C^2 - 7,83 \times 10^{-4} VRt + 0,07 Ct + 0,03 CVR$	0,863
Cu	$R = 13,03 + 8,64 t - 4,15 \times 10^{-3} VR - 45,37 C - 0,04 t^2 + 1,03 \times 10^{-6} VR^2 + 3,36 C^2 - 77,58 \times 10^{-5} VRt - 0,04 Ct + 0,04 CVR$	0,821
Mg	$R = 35,53 + 8,33 t - 1,28 \times 10^{-3} VR - 50,02 C - 0,04 t^2 + 8,04 \times 10^{-7} VR^2 + 4,38 C^2 - 71,99 \times 10^{-5} VRt - 0,08 Ct + 3,88 \times 10^{-3} CVR$	0,834
Mn	$R = 16,41 + 8,34 t - 2,72 \times 10^{-3} VR - 47,05 C - 0,04 t^2 + 9,06 \times 10^{-7} VR^2 + 4,02 C^2 - 7,35 \times 10^{-4} VRt - 0,06 Ct + 0,04 CVR$	0,844
Na	$R = 56,88 + 5,04 t - 1,92 \times 10^{-3} VR - 38,22 C - 0,03 t^2 + 5,71 \times 10^{-7} VR^2 + 3,67 C^2 - 4,63 \times 10^{-4} VRt - 0,10 Ct + 27,42 \times 10^{-4} CVR$	0,845
Sr	$R = 21,80 + 7,91 t - 20,63 \times 10^{-4} VR - 42,10 C - 0,05 t^2 + 9,56 \times 10^{-7} VR^2 + 5,38 C^2 - 63,83 \times 10^{-5} VRt - 0,12 Ct + 20,17 \times 10^{-4} CVR$	0,834
Zn	$R = 40,41 + 7,49 t - 19,56 \times 10^{-4} VR - 48,93 C - 0,04 t^2 + 7,69 \times 10^{-7} VR^2 + 4,49 C^2 - 65,33 \times 10^{-5} VRt - 0,07 Ct + 35,42 \times 10^{-4} CVR$	0,835
R.M.	$R = 3,0 + 69,97 \times 10^{-2} t - 0,21 \times 10^{-3} VR - 4,15 C - 37,07 \times 10^{-4} t^2 + 7,61 \times 10^{-8} VR^2 + 0,39 C^2 - 5,99 \times 10^{-5} VRt + 2,99 \times 10^{-4} CVR - 6,92 \times 10^{-3} Ct$	0,845

Onde: T= tempo de centrifugação; VR= velocidade de rotação da centrifuga; C= concentração da mistura ácida

Os modelos apresentados na Tabela 11 explicam a percentagem de variação total das respostas observadas. Para o cálcio, por exemplo, o seu modelo explica 84,5% da variação total e o restante fica por conta dos resíduos. Com a obtenção das equações que relacionam a percentagem de recuperação com as variáveis que afetam o sistema, pode-se aplicar o critério de Lagrange. A seguir será mostrado esse procedimento matemático sendo aplicado em todas as funções quadráticas obtidas para determinar a natureza dos pontos estacionários em cada elemento e na resposta múltipla.

Para o modelo matemático do cálcio representado na Tabela 11, a aplicação do critério de Lagrange fornece os seguintes valores dos determinantes:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 9,20 - 0,103t - 77,42 \times 10^{-5} VR - 0,08C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -3,71 \times 10^{-3} + 20,75 \cdot 10^{-7} VR - 77,42 \times 10^{-5} t + 3,93 \times 10^{-3} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -55,47 + 10,06C - 0,08t + 3,93 \times 10^{-3} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -77,42 \times 10^{-5}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,08$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 3,93 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 20,76 \times 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 10,06$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10 < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = 3,86 \times 10^{-7} > 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = 5,46 \times 10^{-6} > 0$$

Portanto essa função possui ponto estacionário de sela. Para a função quadrática do cádmio mostrada na Tabela 11 (p.71) a aplicação do critério de Lagrange mostra os seguintes determinantes:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 8,90 - 0,10t - 7,83 \times 10^{-4} VR + 0,07C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = 0,02 + 15,26 \times 10^{-7} VR - 7,83 \times 10^{-5} t + 0,03C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -50,79 + 10,18C + 0,07t + 0,03VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -7,83 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = 0,07$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 0,03$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 15,26 \times 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 10,18$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10 < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -7,64 \times 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = 9,47 \times 10^{-5} > 0$$

Assim essa função possui ponto de sela e não máximos ou mínimos relativos. Aplicando o critério de Lagrange na função quadrática do cobre representada na Tabela 11 (p.71), são obtidas as seguintes derivadas parciais e matrizes:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 8,64 - 0,08t - 77,58 \times 10^{-5} VR - 0,04C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -4,15 \times 10^{-3} + 2,06 \times 10^{-6} VR - 77,58 \times 10^{-5} t + 0,04C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -45,37 + 6,72C - 0,04t + 0,04VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -7,83 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,04$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 0,04$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 2,06 \times 10^{-6}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 6,72$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08 < 0$$

$$\Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -7,78 \times 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = 1,25 \times 10^{-4} > 0$$

Logo a função quadrática do cobre, também possui ponto de sela. Para o modelo matemático do magnésio representado na Tabela 11 (p.71) são obtidas as seguintes derivadas parciais e matrizes com a aplicação do critério de Lagrange:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 8,33 - 0,08t - 71,99 \times 10^{-5} VR - 0,08C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -1,28 \times 10^{-3} + 16,09 \times 10^{-7} VR - 71,99 \times 10^{-5} t + 3,88 \times 10^{-3} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -50,02 + 8,76C - 0,08t + 3,88 \times 10^{-3} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -71,99 \times 10^{-5}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,08$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 3,88 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 16,08 \cdot 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 8,76$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08 < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -6,59 \cdot 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -4,05 \cdot 10^{-6} < 0$$

Portanto essa função também possui ponto de sela. Aplicando o critério de Lagrange na função quadrática do manganês representada na Tabela 11 (p.71), os determinantes obtidos são:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 8,34 - 0,08t + 7,35 \cdot 10^{-4} VR - 0,06C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -2,72 \cdot 10^{-3} + 18,13 \cdot 10^{-7} VR - 7,35 \cdot 10^{-4} t + 0,04C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -47,05 + 8,03C - 0,06t + 0,04VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = 7,35 \cdot 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,06$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 0,04$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 18,12 \cdot 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 8,04$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,08 < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -6,96 \times 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -4,80 \times 10^{-6} < 0$$

Assim, os determinantes indicam que função quadrática do manganês também possui ponto de sela. Aplicando o critério de Lagrange na função quadrática do sódio representada na Tabela 11 (p.71), são obtidos os seguintes determinantes:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 5,04 - 55,22 \times 10^{-3} t - 4,63 \times 10^{-4} VR - 0,10 C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -1,92 \times 10^{-3} + 11,42 \cdot 10^{-7} VR - 4,63 \times 10^{-4} t + 27,42 \times 10^{-4} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -38,22 + 7,34 C - 0,10 t + 27,42 \times 10^{-4} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -4,63 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,10$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 27,42 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -55,22 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 11,42 \cdot 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 7,34$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -55,22 \times 10^{-3} < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -2,15 \times 10^{-5} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -1,38 \times 10^{-6} < 0$$

Os determinantes da função quadrática do sódio também indicam ponto de sela. Já para o estrôncio, com a aplicação do critério de Lagrange no seu modelo matemático mostrado na Tabela 11 (p.71), os seguintes determinantes são encontrados:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 7,91 - 0,10t - 63,83 \times 10^{-5} VR - 0,12C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -20,63 \times 10^{-4} + 19,13 \times 10^{-7} VR - 63,83 \times 10^{-5} t + 20,17 \times 10^{-4} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -42,10 + 10,76C - 0,12t + 20,17 \times 10^{-4} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -63,83 \times 10^{-5}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -0,12$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 20,17 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 19,13 \times 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 10,76$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -0,10 < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -5,87 \times 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -5,65 \times 10^{-8} < 0$$

A função quadrática do estrôncio obtida também mostra ponto de sela, através dos valores dos determinantes. Usando o critério de Lagrange na função quadrática do zinco, mostrada na Tabela 11 (p.71), os seguintes determinantes são obtidos:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 7,49 - 76,61 \times 10^{-3} t - 65,33 \times 10^{-5} VR - 69,44 \times 10^{-3} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -19,56 \times 10^{-4} + 15,38 \times 10^{-7} VR - 65,33 \times 10^{-5} t + 35,42 \times 10^{-4} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -48,93 + 8,98 C - 69,44 \times 10^{-3} t + 35,42 \times 10^{-4} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -65,33 \times 10^{-5}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -69,44 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 35,42 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -76,61 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 15,38 \times 10^{-7}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 8,98$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -76,61 \times 10^{-3} < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -5,45 \times 10^{-7} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial t^2} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -3,61 \times 10^{-6} < 0$$

Esses resultados mostram que a função quadrática do zinco obtida com o planejamento de Doehlert de três fatores não possui nem pontos máximos nem mínimos relativos. Para o modelo matemático da resposta múltipla representado na Tabela 11 (p.71) os seguintes determinantes com a aplicação do critério de Lagrange são encontrados:

$$\frac{\partial R}{\partial t} = 69,97 \times 10^{-3} - 74,15 \times 10^{-3} t - 5,99 \times 10^{-5} VR - 6,92 \times 10^{-3} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR} = -0,21 \times 10^{-3} + 15,23 \times 10^{-8} VR - 5,99 \times 10^{-5} t + 2,99 \times 10^{-4} C$$

$$\frac{\partial R}{\partial C} = -4,15 + 0,78 C - 6,92 \times 10^{-3} t + 2,99 \times 10^{-4} VR$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial VR} = -5,99 \times 10^{-5}$$

$$\frac{\partial R}{\partial t \partial C} = -6,92 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R}{\partial VR \partial C} = 2,99 \times 10^{-4}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -74,15 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} = 15,23 \times 10^{-8}$$

$$\frac{\partial R^2}{\partial^2 C} = 0,78$$

$$\Delta_1 = \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} = -74,15 \times 10^{-3} < 0 \quad \Delta_2 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} \end{pmatrix} = -1,49 \times 10^{-8} < 0$$

$$\Delta_3 = \begin{pmatrix} \frac{\partial R^2}{\partial^2 t} & \frac{\partial R}{\partial t \partial VR} & \frac{\partial R}{\partial t \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial VR \partial t} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 VR} & \frac{\partial R}{\partial VR \partial C} \\ \frac{\partial R}{\partial C \partial t} & \frac{\partial R}{\partial C \partial VR} & \frac{\partial R^2}{\partial^2 C} \end{pmatrix} = -4,57 \times 10^{-9} < 0$$

Portanto, o critério de Lagrange demonstrou que as superfícies de resposta de todas as recuperações dos analitos e da resposta múltipla possuem um ponto (níveis críticos) máximo incluso no domínio experimental, mas pontos estacionários de sela, onde há máximo de um fator independente, e mínimo de outro.

Uma forma de estabelecer as condições experimentais aproximadas de otimização sem realizar outro planejamento é avaliar as superfícies de contorno das respostas analíticas (recuperação dos elementos e resposta múltipla) e empregar um teste de robustez. As superfícies de contorno da resposta múltipla são mostradas nas Figuras 19, 20 e 21 são mostradas como exemplo. Segundo a superfície de contorno da Figura 19 as recuperações dos analitos são favorecidas com altas velocidades de rotação ou tempos de extração elevados. Portanto, foram confirmados os resultados esperados de tempo de extração, já que a mistura ácida (HNO_3 , HCl e CH_3COOH) poderá quebrar mais ligações químicas dos analitos da matriz da amostra de MRC quanto mais tempo estiver em contato com ela. Adicionalmente, poderiam ser usadas as condições 6000 rpm e 40 min ou as condições de 15 min e 10000 rpm como possíveis valores de otimização.

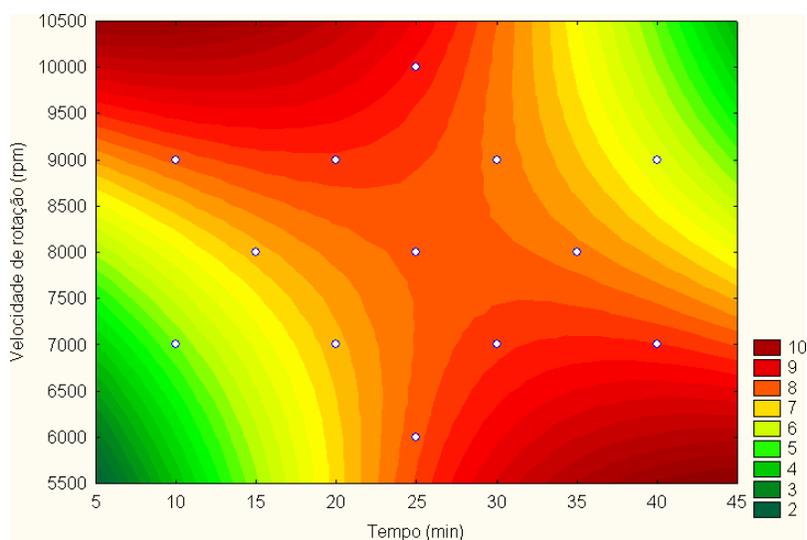


Figura 19. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização da velocidade de rotação e tempo de centrifugação na extração ácida com centrífuga

Na superfície de contorno da Figura 20, é indicada a condição experimental de 25 min e 1,0 mol L⁻¹ ou a condição de 25 min e 3,2 mol L⁻¹ como aquelas que poderiam ser usadas para estabelecer os valores otimizados da extração ácida com centrífuga.

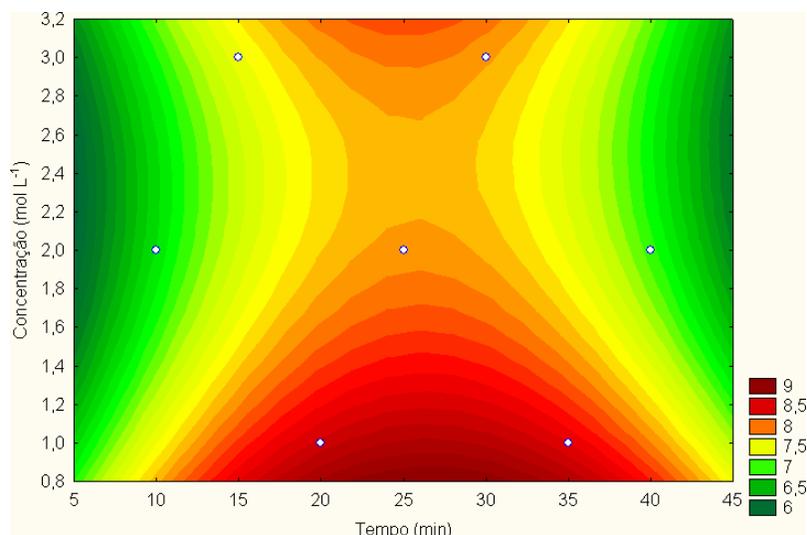


Figura 20. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização da velocidade de rotação e concentração da mistura ácida na extração ácida com centrífuga

Já o gráfico de contorno da Figura 21 mostra que baixas concentrações da mistura ácida (HNO₃, HCl e CH₃COOH), ou altas velocidades de rotação da centrífuga favorecem a extração ácida dos analitos das amostras de MRC. Além disso, poderiam ser usadas as condições de 1,0 mol L⁻¹ e 6000 rpm ou a condição de 3,2 mol L⁻¹ e 10000 rpm como possíveis valores de otimização.

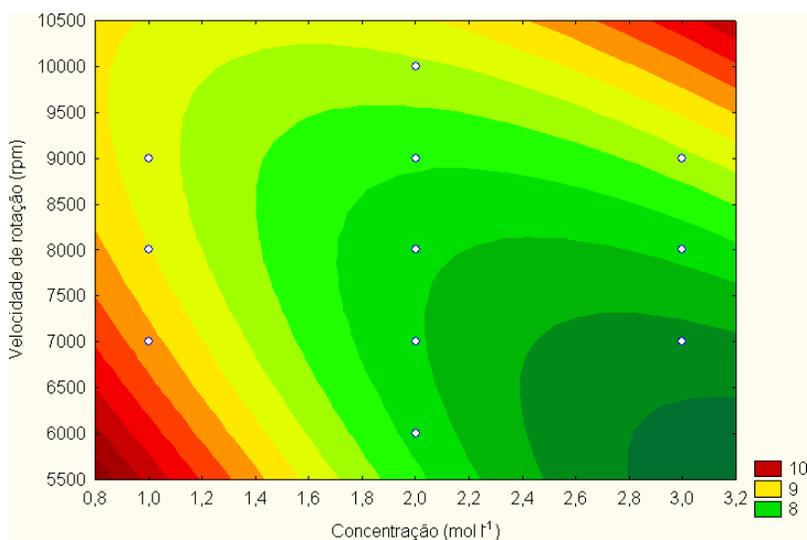


Figura 21. Superfície de contorno da resposta múltipla obtida da matriz Doehlert para otimização

do tempo de centrifugação e concentração da mistura ácida na extração ácida com centrífuga

Apesar dessas observações, optou-se utilizar a condição experimental que ofereceu maior valor de resposta múltipla nos ensaios da matriz Doehlert do que estudar as condições aproximadas com um posterior teste de robustez ou realizar um novo planejamento. Assim as seguintes condições experimentais foram selecionadas: 20 min de tempo de extração, 9000 rpm de velocidade de centrifugação e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ da mistura ácida.

Vale ressaltar que o presente trabalho não realizou um planejamento experimental para seleção dos fatores mais significativos do sistema, como o planejamento fatorial completo, porque foram trabalhados os fatores da extração ácida com centrífuga indicados por Santos *et al.* (2008), um grupo de pesquisa de química Analítica da UFBA.

Santos *et al.* (2008) estudaram a extração ácida de elementos maiores e traço em várias amostras de alimentos (incluindo frutos do mar) empregando centrifugação e determinação por ICP OES. Esses autores analisaram a massa e tamanho da partícula da amostra, velocidade de rotação da centrífuga e tempo de extração com planejamento fatorial fracionário de dois níveis. Santos *et al.* (2008) também estudaram a proporção ideal da mistura ácida HNO_3 , HCl e CH_3COOH com planejamento centróide simplex.

A partir dos resultados de Santos *et al.* (2008) o presente trabalho, focado na determinação de elementos maiores e traço em invertebrados marinhos com ICP OES, pôde otimizar os fatores da extração ácida descritos na otimização do procedimento proposto (tempo, velocidade de rotação e concentração da mistura ácida). Por conseguinte, foi possível estabelecer o domínio experimental baseado nos efeitos mais significativos desses fatores, para serem estudados adequadamente na matriz Doehlert. Além disso, foi possível empregar a proporção de 1/3 da mistura dos ácidos HCl , HNO_3 e CH_3COOH , no presente estudo, pois esses ácidos ofereciam um efeito sinérgico segundo as conclusões de Santos *et al.* (2008).

5.2 Validação do método analítico proposto

5.2.1 Limite de detecção e quantificação

Os resultados da análise das dez medidas de brancos para análise do efeito do ultrassom na extração ácida mostraram que a sonicação promoveu uma leve melhoria nos limites de detecção e quantificação na maioria dos elementos, principalmente para os

metais magnésio e zinco (Tabela 12).

Além disso, os valores de LOD de Ca, Mg, Mn, Na e Zn da extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom estão melhores que aqueles encontrados por Ladrão-Ramos *et al.* (2005) (4,75, 0,24, 0,02, 2,37 e 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, respectivamente), que desenvolveram um método analítico empregando ultrassom no preparo de amostras de bivalves e o FAAS na detecção dos metais. O LOD de Mg obtido com o ultrassom está próximo daquele encontrado por Bermejo-Barrera *et al.* (2001) (0,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) que desenvolveram a extração ácida com ultrassom seguida da determinação desses metais por FAAS em mariscos. O LOD do manganês do presente estudo empregando o ultrassom é igual ao obtido por Bermejo-Barrera *et al.* (2001) e menor que aquele encontrado por Yebra e Moreno-Cid (2003) (0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco), que determinaram o referido elemento utilizando um sistema de extração ácida com sonicação em linha e o FAAS.

Tabela 12. Avaliação dos limites de detecção e quantificação obtidos da extração ácida com centrífuga e extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco)

Elemento	Centrífuga		Ultrassom + Centrífuga	
	LOQ	LOD	LOQ	LOD
Ca	8,59	5,71	8,66	3,31
Cd	0,30	0,09	0,30	0,09
Cu	0,48	0,15	0,33	0,10
K	3,86	1,16	3,01	0,9
Mg	1,04	0,31	0,32	0,10
Mn	0,10	0,03	0,08	0,02
Na	3,05	1,48	4,30	1,87
Sr	0,05	0,01	0,04	0,01
Zn	1,44	0,43	0,89	0,27

Tais resultados estão de acordo com os esperados para um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado, com limites de detecção comparáveis ou melhores do que outros métodos analíticos que empregam outras técnicas espectroscópicas atômicas (Skoog, 2009).

5.2.1 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão do método para determinação de Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn empregando ICP OES e a extração ácida sob as condições otimizadas (tempo de extração e velocidade de rotação da centrífuga, concentração do meio ácido) foram avaliadas através da análise de amostras de MRC (NIST 1566b). Para tanto, foram feitas 10 medidas independentes dessas amostras para o método com a extração ácida e centrífuga e outras 10 medidas independentes de amostras de tecido de ostra certificado para avaliação do uso do ultrassom na extração ácida.

Segundo os resultados da análise de MRC para avaliação da exatidão do método analítico proposto, a extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom promoveu uma melhora na quantificação da maioria dos metais, principalmente para Cd, Cu, Mn e Sr (Tabela 13).

Tabela 13. Concentrações dos elementos maiores e traço em tecido de ostra certificado (NIST 1566b) determinadas por ICP OES após a extração ácida com centrífuga e extração ácida com centrífuga associada ao ultrassom

Elementos	Valores certificados	Valores obtidos com a centrífuga (1) ^a	Valores obtidos com ultrassom + centrífuga (2) ^a	Melhora de (1) em relação à (2)	R% de (2) no MRC
Ca	838 ± 2	763 ± 48	816 ± 27	7	97,4
Cd	2,48 ± 0,08	1,51 ± 0,18	1,78 ± 0,08	18	71,8
Cu	71,6 ± 1,6	55,7 ± 5,7	63,9 ± 2,4	15	89,3
K	6520 ± 90	6241 ± 150	6357 ± 113	2	97,5
Mg	1085 ± 23	905 ± 53	973 ± 24	8	89,6
Mn	18,5 ± 0,2	14,4 ± 1,0	15,8 ± 0,5	10	85,2
Na	3297 ± 53	2879 ± 80	2960 ± 57	3	89,8
Sr	6,8 ± 0,2	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,2	9	73,4
Zn	1424 ± 46	1182 ± 64	1264 ± 29	7	88,8

a – Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=10)

De fato, os resultados do teste t de Student pareado, mostrados na Tabela 14, indicam que se deve rejeitar a hipótese nula $H_0 : \mu_{Diferença} = 0$ a um nível de significância $\alpha=0,05$, para todos os analitos, pois os valores de p são pequenos ($p < 0,05$). Com esses resultados encontrados, verificou-se que, em média, o método que usou o

ultrassom e centrífuga no preparo de amostras, forneceu medidas de concentração mais altas que o método analítico que usou somente a centrífuga na extração ácida.

Tabela 14. Dados do teste t de Student pareado para avaliação do ultrassom na extração ácida

Analito	Procedimento do método	Média das concentrações	Desvio padrão	n	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	<i>Sd</i>	T_{cal}	gl	p
Ca	Ultrassom + Centrífuga	816	27	10	52,9	45	3,710	9	0,0048
	Centrífuga	763	48						
Cd	Ultrassom + Centrífuga	1,78	0,08	10	0,27	0,13	6,360	9	0,0001
	Centrífuga	1,51	0,18						
Cu	Ultrassom + Centrífuga	63,9	2,4	10	8,2	4,4	5,925	9	0,0002
	Centrífuga	55,7	5,7						
K	Ultrassom + Centrífuga	6357	113	10	116	128	2,855	9	0,0189
	Centrífuga	6241	150						
Mg	Ultrassom + Centrífuga	973	24	10	66	48	4,407	9	0,0017
	Centrífuga	906	53						
Mn	Ultrassom + Centrífuga	15,8	0,5	10	1,4	0,8	5,498	9	0,0004
	Centrífuga	14,4	1,0						
Na	Ultrassom + Centrífuga	2960	57	10	82	74	3,479	9	0,0069
	Centrífuga	2879	80						
Sr	Ultrassom + Centrífuga	5,0	0,2	10	0,4	0,3	4,847	9	0,0009
	Centrífuga	4,6	0,3						
Zn	Ultrassom + Centrífuga	1264	29	10	82	58	4,443	9	0,0016
	Centrífuga	1182	64						

$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ = diferença das médias das concentrações. gl = graus de liberdade. tcal = valor de t calculado
sd = desvio padrão das diferenças entre as concentrações. p = valor da probabilidade da hipótese nula.

Verifica-se na Tabela 13 (p.84) também que todos os dados obtidos da extração com centrífuga e da extração com centrífuga associada ao ultrassom estão distorcidos

($|\Delta| < \Delta_c$) em relação aos valores certificados segundo o teste de medidas analíticas recomendadas pela NIST (tópico 4.10.2, p. 62). Assim há diferenças significativas entre os valores encontrados e os de referência ($p < 0,05$). Entretanto os resultados de recuperação dos metais no MRC obtidos com o ICP OES após a extração ácida auxiliada por ultrassom e centrífuga indicaram que esse método pode ser adequado para análise quantitativa dos analitos, pois estes valores estão na faixa de 70 a 120%, que é aceitável para determinação de elementos maiores e traço, segundo a literatura (Ebdon *et al.*, 2001; Cazes 2004; FDA, 2009).

A exatidão do método com extração ácida por centrífuga associada ao ultrassom foi analisada também mediante a comparação dos resultados da determinação dos metais nos bivalves coletados em sete localidades da BTS (Figura 3) com aqueles obtidos com o método com a digestão ácida assistida por microondas. Na Tabela 15, observa-se que foram encontradas diferenças não significativas ($p > 0,05$) entre o método analítico proposto e o método de referência na determinação de cálcio.

Tabela 15. Comparação das medidas de concentração de cálcio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrífuga	Microondas	p
Chumbinho	13	8030 ± 195	8938 ± 646	0,0917
	5	7774 ± 248	7002 ± 760	0,3008
	4	9774 ± 371	12768 ± 1446	0,0664
Sururu	2	2655 ± 614	3192 ± 54	0,2885
	1	3712 ± 58	3517 ± 33	0,0074
	3	3803 ± 24	4141 ± 672	0,4626
Ostra	11	4835 ± 166	5276 ± 49	0,0238
	2	6101 ± 966	5807 ± 482	0,4122
	3	6032 ± 458	6274 ± 939	0,7547

A tabela 16 mostra os valores de concentração de Cd nos tecidos das amostras de bivalves da BTS. Observa-se que o procedimento de digestão ácida possibilitou maior quantificação do metal, segundo o valor de referência tecido de ostra certificado (94% de recuperação do Cd contra 72% de recuperação do referido metal obtido pelo método proposto). Isso pode ser justificado pelo fato do cádmio nos moluscos bivalves estar associado às metalotioneínas, proteínas cujas sínteses são estimuladas principalmente pela presença desse metal e outros como o cobre e zinco. A estrutura dessas moléculas é

rica em grupos sulfidril (-SH) que lhe conferem elevada capacidade de ligação ao Cd (Nordberg, 1998; Santiago-Rivas *et al.*, 2007). Logo, um preparo de amostras com condições mais energéticas, como a digestão ácida assistida por microondas tornam possíveis quantificações mais elevadas, pois promove a completa destruição da matriz convertendo o Cd na forma inorgânica.

Tabela 16. Comparação das medidas de concentração de cádmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrífuga	Microondas	p
Chumbinho	13	$1,44 \pm 0,70$	$1,82 \pm 0,04$	0,4377
	5	< LOD	< LOD	-
	4	< LOD	< LOD	-
Sururu	2	< LOD	< LOD	-
	1	< LOD	< LOD	-
	3	< LOD	< LOD	-
Ostra	11	$12,62 \pm 0,71$	$15,80 \pm 0,40$	0,0302
	2	< LOD	< LOD	-
	3	< LOD	$0,11 \pm 0,03$	-

A Tabela 17 mostra que foram encontradas concentrações similares de cobre nas amostras com o uso de ambos os métodos. O cobre é um dos metais que está associado às metalotioneínas, logo a digestão ácida proporciona quantificações mais elevadas de cobre do que a extração ácida, que não decompõe totalmente a amostra. Por isso, foram observadas mais diferenças significativas entre o método proposto e o de referência do que não significativas.

Tabela 17. Comparação das medidas de concentração de cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrífuga	Microondas	p
Chumbinho	13	$8,69 \pm 0,13$	$9,34 \pm 0,7$	0,0733
	5	$5,14 \pm 0,06$	$5,01 \pm 0,13$	0,0650
	4	$5,33 \pm 0,08$	$5,15 \pm 0,09$	0,0016
Sururu	2	$6,56 \pm 2,01$	$11,06 \pm 0,23$	0,0519
	1	$13,76 \pm 0,29$	$19,85 \pm 0,36$	0,0028
	3	$14,06 \pm 0,74$	$25,34 \pm 1,08$	0,0077
Ostra	11	$136,77 \pm 8,87$	$153,48 \pm 2,31$	0,0883
	2	$26,85 \pm 0,30$	$28,18 \pm 0,15$	0,0046
	3	$28,93 \pm 0,17$	$32,01 \pm 0,28$	0,0005

A Tabela 18 mostra valores de $p < 0,05$ indicando que os dois métodos são significativamente diferentes para quantificarem o potássio em moluscos bivalves. Entretanto, o método proposto teve maior valor de recuperação em MRC do que a digestão ácida com microondas, ou seja, 98% para o método proposto e 94% para o método de referência (digestão ácida com forno de microondas e ICP OES). Conseqüentemente, o método desenvolvido proporciona quantificações mais elevadas.

Tabela 18. Comparação das medidas de concentração de potássio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrífuga	Microondas	p
Chumbinho	13	14372 \pm 509	10985 \pm 111	0,0079
	5	13028 \pm 461	10809 \pm 165	0,0148
	4	12453 \pm 92	10031 \pm 217	0,0052
Sururu	2	6883 \pm 1355	6441 \pm 116	0,6370
	1	10567 \pm 435	8183 \pm 99	0,0119
	3	10711 \pm 336	8130 \pm 82	0,0061
Ostra	11	10633 \pm 583	8689 \pm 81	0,0347
	2	14541 \pm 172	10770 \pm 174	0,0026
	3	15371 \pm 165	11254 \pm 109	0,0009

Os dados da Tabela 19 indicam que as concentrações de Mn nas amostras reais com os dois procedimentos foram próximas, porém foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). As recuperações de Mn em MRC mostram que, as condições mais drásticas da digestão ácida possibilitaram maior quantificação do metal.

Tabela 19. Comparação das medidas de concentração de manganês ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrífuga	Microondas	p
Chumbinho	13	22,3 \pm 0,3	28,0 \pm 1,8	0,0391
	5	19,0 \pm 0,9	20,5 \pm 1,8	0,1091
	4	25,6 \pm 0,3	33,9 \pm 1,7	0,0108
Sururu	2	31,9 \pm 8,8	52,5 \pm 0,8	0,0539
	1	36,8 \pm 0,8	44,6 \pm 2,1	0,0228
	3	40,1 \pm 0,8	52,2 \pm 1,2	0,0036
Ostra	11	24,9 \pm 1,4	28,9 \pm 0,3	0,0417
	2	16,5 \pm 0,3	18,9 \pm 0,2	0,0009
	3	20,4 \pm 0,2	24,3 \pm 0,3	0,0026

A Tabela 20 indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações de Sr obtidas com os dois métodos. Tanto o procedimento da centrifuga quanto o procedimento de microondas com cavidade permitem a quantificarem o estrôncio de forma semelhante, já que as recuperações do metal em MRC (tecido de ostra) foram significativamente iguais.

Tabela 20. Comparação das medidas de concentração de estrôncio ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrifuga	Microondas	p
Chumbinho	13	97,9 \pm 3,9	106,2 \pm 4,9	0,0674
	5	111,4 \pm 3,2	86,6 \pm 36,4	0,3825
	4	135,5 \pm 6,7	164,3 \pm 16,1	0,0768
Sururu	2	45,1 \pm 12,5	61,6 \pm 1,3	0,1468
	1	64,2 \pm 1,9	65,4 \pm 0,9	0,1890
	3	65,3 \pm 0,7	75,0 \pm 8,2	0,1997
Ostra	11	49,1 \pm 2,9	51,6 \pm 0,7	0,2471
	2	66,0 \pm 4,5	64,3 \pm 0,8	0,5357
	3	67,8 \pm 2,5	71,4 \pm 3,7	0,3637

A Tabela 21 mostra que não foram encontradas diferenças significativas entre a maioria dos resultados da metodologia proposta e os resultados da metodologia que emprega a digestão ácida em forno de microondas com cavidade.

Tabela 21. Comparação das medidas de concentração de zinco ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em bivalves da BTS (n=3)

Amostra	Estação	Ultrassom + Centrifuga	Microondas	p
Chumbinho	13	58,9 \pm 2,0	63,8 \pm 2,5	0,2030
	5	62,8 \pm 0,9	76,6 \pm 15,4	0,4836
	4	59,8 \pm 1,3	65,7 \pm 5,5	0,1650
Sururu	2	47,5 \pm 17,4	73,5 \pm 1,3	0,1176
	1	64,8 \pm 0,9	65,8 \pm 1,7	0,3185
	3	60,0 \pm 1,1	64,1 \pm 1,0	0,0296
Ostra	11	2333 \pm 88	3267 \pm 38	0,0024
	2	1230 \pm 14	1342 \pm 19	0,0101
	3	1015 \pm 7,8	1128 \pm 5,0	0,0033

Por último, não foi possível fazer uma avaliação da exatidão do método para determinação de Na e do Mg por comparação entre métodos. Houve um problema nos

resultados obtidos com a digestão ácida com radiação microondas, no qual a curva analítica desses elementos não foi traçada.

A precisão do método analítico é indicada na Tabela 22. Observa-se que houve um aumento da precisão para todos os elementos quando o ultrassom foi aplicado antes da centrifugação. Para o cálcio, por exemplo, a precisão aumentou de 6,27 para 3,27, ou seja uma diminuição de 48% do valor de RSD. Já para o cobre a precisão do método com o uso do ultrassom foi mais acentuada com uma diminuição de 65% do valor de RSD em comparação ao método proposto usando apenas a centrífuga na extração ácida.

Tabela 22. Precisão do método proposto com somente a centrífuga e do método proposto com centrífuga associada ao ultrassom no tratamento de amostras de invertebrados marinhos

Elemento	Centrífuga	Ultrassom + Centrífuga
	RSD (%)	RSD (%)
Ca	6,27	3,27
Cd	11,76	4,70
Cu	10,16	3,81
K	2,40	1,78
Mg	5,87	2,46
Mn	7,28	2,99
Na	2,77	1,94
Sr	7,40	3,53
Zn	5,43	2,30

Adicionalmente os valores de RSD foram melhores que aqueles encontrados por Krishna *et al.* (2004), que empregaram a sonicação com sonda e centrifugação de amostras de moluscos bivalves seguida da determinação desses elementos por ICP OES. Esses autores encontraram valores de RSD iguais ou superiores a 10% para os elementos discutidos.

5.3 Considerações sobre o desenvolvimento do método analítico proposto

É importante ressaltar que o método proposto não foi aplicado para análise de

todas as amostras de mariscos coletados na BTS devido ao incidente ocorrido no mês de abril de 2009 no Instituto de Química da UFBA. Entretanto foi possível analisar todas as amostras de mariscos com o método analítico que emprega digestão ácida com bombas Parr, que estava sendo realizado concomitantemente ao método analítico em desenvolvimento. Portanto, optou-se utilizar (converter para peso úmido) apenas os dados obtidos com as bombas Parr seguida da determinação em ICP OES para a comparação com as concentrações máximas permitidas pela ANVISA e pelas agências especializadas em saúde internacionais. Adicionalmente não foram realizadas as digestões ácidas de todas as amostras de marisco com o forno de microondas com cavidade devido a grande procura que esse aparelho tem nos grupos de pesquisa de química analítica da universidade.

Valem destacar também que as concentrações dos metais nos tecidos moles dos bivalves de algumas estações de estudo obtidas com o método proposto e o método com digestão ácida com forno de microondas (mostrados no tópico 5.2.1, p.86) foram utilizadas apenas para discussão dos resultados da etapa de desenvolvimento do método analítico. Além disso, as elevadas concentrações dos metais encontradas nos tecidos dos bivalves por esses métodos foram também discutidas no artigo baseado neste trabalho publicado no ano de 2010 na edição 95 do *Microchemical Journal*, cujo título é: Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES.

5.4 Determinação multi-elementar em amostras de bivalves da BTS empregando ICP OES após a digestão ácida com bombas Parr

A análise do tecido de ostra certificado (NIST 1566b) necessária para seleção dos elementos no estudo de contaminantes inorgânicos nas amostras de *Crassostrea rhizophorae* (ostra), *Anomalocardia brasiliiana* (chumbinho) e *Mytella guyanensis* (sururu) de diversas regiões da BTS revelou que os elementos Al, As, Ca, Cu, Fe, K, Mn e Zn tiveram recuperações quantitativas (maiores que 90%). Os resultados da determinação de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mn e Zn nos tecidos moles dos bivalves (chumbinho, sururu e ostra) coletados em locais importantes de mariscagem da Baía de Todos os Santos são mostrados na Tabela 23. Pode-se observar que a concentração de Al nos tecidos moles dos bivalves variou na faixa de 161 a 2992 $\mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, valores muito acima daqueles obtidos pela literatura citada (Tabela 1, p.20). Verifica-se também que os bivalves

estudados tiveram concentrações do elemento traço As na faixa de 3,03 a 12,53 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 23). Comparando com os dados de outros estudos citados neste trabalho (Tabela 2, p.21-22), observa-se que as concentrações obtidas estão próximas daquelas relatadas por Jeng *et al.* (2002), Wagner e Booman (2004), Liu e Kueh (2005), que analisaram diferentes espécies de bivalves.

Foram encontradas concentrações de Ca, variando na faixa de 2559 a 8434 $\mu\text{g g}^{-1}$, (Tabela 23) que são próximas daquelas obtidas por Wagner e Booman (2004), que analisaram o metal em um bivalve de água doce. As concentrações de Ca nos bivalves da BTS são menores que aquelas obtidas por Cevik *et al.* (2007) que estudaram esse metal no tecido mole da espécie *Mytilus* (Tabela 1, p.20).

A Tabela 23 mostra que, em geral, as concentrações de cobre nas amostras ficaram na faixa de 4,62 a 205 $\mu\text{g g}^{-1}$. Em comparação aos resultados para cada espécie, foi observado que as amostras de *Anomalocardia brasiliana* possuem concentrações (4,62 a 8,84 $\mu\text{g g}^{-1}$) menores que aquelas obtidas por Coimbra (2003), Gonçalves (2006) e Freire (2009) (Tabela 2 p.22-23). Para as ostras *Crassostrea rhizophorae* foram encontradas as concentrações de cobre na faixa de 28,1 a 205 $\mu\text{g g}^{-1}$. Esses valores são maiores que os de Gonçalves (2006), Augusto *et al.* (2006) e Freire (2009), porém menores que aqueles obtidos por Amado-Filho (2008), que estudou essa espécie de ostra na BTS. Com relação ao sururu *Mytella guyanensis*, as concentrações de Cu nos tecidos moles das amostras (11,06 a 48,05 $\mu\text{g g}^{-1}$) foram próximas daquela encontrada por Coimbra (2003) e de Gonçalves (2006).

Os resultados de ferro, mostrados na Tabela 23, indicam que o metal traço variou de 231 a 1185 $\mu\text{g g}^{-1}$ nos tecidos moles dos bivalves da BTS. As concentrações obtidas estão entre as maiores registradas nos estudos citados (Tabela 2, p.21-23). Algumas amostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* tiveram concentrações menores que algumas amostras analisadas por Amado-Filho *et al.* (2008) que realizaram estudos na BTS. Com relação à espécie *Anomalocardia brasiliana*, foi observado que as concentrações do referido metal são mais elevadas que aquelas relatadas por Coimbra (2003) que estudou o bivalve na Baía de Septiba, considerada moderadamente contaminada pela autora.

As concentrações do metal majoritário potássio nos tecidos moles dos bivalves variaram na faixa de 6748 a 11364 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 23). Os resultados obtidos são maiores que os relatados pelos estudos citados (Tabela 1, p.20). Wagner e Booman (2004) salientaram que além das fontes antropogênicas, a composição química de sedimentos

pode explicar as elevadas concentrações dos macro-elementos. Já os resultados de Mn, mostrados na Tabela 23, indicam concentrações na faixa de 8,45 a 52,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. Esses valores são menores que aqueles obtidos em diversos estudos citados. Adicionalmente, a faixa de concentração de manganês na espécie *Crassostrea rhizophorae* deste estudo (8,45 a 28,8 $\mu\text{g g}^{-1}$) é próxima daquela encontrada por Silva *et al.* (2001).

Os resultados do metal traço Zn nos tecidos moles dos bivalves, mostrados na Tabela 23, indicam a faixa de concentração de 47,8 a 2976 $\mu\text{g g}^{-1}$. Em geral, as concentrações encontradas estão entre as maiores já citadas neste trabalho. Comparando-se os valores de concentração de Zn para cada espécie com aqueles encontrados na literatura citada (Tabela 3, p.24-25), verifica-se que as amostras de *Mytella guyanensis* possuem uma faixa de concentração (50,8 a 159 $\mu\text{g g}^{-1}$) maior que aquela obtida nas amostras analisadas por Gonçalves (2006). Entretanto, as amostras de *Anomalocardia brasiliana* desse autor tiveram maiores concentrações de Zn do que as obtidas neste trabalho (47,8 a 51,5 $\mu\text{g g}^{-1}$). Com relação à espécie *Crassostrea rhizophorae* foi observado que as amostras analisadas possuem concentrações de Zn (990 a 2976 $\mu\text{g g}^{-1}$) maiores que aquelas obtidas por Gonçalves (2006). Adicionalmente, algumas amostras dessa espécie tiveram concentrações menores que algumas estudadas por Wallner-Kersanich (2000), Silva *et al.* (2001), e Amado-Filho *et al.* (2008).

Tabela 23. Média (\pm desvio padrão, n=3) das concentrações de elementos maiores e traço ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) em moluscos bivalves coletados em diversas localidades da Baía de Todos os Santos

Espécie	Estação	Al	As	Ca	Cu	Fe	K	Mn	Zn
<i>Anomalocardia brasiliiana (Chumbinho)</i>	4	2102 \pm 37	10,11 \pm 0,61	8434 \pm 58	5,24 \pm 0,07	1185 \pm 8	9533 \pm 139	32,33 \pm 0,33	51,48 \pm 1,44
	5	307 \pm 5	14,83 \pm 1,49	7632 \pm 1253	4,62 \pm 0,10	299 \pm 7	9614 \pm 100	21,20 \pm 1,24	53,27 \pm 2,43
	13	843 \pm 39	8,95 \pm 0,65	7640 \pm 547	8,84 \pm 0,36	502 \pm 26	10934 \pm 265	27,18 \pm 1,39	47,83 \pm 2,12
<i>Crassostrea rhizophorae (Ostra)</i>	1	251 \pm 3	6,03 \pm 1,13	3076 \pm 42	145,13 \pm 0,38	411 \pm 6	8781 \pm 91	28,17 \pm 0,15	2758 \pm 6
	2	183 \pm 3	5,55 \pm 0,37	5187 \pm 270	28,10 \pm 0,24	347 \pm 9	10805 \pm 152	18,96 \pm 0,31	1274 \pm 13
	3	161 \pm 3	6,67 \pm 0,40	4410 \pm 129	29,04 \pm 0,56	293 \pm 10	11364 \pm 237	22,43 \pm 0,53	1004 \pm 14
	6	309 \pm 7	5,55 \pm 0,62	2929 \pm 15	62,30 \pm 1,40	377 \pm 8	9679 \pm 108	17,84 \pm 0,42	1025 \pm 20
	7	897 \pm 74	3,03 \pm 0,19	3893 \pm 59	205,78 \pm 2,96	638 \pm 25	9691 \pm 209	12,43 \pm 0,57	2976 \pm 20
	8	227 \pm 12	12,30 \pm 1,69	3941 \pm 247	150,54 \pm 4,63	231 \pm 5	9835 \pm 187	12,28 \pm 0,28	2396 \pm 52
	9	254 \pm 14	8,46 \pm 1,17	5062 \pm 176	140,63 \pm 2,36	275 \pm 12	9055 \pm 138	13,92 \pm 0,82	2046 \pm 39
	10	312 \pm 8	4,47 \pm 0,04	3624 \pm 124	120,00 \pm 1,84	295 \pm 6	9252 \pm 137	8,45 \pm 0,14	2122 \pm 36
11	246 \pm 1	6,26 \pm 0,09	4341 \pm 921	34,71 \pm 2,22	315 \pm 4	11021 \pm 116	24,64 \pm 0,21	990 \pm 36	
<i>Mytella guyanensis (Sururu)</i>	1	1894 \pm 22	10,97 \pm 1,57	2997 \pm 118	18,61 \pm 0,64	1074 \pm 2	8114 \pm 39	42,57 \pm 0,88	54,90 \pm 1,18
	2	2311 \pm 62	12,53 \pm 0,94	2559 \pm 75	11,06 \pm 0,73	1421 \pm 62	6748 \pm 64	52,04 \pm 1,22	59,62 \pm 5,17
	3	2992 \pm 34	12,82 \pm 1,51	2985 \pm 36	23,78 \pm 0,28	1643 \pm 39	8175 \pm 159	49,17 \pm 1,11	50,83 \pm 0,47
	11	2656 \pm 105	6,83 \pm 1,34	3403 \pm 918	41,85 \pm 0,67	1625 \pm 29	12056 \pm 610	127,08 \pm 1,82	60,86 \pm 0,76
	12	1810 \pm 111	6,87 \pm 0,31	2416 \pm 274	22,15 \pm 2,75	1258 \pm 78	13594 \pm 480	105,91 \pm 7,15	159,62 \pm 1,75

Vale ressaltar que as concentrações dos analitos, expressas em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco neste trabalho foram convertidas em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido, para se adequar às legislações brasileiras e as agências especializadas em saúde de outros países no estudo dos limites máximos de segurança na alimentação. Os valores de concentração em peso úmido dos elementos maiores e traço serão comentados a seguir.

5.5 Avaliação das concentrações dos elementos maiores e traço em peso úmido nos tecidos moles de bivalves da BTS obtidas da determinação por ICP OES após digestão ácida com bombas Parr

5.5.1 Alumínio

A Figura 22 mostra as concentrações de Al nos tecidos moles dos bivalves da BTS convertidas para peso úmido. O alumínio é um elemento cuja função biológica nos organismos é desconhecida (OMS, 1998). Os resultados mostram que nos três bivalves estudados as concentrações de Al ultrapassaram muito o limite máximo estabelecido pela JECFA ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido), sendo que a estação nº. 3, um tributário do Rio Jaguaripe (Figura 3, p.44), tem o sururu com maior concentração de Al encontrada neste estudo ($449 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido). Conseqüentemente, segundo esta junta, as concentrações de Al encontradas têm potencial para afetar o sistema reprodutivo e desenvolvimento do sistema nervoso (JECFA, 2006). A ANVISA esclarece que o trato gastrointestinal dos humanos representa uma eficiente barreira à absorção deste metal, apresentando uma absorção efetiva de 0,0001 a 1% da quantidade ingerida. Adicionalmente a ANVISA reconhece que o metal é tóxico somente para pessoas com insuficiência renal crônica e que a neurotoxicidade e outros efeitos adversos estão associados à presença do metal nos fluidos de diálises (ANVISA, 2010). Como os bivalves são organismos marinhos de hábito alimentar filtrador é provável que as elevadas concentrações de Al observadas estejam associadas ao material particulado em suspensão na água ou substrato (sedimento) com altas concentrações desse elemento. Estes valores também apontaram para uma maior contaminação por alumínio nas amostras de sururu e que esse bivalve concentrou mais o metal do que a ostra, nas mesmas localidades (1, 2, 3 e 11).

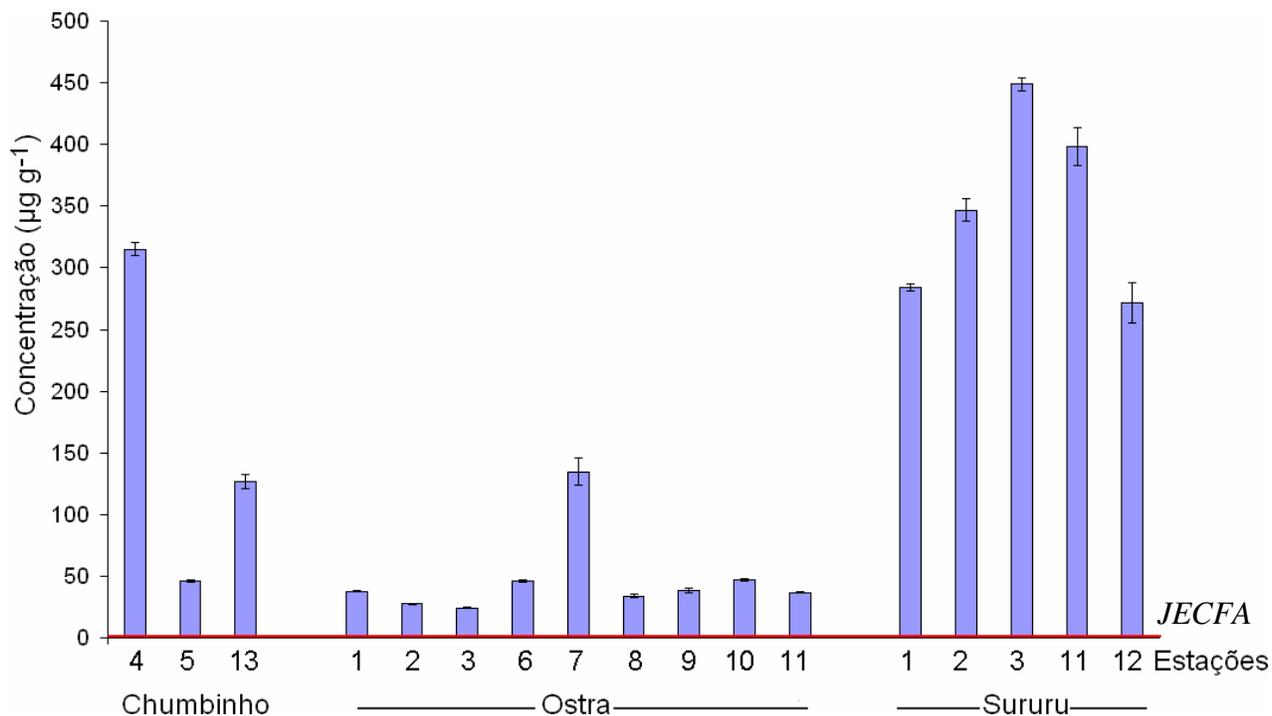


Figura 22. Concentrações de alumínio nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES

5.5.2 Arsênio

As concentrações de arsênio nos tecidos moles de bivalves da BTS (Figura 23) indicaram amostras que excederam à concentração máxima permitida pela ANVISA ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$), com exceção das estações n.º 2, 6, 7, 9 e 10. Todos os resultados foram superiores ao nível estabelecido pela JECFA ($0,015 \mu\text{g g}^{-1}$). As principais fontes antropogênicas de arsênio no ecossistema aquático são os efluentes urbanos, queima de carvão vegetal e depósitos de rejeito (Carvalho *et al.* 1993). Observa-se pelos dados da Figura 22, que o sururu das estações n.º 1, 2 e 3, tributários do Rio Jaguaripe (Figura 3, p.44), bioacumularam mais o elemento, do que as ostras coletadas nas mesmas localidades. A maior concentração de arsênio encontrada nesse estudo foi no chumbinho da estação n.º 5, uma região localizada nas proximidades do Rio Jaguaripe ($2,22 \pm 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido). Vale ressaltar que os organismos marinhos têm uma habilidade limitada de acumular arsênio na forma inorgânica da água do mar ou dos alimentos e a maior parte do elemento está na forma de vários organoarsênicos que não são tóxicos ou carcinogênicos aos próprios organismos marinhos e aqueles que os consomem principalmente os humanos (Neff, 2002). Dentre essas formas orgânicas do arsênio destacam-se a arsenobetaína que tem uma eficiência de biocumulação elevada nos

bivalves em comparação as outras formas químicas do elemento, é metabolicamente inerte, não tóxica, e é rapidamente excretada pelos humanos (Neff, 2002; Carolli, 2007). Portanto, os dados sugerem que deve ser feito um estudo de especiação para indicar a espécie de arsênio que se encontra nos tecidos moles analisados. Apesar do arsênio nos organismos analisados não oferecer risco parente, os resultados acima do limite da ANVISA sugerem que o consumo deve ser moderado.

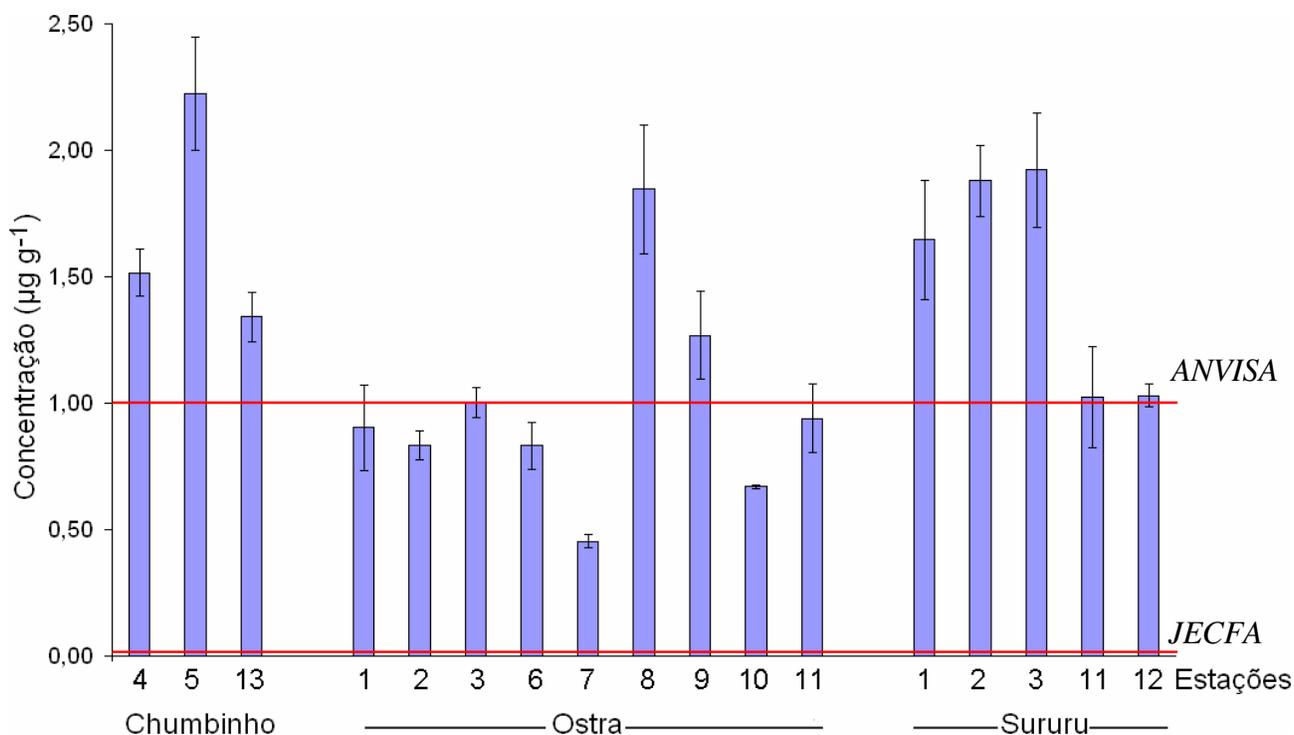


Figura 23. Concentrações de arsênio nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

5.5.3 Cálcio

Os resultados da determinação de cálcio nos tecidos moles dos bivalves da BTS são mostrados na Figura 24. O cálcio é um metal essencial que tem função estrutural nos ossos e dentes, e, além disso, atua na constrição e relaxamento dos vasos sanguíneos, transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, secreção de hormônios e como cofator de enzimas (FNB, 1997). Segundo a FNB, não há relatos de toxicidade do metal resultantes do consumo de alimentos, mas somente de suplementos minerais. Adicionalmente, essa junta recomenda que a ingestão adequada de cálcio para saúde

dos ossos é de 1200 mg dia⁻¹ para adultos e 1300 mg dia⁻¹ para adolescentes e 800 mg dia⁻¹ para crianças (FNB, 1997). As concentrações de Ca encontradas nos bivalves estudados fornecem a cada 100 g da parte comestível, quantidades do mineral próximas a de outros pescados e frutos do mar, como merluza (36 mg), bacalhau (59 mg), corvina (60 mg), camarão (90 mg) e pintado (114 mg) descritos na Tabela brasileira de composição de alimentos da NEPA (NEPA-UNICAMP, 2006). Segundo a tabela de composição de alimentos do Estudo Nacional da Despesa Familiar, o mexilhão (sururu) e a ostra possuem 52 e 68 mg de cálcio a cada 100 g de parte comestível (ENDEF-IBGE, 1999). Esses valores são muito próximos daqueles obtidos neste estudo para 100 g de cada espécie. Além disso, pode-se observar na Figura 24, que a espécie *Anomalocardia brasiliiana* teve as maiores concentrações do elemento nos seus tecidos moles. Segundo Cozzolino (2005), a ingestão de cálcio está muito abaixo dos valores considerados adequados. Assim, os bivalves extraídos da Baía de Todos os Santos poderia ser uma opção alimentar do mineral. Dentre os moluscos estudados, o chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) poderia ser considerado uma fonte complementar mais indicada para suprir a necessidade de cálcio da população.

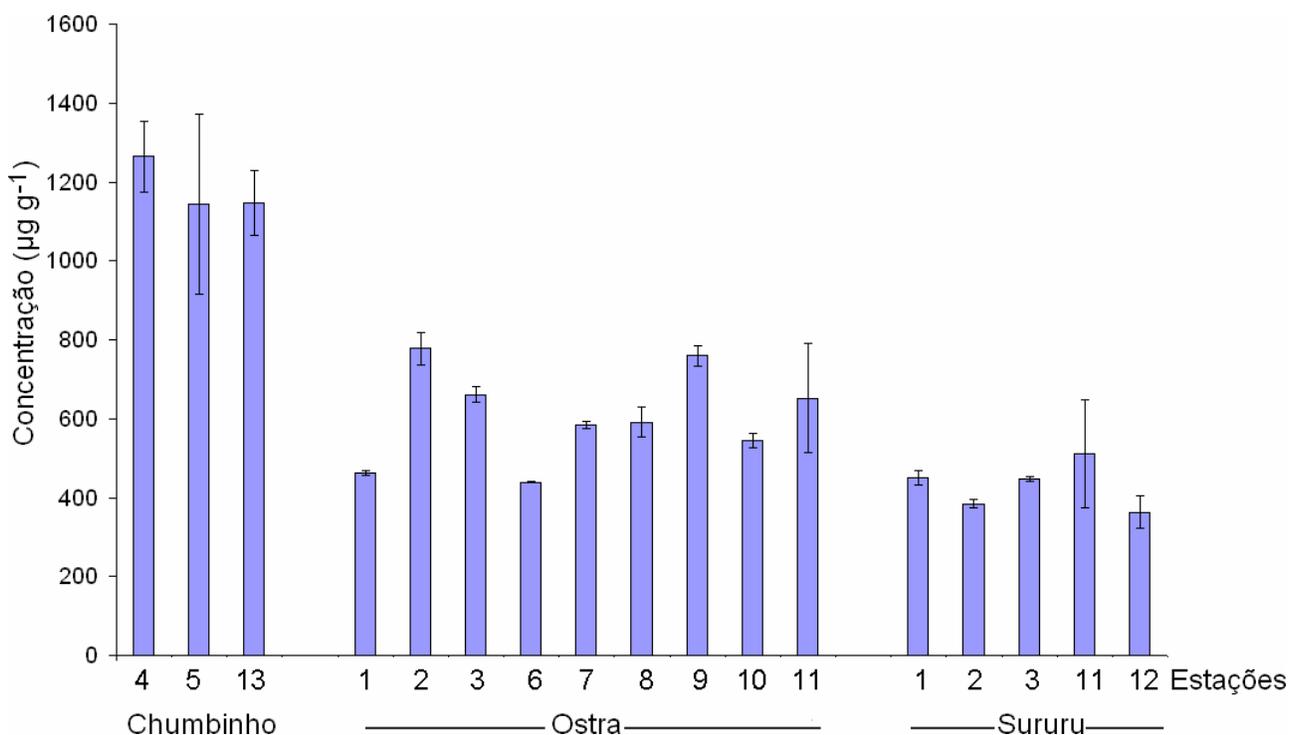


Figura 21. Concentrações de cálcio nos tecidos moles de bivalves da BTS (µg g⁻¹ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

5.5.4 Cobre

Os resultados da determinação de cobre nos tecidos moles dos bivalves da BTS são mostrados na Figura 25. O cobre é um metal traço essencial para os organismos, e atua como um componente funcional de uma série de enzimas que têm um papel importante em funções fisiológicas (produção de energia, formação de tecidos, metabolismo do ferro, funcionamento do sistema nervoso central, síntese de neurotransmissores, formação e manutenção de melanina e funções antioxidantes). Observam-se nos dados da Figura 25 que os teores de cobre, na maioria das amostras estudadas, estiveram abaixo do limite de consumo recomendado pela ANVISA e pela ANFZA ($30 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido), com exceção da estação nº 7 localizada nas proximidades do Rio Paraguaçu (Figura 3, p.44). Os resultados mostram elevadas concentrações do metal nas ostras em relação às outras duas espécies avaliadas, o que pode estar relacionado com descargas de esgotos urbanos. Segundo os limites máximos de cobre preconizados pela UK EVM e JECFA ($0,16$ e $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido., respectivamente) todas as amostras de bivalves ofereceriam risco à saúde humana. A OMS afirma que alimentos contaminados com quantidades muito elevadas de cobre, podem ocasionar a toxicidade aguda com o surgimento de sérios efeitos adversos, tais como, hemólise, icterícia, dano hepático, convulsões, coma e morte. Alimentos contaminados em quantidades pequenas de cobre podem ocasionar o vômito e diarreia, devido ao efeito irritante dos íons cobre sobre as mucosas (OMS, 1998). Do ponto de vista nutricional, observa-se que 100 g de parte comestível do chumbinho e sururu, fornecem quantidades próximas das consideradas adequadas para adultos do sexo masculino e feminino, isto é, $1,3$ e $1,2 \text{ mg dia}^{-1}$, respectivamente.

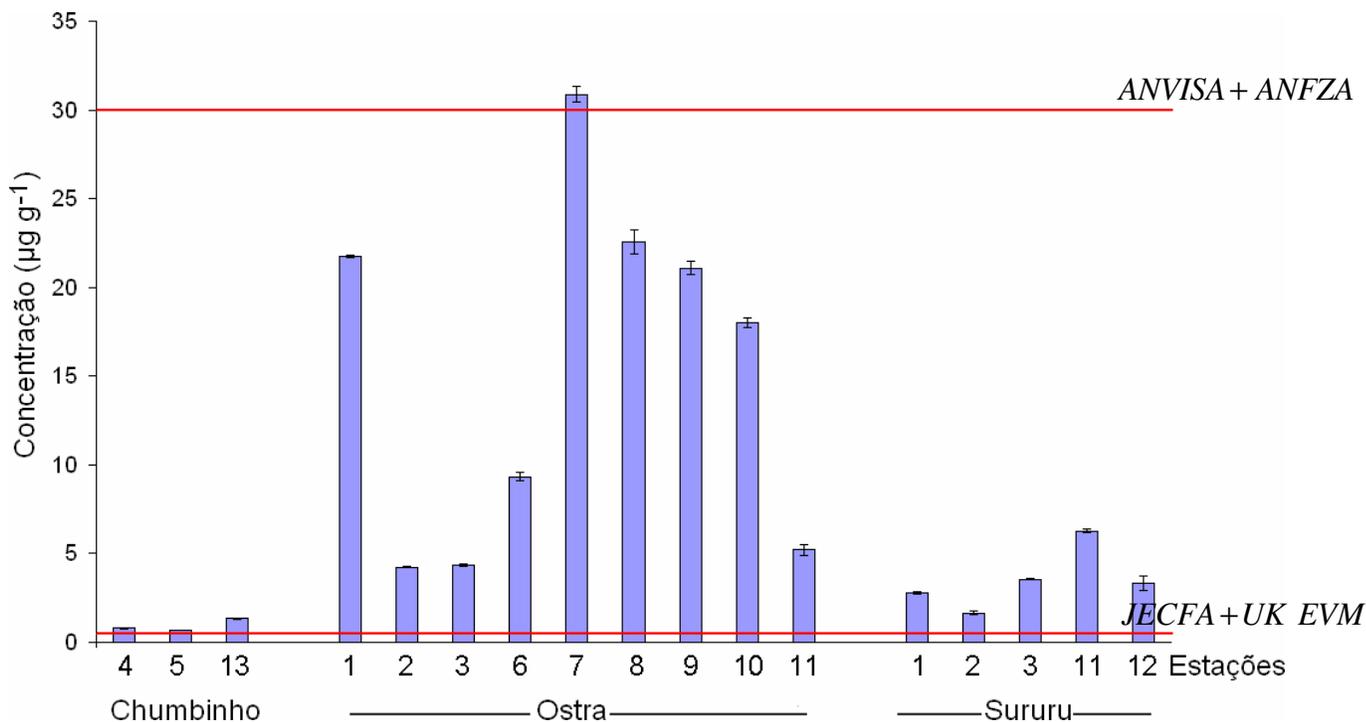


Figura 25. Concentrações de cobre nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

5.5.5 Ferro

O ferro é um elemento traço essencial para os humanos, que faz parte de uma série de proteínas e enzimas e que tem importante papel no metabolismo (transporte e estocagem de oxigênio no sangue, transporte de elétrons nas mitocôndrias, função antioxidante, síntese de DNA). Observam-se nos resultados obtidos (Figura 26) que todas as amostras possuem elevados teores do elemento nos seus tecidos moles, que podem estar associados à filtragem de sedimento ou material particulado em suspensão com altas concentrações desse metal. Não existem evidências de efeitos tóxicos resultantes da sua ingestão em alimentos, somente de suplementos minerais (FNB, 2001). Segundo a ENDEF o sururu e as ostras possuem as maiores quantidades de ferro do que outros pescados de água salgada (12,7 e 7,2 mg de ferro, respectivamente, por 100 g de parte comestível). Portanto, tanto o mexilhão quanto as ostras possuem quantidades próximas daquelas relatadas na tabela de composição de alimentos do IBGE. A FNB recomenda que a ingestão de ferro em uma dieta, necessária para manter a saúde seja de 18 mg dia^{-1} para adultos e 8 mg dia^{-1} para crianças (FNB, 2001). Adicionalmente, os resultados de ferro nas localidades 1, 2, 3 e 11 mostram que a espécie *Mytella*

guyanensis bioacumulou mais o metal que à espécie *Crassostrea rhizophorae*. A maior concentração do referido metal foi de $247 \pm 6 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso úmido) presente nas amostras da estação n.º. 3, localizada próxima do Rio Jaguaripe (Figura 3, p.44).

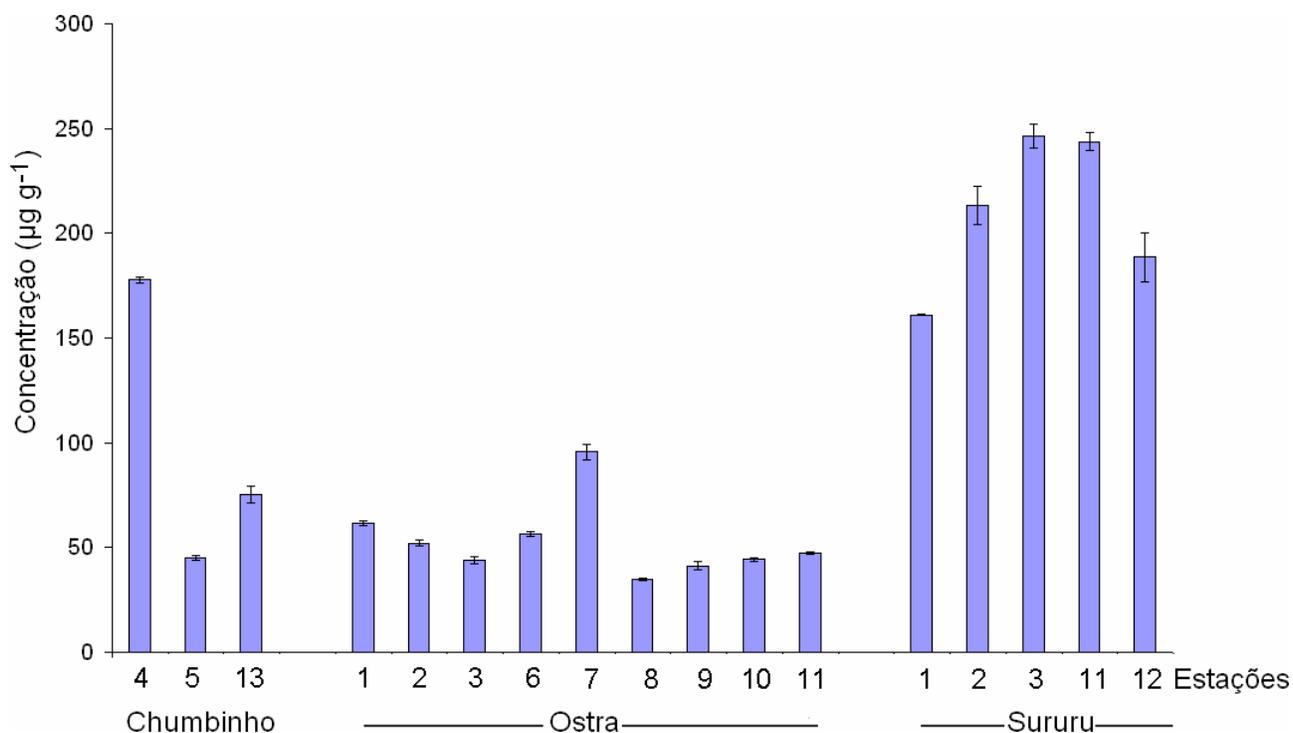


Figura 26. Concentrações de ferro nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES

5.5.6 Potássio

Os resultados de potássio (Figura 27) revelaram elevadas concentrações do metal nos tecidos moles de chumbinho, ostra e sururu. O potássio é um elemento essencial importante para células, além de atuar como cofator de enzimas. O referido metal não tem um limite máximo de segurança estabelecido, entretanto, sabe-se que o consumo de quantidades maiores que 18 gramas podem levar ao desenvolvimento de hiperpotassemia severa, que ocasiona formigamento nas mãos, pés, fraqueza, paralisia muscular e parada cardíaca (FNB, 2004). Verificam-se também nos dados de potássio que não existe uma espécie com maior concentração do metal do que a outra. Segundo a tabela brasileira de composição de alimentos da NEPA os pescados e outros frutos do mar, possuem de 50 a 574 mg de potássio a cada 100 g de parte comestível. Assim, as concentrações encontradas sugerem que o chumbinho, sururu e ostra da BTS, fornecem

quantidades de potássio dentro da faixa do teor do mineral em alimentos marinhos. Adicionalmente, a FNB recomenda que os valores de ingestão adequada na dieta (aqueles que garantem uma boa saúde) sejam 4500 mg dia^{-1} para crianças e 4700 mg dia^{-1} para adultos (FNB, 2004). A maior concentração do metal obtida ($2039 \pm 72 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) estava nas amostras de sururu da estação nº. 12 (Figura 3, p.44), localizada nas proximidades do Rio Subaé.

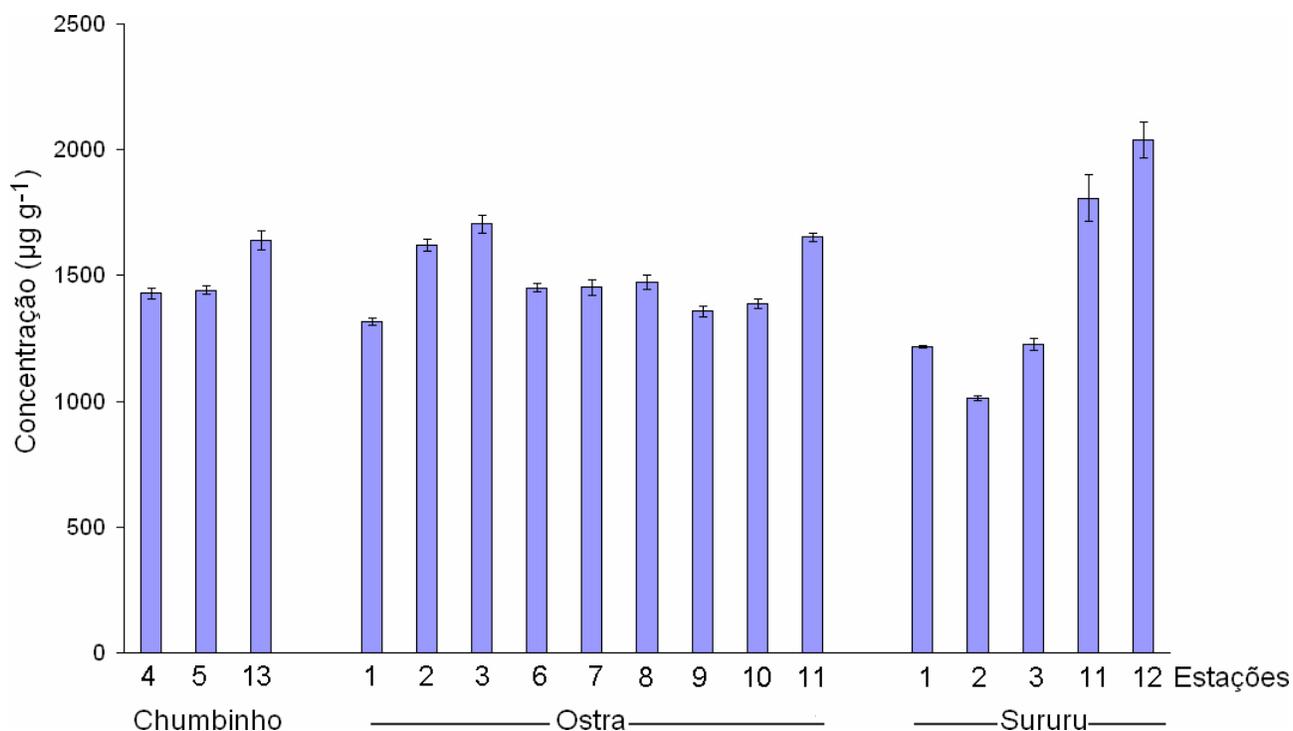


Figura 27. Concentrações de potássio nos tecidos moles de bivalves da BTS (mg g^{-1} de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

5.5.7 Manganês

Os resultados de Mn, mostrados na Figura 28, indicaram que o sururu foi o bivalve que apresenta os mais altos valores de concentração nas mesmas localidades (1, 2, 3 e 11) bioacumulou mais o metal que as ostras. Os dados mostram que a maior concentração de Mn encontrada corresponde ao valor de $19,06 \pm 0,27 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso úmido) presente no sururu da estação 11, localizada nas proximidades do Rio Subaé (Figura 3, p.44). O metal é um elemento traço essencial, porque é ativador de uma série de enzimas, além de desempenhar um papel importante em vários processos fisiológicos (cicatrização, crescimento dos ossos, função antioxidante) (FNB, 2001). Existem poucos relatos de

toxicidade de manganês, os quais se limitam à ingestão de altas doses de suplementos minerais (FNB, 2001). Os maiores sinais de toxicidade são a diminuição do apetite, do crescimento, inibição da absorção de ferro e funções neurológicas alteradas (Hathcook, 2004). A ANVISA e a maioria das agências especializadas em saúde internacionais, não estabeleceram CMPs para Mn em alimentos. Apenas a UK EVM sugeriu um nível seguro de $8,2 \text{ mg dia}^{-1}$ do metal nos alimentos, baseado em poucos estudos epidemiológicos (UK EVM, 2003). Dessa forma, verifica-se nos resultados obtidos que 100 g dos bivalves da BTS fornecem quantidades menores que aquela sugerida pela UK EVM que não ocasionaria o aparecimento de efeitos adversos. Segundo os dados obtidos os bivalves da BTS fornecem a cada 100 g de parte comestível, quantidades maiores do metal do que outros os frutos do mar e pescados descritos na tabela de composição de alimentos da ENDEF, que possuem 0,01 a 0,36 mg de Mn.

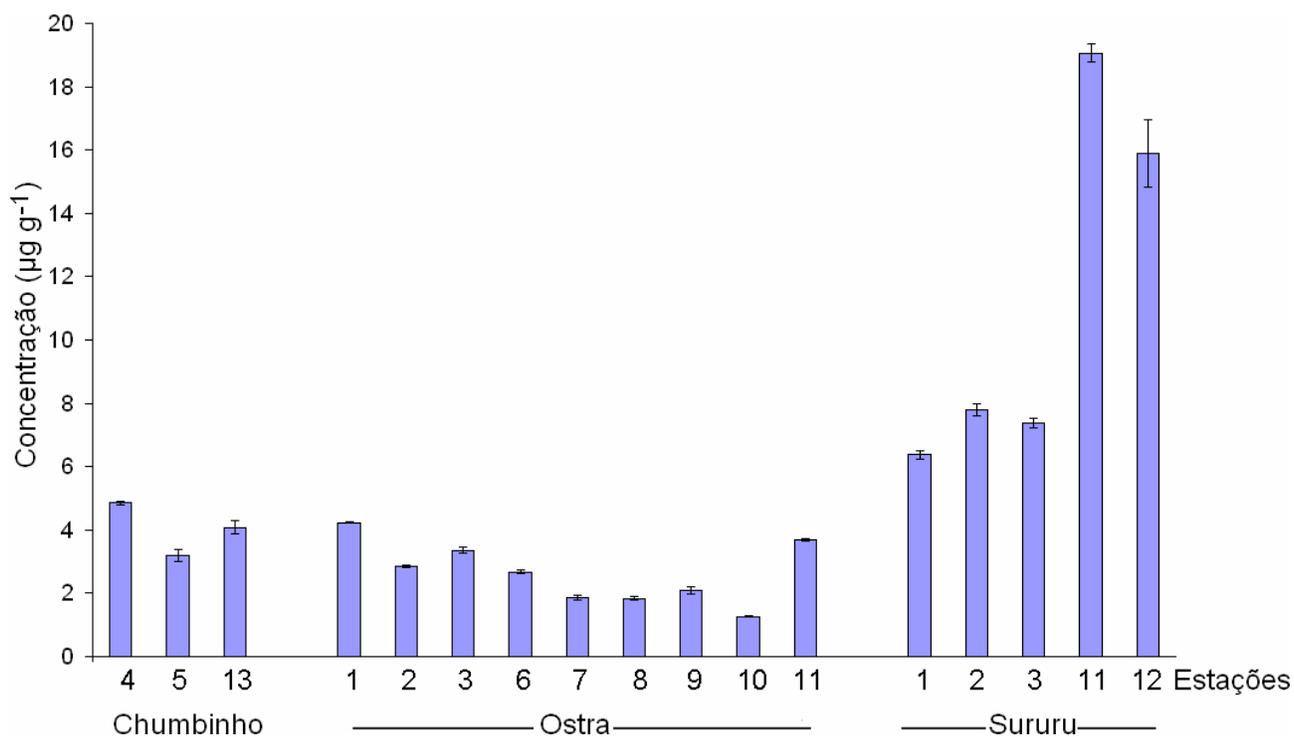


Figura 28. Concentrações de manganês nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

5.5.8 Zinco

O zinco é um metal traço essencial para todas as formas de vida. Esse elemento desempenha um papel importante no crescimento, no desenvolvimento do sistema

imunológico, na função neurológica, reprodução e no metabolismo celular (FNB, 2001). Os dados indicados na Figura 29 mostram que os teores do metal nos tecidos moles das ostras estavam muito acima da concentração máxima permitida pela ANVISA ($50 \mu\text{g g}^{-1}$), ANFZA ($290 \mu\text{g g}^{-1}$), JECFA ($1,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e EVM ($0,7 \mu\text{g g}^{-1}$). O zinco é um dos metais regulados pelos bivalves, o que dificulta avaliar a contaminação ambiental através dos dados de concentração deste elemento (Regoli e Orlando, 1994). Além disso, o mecanismo de estocagem e detoxificação das ostras é particularmente mais eficiente (Carvalho *et al.* 1993). Explicam-se assim, os elevados valores para esse metal nas ostras. Portanto, os bivalves das estações nº. 1, 2, 3, e 11, onde também tiveram coleta de sururu, bioacumularam mais o metal. A maior concentração de zinco foi de $446 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso úmido) encontrada nos tecidos moles das ostras da estação nº. 7, localizada próxima do Rio Paraguaçu (Figura 3, p.44). Os possíveis sinais toxicidade de zinco são: dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos. A maior consequência do consumo excessivo de zinco na dieta (em longo prazo) é a deficiência de cobre (OMS, 1998; FNB, 2001).

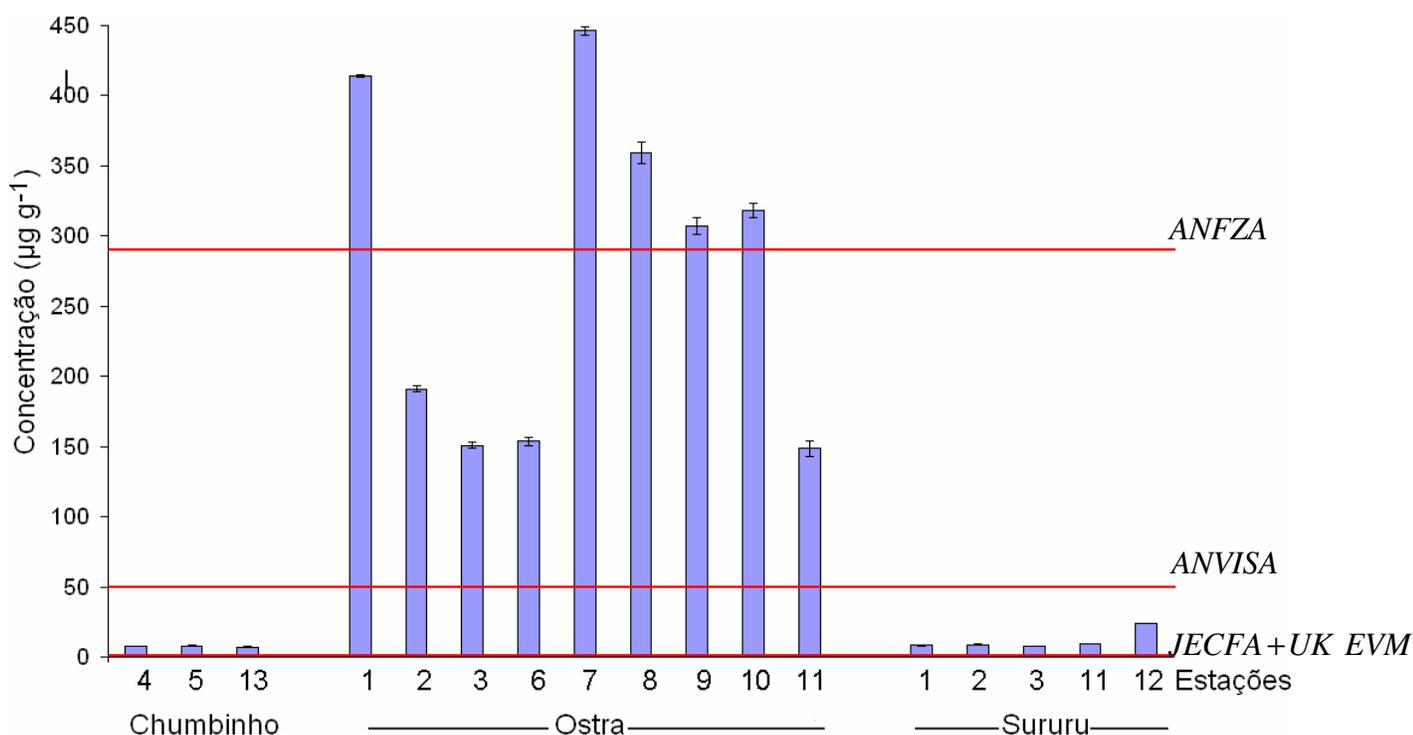


Figura 29. Concentrações de zinco nos tecidos moles de bivalves da BTS ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso úmido) determinadas pelo método de digestão ácida com bombas Parr e detecção por ICP OES.

6. Conclusões

O presente trabalho atingiu os seus objetivos, ou seja, propor um método analítico que oferecesse um preparo de amostras fácil, rápido e eficiente para determinação multi-elementar em moluscos bivalves por ICP IOES e realizar uma avaliação da contaminação de bivalves em alguns locais de mariscagem na Baía de Todos os Santos.

A aplicação do planejamento de Doehlert de três fatores (tempo de centrifugação, concentração do meio ácido e velocidade de rotação) demonstrou que os elementos Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn foram passíveis de serem quantificados. Além disso, foi demonstrado nesse planejamento que não havia pontos máximos inclusos nos domínios experimentais, mas sim pontos estacionários de sela. Dessa forma, foram consideradas as condições experimentais que forneceram maiores valores de recuperação dos metais em MRC NIST 1566b (tecido de ostra), ou seja, 20 min no tempo de centrifugação, 9000 rpm na velocidade de centrifugação e 1 mol L^{-1} na concentração do meio ácido. Foi observado que o emprego do ultrassom na extração ácida, previamente a centrifugação, colaborava para um aumento nas extrações ácidas dos metais Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn Na, Sr e Zn no tecido de ostra certificado.

O método foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: LOQ, LOD, exatidão e precisão. Os limites de detecção e quantificação do método foram suficientemente baixos para permitir a determinação dos analitos no MRC (tecido de ostra, NIST 1566b). Os resultados de exatidão mostraram que a extração ácida com o uso do ultrassom permite melhores resultados de concentração dos analitos e que este poderia ser adequado para quantificação de todos os elementos estudados, segundo os dados de recuperação em tecido de ostra certificado. Porém, na comparação entre métodos, foram constatados que apenas os resultados de Ca, K, Sr e Zn obtidos com o método proposto, tiveram poucas diferenças significativas com os resultados do método analítico de referência. Dessa forma, pode-se afirmar que o método proposto pode produzir resultados mais exatos para análise destes elementos citados anteriormente. Além disso, o método analítico mostrou ser preciso para todos os elementos possíveis de serem quantificados, (Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn) apresentando valores de RSD menores que 5%.

O estudo da determinação multi-elementar nas amostras de ostra (*Crassostrea rhizophorae*), sururu (*Mytella guyanensis*) e chumbinho (*Anomalocardia brasiliana*) da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil mostrou elevadas concentrações de Al, As, Cu e Zn nos tecidos dos bivalves, que em algumas estações, ultrapassaram os limites máximos

para a dieta preconizados pela ANVISA e por agências de outros países. Assim, o consumo de tais moluscos deve ser moderado principalmente por aquelas comunidades pesqueiras onde os moluscos bivalves representam uma das poucas alternativas de subsistência e renda.

Este estudo foi de grande valia, uma vez que foi desenvolvida uma metodologia analítica nova para monitoramento de metais majoritários e alguns elementos traços em tecidos de invertebrados marinhos, podendo ser aplicado em análises químicas que visem baixo custo. Além disso, o estudo ambiental de algumas áreas de mariscagem da BTS forneceu informações importantes sobre a contaminação de metais majoritários e elementos traços.

Sugere-se que seja feita uma completa avaliação de risco a saúde humana, nas áreas estudadas do presente trabalho. Para isso, seria necessário, coletar dados do histórico ambiental da área e dados da comunidade (peso corpóreo médio, posição social, profissão, idade, sexo), identificar o local onde está ocorrendo o evento de contaminação ambiental (efluentes industriais, derrames acidentais ou propositais) e avaliar a exposição (frequência de consumo dos mariscos, quantidade). Além disso, a avaliação deve ser realizada visando medidas investigadoras ou minimização do risco a saúde humana nas áreas estudadas.

Referências Bibliográficas

- Abollino, O., *et al.* Spatial and seasonal variations of major, minor and trace elements in Antarctic seawater. Chemometric investigation of variable and site correlations. **Advances in Environmental Research** 6: 29-43, 2001
- Adams W.J. *et al.* **Assessing the Hazard of Metals And Inorganic Metal Substances in Aquatic And Terrestrial Systems**, Pensacola Beach: SETAC, 2003 p.59
- Amado-Filho G.M. *et al.* Heavy metal in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brazil **Brazilian Journal of Biology** 68(1): 95 -100, 2004
- Amiard J. C. e Berthet B. Fluctuations Of Cadmium, Copper, Lead And Zinc Concentrations In Field Populations Of The Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* In The Bay Of Bourgneuf (Atlantic Coast, France) **Annales de l'Institut Océanographique** 72(2): 195 - 207, 1996
- Amiard, J.C. *et al.* Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. **Food and Chemical Toxicology** 46: 2010–2022, 2008
- ANFZA, **The Establishment of Guideline Levels for Contaminants (Metals) in Food: Generally Expected Levels**. Disponível em: http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/GELs_0801.pdf. Acesso em; 01 mar. 2010
- ANVISA. **Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm. Acesso em: 10 fev. 2010
- ANVISA. **Perguntas Frequentes – Alimentos – Alumínio**. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 1 mar. 2010
- ANVISA. **Portaria n ° 685, de 27 de agosto de 1998**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm. Acesso em fev. 2010

- Aras N.K e Ataman O.Y. **Trace Element Analysis of Food and Diet**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006, p.1-5
- Arruda, M.A.Z. e Santelli R. E. Mecanização No Preparo De Amostras Por Microondas: O Estado Da Arte. **Química Nova** 20(6): 638-643, 1997
- Ashoka, S., *et al.* Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. **Analytica Chimica Acta** 653: 191–199, 2009
- Augusto C. *et al.* Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). **Marine Environmental Research** 61: 439–455, 2006
- Baird, C. – **Química Ambiental**. 2ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p
- Bellotto, V.R., *et al.* Biomonitoramento ativo de metais traço e efeito biológico em mexilhões transplantados para área de influência de efluente de indústria de e beneficiamento de aço - fase I. Braz. **J. Aquat. Sci. Technol** 9(2): 33-37, 2005
- Benite A.M.R *et al.* Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova** 30(8): 2062-2067, 2007
- Beraldo H. Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola** (6): 4-6, 2005
- Bermejo-Barrera P. *et al.* Optimization of a microwave-pseudo-digestion procedure by experimental designs for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** (55): 1351 -1371, 2000
- Bermejo-Barrera P. *et al.* Sample pre-treatment methods for the trace elements determination in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Talanta** (57): 969 - 984, 2001

- Bermejo-Barrera P. *et al.* Slurry sampling for electrothermal aas determination of cadmium in seafood products. **Atomic Spectroscopy** 21: 5 – 9, 2000
- BNB (Banco do Nordeste), **Perfil dos Estados – Bahia**. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/> . Acesso em: dez 2009
- Borges D.L.G., *et al.* Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 21: 763 -769, 2006
- Boss C.B. e Fredeen K.J. **Concepts, Instrumentations, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**, USA: Perkin-Elmer Corporation. 1997
- Boulyga S.F., *et al.* Performance of ICP-MS with Hexapole Collision Cell and Application for Determination of Trace Elements in Bio-Assays. **Mikrochimica Acta** (137): 93 -103, 2001
- Brady J. e Humiston G. **Química geral - volume 1.2ª** edição. Rio de Janeiro: ECT. 2000, p.77
- Bruhn C.G., *et al.* Determination of cd in mussels and non-fat milk powder by flow injection - flame atomic absorption spectrophotometry (fi-faas) with on-line extraction by a chelating resin. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** 47: 123 -135, 2002
- Burguera, M. e Burguera J.L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis." **Analytica Chimica Acta** 366(63-80), 1998
- Buseth E., *et al.* Determination of endogenous concentrations of the lanthanides in body fluids and tissues using electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 13: 1039 -1049, 1998

- Capelo J.L., *et al.* Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid–liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry** 12: 225–232, 2005
- Capelo J.L., *et al.* Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS. **Talanta** 68: 1442–1447, 2006
- Cardellicchio N., *et al.* Levels of metals in reared mussels from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). **Food Chemistry** 107: 890 – 896, 2008
- Carl G.F. e Gallagher B.B. **Manganese in health and disease**. Florida: CRC Press, Inc, 1994:133-15
- Caroli S. **The Determination of Chemical Elements in Food – Applications for Atomic and Mass Spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, inc, 2007, p.568
- Carvalho C.E.V., *et al.* Distribuição de metais pesados em mexilhões (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. **Ecotoxicology and Environmental Restoration** 4(1); 1-5, 2001
- Carvalho C.E.V., *et al.* Metais pesados na biota bêntica da Baía de Sepitiba e Angra dos Reis, RJ. **Acta Limnologica Brasiliensia** 6: 222-229, 1993
- Cataldi T.R.I *et al.*, A three-factor Doehlert matrix design in optimising the determination of octadecyltrimethylammonium bromide by cation-exchange chromatography with suppressed conductivity detection. **Analytica Chimica Acta** 597: 129–136, 2007
- Cazes J. **Encyclopedia of Chromatography 2004 Update Supplement**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2004, p.337
- Cecília Z. *et al.* **Manual de identificação dos invertebrados marinhos da região do Sudeste-Sul do Brasil**, vol.1, 1ª edição. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2006

- Cevik U., *et al.* Assessment of metal element concentrations in mussel (*M. Galloprovincialis*) in Eastern Black Sea, Turkey. **Journal of Hazardous Materials** 160: 396–401, 2008
- Cheong L. e Lee, H.B. **Mussel farming -Satis Extension Manual Series**, Bangkok: Southern Asian Fisheries Development Centre, 1984
- Cirano M. e Lessa G.C. Oceanographic Characteristics of Baía de Todos os Santos, Brazil. **Revista Brasileira de Geofísica** 25(4): 363-387, 2007
- Coimbra A.G.. **Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Graças, Baía de Sepetiba, R.** Dissertação de mestrado, Pós- Graduação em Geociências, Universidadal Federal Fluminense, Brasil. 2009
- Conti M.E. e Cecchetti G. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. **Environmental Research** 93: 99–112, 2003
- Cravo A., *et al.* Minor and trace elements in the shell of *Patella aspera* (Roding 1798). **Environment International** 28: 95– 302, 2002
- Crosby M.P. e Gale L.D. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. **Journal of Shellfish Research** (9) 1: 233-237, 1990
- Dallinger R. e Rainbow. P. S. "Ecotoxicology of metals in invertebrates. Florida: CRC press 1993, p.4-5
- Das A. K., *et al.* Metal speciation in solid matrices. **Talanta** 42: 1007-1030, 1995
- Deaker M. e Maher W. Low volume microwave digestion for the determination of selenium in marine biological tissues by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. **Analytica Chimica Acta** 350: 287-294, 1997

- Depledge, M. H. & Rainbow, P. S. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. **Comp Biochem Physiol Part C**: 97: 1-7, 1990
- Driscoll C.R *et al.* Trace Metals Speciation and Cycling, Biogeochemistry of Small Catchments: A Tool for Environmental Research”, Nova Iorque: John Wiley & Sons Ltd, 1994. p.299-300
- Dubuisson C. *et al.*, Comparison of Axially and Radially Viewed Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry in Terms of Signal-to-Background Ratio and Matrix Effects. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 12: 281–286, 1997
- Duffus J.H. “Heavy metals” – a meaningless term? **Pure Appl.Chem** 74 (5): 793 – 807, 2002
- Ebdon L. *et al.*, **Trace Element Speciation for Environment, Food and Health**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, p.39-40
- ENDEF-IBGE, **Estudo Nacional da Despesa Familiar – Tabelas de Composição de Alimentos - 1999**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS - RJ/Tabela de Composicao de Alimento-ENDF.pdf>. Acesso em: abr 2010
- España M.S.A., *et al.* Comparison of mineral and trace element concentrations in two molluscs from the Strait of Magellan (Chile). **Journal of Food Composition and Analysis**_(20): 273 - 279, 2007
- Ferreira L.C.F. *et al.*, Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta** 63 1061–1067, 2004
- Font R., *et al.* Fast, clean, low-cost screening of cadmium and lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. by visible spectroscopy and partial least squares regression. **Food Chemistry** 105: 667 – 674, 2007

- Food and Drug Administration, **Methods, Method Verification and Validation ORA-LAB.5.4.5.** Disponível em; <http://www.fda.gov/ScienceResearch/FieldScience/ucm171877.htm>, Acesso em: jun 2010
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. **Calcium. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride.** Washington: National Academy Press; 1997:71-145
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc** Washington: National Academy Press, 2001:290 – 393
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. **Potassium. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate.** Washington: National Academy Press; 2004:173-246.
- Ford E.S. e Cogswell M.E. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. **Diabetes Care** 22(12):1978-1983, 1999
- Froes R.E.S., *et al.* Exploratory analysis and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) applied in the determination of metals in soft drinks. **Microchemical Journal** 92: 68–72, 2009
- Fukushima M., *et al.* Determination of metal-binding proteins in soft tissues of rock oyster by neutron activation analysis and particle induced X-ray emission. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** 257(1): 105 – 108, 2003
- Fukushima M., *et al.* Trace element determination in soft tissues of marine bivalves by activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** 255(2): 231 - 234, 2003

- García-Luque E., *et al.* Biological Adverse Effects on Bivalves Associated with Trace Metals Under Estuarine Environments. **Environ Monit Assess** 131: 27 – 35, 2007
- Galvão P.M.A. *et al.* Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol** 13(2):59-66, 2009
- Goldberg E.D. *et al.* U.S. Mussel Watch: 1977–1978 results on trace metals and radionuclides. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 16: 69-93, 1983
- Goldberg, E.D e Bertine K.K. Beyond the Mussel Watch--new directions for monitoring marine pollution. **Science of The Total Environment** 20 247 (2-3): 165-174, 2000
- Goldberg, E.D. Emerging Problems in the Coastal Zone for the Twenty-First Century. **Marine Pollution Bulletin** 31: 152-158, 1995
- Gómez L.R., *et al.* Dual nebulizer sample introduction system for simultaneous determination of volatile elemental hydrides and other elements. **Anal Bioanal Chemistry** (386):188 -195, 2006
- Gómez-Ariza J.L., *et al.* Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home-modified AFS detector. Application to the Andalusian coast (south Spain). **Chemosphere** 61: 1401 - 1409, 2005
- Gonçalves R.S.L. **Avaliação biogeoquímica de metais pesados em moluscos bivalves de áreas da Baía de Todos os Santos - BA e rios Cocó e Ceará – CE.** Dissertação de mestrado, Pós- Graduação em Geologia, Universidadal Federal do Ceará, Brasil. 2006
- González A.G., *et al.* Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta** 48: 729-736, 1999.
- Goyer R.A. *et al.* **Metal Toxicology**, San Diego - EUA: Academic Press. 1995

- Guiné M.F., **Plasma Acoplado Indutivamente ICP-AES**, São Paulo – Brasil: Centro de energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo. 1998
- Harrington C. F., *et al.* A protocol for the multielemental analysis of trace metals in food samples by flow injection coupled to icp-ms. **Atomic Spectroscopy** (21): 174 - 179, 1999
- Hatje V. e Andrade J.B. **Baía de Todos os Santos: Aspectos Oceanográficos**. Salvador - Ba: EDUFBA, 2009
- Hedge L.H., *et al.* Dredging related metal bioaccumulation in oysters. **Marine Pollution Bulletin** 58: 832–840, 2009
- Hill, **Abnormal Development - Heavy Metals**. Disponível em: <http://embryology.med.unsw.edu.au/defect/metal.htm>. Acesso em: nov 2009
- Hoenig M. e Kersabiec A.M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B** 51: 1297-1307, 1996
- Hsu M., *et al.* Application of acetylacetonone chelation solid-phase extraction to gfaas measurements of trace amounts of beryllium in marine organisms. **Analytical Sciences** 20: 1697 – 1700, 2004
- Hunt J. *et al.*, Regional Monitoring Program for Water Quality (RMP) - Annual Monitoring Results – 2004-2005. Disponível em: <http://legacy.sfei.org/rmp/annualmonitoringresults/> Acesso em: 10 abr 2010
- INMETRO “**Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**”, Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf . Acesso em: 6 jun 2009

- IUPAC. **Compendium on Analytical Nomenclature Definitive Rules - Spectrochemical Analysis - Preparation of materials for analytical atomic spectrometry**, 3ª edição, 1997
- Jacob C.R. *et al.* **Religião e sociedade em capitais brasileiras**. São Paulo: Loyola, 2006
- JECFA. **Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives: Sixty-fourth meeting - 2005**. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf. Acesso em: fev 2010
- JECFA. **Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives: Sixty-seven meeting -2006**. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/jecfa67_final.pdf Acesso em: fev 2010
- JECFA. **WHO Food Additives Series 17 – 1982: Zinc**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je33.htm>. Acesso em: fev 2010
- JECFA. **WHO Food Additives Series 24 -1989: Aluminum** . Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je07.htm>. Acesso em: fev 2010
- JECFA. **WHO Food Additives Series 24 -1989: Arsenic**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je08.htm>. Acesso em: fev 2010
- Jeng M., *et al.* Mussel Watch: a review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991-1998 **Environmental Pollution** 110: 207-215, 2000
- Jerry M. **Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water**, Oxford: Elsevier Science, 2002
- Kabata-Pendias A. e Mukherjee A.B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer-Verlag, 2007. 550p

- Karadjova I.B., *et al.* Arsenic in marine tissues - The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** 62: 258 – 268, 2007
- Kazi T.G., *et al.* Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals determination in environmental and biological samples. **Journal of Hazardous Materials** 161: 1391–1398, 2009
- Kennish M.J. **The Practical Handbook of Marine Science**. Florida: CRC Press, 2000, p.45-47
- Krishna M.V.B. e Arunachalam J. Ultrasound-assisted extraction procedure for the fast estimation of major, minor and trace elements in lichen and mussel samples by ICP-MS and ICP-AES. **Analytica Chimica Acta** 522: 179–187, 2004
- Krug, F.J. **Métodos de Decomposição de Amostras**. 3ª edição. Piracicaba: III Workshop sobre Preparo de Amostras, 2000
- Lavilla I. *et al.* Fast determination of arsenic, selenium, nickel and vanadium in fish and shellfish by electrothermal atomic absorption spectrometry following ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry** 106: 403 - 409, 2008
- Lewis M. e Chancy C. A summary of total mercury concentrations in flora and fauna near common contaminant sources in the Gulf of Mexico. **Chemosphere** 70: 2016 – 2024, 2008
- Lima G.M.P. e Lessa G. C. The fresh-water discharge in Todos os Santos Bay (Ba) and its significance to the General Water Circulation. **Revista Pesquisas** 28(2): 85-98, 2002
- Liu C. e Russell R.M. Nutrition and gastric cancer risk: an update. **Nutrition Reviews** 66(5):237-249, 2008

- Liu C., *et al.* "Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. **Science of the Total Environment** 361: 57 – 66, 2006
- Liu C., *et al.* Bioaccumulation of arsenic compounds in aquacultural clams (*Meretrix lusoria*) and assessment of potential carcinogenic risks to human health by ingestion. **Chemosphere** 69, 2007
- Liu C., *et al.* g-Aminobutyrohydroxamate resins as stationary phases of chelation ion chromatography. **Analytica Chimica Acta** 369: 225 – 233, 1998
- Liu J.H. e Kueh C.S.W. Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters. **Marine Pollution Bulletin** 51: 857–875, 2005
- Linde, Inductively Coupled Plasma. Disponível em: http://hiq.linde-gas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/anal_icp. Acesso em: jun 2010
- Locatelli C. e Torsi G. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 509: 80–89, 2001
- Locatelli C., *et al.* Determination of heavy metals in environmental bio-indicators by voltammetric and spectroscopic techniques. **Fresenius J Anal Chem** 363: 662 – 666, 1999
- Maduro C., *et al.* Determination of Cd and Pb in biological reference materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison of three ultrasonic-based sample treatment procedures. **Talanta** 68: 1156–1161, 2006
- Magalhães C.E. e Arruda M.A.Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. **Química Nova** 21(4): 460-466, 1998

- Maggi C., *et al.* Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. **Analytica Chimica Acta** 641: 32–36, 2009
- Magnusson, W.E.; Mourão, G. **Estatística sem matemática: a ligação entre as questões e a análise.** Londrina: Editora Planta, 2003. 126p
- Manutsewee N., *et al.* Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction. **Food Chemistry** 101: 817 – 824, 2007
- Marigomez, I. *et al.* Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. **Micros Res Techniq.** 56: 358-392, 2002
- Marques H. L. **A Criação comercial de mexilhões.** 1ª edição. São Paulo:Nobel, 1998
- Martin R.E. *et al.* **Marine & freshwater products handbook.** Estados unidos: Technomic, 2000
- Méndez H., *et al.* Ultrasonic extraction combined with fast furnace analysis as an improved methodology for total selenium determination in seafood by electrothermal-atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 452: 17–222, 2002
- Mermet J. Limit of quantitation in atomic spectrometry: An unambiguous concept? **Spectrochimica Acta Part B** 63: 166–182, 2008
- Mesko M.F., *et al.* Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. **Microchemical Journal** 82: 183–188, 2006
- Moreira F.R. e Moreira J.C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde **Química Nova** 27(2): 251-260, 2004
- Moreno-Cid A. e Yebra M.C. Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction. **Spectrochimica Acta Part B** 57: 967 – 974, 2002

- Mubiana V.K., *et al.* The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. **Environmental Pollution** 144: 272-279, 2006
- Nano R.M.W., *et al.* Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. **Talanta** 80: 559–564, 2009
- Narasaki H. e Cao J. Determination of Arsenic and Selenium in River Water by Hydride Generation ICP-AES. **Atomic Spectroscopy** 17(2): 77 – 82, 1996
- National Research Council, U.S. **Mineral tolerance of Animals, Committee on Mineral and Toxic substances in diet and water for animals**, 2ª edição, Washington: National Academy Press, 2005
- NBR ISO/IEC 17025 **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios**. Rio de Janeiro: ABNT, 2001
- NEPA-UNICAMP, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – Versão 2**. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php>. Acesso em: abr 2010
- Neves R.C.F., *et al.* FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry** 113: 679–683, 2009
- Neff J.M. **Bioaccumulation in Marine Organisms – Effects of Contaminants from Oil Well Produced Water**. San Diego; Elsevier Ltd, 2002, p.65
- Nieboer E. e Richardson D.H.S. The replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical** 1 (3), 1980
- NIST, **Use of NIST Standard Reference Materials for Performance of Analytical Chemical Methods and Laboratories**. Disponível em:

http://www.nist.gov/cstl/analytical/inorganic/upload/NIST_SpecialPub829.pdf, Acesso em: jun 2010

- Nordberg M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta** 46(2); 243 - 253, 1998
- NRC-US. **Mineral tolerance of Animals, Committee on Mineral and Toxic substances in diet and water for animals**, 2ª edição, Washington. DC, 2005
- Odzak, N., T. Zvonaric, *et al.* "Biomonitoring of mercury in the Kastela Bay using transplanted mussels." The Science of the Total Environment **261**: 61-68, 2000
- Oliveira F.M. *et al.* PCBs (Arochlor™ 1242, 1254 and 1260) in water and mussels by GC-MS-MS – 2001. Disponível em: [http:// www.labwin.com.br/](http://www.labwin.com.br/) Acesso em abr 2010
- OMS **Elementos traços na nutrição e saúde humanas**. São Paulo: Rocca, 1998. 296p
- Orban E., *et al.* Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. **Food Chemistry** 77: 57–65, 2002
- Orescanin V. *et al.* Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** 245: 495–500, 2005
- Özden Ö., *et al.* Trace mineral profiles of the bivalve species *Chamelea gallina* and *Donax trunculus*. **Food Chemistry** 113: 222–226, 2009
- Peacock J.M., *et al.* Relationship of serum and dietary magnesium to incident hypertension: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Annals of Epidemiology** 9(3):159-165, 1999

- Petrobras (Petróleo Brasileiro S/A). **Refinarias Petrobrás**. Disponível em: http://www2.petrobras.com.br/minisite/refinarias/portugues/refinarias/rlam_imp.asp, Acesso em: dez 2009
- Phillips D.J.H. e Rainbow P.S. **Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants** Londres: Elsevier Applied Science. 1994, p.79
- Pimentel G. **Centro foi marco da industrialização na Bahia** Disponível em: http://www.achanoticias.com.br/noticia_pdf.kmf?noticia=494260, acesso em: dez 2009
- Pivetta, F., *et al.* Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. **Caderno da Saúde Pública** 17(3): 545-554, 2001
- Priego-Capote F. e Castro M.D.L. Ultrasound-assisted digestion: A useful alternative in sample preparation. **Journal of Biochemical Biophysical Methods** 70: 299-310, 2007
- Protasowicki M., *et al.* Trace metals in the shells of blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Poland coast of Baltic sea. **Environ Monit Assess** 141: 329 – 337, 2008
- Rainbow P.S e Luoma S.N. **Metal Contamination in Aquatic Environments**, 1ª edição. Cambridge University Press: Science and Lateral Management. 2008
- Rainbow P.S., *et al.* Biomonitoring of trace metals in the gulf of gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*balanus improvisus*). **Water Research** 34(6): 1823-1829, 2000
- Rainbow, P. S. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. **Marine Pollution Bulletin** 31: 183-192, 1995
- Rainbow, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**(120): 497–507, 2002

- Regoli, F. e Orlando, E. Seasonal-Variation of Trace-Metal Concentrations in the Digestive Gland of the Mediterranean Mussel *Mytilus- Galloprovincialis* - Comparison between a Polluted and a Non-Polluted Site. **Arch Environ Con Tox.** 27: 36-43, 1994
- Reis P.A.. e Almeida C.M.R. Matrix importance in animal material pre-treatment for metal determination. **Food Chemistry** 108: 1294–1299, 2008
- Ribani M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova** 27(5): 771-780, 2004
- Richards R.G. e Chaloupka M. Temperature-dependent bioaccumulation of copper in an estuarine oyster. **Science of the Total Environment** 407: 5901–5906, 2009.
- Riley, J.P. e Chester, R. **Introduction to marine chemistry.** Londres: Academic Press. 1971, p.92-93
- Rocha, O. G. F. *et al.* Teores de Estrôncio Sérico em Pacientes Portadores de Insuficiência Renal Crônica em Tratamento Hemodialítico. **J Bras Nefrol** 27(1): 15 - 21, 2005
- Rojas I., *et al.* Investigation of the direct hydride generation nebulizer for the determination of arsenic, antimony and selenium in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Anal Bioanal Chem** 376: 110 – 117, 2003
- Rousseau R.M. Detection limit And Estimate of uncertainty of Analytical XRF results. **The Rigaku Journal** 18(2): 40, 2001
- Saavedra Y., *et al.* The effect of size on trace metal levels in raft cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **The Science of the Total Environment** 318: 115–124, 2004
- Sadiq M. **Toxic Metal Chemistry in Marine Environment**, Nova Iorque: Marcel and Dekkar Inc. 1992, p.24-25

- Santamaría-Fernandéz R., *et al.* Blending Procedure For The Cytosolic Preparation Of Mussel Samples For Aas Determination Of Cd, Cr, Cu, Pb, And Zn Bound To Low Molecular Weight Compounds. **Atomic Spectroscopy** 25(1): 37 – 43, 2004
- Santiago-Rivas S. *et al.* Pressurized liquid extraction-assisted mussel cytosol preparation for the determination of metals bound to metallothionein-like proteins. *Analytica Chimica Acta* 603(1): 36-43, 2007
- Santos V.L.C.S., *et al.* Isomers of the dodecylbenzene in marine sediments from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management** 3: 479-484, 2000
- Santos W.N.L. *et al.*, Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal** 75: 211–221, 2004
- Santos W.P.C., *et al.* Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES. **Microchemical Journal** 95: 169–173, 2010
- Schiavo D., *et al.* Evaluation of the use of multiple lines for determination of metals in water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing. **Spectrochimica Acta Part B** 64: 544–548, 2009
- Schintu M., *et al.* Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. **Marine Pollution Bulletin** 57: 832–837, 2008
- Schmidt E.B., *et al.* Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: A minireview with focus on clinical trial data. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 75: 191–195, 2006

- Schmidt E.B., *et al.* Marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease Part I. Background, epidemiology, animal data, effects on risk factors and safety. **Thrombosis Research** 115: 163—170, 2005
- Schwartz S.B. **Segredo internos: engenheiros e escravos na sociedade colonial, 1550-1835**, São Paulo: Companhia da letras, 2005
- Seco-Gesto E.M., *et al.* Multi-element determination in raft mussels by fast microwave-assisted acid leaching and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Talanta** 72: 1178–1185, 2007
- Seixas T.G., *et al.* Distribuição de selênio em organismos marinhos da Baía de Guanabara/ Rj. **Química Nova** 30(3): 554 – 559, 2007
- Silva C.A.R., *et al.* Biomonitoring Of Trace Metal Contamination In The Potengi Estuary, Natal (Brazil), Using The Oyster *Crassostrea rhizophorae*, A Local Food Source. **Water Research** 35: 4072-4078, 2001
- Silva E.G.P., *et al.* Fast method for the determination of copper, manganese and iron in seafood samples. **Journal of Food Composition and Analysis** 21: 259 – 263, 2008
- Silva J. R. e Boehs G. Ocorrência e distribuição de larvas de ostras *Crassostrea rhizophorae* (goulding, 1828) na baía de camamu, bahia. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG**, 2007
- Skoog D.A., *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª edição. Porto Alegre: Bookman. 2009
- Slejkovec Z., *et al.* Preliminary studies on arsenic species in some environmental samples. **Fresenius J Anal Chem** 354: 592 – 595, 1996
- Souto F.J.B, Martins V.S. Conhecimentos etnoecológicos na mariscagem de moluscos bivalves no Manguezal do Distrito de Acupe, Santo Amaro – BA. **Biotemas** 22 (4): 207-218, 2009

- Sudic (Superintendência de Desenvolvimento Industrial e Comercial) **Áreas industriais e distritos sob a jurisdição da Sudic**. Disponível em: <http://www.sudic.ba.gov.br/infranew.htm>, Acesso em: dez 2009
- Swaminathan S., *et al.* The role of iron in diabetes and its complications. **Diabetes Care** 30(7):1926-1933, 2007
- Szpunar J. Trace element speciation analysis of biomaterials by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Trends in Analytical Chemistry** 19(2): 127- 137, 2000
- Szpunnar J. e Lobnski R. **Hyphenated Techniques in Speciation Analysis**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003, p.7-9
- Tavares, T. M. e F. M. Carvalho "Avaliação de Exposição de Populações Humanas a Metais Pesados no Ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano." **Química Nova** 15(2): 147-152, 1992
- Teófilo R.F. e Ferreira M.M.C, Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova** 29(2): 338-350, 2006
- Thomas R. **Practical guide to ICP-MS**.1ª edição. EUA: Marcel Deker, Inc. 2004, p-268-269, 2004.
- Thomsen V.B.E. **Modern spectrochemical analysis of metals: an introduction for users of arc/spak instrumentation**. 1ª edição. EUA: ASM international. 1996, p.115-116
- Tokman N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials** 143: 87–94, 2007

- Toledo M. *et al.* Aspectos da contaminação por cádmio em produtos do mar coletados no Estuário de Santos, Baía da Guanabara e Baía de Todos os Santos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 43: 15-24, 1983
- Torres F.R. **Disponibilidade dos metais cobre e chumbo em um canal de maré receptor de efluentes de carcinicultura**. Dissertação de mestrado, Pós- Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidadal Federal do Ceará, Brasil. 2009
- UK EVM, Expert Group on Vitamins and Minerals, **Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals**. Disponível: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/vitmin2003.pdf> . Acesso em: mar. 2010
- Vale G., *et al.* Enzymatic probe sonication as a tool for solid–liquid extraction for total selenium determination by electrothermal-atomic absorption spectrometry. **Talanta** 74: 198 – 205, 2007
- Vélez D., *et al.* "Determination of Arsenobetaine in Manufactured Seafood Products by Liquid Chromatography, Microwave assisted Oxidation and Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 12: 91 – 96, 1997
- Vieira M.A., *et al.* Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review. **Spectrochimica Acta Part B** (64): 459–476, 2009
- Wagner A. e Boman J. Biomonitoring of trace elements in Vietnamese freshwater mussels. **Spectrochimica Acta Part B** 59: 1125– 1132, 2004
- Wallace W.G. e Lopez G.R. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. **Estuaries** 19 (4): 923–930, 1996
- Wallace W.G.e Luoma S.N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves.II.Significance of trophically available metal (TAM). **Marine ecology. Progress series** 257:125–137, 2003

- Wallner-Kersanach M. **Assessment of trace metal pollution of Todos os Santos Bay, Brazil, on the basis of measurements of bivalves and sediments.** Tese de doutorado na Universitat Bremen, Bremen, Alemanha, 1994
- Wang W. e Rainbow P.S. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 61: 145–159, 2005
- Yang K. X. e Swami K. Determination of metals in marine species by microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis. **Spectrochimica Acta Part B** 62: 1177 - 1181, 2007
- Yap C.K., *et al.* Can the shell of the green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia be a potential biomonitoring material for Cd, Pb and Zn? **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 57: 623 - 630, 2003
- Yebra, M.C. e Moreno-Cid A. On-line determination of manganese in solid seafood samples by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta** 477: 149 – 155, 2003
- Yoshino K., *et al.* Trends in dietary intake of folate, vitamin B6, and B12 among Japanese adults in two rural communities from 1974 through 2001". **Journal of Epidemiology** 15: 29 - 37, 2005
- Zhou Q., *et al.* Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica chimica acta** 606: 135–150, 2008