



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FLORIATAN DOS SANTOS COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM TECIDOS VEGETAIS
(*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA**

ILHÉUS

2019

FLORIATAN DOS SANTOS COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR
ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM TECIDOS VEGETAIS
(*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA EM CHAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito parcial de obtenção do Grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Luana Novaes Santos

ILHÉUS

2019

C837 Costa, Floriatan dos Santos.
Desenvolvimento de metodologia de
extrato assisti-
da por ultrassom para determinação de
metais em te-
cidos vegetais (Rhizophora mangle L. e
Laguncularia
racemosa (L.) C.F.Gaertn) por
espectrometria de ab-
sorção atômica em chama / Floriatan dos
Santos
Costa. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.
75 f. : il.

Orientador: Erik Galvão Paranhos da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Química.

Referências: f. 68-75.

1. Química. 2. Espectrometria de absorção atômica.
3. Metais pesados. 4. Manguezais. 5. Laguncularia
racemosa. I. Título.

CDD 540

FOLHA DE APROVAÇÃO
(PÁGINA INTENCIONALMENTE DEIXADA EM BRANCO)

A minha mãe e a minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a todos aqueles que compartilharam tempo, conhecimento e experiências, viabilizando a finalização desta dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva e a Prof. Dra. Luana Novaes Santos pela orientação valiosa, paciência e colaboração ao longo do desenvolvimento do trabalho, e pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Às instituições que deram suporte no desenvolvimento do trabalho: Universidade Estadual de Santa Cruz, através do Programa de Pós-Graduação em Química e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pela concessão da bolsa de estudos.

Agradecimento especial ao Prof. Raildo Mota de Jesus, pelo apoio, oportunidades e valiosas contribuições dadas ao longo do trabalho. Aos Professores. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo, Dr. Francisco H. Martinez Luzardo, pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

À Raquel Leal, pela parceria durante a realização deste trabalho.

Aos amigos mais recentes, Adriele, Ariaidny, Cíntia, Claudia, Jordan, Nájila, Rafaela, Sabrina, pelos bons momentos vividos nos dois últimos anos. Especialmente a Thaís Farias, pelas risadas e resenhas nos dias e noites de redação.

Aos amigos, Clissiane, Glêydison, Luana e Marina, pelas risadas e momentos de alegria.

Aos meus amigos de longa data, pelos incentivos nos momentos mais difíceis desta caminhada.

À minha família, especialmente minha mãe, Palmira, pelo apoio em tudo que foi importante.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

– Albert Einstein.

RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um procedimento de extração assistida por ultrassom para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras vegetais (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) por Espectrometria de Absorção Atômica em Chama. As condições do preparo de amostra foram otimizadas utilizando um planejamento de mistura simplex-centroide para determinação da composição da solução extratora (HNO₃, HCl e H₂O) e Box-Behnken na determinação das melhores condições aplicadas no procedimento de extração (potência, temperatura e tempo). As respostas experimentais foram normalizadas aplicando a função de resposta múltipla a partir do sinal analítico (absorbância) obtido no F AAS. A solução extratora apresentou sua composição ótima quando utilizados 1,14, 2,83 e 6,03 mL de HNO₃, HCl e H₂O, respectivamente, para um volume final de 10 mL e 250 mg de amostra. A condição de extração adequada à obtenção da máxima resposta foi, potência de 92,3%, tempo de 9,8 minutos e temperatura de 40,3 °C. A exatidão do procedimento foi verificada a partir da análise de material de referência certificado e comparação com digestão ácida convencional, obtendo recuperações entre 89 e 106% para ambos procedimentos. A precisão foi avaliada em estudo de repetibilidade (n=10), obtendo RSDs menores que 6,7%, e os limites de quantificação (mg kg⁻¹) foram de 0,95, 2,42, 1,31, 1,18 para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. As concentrações (mg kg⁻¹) de metais nos tecidos vegetais (folha e caule) variaram de 1,45–11,47, 29,20–126,46, 30,93–348,38 e 4,47–9,85 para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente, e são semelhantes às relatadas em estudos similares. O procedimento proposto mostrou-se eficiente e confiável para determinação dos metais em amostras vegetais, com a vantagem do baixo custo, redução do consumo de reagentes e tempo de análise, sendo, portanto, uma alternativa válida aos procedimentos de preparo de amostra convencionais.

Palavras-chave: Extração, Ultrassom, F AAS, Box-Behnken, Planejamento de mistura, Manguezal.

ABSTRACT

In this work, an ultrasonic assisted extraction procedure was developed for determination of Cu, Fe, Mn and Zn in plant samples (*Rhizophora mangle* L. and *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) by Flame Atomic Absorption Spectrometry. The sample preparation conditions were optimized using a simplex-centroid mixture design to determine the composition of the extraction solution (HNO₃, HCl and H₂O) and Box-Behnken in the determination of the best conditions applied in the extraction procedure (power, temperature and time). The experimental responses were normalized by applying the multiple response function from the analytical signal (absorbance) obtained in the F AAS. The extractive solution presented its optimum composition when used 1.14, 2.83 and 6.03 mL of HNO₃, HCl and H₂O, respectively, for a final volume of 10 mL and 250 mg of sample. The extraction condition adequate to obtain the maximum response was, power of 92.3%, time of 9.8 minutes and temperature of 40.3 °C. The accuracy of the procedure was verified from the analysis of certified reference material and comparison with conventional acid digestion, obtaining recoveries between 89 and 106% for both procedures. The precision was evaluated in a repeatability study (n=10), obtaining RSDs lower than 6.7%, and the limits of quantification (mg kg⁻¹) were 0.95, 2.42, 1.31, 1.18 for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively. The concentrations (mg kg⁻¹) of metals in plant tissues (leaf and stem) ranged from 1.45-11.47, 29.20-126.46, 30.93-348.38 and 4.47-9.85 for Cu, Fe, Mn and Zn, respectively, and are similar to those reported in similar studies. The proposed procedure proved to be efficient and reliable for the determination of metals in plant samples, with the advantage of low cost, reduction of reagent consumption and analysis time, thus being a valid alternative to conventional sample preparation procedures.

Keywords: Extraction, Ultrasound, F AAS, Box-Behnken, Mixture design, Mangrove.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais espécies arbóreas encontradas no manguezal da Baía do Pontal. <i>Rhizophora mangle</i> L. (A) <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn (B).....	21
Figura 2 – Locais de coleta de amostras distribuídos na área de estudo no estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, BA	38
Figura 3 – Região experimental do planejamento de mistura simplex-centroide aplicado na otimização da solução extratora.....	40
Figura 4 – Gráficos de resíduos e valores preditos para modelo quadrático usando resposta múltipla	48
Figura 5 – Efeitos padronizados para componentes e interações previstos pelo modelo quadrático obtido na modelagem da mistura	49
Figura 6 – Gráfico de contorno (A) e superfície de resposta (B) para proporção dos pseudocomponentes da mistura.....	51
Figura 7 – Comparação entre os valores preditos e resíduos (A) e valor observados experimentalmente e valor predito (B) obtidos no modelo quadrático.....	53
Figura 8 – Efeito padronizado para fatores e suas interações obtido do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais no delineamento Box-Behnken usando a resposta múltipla.....	54
Figura 9 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Box-Behnken usando a resposta múltipla.....	57
Figura 10 – Fatores de bioconcentração para Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido foliar (<i>Rhizophora mangle</i> L. e <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn) coletadas na área de manguezal do estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Trabalhos que empregam energia ultrassônica no preparo de amostra para determinação elementar em plantas e material vegetal aplicando diferentes técnicas analíticas	29
Tabela 2 – Análise de variância para avaliação de modelo matemático ajustado aos dados experimentais	34
Tabela 3 – Parâmetros instrumentais aplicados na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos vegetais por F AAS	37
Tabela 4 – Informações dos locais de coleta de amostras.....	38
Tabela 5 – Matriz de dados do planejamento de mistura simplex-centroide e respostas experimentais normalizadas aplicando função de resposta múltipla	46
Tabela 6 – Análise de variância dos modelos matemáticos obtidos com os dados experimentais modelados no planejamento de mistura utilizando a resposta múltipla	47
Tabela 7 – Valores críticos obtidos a partir do modelo quadrático e comparação da resposta prevista com dados obtidos experimentalmente	51
Tabela 8 – Matriz de dados do planejamento Box-Behnken e respostas experimentais normalizadas aplicando função de resposta múltipla	52
Tabela 9 – Análise de variância do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais no delineamento Box-Behnken utilizando a resposta múltipla	53
Tabela 10 – Valores críticos obtidos a partir do modelo matemático ajustado aos dados experimentais e comparação do ponto de máximo gerado pelo modelo quadrático	56
Tabela 11 – Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de diferentes métodos de calibração (curva aquosa e de adição de padrão em amostras de folha e caule)	58

Tabela 12 – Aplicação da extração assistida por ultrassom (UAE) na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em material de referência certificado (NIST 1515) e material de referência (EMBRAPA E1001a).....	59
Tabela 13 – Aplicação da digestão ácida convencional (CAD) na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em material de referência certificado (NIST 1515) e em material de referência (EMBRAPA E1001a).....	60
Tabela 14 – Comparação entre extração assistida por ultrassom (UAE) e digestão ácida convencional (CAD) aplicados na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de folha e caule (<i>Rhizophora mangle</i> L. e <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn)	61
Tabela 15 – Ensaio de recuperação em dois níveis de concentração realizado com amostras de folha e caule aplicando procedimento de extração assistida por ultrassom (UAE)	62
Tabela 16 – Desvio padrão relativo obtido nas determinações de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de folha e caule aplicando procedimento de extração assistida por ultrassom (UAE)	63
Tabela 17 – Concentração (mg kg^{-1} , média $\pm u_{\text{med}}$, $n=3$, 95% confiança) de Cu, Fe, Mn e Zn determinados em amostras de caule e folha (<i>Rhizophora mangle</i> L. e <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn) aplicando extração assistida por ultrassom (UAE)	63
Tabela 18 – Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em sedimento superficial coletado na área de manguezal do estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia	65
Tabela 19 – Matriz do coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> para concentração de metais em tecidos vegetais (<i>Rhizophora mangle</i> L.) e sedimento	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância <i>Analysis of Variance</i>
BCF	Fator de bioconcentração <i>Bioconcentration factor</i>
CAD	Digestão Ácida Convencional <i>Conventional Acid Digestion</i>
CP	Ponto central <i>Central point</i>
ER	Resposta experimental <i>Experimental response</i>
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica em Chama <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LOD	Limite de Detecção <i>Limit of determination</i>
LOQ	Limite de Quantificação <i>Limit of quantification</i>
MR	Função de Resposta Múltipla <i>Multiple Response Function</i>
MS	Média quadrática <i>Mean square</i>
PLI	Índice de carga de poluição <i>Pollution load index</i>
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo <i>Relative Standard Deviation</i>
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta <i>Response surface methodology</i>
SS	Soma Quadrática <i>Sum square</i>

TXRF	Fluorescência de Raios X por Reflexão Total <i>Total Reflection X-ray Fluorescence</i>
UAE	Extração Assistida por ultrassom <i>Ultrasound-assisted extraction</i>
u_{med}	Incerteza da medida

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
F	Estatística crítica de <i>Fisher</i>
G	Força G
k	Número de fatores
kHz	Quilohertz
n	Número de réplicas
N	Número de experimentos
p	Probabilidade
R ²	Coeficiente de determinação
R ² _{ajus}	Coeficiente de determinação ajustado
s	Desvio padrão
W	Watt
ε	Erro experimental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1	O ECOSSISTEMA DE MANGUEZAL	20
3.2	ESPÉCIES VEGETAIS COMO BIOINDICADORES	22
3.3	EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR COBRE, FERRO, MANGANÊS E ZINCO	23
3.3.1	Cobre	23
3.3.2	Ferro.....	23
3.3.3	Manganês.....	24
3.3.4	Zinco	24
3.4	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	24
3.4.1	Aplicação de energia ultrassônica no preparo de amostra.....	26
3.4.2	Aplicações de ácidos diluídos na Extração Assistida por Ultrassom.....	31
3.5	TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	32
3.5.1	Planejamento de mistura.....	32
3.5.2	Box-Behnken.....	33
3.5.3	Avaliação do modelo matemático.....	34
4	PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1	MATERIAL E REAGENTES	36
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	36
4.3	ANÁLISE DE DADOS	37
4.4	ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	37
4.5	TRATAMENTO PRELIMINAR.....	39
4.6	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	39
4.7	PREPARO DE AMOSTRA	41
4.7.1	Extração assistida por ultrassom (UAE).....	41
4.7.2	Digestão ácida convencional (CAD).....	41
4.8	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO.....	42

4.8.1	Estudo do efeito de matriz.....	42
4.8.2	Limite de detecção e limite de Quantificação	42
4.8.3	Avaliação da exatidão	43
4.8.4	Avaliação da precisão	44
4.9	AVALIAÇÃO DE RISCO POTENCIAL	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	46
5.2	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO	57
5.2.1	Estudo do efeito de matriz.....	57
5.2.2	Limites de detecção e de quantificação	59
5.2.3	Exatidão	59
5.2.4	Avaliação da Precisão	62
5.3	APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO	63
5.4	AVALIAÇÃO DE RISCO POTENCIAL	65
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e a modernização nos meios de produção ampliaram a exploração dos recursos naturais em função da expansão do consumo de bens e energia. Em mesma proporção, houve intensificação de condições tensoras em ecossistemas costeiros, resultado de impactos associados ao desenvolvimento urbano, atividades industriais e de lazer (TAM; WONG, 2000).

Globalmente, pesquisas indicam que tem ocorrido um significativo aumento nos níveis de metais encontrados no sedimento e em espécies relacionadas ao manguezal, como resultado do crescimento da poluição, decorrente de atividades industriais, mineração e desenvolvimento urbano (AGORAMOORTHY; CHEN; HSU, 2008; DEFEW; MAIR; GUZMAN, 2005; SEKABIRA et al., 2010). A presença de metais em estuários e manguezais têm se tornado objeto de estudo em múltiplas frentes. Metais provenientes de fontes antropogênicas podem representar riscos ao equilíbrio ecológico e acarretar efeitos danosos aos organismos que vivem no ecossistema.

A maioria dos ecossistemas de manguezal estão localizados em áreas de desenvolvimento urbano sendo, portanto, requerido formas efetivas de avaliar riscos ou impactos ao ecossistema. A determinação da concentração de metais em tecidos vegetais é frequentemente apresentada como uma estratégia eficiente, sobretudo pela capacidade de determinadas espécies atuarem como bioindicadores (MACFARLANE; PULKOWNIK; BURCHETT, 2003; MADI; BOEGER; REISSMANN, 2015). Estudos que possibilitem quantificar metais em matrizes ambientais são fundamentais na atividade de avaliação de impactos em determinado ambiente, especialmente aqueles destinados à simplificação de análises químicas.

Apesar dos recentes avanços, as etapas de preparo de amostra ainda são necessárias na análise elementar. As formas convencionais de preparo requerem, normalmente, grandes volumes de reagentes, temperaturas elevadas e longos períodos de trabalho. Além disso, podem acarretar em condições favoráveis à perda de analitos ou a contaminação da amostra (KRUG, 2006; SANTOS JÚNIOR et al., 2006).

Procedimentos alternativos às formas clássicas, como a extração assistida por ultrassom, são estratégias promissoras no preparo de amostra (COSTA et al., 2018a). A extração assistida por ultrassom faz uso da energia ultrassônica para

promover a extração do analito, pois, facilita e acelera processos químicos e físicos atribuídos à cavitação acústica (NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001). Nesses procedimentos, geralmente é necessário o estudo de fatores que possam interferir na eficiência da extração do analito, objetivando determinar as melhores condições para execução experimental. As técnicas de otimização multivariada se tornaram uma excelente alternativa para tal finalidade, principalmente por possibilitar melhorar ou maximizar uma resposta associada a um sistema em estudo. Além disso, apresenta vantagens frente à abordagem univariada e normalmente corrobora com a obtenção de melhores resultados.

Nesse sentido, é de grande interesse o desenvolvimento de estratégias analíticas que possam simplificar as etapas de preparo de amostra, minimizar perdas de analito ou contaminação, conciliada ao aumento da eficiência e redução de custos. Diante do exposto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um procedimento de extração assistida por ultrassom, fazendo uso de estratégias multivariadas para otimização de condições experimentais. O procedimento proposto, foi aplicado na determinação de metais em amostras de tecidos vegetais coletados em áreas de manguezal, sucedendo da avaliação de possíveis danos e riscos ao ecossistema.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um procedimento de extração assistida por ultrassom para determinação de metais em amostras vegetais (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) empregando otimização multivariada e Espectrometria de Absorção Atômica em Chama.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um procedimento de extração assistida por ultrassom para determinação de metais em material vegetal.
- Aplicar técnicas multivariadas para otimização de fatores associados ao procedimento de extração assistida por ultrassom.
- Determinar a concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de caule, folhas e sedimento.
- Avaliar o fator de bioconcentração de metais (sedimento/planta) e a distribuição espacial.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O ECOSSISTEMA DE MANGUEZAL

O Manguezal é um ecossistema típico de zonas costeiras de áreas tropicais, caracterizando-se como um ambiente dinâmico, impactado por alterações frequentes em função de características próprias, como regime de marés, vento, chuva e salinidade. Tais condições geram uma intensa renovação de substratos, nutrientes e metais oriundos de fontes diversas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; VANNUCCI, 2001).

Essas características inconstantes são determinantes na fauna e flora do ambiente e os organismos que nele vivem, apresentam adaptações biológicas e fisiológicas que os permitam sobreviver (SOUZA et al., 2018). Essas condições favorecem um processo eficiente de transformação da matéria orgânica, presente no meio, em nutrientes, facilmente disponibilizados na cadeia trófica. Por essas características, o manguezal é um ecossistema adequado para a alimentação, reprodução e proteção de muitas espécies (SOUZA et al., 2018; VANNUCCI, 2001).

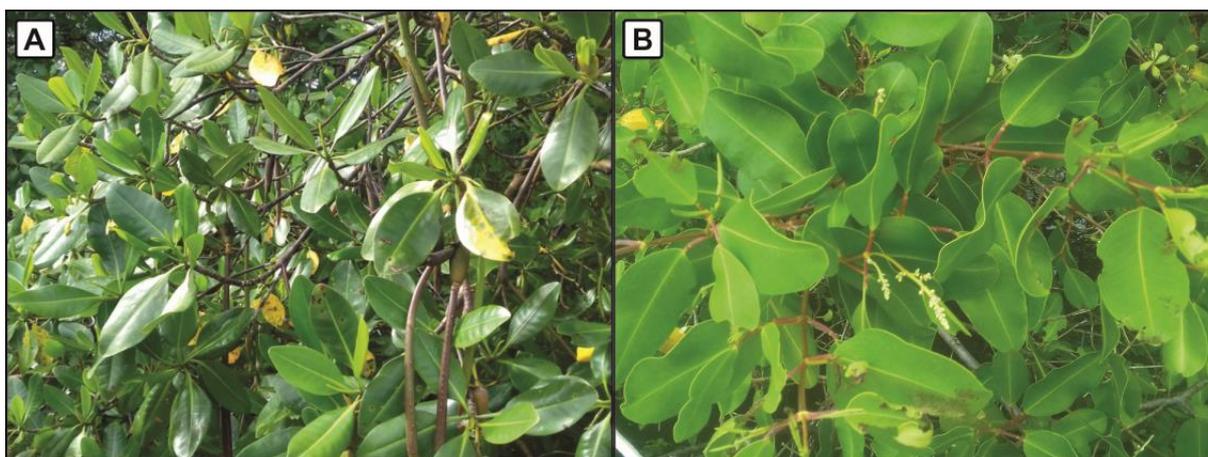
O manguezal desempenha um papel importante e suas funções são notáveis nos ecossistemas adjacentes. A mais importante delas, é a capacidade do manguezal em atuar como filtro biológico, retendo partículas, poluentes e contaminantes em suspensão na água, imobilizando-os na fração sedimentar. A intensa atividade bacteriana no sedimento lodoso gera um ambiente anóxico e a redução dos sulfatos, promovida pela oxidação da matéria orgânica, produz sulfetos que precipitam os íons metálicos, reduzindo a mobilidade destes (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; SOUZA et al., 2018; WALSH; AINSWORTH; RIGBY, 1979).

Apesar da sua importância, o manguezal é um ecossistema ameaçado, principalmente por impactos que incluem o desmatamento, aterro, descarte de resíduos sólidos e efluentes provenientes de setores industriais e áreas urbanas (SUMAN, 2019; VANNUCCI, 2001). Tais condições tensoras podem provocar impactos permanentes, a curto, médio e longo prazo, desfavoráveis à manutenção do equilíbrio no ecossistema (MOUNIER; MARINS; LACERDA, 2018; SOUZA et al., 2018; VANNUCCI, 2001).

Poucas espécies são adaptadas ao ecossistema do manguezal. No Brasil, as espécies *Avicennia schaueriana*, *Rhizophora mangle* (Figura 1A) e *Laguncularia*

racemosa (Figura 1B) são as mais comuns e estão presentes do norte ao sul na linha costeira (GONÇALVES; GERALDO, 2007; HOGARTH, 2015; SOUZA et al., 2018).

Figura 1 – Principais espécies arbóreas encontradas no manguezal da Baía do Pontal. *Rhizophora mangle* L. (A) *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn (B)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A *Rhizophora mangle*, popularmente conhecida como mangue-vermelho, atinge entre 10 a 20 metros de altura, suas folhas são do tipo lanceoladas (formato de lança), opostas e brilhantes, devido principalmente pela maior presença de ceras em sua superfície (PRANCE et al., 1975). A casca tem aparência levemente rugosa, e quando raspada apresenta coloração vermelha intensa em função da grande quantidade de taninos presentes. Além da cor, os rizóforos (ramificações do caule) são características da planta, sendo estruturas capazes de ajudar na sustentação no solo lodoso, formando um emaranhado de ramificações e um ambiente ideal para a reprodução de diversas espécies de caranguejos e moluscos que são amplamente consumidos pela população de áreas costeiras (SOUZA et al., 2018).

A *Laguncularia racemosa*, conhecida como mangue-branco, é uma espécie de porte médio e raramente atinge mais de 10 metros de altura. Essa espécie geralmente apresenta-se na faixa de transição entre a fração lodoso do manguezal e a terra firme, em formações arenosas, margens ou pequenas ilhotas. Na medicina popular, suas folhas são usadas em infusões e chás. As folhas apresentam-se opostas, textura coriácea (similar ao couro), com lâmina foliar elíptica arredondada nas extremidades e pecíolo avermelhado (SOUZA et al., 2018).

Ambas espécies podem ser aplicadas para fins de avaliação da contaminação por metais e possíveis impactos ao ecossistema, utilizando-as como bioindicadores (ARRIVABENE et al., 2014; GONÇALVES; GERALDO, 2007). A capacidade adaptativa, resistência à presença de metais e a dispersão ao longo de toda costa oceânica, pode facilitar a obtenção de informações quantitativas sobre a condição ambiental e ecológica do manguezal (MAITI; CHOWDHURY, 2013).

3.2 ESPÉCIES VEGETAIS COMO BIOINDICADORES

Bioindicadores são organismos que apresentam alguma reação ou adaptação adversa gerada em resposta a estímulos específicos e por mudanças no meio em que vive, podendo ser utilizados como indicadores da condição do ambiente e avaliar o seu estado de conservação (SOUZA et al., 2018).

No geral, as plantas podem apresentar diversos comportamentos quando expostas a metais, podendo atuar como (i) acumuladoras, caracterizado pela retenção de metais em partes superiores em níveis mais baixos ou mais altos, se comparado à concentração disponível no solo; (ii) indicadoras, cuja absorção e transporte nos diferentes tecidos da planta são regulados por mecanismos biológicos, de modo que a concentração do metal nos tecidos da planta é diretamente proporcional a concentração do metal no ambiente externo; (iii) excludentes, onde a concentração do metal na parte superior da planta é mantida constante independente da faixa de concentração disponível no solo. Nesse caso, geralmente os metais são retidos na raiz, em níveis extremamente elevados, sem causar danos a planta ou comprometer suas funções biológicas (BAKER, 1981; SOUZA et al., 2018).

As plantas são um dos principais meios de entrada de metais na cadeia trófica, caracterizando-se como um bom indicador do estado de conservação do ambiente, tendo em vista que metais, derivados fontes naturais ou antrópicas, podem afetar o equilíbrio ecológico por meio de impactos a longo prazo, como resultado da persistência e presença nos diversos compartimentos ambientais, (PINHEIRO et al., 2012).

Metais, de modo geral, tendem a se acumular em tecidos permanentes da vegetação (caules), mas também podem ser transportados para partes decíduas (folhas), sendo capazes de se combinar com macromoléculas da membrana celular.

As plantas adaptadas ao manguezal possuem mecanismos e adaptações morfológicas que lhes tornam tolerantes a presença de metais, principalmente, por meio de processos de controle osmótico e bioacumulação (MACHADO et al., 2002).

O uso de plantas como bioindicadores é, portanto, um meio eficiente para avaliar o impacto da poluição sobre um ecossistema e demonstrar sua distribuição espacial. Informações que podem subsidiar investigações de risco potencial ao ecossistema, aos organismos que nele vivem, e a população (MARKERT et al., 1996).

3.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS POR COBRE, FERRO, MANGANÊS E ZINCO

A toxicidade de um metal no ambiente depende de muitos fatores, especialmente das formas biodisponíveis. Metais como o cobre, ferro, manganês e zinco, em geral, apresentam baixos efeitos toxicológicos, embora possam representar riscos biológicos em função da sua presença no ambiente. Normalmente, estes metais desempenham funções importantes e são essenciais para diversos mecanismos metabólicos e enzimáticos nos organismos, ainda que os efeitos sejam diretamente atrelados à concentração e das necessidades fisiológicas (ALLOWAY, 2013).

3.3.1 Cobre

O cobre desempenha importantes funções estruturais em enzimas oxidativas. Os processos fisiológicos que dependem diretamente do Cu afetam a fotossíntese, metabolismo de carboidratos, respiração, metabolismo proteico, além do transporte de água nas células (ALLOWAY, 2013). Excesso de Cu em plantas podem levar ao aumento de permeabilidade celular e afetar os mecanismos fotossintéticos (MOORE; RAMAMOORTHY, 1984).

3.3.2 Ferro

O ferro é o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, sendo extremamente importante para animais e plantas (SARIKA, 2005). Em ambientes

estuarinos, concentrações de ferro normalmente são elevadas, na ordem de 20.000 mg kg⁻¹. Embora seja de menor importância ecotoxicológica, este metal pode atuar o controle e disponibilidade de outros metais potencialmente tóxicos e, na forma de sulfeto, participa de um importante mecanismo que leva a precipitação de metais no sedimento em áreas de manguezal (SOUZA et al., 2018).

3.3.3 Manganês

O manganês combinado com outros elementos é amplamente distribuído na crosta terrestre (KABATA-PENDIAS, 2011; SARIKA, 2005). Em plantas, participa de um grande número de reações de oxidação-redução como catalisador, além de atuar em mecanismos envolvidos na produção de lignina, flavonoides e ácidos graxos (ALLOWAY, 2013). Um excesso deste elemento em plantas e animais é tóxico.

3.3.4 Zinco

É um metal relativamente raro na natureza, em que se apresenta principalmente na forma de minérios de sulfetos e carbonato. Normalmente apresenta-se em concentrações <50 mg kg⁻¹ em áreas de sedimentos não contaminadas (MOORE; RAMAMOORTHY, 1984). O zinco é um metal essencial para nutrição de várias espécies de plantas e atua principalmente em funções enzimáticas estruturais e regulatórias de diversos mecanismos em sistemas biológicos. Para seres humanos, é essencial, estando presente em glóbulos vermelhos, pâncreas e como componente de enzimas que digerem proteínas no trato intestinal (SARIKA, 2005).

3.4 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A extração, de modo geral, é um processo pelo qual se move um ou mais analitos da matriz para um local físico separado e que permite efetuar processamentos ou análises adicionais com diversas finalidades. A maioria dos procedimentos analíticos visa a extração completa, embora existam situações onde bons resultados são possíveis com a extração parcial (BICKING, 2000).

A energia ultrassônica pode ser aplicada em procedimentos de extração, como alternativa aos métodos que empregam agitação manual, mecânica, magnética, ou à agitação por efeito vortex (KRUG, 2006). Os ultrassons compreendem a faixa de frequência maior que 20 kHz, não audíveis por humanos, e apresenta inúmeras aplicações, desde medicina até limpeza de materiais. Nos últimos anos, vem sendo frequentemente utilizada em processos químicos, como promotor da reatividade química, em diversas aplicações, incluindo procedimentos de preparo de amostra (BENDICHO; LAVILLA, 2000a; KRUG, 2006).

O fundamento da aplicação do ultrassom no procedimento de extração baseia-se na capacidade do aumento da energia química no meio reacional, empregando energia externa proveniente das ondas ultrassônicas, visando aumentar a interação entre solvente e meio sólido (KRUG, 2006; SUSLICK; PRICE, 1999). As ondas ultrassônicas atuam sobre as moléculas orgânicas das amostras, rompendo as ligações do metal com a matriz, liberando-os para o solvente presente no meio reacional em formas disponíveis para detecção e quantificação (BARNES; JÚNIOR; KRUG, 2014; BENDICHO; LAVILLA, 2000a).

O efeito que possibilita a aplicação prática do ultrassom no preparo de amostra é a cavitação acústica, que consiste na nucleação, crescimento e colapso de microbolhas em líquidos formadas durante a exposição do meio reacional as ondas ultrassônicas. A irradiação ultrassônica de um meio líquido dá origem a uma pressão acústica (P_a), que é adicionada à pressão hidrostática (P_h) existente no meio, descrita de acordo com a Equação 1.

$$P_a = P_A \sin 2\pi ft \quad \text{Equação 1}$$

Onde f é a frequência da onda, t o tempo e P_A a máxima pressão de amplitude da onda. A intensidade (I) da onda é definida como a energia transmitida por $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$, no líquido do meio reacional, relacionada a P_A (Equação 2).

$$I = P_A^2 (2\rho c)^{-1} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação, c é a velocidade do som no meio e ρ é a sua densidade. A intensidade da onda diminui conforme penetra no meio e a vibração molecular induzida pela onda sonora resulta em perda de intensidade que é convertida em calor. O aquecimento localizado ocorre nos pontos de compressão e rarefação,

embora uma grande parcela seja gerado pela degradação da energia acústica devido à absorção pelo meio (YASUI, 2018).

A onda de pressão resultante da transmissão das ultrassons gera a oscilação das moléculas em torno de sua posição média e forma as bolhas de cavitação, que se desenvolvem durante os ciclos de compressão e rarefação, absorvendo uma fração dos gases dissolvidos no meio líquido, até quando ocorrer sua implosão, após atingir o diâmetro crítico (BENDICHO; LAVILLA, 2000a; SANTOS et al., 2009). A pressão antes do colapso é de aproximadamente 1000 atm e temperaturas na ordem de 4000 °C.

Além do rompimento de ligações químicas, o efeito combinado da cavitação acústica propicia condições favoráveis a formação de radicais e espécies reativas que interagem com a matéria orgânica (BENDICHO; LAVILLA, 2000a; KRUG, 2006). A presença de material particulado no meio reacional gera a formação assimétrica das microbolhas, que implodem e lançam microjatos. Esses microjatos são responsáveis pela fragmentação da matriz e favorecem a dispersão do solvente no meio reacional (PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, 2004; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012). Esses fatores aumentam a área superficial e o contato do solvente com a matriz, maximizando o rompimento de ligações químicas (ASHOKKUMAR; MASON, 2007; BENDICHO; LAVILLA, 2000a; KRUG, 2006; SUSLICK; PRICE, 1999).

3.4.1 Aplicação de energia ultrassônica no preparo de amostra

A UAE apresenta inúmeras vantagens no que concerne à sua aplicação no preparo de amostra, relacionadas principalmente com (i) rapidez e eficiência, (ii) baixo consumo de reagentes, (iii) possibilidade de trabalhar com ácidos diluídos e temperaturas amenas e, frequentemente, o (iv) trabalho é realizado em um ambiente mais seguro e menos suscetível a contaminação. Entretanto, como qualquer método de preparo de amostra, apresenta limitações relacionadas com a (i) reprodução experimental de condições em diferentes aplicações e matrizes diversas, além da (ii) robustez dos procedimentos adotados (BENDICHO et al., 2012; KRUG, 2006; SANTOS JÚNIOR et al., 2006).

O uso das ondas ultrassônicas no preparo de amostra tem apresentado inúmeras vantagens, possibilitando uma determinação multielementar, rápida e de

baixo custo. Diversos trabalhos exploraram a extração de analitos orgânicos e inorgânicos em variados tipos de matrizes, sempre buscando apresentar as potencialidades dos procedimentos desenvolvidos como alternativa aos métodos convencionais, aplicados principalmente em técnicas de espectrometria atômica (BARNES; JÚNIOR; KRUG, 2014; KRUG, 2006). A necessidade de lidar com amostras líquidas transformou a etapa de preparo de amostra em um passo essencial para simplificação de todo o processo analítico e a obtenção do analito em condição adequada para quantificação (BENDICHO; LAVILLA, 2000a).

Na literatura, foram relatados diversos trabalhos (Tabela 1) desenvolvidos visando investigar as potencialidades da UAE na determinação de metais em plantas e matrizes vegetais. O estudo de fatores associados ao processo de extração e a determinação de condições ótimas são geralmente abordadas e exploradas, principalmente de forma univariada.

A estratégia adotada por Lavilla, Perez-cid e Bendicho (1998), foi a realização de duas etapas de extração utilizando a combinação de HCl-HNO₃, cujas concentrações foram definidas após estudo univariado. A realização das sucessivas etapas de extração propiciou a obtenção de recuperações entre 74–100% obtidas na determinação de Cu, Mn, Pb e Zn em material de referência certificado (CRM).

A determinação multielementar foi explorada no trabalho de Filgueiras et al. (2000), que determinaram Mg, Mn e Zn em amostras de plantas. As condições de extração foram estudadas de modo univariado e os fatores investigados foram: tempo (minutos), amplitude (%), tamanho de partícula (µm), massa de amostra (g) e concentração de HCl (% m v⁻¹). Em comparação com digestão assistida por micro-ondas, as recuperações médias variaram de 98–102%. O procedimento descrito pelos autores foi eficiente e rápido para determinação dos analitos por F AAS com concentração e HCl de 0,3% m v⁻¹.

Kazi et al. (2009) investigaram a aplicação de UAE na determinação de Cd, Cr, Ni e Pb em amostras de peixes, vegetais e grãos. As recuperações, comparadas ao protocolo convencional de decomposição, foram na faixa de 96–102% e a precisão, avaliada pelo desvio padrão relativo, variou de 3,5–8,2%.

Noutra abordagem, Costa et al. (2018a) utilizou o delineamento Box-Behnken para otimizar a concentração de HNO₃ (mol L⁻¹), tempo de sonicação (minutos) e temperatura (°C) na determinação de metais em folhas de chá por ICP OES. Os resultados obtidos mostraram que o procedimento proposto foi eficiente na extração,

cujas recuperações variaram de 93–108%, obtidas a partir da sonicação por 7 minutos e com concentração de HNO_3 de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 1 – Trabalhos que empregam energia ultrassônica no preparo de amostra para determinação elementar em plantas e material vegetal aplicando diferentes técnicas analíticas

Matriz	Analito	Técnica	Tempo (minutos)	Extrator (Tipo e concentração)	Recuperação (%)	RSD (%)	Referência
Planta aquática	Cu, Mn, Pb e Zn	F AAS	3	HCl (1% m m ⁻¹) HNO ₃ (15% m m ⁻¹)	74–100	< 2,5	(LAVILLA; PEREZ-CID; BENDICHO, 1998)
Especiarias e plantas medicinais	Mg, Mn e Zn	F AAS	3	HCl (0,3 % m v ⁻¹)	86–119	0,5–1,5	(FILGUEIRAS et al., 2000)
Plantas	Ca, Fe, Mg, Mn e Zn	F AAS	10	HNO ₃ (0,14 mol L ⁻¹)	96–102	–	(NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001)
Especiarias e plantas medicinais	Ca, Cd, Fe, Mg, Mn, Pb e Zn	ET AAS ¹ F AAS	3	EDTA (0,1 mol L ⁻¹)	–	2–10	(FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2001)
Plantas	Ca, K e Mg	F AAS F AES	15	HNO ₃ (0,014 mol L ⁻¹)	–	< 1,0	(ARRUDA; RODRIGUEZ; ARRUDA, 2003)
Plantas e vegetais	Cd, Cu, Cr, Ni, Pb e Zn	ET AAS F AAS	10	HNO ₃ + H ₂ O ₂ (2:1)	95–102	2,3–7,9	(JAMALI et al., 2007)
Pinheiro	Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	ICP OES	9	HNO ₃ + HCl (1:3)	92–108	–	(VÄISÄNEN et al., 2008)
Folha de Tabaco	Cd e Ni	ET AAS	5	HNO ₃ + H ₂ O ₂ (1:1 v v ⁻¹)	98–99	5,2–8,3	(ARAIN et al., 2008)
Feijão	Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn	ICP OES	15	HNO ₃ +HCl + CH ₃ COOH (1,5 mol L ⁻¹)	58–90	1–6,3	(SANTOS et al., 2009)
Planta e vegetais	Cd, Cr, Ni e Pb	ET AAS	10	HNO ₃ + H ₂ O ₂ (2:1)	96–102	3,5–8,2	(KAZI et al., 2009)
Plantas	Cd e Cu	ET AAS F AAS	2	HNO ₃ (0,29 mol L ⁻¹)	23–105	–	(PEREIRA et al., 2010)
Plantas e vegetais	Cu, Mn e Se	GF AAS	3,5	HCl (0,1 mol L ⁻¹)	–	< 2,0	(PADILHA et al., 2011)

Tabela 1 – Continuação.

Matriz	Analito	Técnica	Tempo (minutos)	Extrator (Tipo e concentração)	Recuperação (%)	RSD (%)	Referência
Ervas e plantas medicinais	Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, P, Pb e Zn	TXRF	15	HNO ₃ (10%) + HCl (10%) + HF (10%)	54–175	< 9,0	(CALLE et al., 2013)
Plantas oleaginosas	Ca, Cu, Mg e Mg	F AAS	10	HNO ₃ (1,40 mol L ⁻¹)	89–106	0,52–6,13	(PERONICO; RAPOSO, 2016)
Folhas de chá	Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na e Zn	ICP OES	7	HNO ₃ (1,0 mol L ⁻¹)	93–108	1,8–4,9	(COSTA et al., 2018a)
Mandioca	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	F AAS	30	HNO ₃ + HCl + CH ₃ COOH (2,5 mol L ⁻¹)	–	1,9–5,6	(COSTA et al., 2018b)

¹ A terminologia ET AAS deixou de ser amplamente utilizada. Entretanto, conforme citado nos respectivos artigos, aqui adotou-se a mesma definição referindo-se a GF AAS.

ET AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica;

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Chama;

F AES – Espectrometria de Emissão Atômica em Chama;

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite;

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente;

TXRF – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.

3.4.2 Aplicações de ácidos diluídos na Extração Assistida por Ultrassom

Frequentemente, em procedimentos de preparo de amostra, são requeridos ácidos concentrados e temperaturas elevadas para alcançar resultados satisfatórios, especialmente em formas clássicas ou convencionais de preparo – digestão em sistemas abertos e fechados (SANTOS JÚNIOR et al., 2006).

O uso da energia ultrassônica em procedimentos de extração, viabilizou a realização de procedimentos mais seguros e menos suscetíveis a perdas de analitos e contaminação cruzada (BARNES; JÚNIOR; KRUG, 2014; KRUG, 2006), principalmente pela possibilidade de utilizar ácidos diluídos ou combinações de diferentes componentes para compor soluções extratoras que apresentem propriedades favoráveis a extração dos analitos da matriz (COSTA et al., 2018b). Normalmente, HNO_3 , HCl , H_2O_2 , CH_3COOH e HF são os reagentes mais utilizados, além de outras opções menos comuns, como EDTA (Etilenodiamino tetra-acético). Combinações entre HNO_3 – HCl e HNO_3 – H_2O_2 são frequentemente aplicadas na extração de variados analitos em diversas matrizes.

No procedimento proposto por Santos et al. (2009), foi investigado a composição da solução extratora (HNO_3 – HCl – CH_3COOH). Um planejamento de mistura simplex-centroide foi utilizado na otimização dos componentes e a concentração da solução final foi investigada utilizando o delineamento Box-Behnken. Baixas recuperações foram obtidas com os componentes puros, enquanto que a combinação HCl – CH_3COOH foi mais eficiente, cujos efeitos foram atribuídos a ação complexante do íon cloreto (Cl^-) resultante da dissociação do HCl . A concentração otimizada para a solução ácida foi $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, que garantiu recuperações de 58–90% (SANTOS et al., 2009).

Calle et al. (2013) estudaram variadas composições de soluções para extração variando concentrações dos componentes HNO_3 – HCl – H_2O_2 – HF . O ácido fluorídrico (HF) apresentou bons resultados na extração de Fe , com recuperações variando de 80–97%, considerando que parte do analito estava ligada à fração de sílica presente na amostra, sendo o HF , capaz de destruir essa fração, liberando os metais para fase aquosa. O procedimento proposto foi aplicado na determinação de metais em ervas e plantas medicinais por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total – TXRF (CALLE et al., 2013).

A combinação de $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{O}_2$ foi utilizada no trabalho Arain et al. (2008), aplicados na determinação de metais em folhas de tabaco, cuja combinação de reagentes propiciou recuperações de 98 e 99% para Cd e Ni, respectivamente.

No trabalho de Filgueiras, Lavilla e Bendicho (2001), foi utilizado EDTA em concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para solubilização de metais em amostras de especiarias e plantas medicinais. A concentração do EDTA e o pH do meio foram investigados de forma univariada. O procedimento foi executado em 3 minutos e os RSDs foram menores que 10%.

3.5 TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

Técnicas de otimização multivariada são frequentemente aplicadas na otimização de fatores e condições experimentais associadas aos procedimentos de preparo de amostras e determinação elementar, aplicadas em diversos procedimentos e em variadas matrizes. Os delineamentos experimentais multivariados apresentam vantagens, quando comparadas às estratégias univariadas, principalmente por reduzir consideravelmente a quantidade de experimentos necessários e, portanto, custos e tempo, além de possibilitar investigar efeitos resultantes de interações entre os fatores estudados (FERREIRA, 2015).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é frequentemente utilizada quando se deseja otimizar fatores, de modo a obter um aumento ou a redução de uma resposta analítica desejada. É uma ferramenta estatística baseada no ajuste de modelo matemático capaz de descrever o comportamento de dados experimentais. Funções matemáticas podem ser obtidas, de modo a gerar previsões de condições ótimas com base no domínio experimental estudado (BEZERRA et al., 2008). Os delineamentos mais comuns são: Planejamento de mistura (FERREIRA et al., 2007a), Matriz Doehlert (FERREIRA et al., 2004), Box-Behnken (FERREIRA et al., 2007b) e Composto Central (FERREIRA et al., 2018).

3.5.1 Planejamento de mistura

A modelagem de misturas apresenta características diferenciadas quando comparada a outras técnicas de planejamento de experimentos. As propriedades de uma mistura são determinadas pela proporção dos seus componentes, cujo total

sempre é igual a unidade. Mantendo a proporção dos componentes, a mistura manterá suas propriedades (NOVAES et al., 2018). Sejam x_i , os fatores que representam as proporções dos q componentes da mistura, então:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1; x_i \geq 0; i = 1, \dots, q \quad \text{Equação 3}$$

Normalmente o uso de mistura ternárias são amplamente empregados na química analítica, principalmente na otimização de processos por facilitar a interpretação gráfica ou eliminar um componente que não apresente efeito significativo na resposta experimental (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009; NOVAES et al., 2018).

O domínio experimental para uma mistura ternária é representado por um triângulo, cujos pontos localizados nos vértices são os componentes puros e nas arestas as misturas binárias. Além disso, a modelagem de misturas permite aplicar restrições entre os componentes, ou seja, avaliar a composição da mistura limitando um ou mais componentes em níveis superiores e inferiores ou com outros tipos de restrições que ajudam a investigar o sistema de forma mais completa (PRESCOTT et al., 2002).

Pontos dentro do triângulo são compostos pela mistura dos três componentes, normalmente aplicados em modelagem simplex-centroide (FERREIRA et al., 2007a). Essa abordagem é a mais comum, principalmente pela facilidade de determinação dos coeficientes do modelo polinomial e a quantidade de experimentos, caracterizada pela presença de ponto central, utilizado para modelar e avaliar os efeitos sinérgicos entre os componentes da mistura (NOVAES et al., 2018).

3.5.2 Box-Behnken

O delineamento Box-Behnken é uma ferramenta atrativa na modelagem de experimentos e obtenção dos coeficientes de um modelo quadrático. De forma geral, esse planejamento requer a execução de poucos experimentos e todos os fatores são estudados em três níveis (-1, 0 +1).

Uma das principais vantagens é a inexistência de experimentos que combinem todos os fatores em seus níveis máximos ou mínimos, o que impossibilita a realização de experimentos em condições críticas ou inviáveis experimentalmente (FERREIRA et al., 2007b, 2007a, 2018). Neste delineamento, o total de experimentos (N) é definido como $N = 2k(k - 1) + C_0$, onde k é o número de fatores e C_0 número de pontos centrais (FERREIRA, 2015).

3.5.3 Avaliação do modelo matemático

A avaliação do modelo matemático obtido é relevante para atestar se o modelo é capaz de descrever um determinado sistema de forma satisfatória. Um modelo bem ajustado deve ser aquele capaz de descrever adequadamente o comportamento dos fatores e suas interações dentro do domínio experimental estudado. A adequação do modelo matemático pode ser avaliada por meio da Análise de variância (ANOVA), que consiste no cálculo das variâncias apresentadas entre os valores preditos pelo modelo e observados experimentalmente, ou seja, regressão e resíduos, cujas definições constam na Tabela 2 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Tabela 2 – Análise de variância para avaliação de modelo matemático ajustado aos dados experimentais

Fonte de Variação	SS	Df	MS
Regressão	$SS_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MS_{reg} = \frac{SS_{reg}}{p - 1}$
Resíduos	$SS_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{n - p}$
Falta de ajuste	$SS_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MS_{faj} = \frac{SS_{faj}}{m - p}$
Erro Puro	$SS_{pe} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MS_{pe} = \frac{SS_{pe}}{n - m}$
Total	$SS_{tot} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

Fonte: Ferreira et al. (2007a), Novaes et al. (2017), Pereira Filho (2017). Adaptada pelo autor. SS – Soma quadrática; Df – Grau de liberdade; MS – Média quadrática; n_i – número de observações; m – número total de níveis no planejamento; p – número de parâmetros do modelo; \hat{y}_i – valor estimado pelo modelo para o nível i; \bar{y} – média global; y_{ij} – réplica realizada em cada nível individual; \bar{y}_i – média das réplicas realizadas no mesmo conjunto de condições experimentais.

As expressões admitidas, se aplicam ao ajuste por mínimos quadrados, com p parâmetros, sendo que a única restrição imposta é que o modelo deve ser linear nos parâmetros, ou seja, definidos como coeficientes de um polinômio (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; NOVAES et al., 2018).

A significância estatística da regressão pode ser avaliada com base na distribuição de Fisher (Teste F), considerando os graus de liberdade, em que MS_{reg}/MS_{res} ($F_{calculado}$) deverá ser maior que o $F_{tabelado}$ (BEZERRA et al., 2008). Quanto maior for a razão entre o $F_{calculado}$ e o $F_{tabelado}$, melhor será o modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PIMENTEL; BARROS NETO, 1996).

Se o modelo está bem ajustado a média quadrática da falta de ajuste (MS_{faj}) refletirá apenas os erros aleatórios, assim como o erro puro, isto é, ambos estariam estimando a mesma grandeza. Assumindo que esses dois valores não são estatisticamente diferentes, considera-se como modelo satisfatório aquele que a razão entre MS_{faj}/MS_{pe} ($F_{calculado}$) é inferior ao $F_{tabelado}$, no respectivo nível de confiança e graus de liberdade. Em suma, para que um modelo seja considerado adequado a regressão deverá ser significativa e a falta de ajuste não significativa (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; BEZERRA et al., 2008).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL E REAGENTES

Ácido nítrico (HNO_3 65% m m⁻¹), ácido clorídrico (HCl 37% m m⁻¹), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30% m m⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados no preparo da solução extratora e nos protocolos de digestão ácida convencional.

As soluções padrões utilizadas na calibração instrumental foram preparadas a partir de soluções estoque, utilizando água ultrapura com resistividade de 18,2 M Ω cm⁻¹ obtida em sistema de purificação Easypure II (Thermo Scientific, Inc., Estados Unidos).

As vidrarias e materiais utilizados nos procedimentos foram descontaminados em banho de HNO_3 10% (v v⁻¹) por 24h, e lavados com água ultrapura.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Um banho ultrassônico modelo P 30H, 350W e 80 kHz (Elmasonic, inc. Singen, Alemanha) foi utilizado em todos os procedimentos de extração. As amostras de tecido vegetal foram secas em estufa de circulação de ar (Odontobrás, São Paulo, Brasil) e moídas em moinho de facas modelo TE-350 (Tecnal, Ltda., São Paulo, Brasil). Para separação da fase sólida foi empregada centrífuga modelo SL700 (Solab, Eireli., São Paulo, Brasil) e para agitação mecânica foi utilizado um agitador vortex, modelo AP59 (Phoenix Luferco, inc., São Paulo).

A decomposição total das amostras de folha, caule, sedimento e material de referência certificado foi feita utilizando bloco digestor modelo TE-007 MP (Tecnal, Ltda., São Paulo, Brasil) com sistema de refluxo (dedo frio).

A determinação elementar foi feita utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (F AAS), modelo AA 240FS (Varian, inc., Mulgrave, Victoria, Austrália), com lâmpada de deutério para correção de sinal de fundo e utilizando os itens padrão de fábrica. Utilizou-se lâmpada de cátodo oco multielementar (Varian, inc., Mulgrave, Victoria, Austrália) e a chama foi gerada usando ar comprimido (vazão de 13,5 L min⁻¹), obtido via sistema de compressão, e gás acetileno 99,7% (White Martins Praxair, inc., Dourados, Brasil) em vazão de 2 L min⁻¹. A taxa de

aspiração de amostra foi mantida em aproximadamente 6 mL min⁻¹. As demais condições instrumentais utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros instrumentais aplicados na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em tecidos vegetais por F AAS

Parâmetro	Cu	Fe	Mn	Zn
λ (nm)	324,7	248,3	279,5	213,9
Largura da fenda (nm)	0,5	0,2	0,2	1,0
Corrente da Lâmpada (mA)	4,0	5,0	5,0	5,0
Total de medidas (n)	5	3	3	3
Tempo de medida (s ⁻¹)	1	2	2	1

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Todos os parâmetros estatísticos e modelos matemáticos foram gerados e avaliados aplicando o software Statistica® 12 (StatSoft, inc., Tulsa, Estados Unidos). Cálculos rotineiros foram feitos utilizando o software Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft, inc., Redmond, Estados Unidos).

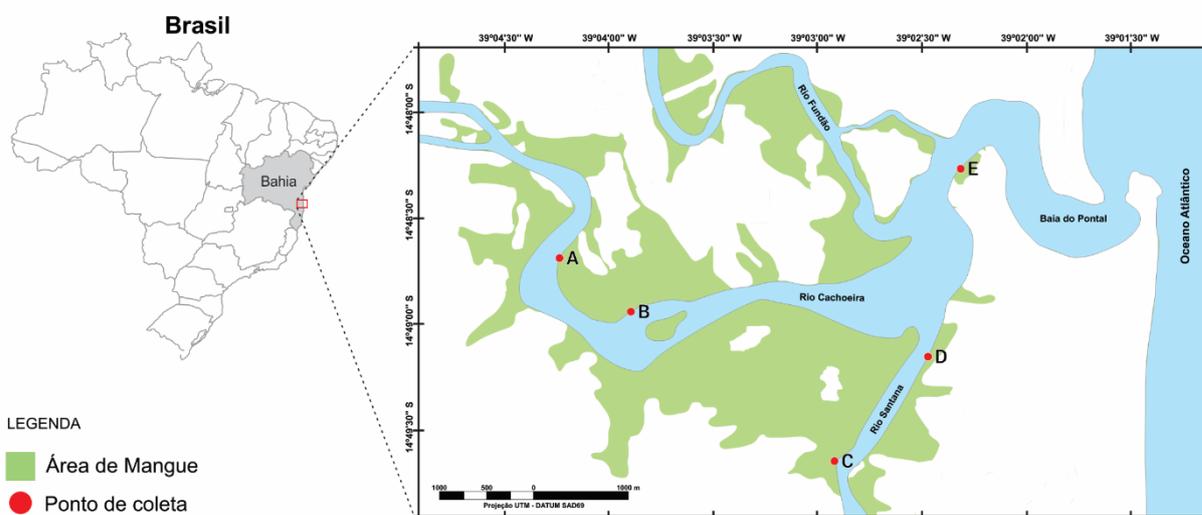
4.4 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estuário do Rio Cachoeira é formado pela junção de três rios: Rio Cachoeira, Rio Santana e o Rio Fundão, sendo o Rio Cachoeira o de maior vazão hídrica. A bacia do Rio Cachoeira integra 12 municípios com área urbana em seu interior e ainda alguns municípios de forma parcial. No ano de 2016 viviam cerca de 415 mil pessoas na área da bacia, concentradas principalmente no município de Itabuna – 53% da população (SEMA, 2017a).

Este estudo foi realizado com amostras de tecido vegetal (folha e caule) das espécies *Rhizophora mangle* L. (Família: Rhizophoraceae) e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn (Família: Combretaceae) e foram escolhidas em função da predominância e distribuição na área em estudo (GONÇALVES; GERALDO, 2007; MARTINS; SANTOS; COUTO, 2013). As exsiccatas das espécies estudadas foram depositadas no Herbário da UESC, sob códigos 23703 e 23704, respectivamente.

As amostras de tecido vegetal e sedimento foram coletadas no mês de fevereiro (2018) em cinco pontos distribuídos de forma aleatória na área em estudo (Figura 2) e identificados de forma sequencial A–E (Tabela 4).

Figura 2 – Locais de coleta de amostras distribuídos na área de estudo no estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, BA



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os pontos A e B são localizados no Rio Cachoeira, que recebe uma elevada carga de efluentes ao longo de sua extensão, além de captação de atividades intensivas ligadas a agricultura, pecuária e industrial. Os pontos C e D estão localizados no Rio Santana, em uma área de baixa atividade antrópica e menor carga de efluentes, e o ponto E localizado em área urbanizada e fortemente impactada.

Tabela 4 – Informações dos locais de coleta de amostras

Ponto	Coordenadas geográficas		Espécie coletada
	Latitude	Longitude	
A	14°48'57.0" S	39°04'16.7" O	<i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F.Gaertn
B	14°48'59.6" S	39°04'01.5" O	<i>Rhizophora mangle</i> L.
C	14°48'26.5" S	39°04'10.8" O	<i>Rhizophora mangle</i> L.
D	14°48'46.3" S	39°04'18.2" O	<i>Rhizophora mangle</i> L.
E	14°49'10.6" S	39°02'32.2" O	<i>Rhizophora mangle</i> L.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras de folhas foram coletadas por remoção manual na extensão da copa da árvore, excluindo-se folhas jovens e senescentes. Amostras de caule foram coletadas de forma aleatória ao longo da extensão da árvore, excluindo-se ramos novos e brotos. Amostras de sedimento superficial foram coletadas sob a área de projeção da copa das árvores com auxílio de um amostrador draga tipo “*Petersen*” que permite recolher aproximadamente 10 cm da camada superficial do sedimento.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno e transportadas ao Laboratório de Química Analítica Aplicada (UESC) para etapas de tratamento preliminar.

4.5 TRATAMENTO PRELIMINAR

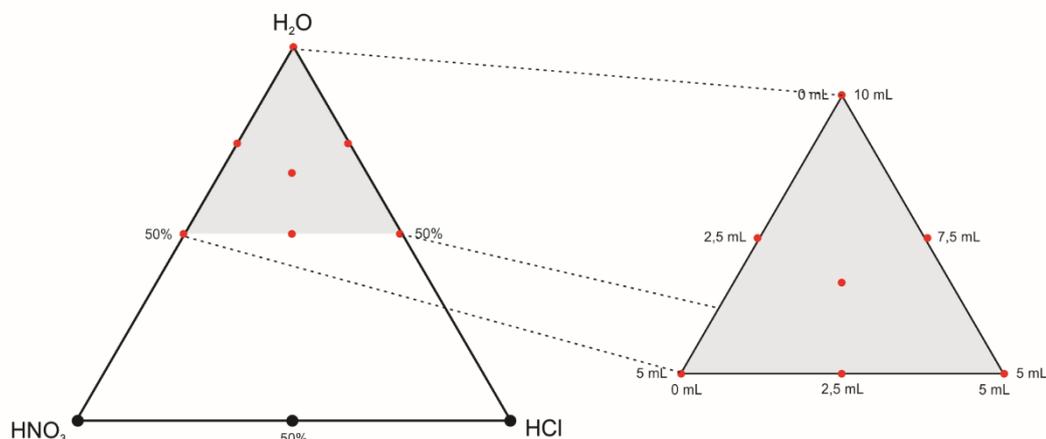
As amostras de folha e caule foram lavadas com água destilada, secas em temperatura de 60 °C por 72 h, seguido da moagem em moinho de facas. Para a aplicação do procedimento de extração, todas as amostras foram peneiradas em malha com abertura de 0,15 mm, obtendo tamanho de partícula <150 µm. As amostras de sedimento foram secas em temperatura de 60 °C por 72 h e peneiradas em malha com abertura de 0,15 mm (partícula <150 µm).

4.6 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A otimização da extração foi conduzida em duas abordagens: solução extratora e condições de extração. Para a otimização da composição da solução extratora, foi aplicado um planejamento de mistura simplex-centroide, visando avaliar a composição percentual dos componentes: HNO₃ (Ácido nítrico), HCl (ácido clorídrico) e H₂O (água). Nessa etapa, as condições operacionais foram fixas: potência de 90% (≈315 W), temperatura de 40 °C e sonicação por 10 minutos. No planejamento, estudou-se o volume (mL) percentual dos componentes (fatores) para composição da solução extratora: X₁–HNO₃ (0–50%), X₂–HCl (0–50%) e X₃–H₂O (50–100%). Optou-se por utilizar ácidos previamente diluídos em concentração de 4 mol L⁻¹. A opção por estes componentes para solução extratora foi tomada com base em estudos anteriores (ASHLEY et al., 2001; CALLE et al., 2013; LAVILLA; PEREZ-CID; BENDICHO, 1998; VÄISÄNEN et al., 2008) que apontaram as potencialidades da combinação HNO₃–HCl para o procedimento de UAE.

A região destacada em cinza (Figura 3) representa área composta por três componentes e seus respectivos limites inferiores e superiores.

Figura 3 – Região experimental do planejamento de mistura simplex-centroide aplicado na otimização da solução extratora



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na otimização das condições operacionais e instrumentais aplicadas no procedimento de extração, utilizou-se o delineamento Box-Behnken. Os fatores estudados foram: X1 – potência (80–100%), X2 – Tempo de extração (5–15 minutos), e X3 – temperatura (30–50 °C), todos investigados em três níveis. As condições preliminares foram definidas amparado em aspectos teóricos relacionados a UAE (ANDERSON, 2000; BENDICHO; LAVILLA, 2000a, 2000b; YASUI, 2018) e com base em trabalhos publicados anteriormente (FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2001; LAVILLA; PEREZ-CID; BENDICHO, 1998). O domínio experimental foi ajustado de acordo com as tendências observadas nas sucessivas repetições realizadas e os experimentos foram executados de forma aleatória.

Nesta abordagem multivariada, as respostas instrumentais (absorbância) dos analitos foram normalizadas utilizando uma função de resposta múltipla (MR), descrita na Equação 4 (BEZERRA et al., 2019; FERREIRA, 2015; FERREIRA et al., 2007a; NOVAES et al., 2016).

$$MR = \frac{\text{Sin. (Cu)}}{\text{MaxSin. (Cu)}} + \frac{\text{Sin. (Fe)}}{\text{MaxSin. (Fe)}} + \frac{\text{Sin. (Mn)}}{\text{MaxSin. (Mn)}} + \frac{\text{Sin. (Zn)}}{\text{MaxSin. (Zn)}} \quad \text{Equação 4}$$

Sin. – Sinal analítico do experimento (Absorbância);
SinMax. – Máximo sinal no conjunto de medidas.

Os modelos matemáticos foram gerados empregando MR como resposta. A avaliação do modelo foi conduzida com base na ANOVA, através da significância estatística da regressão e por meio do teste de falta de ajuste, ao nível de confiança de 95%. A condição crítica (ótima) prevista pelo modelo foi comparada (Equação 5)

com a resposta obtida experimentalmente no ponto crítico para os fatores estudados aplicando o teste t de *Student* (GEMPERLINE, 2006).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|C_1 - C_2|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação 5}$$

$t_{\text{calculado}}$ – Valor t_{Student} calculado para diferença entre C_1 e C_2 ;
 C_1 – Média da MR obtida experimentalmente;
 C_2 – MR prevista pelo modelo;
 s – Desvio padrão das medidas de C_1 ;
 n – Número de medidas.

4.7 PREPARO DE AMOSTRA

4.7.1 Extração assistida por ultrassom (UAE)

Para extração, foram utilizados tubos de ensaio de vidro borossilicato com fundo arredondado e dimensões de 180 mm de altura e 30 mm de diâmetro. Foram fixadas as posições dos tubos de ensaio e altura relativa (em relação ao nível de água) no banho ultrassônico, utilizando suporte confeccionado em poliestireno expandido (isopor®). A temperatura da água na cuba do banho ultrassônico foi controlada por meio da retirada e adição de iguais volumes de água e o volume total na cuba do banho foi mantido em torno de 1,8 L. Aproximadamente 250 mg da amostra foi pesada em microtubo e transferida para tubo de ensaio. A solução extratora na concentração otimizada foi adicionada, perfazendo um volume total de 10 mL, seguido da agitação mecânica por aproximadamente 10 segundos. O tubo foi fixado ao suporte no banho ultrassônico, sucedendo da sonicação nas condições instrumentais otimizadas. Finalmente, o extrato foi transferido para tubo plástico de polipropileno e o sobrenadante foi separado da fase sólida por centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm (1844 G).

4.7.2 Digestão ácida convencional (CAD)

Amostras de caule, folha e material de referência certificado foram submetidas ao procedimento de digestão ácida convencional (CAD) adaptado do protocolo adotado por Marchand, Fernandez e Moreton (2016). Aproximadamente 250 mg da amostra foram pesados em microtubo e transferido para tubo de

digestão, seguido da adição de 4 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂ (adicionado 1 h antes do término do procedimento). Inicialmente foi arrefecido em gradiente de temperatura de 60 °C, por 30 minutos, sendo posteriormente mantido a 120 °C por 3 h. A solução final teve seu volume aferido para 10 mL.

Amostras de sedimento foram submetidas ao procedimento de CAD adaptado de Defew, Mair e Guzman (2005). Aproximadamente 150 mg da amostra foi pesada em microtubo e transferida para tubo digestor, seguido da adição de 10 mL de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂ (adicionado em duas alíquotas de 1 mL, 1 h antes do término do procedimento). Inicialmente o bloco foi arrefecido em gradiente de temperatura de 60 °C, por 1 h, sendo posteriormente mantido a 120 °C por 4 h. Após a aferição do volume para 12 mL, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (1844 G) por 10 minutos.

4.8 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO

4.8.1 Estudo do efeito de matriz

Foram preparadas três curvas analíticas distintas (aquosa, matriz caule e matriz folha) nas mesmas condições de determinação das amostras (INMETRO, 2018). Possíveis efeitos de matriz foram investigados com base na sensibilidade analítica, por meio da comparação dos coeficientes angulares (a) das curvas analíticas. O teste F para verificar se as variâncias são equivalentes, sucedendo da aplicação do teste t, ambos ao nível de confiança de 95% (GEMPERLINE, 2006).

4.8.2 Limite de detecção e limite de Quantificação

O limite de detecção (LOD) e limite de Quantificação (LOQ) foram estimados (Equação 6 e 7) a partir da medida do sinal analítico de 18 brancos analíticos preparados nas mesmas condições das amostras (ICH, 2005; INMETRO, 2018; IUPAC, 1978).

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times S_b}{a}$$

Equação 6

$$LOQ = \frac{10 \times S_b}{a} \quad \text{Equação 7}$$

S_b . – Desvio padrão do branco;
 a – Inclinação da curva analítica.

4.8.3 Avaliação da exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da análise de material de referência certificado Apple Leaves 1515 (NIST, Gaithersburg, Estados Unidos) e material de referência *Brachiaria brizantha* cv Marandu E1001a (EMBRAPA, São Carlos, Brasil) submetidos ao procedimento de extração assistida por ultrassom (item 4.7.1) e ao procedimento de digestão ácida convencional (item 4.7.2). Os resultados experimentais foram comparados (Equação 8) com os valores certificados dos respectivos analitos ao nível de confiança de 95%, onde $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ indica a inexistência de diferença significativa entre a média e o valor certificado (GEMPERLINE, 2006).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|C_1 - C_2|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação 8}$$

$t_{\text{calculado}}$ – Valor t_{student} calculado para diferença entre C_1 e C_2 ;
 C_1 – Média das medidas;
 C_2 – Valor de referência;
 s – Desvio padrão das medidas;
 n – Número de medidas.

Além disso, a recuperação quantitativa (expressa em porcentagem) foi utilizada para verificar a exatidão (Equação 9).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

C_1 – Concentração do analito quantificada no procedimento;
 C_2 – Concentração de referência.

Complementar às análises, foi feito ensaio de recuperação em amostras de folha e caule coletadas nos pontos A e B. Após realizar as diluições apropriadas, os padrões aquosos foram adicionados na amostra (sólida), em dois níveis de concentração: 4 e 8 mg kg⁻¹ (Cu e Zn); 12 e 28 mg kg⁻¹ (Fe); 16 e 32 mg kg⁻¹ (Mn).

As recuperações foram calculadas conforme Equação 10 (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

C_1 – Concentração do analito na amostra fortificada;
 C_2 – Concentração do analito na amostra não fortificada;
 C_3 – Concentração do analito adicionado à amostra.

Ademais, o procedimento proposto (UAE) foi comparado com protocolo de digestão ácida convencional (CAD). A eficiência da extração foi calculada com base na recuperação quantitativa dos analitos (Equação 9). O teste t de *Student* (Equação 8) foi utilizado para comparar estatisticamente os procedimentos.

Os critérios de avaliação da exatidão, por meio das recuperações quantitativas, foram adotados de acordo com a *AOAC International* (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

4.8.4 Avaliação da precisão

A precisão foi avaliada com base no desvio padrão relativo (RSD), expresso em porcentagem (INMETRO, 2018; MITRA, 2003), calculado conforme Equação 11. Um estudo da repetibilidade foi conduzido a partir da análise de duas amostras. O trabalho experimental foi executado em condições similares (operador, dia e instrumentação), em dez repetições distintas ($n=10$). Os critérios de avaliação da precisão foram adotados de acordo com a *AOAC International* (CURRIE, 1999; INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

$$\text{RSD\%} = \left(\frac{s}{\bar{X}_c} \right) \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

RSD% – Desvio padrão relativo (expresso em porcentagem);
 s – Desvio padrão da medida;
 \bar{X}_c – Média das medidas.

4.9 AVALIAÇÃO DE RISCO POTENCIAL

Indicadores de risco potencial foram utilizados para estabelecer critérios e grau de poluição, calculados com base nas concentrações dos metais em tecido

vegetal e sedimentos. O fator de bioconcentração (BCF) do tecido foliar foi calculado conforme a Equação 12 (SUTHERLAND, 2000; WU et al., 2014).

$$BCF = \frac{C_{\text{Folha}}}{C_{\text{sedimento}}} \quad \text{Equação 12}$$

BCF – Fator de bioconcentração;
C – Concentração do metal.

O BCF é classificado em categorias e indica o grau de impacto gerado pela presença do metal no ambiente: a) BCF < 2 Depleção mínima, poluição mínima ou nula; b) BCF 2–5 Enriquecimento moderado, sinal de poluição moderada; c) BCF 5–20 Enriquecimento significativo, sinal de poluição significativa; d) BCF 20–40 Enriquecimento alto, sugere poluição muito alta; e) BCF > 40 Extremamente enriquecido, indicando sinais extremos de poluição (SEKABIRA et al., 2010; SUTHERLAND, 2000). Em síntese, BCF > 1, indica que o elemento é de origem antropogênica (NOLTING; RAMKEMA; EVERAARTS, 1999).

De posse dos BCFs, foi calculado (Equação 13) o índice de carga de poluição (PLI) da área em estudo (TOMLINSON et al., 1980; WANG et al., 2017).

$$PLI = \sqrt[n]{BCF_1 \times BCF_2 \cdots BCF_{10}} \quad \text{Equação 13}$$

PLI – Índice de carga de poluição;
BCF – Fator de bioconcentração;
n – Número de BCFs.

De forma geral, assume-se que valores de PLI > 1 indica que o ambiente está poluído, enquanto PLI < 1 indica que não há poluição (SEKABIRA et al., 2010). Além disso, foram feitas correlações de Pearson entre as concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn determinadas nos tecidos vegetais (caule e folha) e nos sedimentos coletados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A otimização da solução extratora demandou a avaliação da composição percentual dos pseudocomponentes HNO_3 , HCl e H_2O . Foi aplicado um delineamento experimental de planejamento de mistura simplex-centroide, sendo realizados nove experimentos, dos quais dois foram repetições do ponto central, conforme matriz de dados apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Matriz de dados do planejamento de mistura simplex-centroide e respostas experimentais normalizadas aplicando função de resposta múltipla

n	Fator ¹			Absorbância				MR
	X1	X2	X3	Cu	Fe	Mn	Zn	
1	0,00 (0)	0,00 (0)	10,00 (1)	0,0024	0,0078	1,5383	0,0150	1,316
2	5,00 (0,5)	0,00 (0)	5,00 (0,5)	0,0049	0,1009	2,0637	0,0511	3,082
3	0,00 (0)	5,00 (0,5)	5,00 (0,5)	0,0044	0,1326	2,2012	0,0727	3,568
4	0,00 (0)	2,50 (0,25)	7,50 (0,75)	0,0052	0,1226	2,0984	0,0603	3,419
5	2,50 (0,25)	0,00 (0)	7,50 (0,75)	0,0046	0,1118	2,1676	0,0685	3,389
6	2,50 (0,25)	2,50 (0,25)	5,00 (0,5)	0,0058	0,1099	2,0593	0,0718	3,575
7 (CP)	1,67 (0,17)	1,67 (0,17)	6,67 (0,67)	0,0049	0,1412	2,2761	0,0687	3,686
8 (CP)	1,67 (0,17)	1,67 (0,17)	6,67 (0,67)	0,0048	0,1482	2,3421	0,0684	3,741
9 (CP)	1,67 (0,17)	1,67 (0,17)	6,67 (0,67)	0,0060	0,1273	2,1817	0,0653	3,689

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹ Valor real (valor codificado).

X1 – HNO_3 (mL); X2 – HCl (mL); X3 – H_2O (mL); MR – Resposta múltipla (Calculada de acordo com Equação 4); CP – Ponto central.

Os modelos matemáticos (quadrático, especial cúbico e linear) foram avaliados a fim de obter a descrição satisfatória do comportamento dos fatores e da resposta experimental (ER) dentro do domínio estudado. Utilizando a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 6, foi possível verificar o ajuste dos modelos baseado na significância estatística da regressão e no teste de falta de ajuste.

Para o modelo quadrático ($p < 0,0001$) e especial cúbico ($p = 0,0012$) a regressão foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A razão entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$

foi aproximadamente 122 e 42 vezes, indicando que a regressão do modelo quadrático é altamente significativa.

Tabela 6 – Análise de variância dos modelos matemáticos obtidos com os dados experimentais modelados no planejamento de mistura utilizando a resposta múltipla

Fonte de variação	SS	Df	MS	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²	R ² _{ajus}
Quadrático*							
Regressão	4,6394	5	0,9278	1103,78	9,01	0,999	0,998
Resíduos	0,0025	3	0,0008				
Falta de ajuste	0,0006	1	0,0006	0,63	18,51		
Erro puro	0,0019	2	0,0009				
Total	4,6419	8					
Especial Cúbico*							
Regressão	4,6400	6	0,7733	808,65	19,33	0,999	0,998
Resíduos	0,0019	2	0,0009				
Linear							
Regressão	2,4400	2	1,2200	3,32	5,14	0,525	0,367
Resíduos	2,2018	6	0,3669				
Falta de ajuste	2,1999	4	0,5499	575,10	19,25		
Erro puro	0,0019	2	0,0009				
Total	4,6419	8					

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

SS – soma quadrática; Df – grau de liberdade; MS – média quadrática; F – estatística crítica Fisher; R² – coeficiente de determinação; R²_{ajus} – coeficiente de determinação ajustado.

Os coeficientes de determinação (R²), que descrevem a percentagem de variação explicada, são adequados em ambos os modelos. A regressão é capaz de descrever satisfatoriamente aproximadamente 99,9%. Quanto mais próximo o valor de R² for da unidade, melhor o ajuste do modelo empírico aos dados experimentais (LUNDSTEDT et al., 1998; NOVAES et al., 2017). O coeficiente de determinação ajustado (R²_{ajus}), 99,8% para ambos modelos, representa a máxima variação explicável pelo modelo.

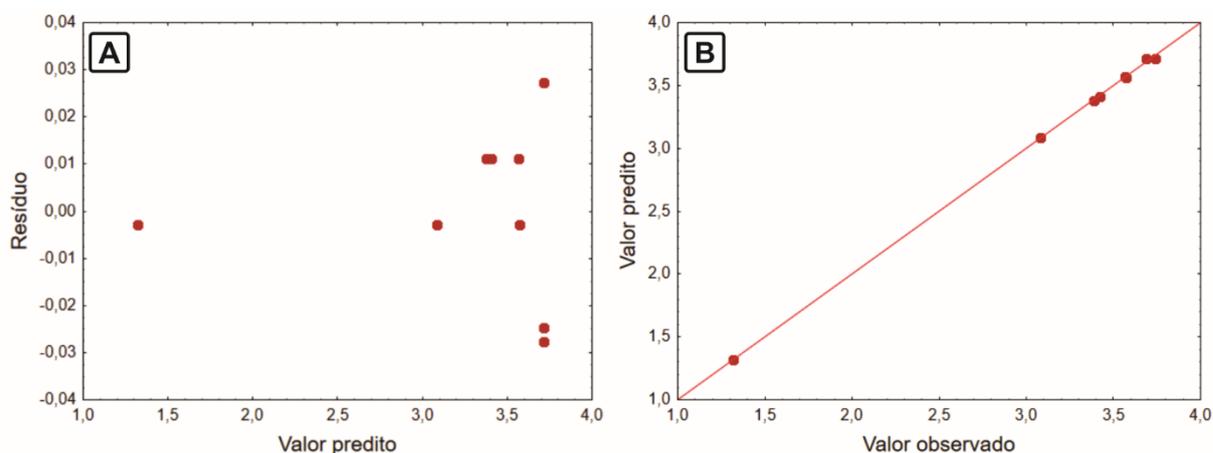
O teste de falta de ajuste para o modelo quadrático indicou que o modelo está bem ajustado aos dados experimentais e não apresenta falta de ajuste ($p=0,508$), ou seja, o $F_{calculado}$ (0,63) < $F_{tabelado}$ (18,51) em seus respectivos graus de liberdade, sugerindo que a MS_{faj} e MS_{pe} reflete apenas os erros aleatórios inerentes ao sistema investigado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; NOVAES et al., 2017). Em relação ao modelo linear, a falta de ajuste foi significativa ($p=0,0021$) e o modelo não está adequadamente ajustado aos dados. A avaliação da regressão, cujo

$F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, indica baixa linearidade, concordante com a grande parcela de resíduos deixados pelo modelo indicado pela soma quadrática residual.

Embora o modelo quadrático e especial cúbico sejam adequados para descrever o sistema em estudo, o modelo quadrático apresentou maior razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$, indicando que a regressão é altamente significativa (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996). Deste modo, o modelo quadrático foi usado no cálculo das coordenadas do ponto crítico (valores críticos) e estudo dos efeitos e interações entre os fatores investigados.

Os resíduos deixados apresentam comportamento aleatório e nenhum indício de anormalidade (Figura 4A). Como sugere o R^2_{ajus} , o modelo gerado deixa resíduos baixos (Figura 4B), incorrendo em boa concordância entre os valores preditos e observados. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2017).

Figura 4 – Gráficos de resíduos e valores preditos para modelo quadrático usando resposta múltipla

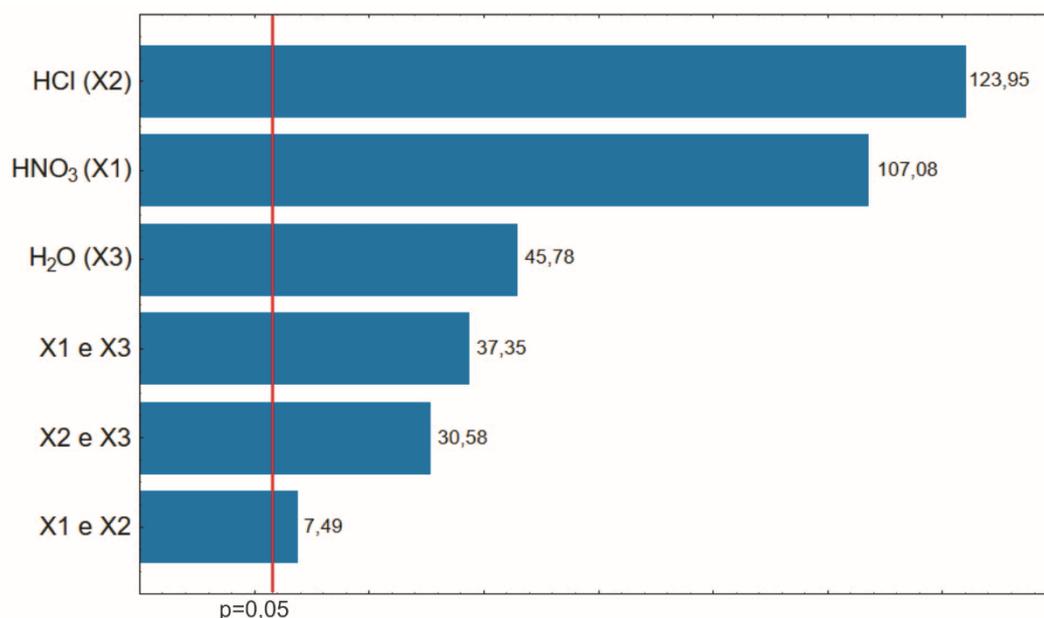


Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito padronizado, relação entre o efeito e o erro normal, dos componentes e das possíveis interações são apresentados no gráfico de pareto (Figura 5), e evidencia a importância de um efeito na resposta obtida comparando-a a um fator estatisticamente significativo, indicado pela linha no eixo x. Esta linha corresponde ao valor crítico da distribuição t de *Student*, no respectivo grau de liberdade e nível de confiança envolvido no cálculo do desvio padrão dos efeitos (FERREIRA et al., 2018). Além disso, um efeito positivo indica um aumento da resposta à medida que o fator varia de um nível inferior para um nível superior (FERREIRA, 2015).

Como evidenciado, o fator X2 (HCl) é o que apresenta maior efeito (123,95) e sugere que este componente é o principal responsável pela extração dos analitos da matriz. A ação complexante do íon Cl^- , proveniente da dissociação do HCl, favorece a separação dos íons da matéria orgânica, especialmente para o ferro. O HCl apresentou o melhor desempenho na extração do Fe, com base no comportamento da extração do metal individualmente, tal fato, deve-se principalmente, que na presença do ânion Cl^- (complexante), os cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} podem formar as espécies FeCl_4^{2-} e FeCl_4^- , significativamente mais solúveis em meio aquoso (CALLE et al., 2013).

Figura 5 – Efeitos padronizados para componentes e interações previstos pelo modelo quadrático obtido na modelagem da mistura



Fonte: Elaborado pelo autor.

A linha vermelha (vertical) indica o nível de confiança (95%).

O fator X1 (HNO₃) apresentou efeito (107,08), 14% menor em relação ao fator X2. Embora o componente tenha menor efeito, este é importante na extração pois é responsável pela manutenção dos íons disponibilizados em solução na forma de nitratos (KRUG, 2006).

Os efeitos de interação entre os fatores X2–X3 e X1–X3 são significativos, indicando que a interação pode ser em função, principalmente, da diluição dos ácidos, promovida pela adição do componente X3 (H₂O) na solução. Embora a tendência seja a redução da efetividade da extração, pela baixa concentração dos ácidos, o que se observa é um efeito de caráter positivo, sugerindo que alterações

viscosidade do meio pode favorecer a distribuição da energia ultrassônica de forma mais efetiva (BENDICHO; LAVILLA, 2000a).

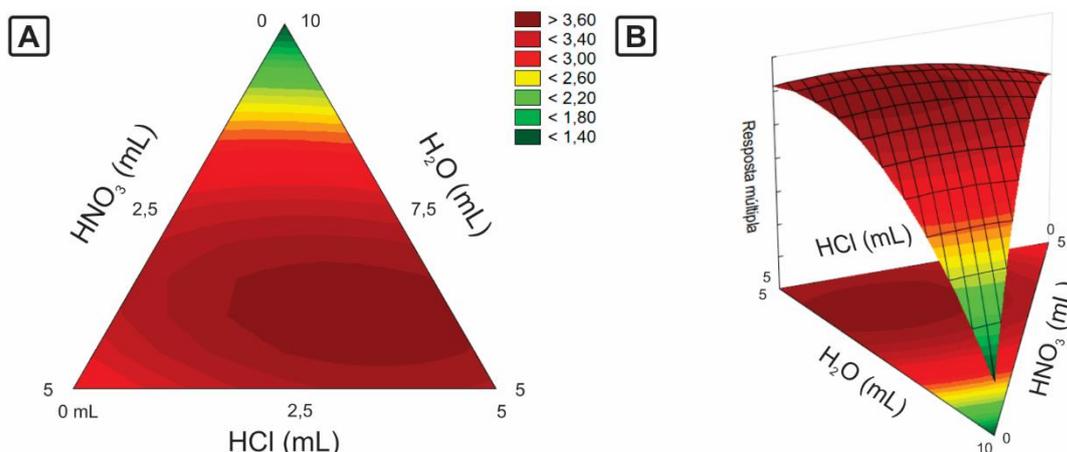
A interação entre os fatores X1–X2 e seu efeito positivo, pode indicar que a interação entre os componentes favorece a formação de espécies intermediárias de elevado poder oxidante no meio relacional. Esta condição é favorável a disponibilização dos analitos no meio aquoso. Entretanto, devido à baixa concentração de ambos os componentes, essas reações podem não ser termodinamicamente favoráveis, como sugere a magnitude do efeito, a menor, entre todos observados. A combinação dos dois ácidos, com característica oxidante e complexante, são favoráveis a extração e manutenção dos metais em solução, em formas passíveis de quantificação (CALLE et al., 2013; VÄISÄNEN et al., 2008).

A partir dos fatores investigados foi possível estabelecer o modelo matemático, em termos dos valores codificados e da restrição imposta, descrito pela Equação 14, onde MR é a resposta múltipla, X1–HNO₃, X2–HCl e X3–H₂O, em termos percentuais.

$$MR = 3,085X1_{(\pm 0,029)} + 3,571X2_{(\pm 0,029)} + 1,318X3_{(\pm 0,029)} + 0,944X1X2_{(\pm 0,126)} + 4,704X1X3_{(\pm 0,126)} + 3,852X2X3_{(\pm 0,126)} \quad \text{Equação 14}$$

Dentro do domínio experimental estudado esta equação é capaz de descrever o comportamento dos fatores e a resposta predita pelo modelo de forma satisfatória. Com base no modelo obtido, foi gerado o gráfico de contorno (Figura 6A) e de superfície (Figura 6B), que apresenta o comportamento da MR em função da variação da proporção dos componentes da solução extratora.

Figura 6 – Gráfico de contorno (A) e superfície de resposta (B) para proporção dos pseudocomponentes da mistura



Fonte: Elaborado pelo autor.

No modelo quadrático obtido, o ponto crítico caracteriza-se como região de máximo, e indica a máxima resposta prevista dentro do domínio estudado. Os valores críticos para os fatores e a validação do ponto crítico previsto são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores críticos obtidos a partir do modelo quadrático e comparação da resposta prevista com dados obtidos experimentalmente

Fator	Ponto crítico ¹	Resposta múltipla (MR)
X1 HNO ₃ (mL)	1,2 (0,12)	Predita 3,788
X2 HCl (mL)	2,8 (0,28)	Experimental (n=3) 3,839 ± 0,319
X3 H ₂ O (mL)	6,0 (0,60)	t _{calculado} ² 0,68

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹ Valor real (valor codificado).

² Valor t calculado conforme Equação 5, 95% de confiança.

A capacidade preditiva do modelo foi confirmada aplicando o teste t de *Student* para comparação das médias. O valor de t_{calculado} (0,68) < t_{tabelado} (4,30) indica que não existe diferença significativa (95% confiança) entre a MR prevista pelo modelo e a MR obtida experimentalmente, assim sendo, demonstra a exatidão do modelo e a obtenção da máxima resposta dentro do domínio estudado.

Ainda que a solução tenha sido modelada utilizando ácidos diluídos em concentração de 4 mol L⁻¹, o volume adicional de água sugerido pelo modelo obtido, proporcionou o aumento da diluição dos ácidos, resultando numa solução cujas concentrações foram de 0,48 e 1,12 mol L⁻¹ para HNO₃ e HCl, respectivamente,

sendo, portanto, a melhor condição para extração dos analitos no sistema em estudo.

Embora a otimização da solução extratora já tenha demonstrado resultados satisfatórios, outros fatores podem influenciar na eficiência da extração utilizando energia ultrassônica (FILGUEIRAS; LAVILLA; BENDICHO, 2001; NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001; SANTOS et al., 2009). Desta forma, foram estudados e otimizados, em busca das melhores recuperações quantitativas. Para esta otimização, aplicou-se o delineamento Box-Behnken, cuja matriz e respostas experimentais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz de dados do planejamento Box-Behnken e respostas experimentais normalizadas aplicando função de resposta múltipla

n	Fator ¹			Absorbância				MR
	X1	X2	X3	Cu	Fe	Mn	Zn	
1	80 (-1)	5 (-1)	40 (0)	0,0055	0,0484	0,4675	0,0147	3,322
2	100 (1)	5 (-1)	40 (0)	0,0051	0,0474	0,4955	0,0198	3,467
3	80 (-1)	15 (1)	40 (0)	0,0051	0,0474	0,4869	0,0148	3,277
4	100 (1)	15 (1)	40 (0)	0,0053	0,0504	0,4912	0,0148	3,378
5	80 (-1)	10 (0)	30 (-1)	0,0052	0,0507	0,4869	0,0129	3,293
6	100 (1)	10 (0)	30 (-1)	0,0058	0,0465	0,4983	0,0145	3,390
7	80 (-1)	10 (0)	50 (1)	0,0046	0,0491	0,5014	0,0152	3,268
8	100 (1)	10 (0)	50 (1)	0,0056	0,0509	0,4977	0,0152	3,466
9	90 (0)	5 (-1)	30 (-1)	0,0059	0,0478	0,5012	0,0133	3,397
10	90 (0)	15 (1)	30 (-1)	0,0045	0,0490	0,4925	0,0122	3,128
11	90 (0)	5 (-1)	50 (1)	0,0042	0,0478	0,4888	0,0152	3,150
12	90 (0)	15 (1)	50 (1)	0,0055	0,0510	0,4948	0,0130	3,369
13 (CP)	90 (0)	10 (0)	40 (0)	0,0056	0,0496	0,5015	0,0268	3,849
14 (CP)	90 (0)	10 (0)	40 (0)	0,0052	0,0479	0,4907	0,0289	3,799
15 (CP)	90 (0)	10 (0)	40 (0)	0,0054	0,0482	0,5002	0,0275	3,809

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹ Valor real (valor codificado).

X1 – Potência (%); X2 – Tempo (minutos); X3 – Temperatura (°C); MR – Resposta Múltipla (Calculada de acordo com Equação 4); CP – Ponto central.

A validade e a significância estatística da regressão foi avaliada com base na ANOVA (Tabela 9). A razão entre $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi aproximadamente 28 vezes, e indica que a regressão do modelo é altamente significativa ($p=0,0005$).

Tabela 9 – Análise de variância do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais no delineamento Box-Behnken utilizando a resposta múltipla

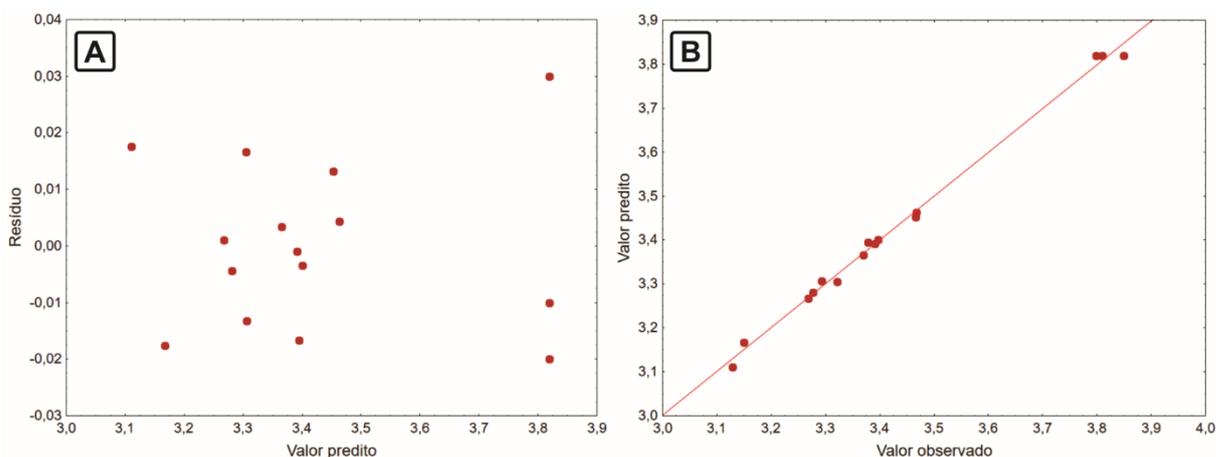
Fonte de variação	SS	Df	MS	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	R^2	R^2_{ajus}
Regressão	0,7133	9	0,0793	132,62	4,77	0,996	0,988
Resíduos	0,0030	5	0,0006				
Falta de ajuste	0,0016	3	0,0005	0,75	16,16		
Erro puro	0,0014	2	0,0007				
Total	0,7163	14					

Fonte: Elaborada pelo autor.

SS – soma quadrática; Df – grau de liberdade; MS – média quadrática; F – estatística crítica Fisher; R^2 – coeficiente de determinação; R^2_{ajus} – coeficiente de determinação ajustado.

O teste de falta de ajuste evidenciou que os dados estão adequadamente ajustados, isto é, $F_{\text{calculado}} (0,75) < F_{\text{tabelado}} (16,16)$, e não foi significativa ($p=0,6125$) ao nível de confiança de 95%. Além disso, a inspeção dos resíduos deixados pelo modelo (Figura 7A) sugere uma distribuição aleatória e sem indícios de anormalidade. Observa-se uma concordância satisfatória entre a MR prevista pelo modelo e a MR experimental, como evidenciado no gráfico de valores observados e preditos (Figura 7B).

Figura 7 – Comparação entre os valores preditos e resíduos (A) e valor observados experimentalmente e valor predito (B) obtidos no modelo quadrático

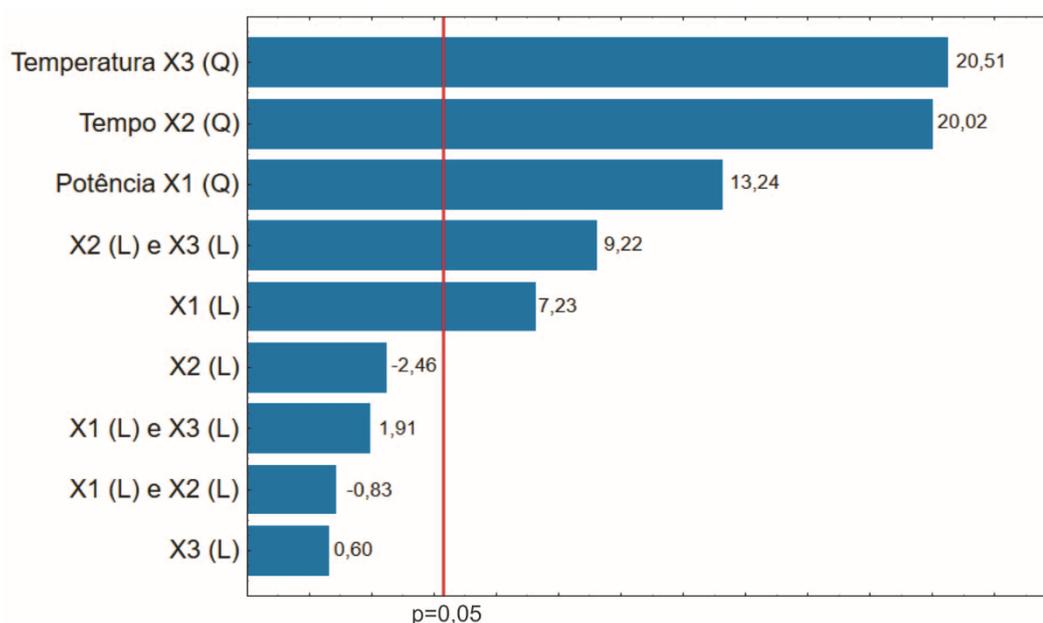


Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir do modelo obtido foi possível estabelecer a importância de cada fator e suas interações. O gráfico de efeito padronizado (Figura 8), mostra que o tempo e temperatura apresentam efeitos positivos e de mesma magnitude, indicando que a ER aumenta juntamente com a elevação do nível do fator (FERREIRA, 2015).

A temperatura (Fator X3, Q) exerce influência significativa no meio reacional (efeito 20,51). Na UAE, desempenha um papel importante em procedimento de extração, por favorecer cineticamente a ocorrência de reações químicas. Embora temperaturas na faixa de 20–50 °C apresentem efeitos positivos na UAE para a maioria dos metais, acima de 50 °C promovem a diminuição da tensão superficial da fase extratora e o aumento da pressão de vapor dentro das bolhas de cavitação. Essa condição promove a redução das ondas de choque e os efeitos sonoquímicos no meio reacional (BENDICHO; LAVILLA, 2000a; CALLE et al., 2013; PADILHA et al., 2011). Temperatura e tempo são fortemente correlacionados e a importância do tempo (Fator X2, Q) pode ser entendida como o intervalo necessário para as ondas ultrassônicas agirem sobre a matriz, principalmente na fragmentação das partículas, condição favorável ao aumento da área superficial e a circulação do solvente extrator entre as fissuras da matriz (PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, 2004).

Figura 8 – Efeito padronizado para fatores e suas interações obtido do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais no delineamento Box-Behnken usando a resposta múltipla



Fonte: Elaborado pelo autor.

A linha vermelha (vertical) indica o nível de confiança (95%).

Outro fator que apresenta efeito elevado é a potência (Fator X1, Q) que está diretamente relacionada com a amplitude e a distribuição de energia no banho ultrassônico. O aumento na intensidade energética favorece a elevação dos efeitos químicos causados pela sonicação. Entretanto, quando uma vibração de amplitude muito alta é aplicada, um grande número de bolhas de cavitação é gerado na solução, o que pode ser desfavorável para o crescimento e colapso destas bolhas e resultar em uma diminuição da energia liberada através do líquido. Essa condição deprecia a quebra das ligações dos analitos com os concomitantes orgânicos e inorgânicos da matriz, reduzindo a eficiência da extração (BENDICHO; LAVILLA, 2000a; PADILHA et al., 2011).

O efeito de interação entre o fator X2 (L) e X3 (L) tende a ser favorável na UAE, visto que, uma maior potência aplicada ao meio reacional leva a um aquecimento gradual do sistema.

Os demais efeitos, não significativos ao nível de confiança de 95%, não exercem influência na resposta e foram desconsiderados (indicados em negrito) no modelo matemático, apresentado em termos de valores codificados (Equação 15), em que, MR é a resposta múltipla, X1 – potência (%W), X2 – tempo (minutos) e X3 – a temperatura (°C).

$$\begin{aligned}
 MR = & 3,325_{(\pm 0,008)} + 0,068X1_{(\pm 0,009)} - \mathbf{0,023X2}_{(\pm 0,009)} \\
 & + \mathbf{0,006X3}_{(\pm 0,009)} - \mathbf{0,011X1X2}_{(\pm 0,013)} + \mathbf{0,025X1X3}_{(\pm 0,013)} \\
 & + 0,122X2X3_{(\pm 0,013)} - 0,091X1^2_{(\pm 0,007)} - 0,138X2^2_{(\pm 0,007)} \\
 & - 0,141X3^2_{(\pm 0,007)}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 15}$$

Esta equação é capaz de descrever satisfatoriamente, dentro do domínio estudado, o comportamento da resposta durante a variação dos níveis dos fatores e suas respectivas interações, que podem ser graficamente visualizados nos gráficos de superfície e de contorno apresentados na Figura 9 (A, B e C).

O bom ajuste do modelo e a região estudada indica pontos de máximo e os valores críticos para os fatores estudados estão apresentados na Tabela 10, assim como, a comparação entre a MR prevista e a MR obtida.

Tabela 10 – Valores críticos obtidos a partir do modelo matemático ajustado aos dados experimentais e comparação do ponto de máximo gerado pelo modelo quadrático

Fator	Ponto crítico ¹	Resposta múltipla (MR)	
X1 Potência (%) ²	91,87 (0,19)	Predita ³	3,825
X2 Tempo (minutos)	9,78 (-0,04)	Experimental (n=3)	3,866 ± 0,133
X3 Temperatura (°C)	40,09 (0,09)	t _{calculado} ⁴	1,32

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹ Os valores críticos foram arredondados para 90, 10 e 40, respectivamente na execução experimental.

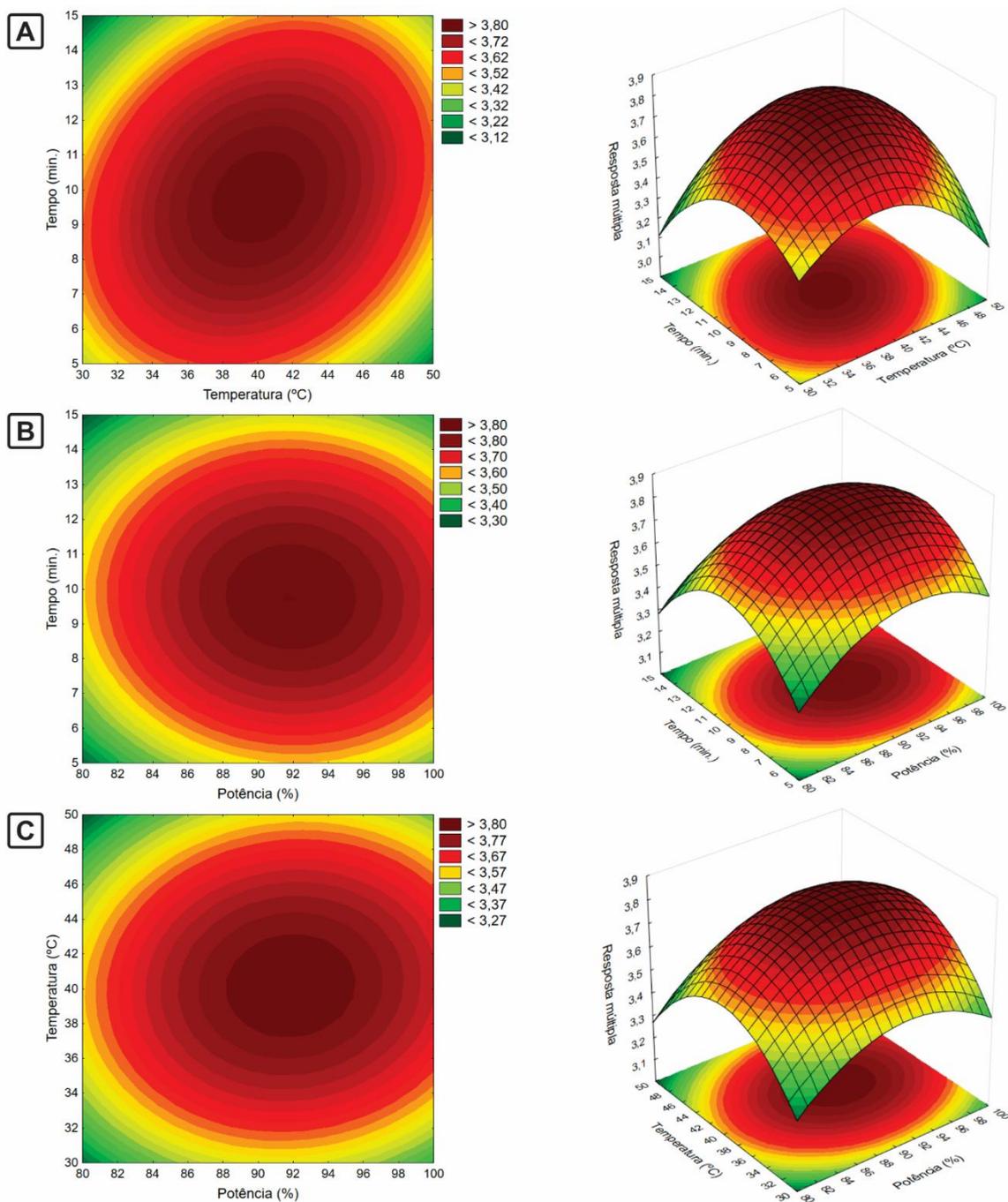
² Potência de ≈ 323 W, calculada com base na potência nominal do equipamento (350 W).

³ Calculada tendo por base o valor executado experimentalmente.

⁴ Valor t calculado conforme Equação 5, 95% de confiança.

Comparando os valores de t em seu respectivo grau de liberdade ($n=3$) e nível de confiança (95%), verifica-se que $t_{\text{calculado}} (1,32) < t_{\text{tabelado}} (4,30)$, indicando a inexistência de diferença significativa entre ambas as MRs (prevista e experimental), isto é, ratifica a validade do modelo matemático e sua elevada capacidade preditiva.

Figura 9 – Superfície de resposta e gráfico de contorno modeladas a partir do delineamento Box-Behnken usando a resposta múltipla



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

5.2.1 Estudo do efeito de matriz

Conforme os dados apresentados na Tabela 11, observa-se os coeficientes

angulares e lineares com suas respectivas incertezas e o coeficiente de determinação (R^2).

O teste F indicou que as variâncias dos grupos são equivalentes, em que $F_{\text{calculado}} \text{ Aq-Ad.C (0,98) e Aq-Ad.F (0,97) < } F_{\text{tabelado(4,4)}} (6,38)$. A comparação dos coeficientes angulares da curva aquosa com a curva de adição de matriz de caule (Ad.C) e folha (Ad.F) por meio do teste t, indicou que não existe diferença significativa entre os coeficientes angulares obtidos na curva aquosa (Aq) e nas curvas de adição de padrão (Ad), em que $t_{\text{calculado}} \text{ Ad.C (0,01); Ad.F (0,02) < } t_{\text{tabelado}} (2,31)$, Df=8, ao nível de confiança de 95%.

Tabela 11 – Comparação entre curvas analíticas obtidas a partir de diferentes métodos de calibração (curva aquosa e de adição de padrão em amostras de folha e caule)

Analito	Curva	a	b	R^2
Cu	Aq.	0,172 ± 0,002	0,002 ± 0,001	0,9990
	Ad.F.	0,177 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,9991
	Ad.C.	0,173 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,9993
Fe	Aq.	0,120 ± 0,001	-0,001 ± <0,001	0,9991
	Ad.F.	0,126 ± 0,001	0,061 ± 0,001	0,9992
	Ad.C.	0,127 ± 0,001	0,021 ± <0,001	0,9990
Mn	Aq.	0,256 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,9996
	Ad.F.	0,247 ± 0,003	0,226 ± 0,001	0,9992
	Ad.C.	0,246 ± 0,002	0,132 ± 0,001	0,9993
Zn	Aq.	0,750 ± 0,009	0,008 ± 0,005	0,9994
	Ad.F.	0,775 ± 0,013	0,062 ± 0,007	0,9984
	Ad.C.	0,773 ± 0,014	0,038 ± 0,007	0,9987

Fonte: Elaborada pelo autor.

a – Coeficiente angular; b – Coeficiente linear; R^2 – Coeficiente de determinação; Aq. – Aquosa; Ad.F. – Adição de analito na folha; Ad.C. – Adição de analito no caule.

Os resultados indicam que a matriz residual não interfere na sensibilidade e, portanto, não afeta a magnitude da resposta instrumental de forma significativa. Embora ambos os métodos de calibração possam ser utilizados, a curva de calibração aquosa convencional pode ser aplicada na calibração instrumental sem perda e/ou ganho de sensibilidade para os analitos estudados, estratégia que colabora com a simplificação do processo analítico.

5.2.2 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados a partir de medidas independentes de 18 brancos analíticos preparados nas mesmas condições das amostras reais. Os LODs (mg kg^{-1}) obtidos foram: 0,31, 0,80, 0,43 e 0,39 para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente. No geral, foram inferiores aos relatados na literatura para procedimentos semelhantes. Filgueiras et al. (2000) encontraram LODs (mg kg^{-1}) de 1,26 para Mn e 0,65 para Zn. Lavilla, Perez-Cid e Bendicho (1998) relataram LODs (mg kg^{-1}) de 0,83 para Cu, 0,45 para Mn e 0,23 para Zn. Os LOQs (mg kg^{-1}) deste procedimento foram de 0,95, 2,42, 1,31, 1,18 para Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente.

5.2.3 Exatidão

A exatidão da UAE foi avaliada com base na análise de CRM e por meio da comparação entre protocolos de preparo de amostra. Os resultados para análise do material de referência certificado aplicando a UAE (Tabela 12) evidencia que o procedimento proposto apresenta exatidão adequada (LATIMER, 2016).

Tabela 12 – Aplicação da extração assistida por ultrassom (UAE) na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em material de referência certificado (NIST 1515) e material de referência (EMBRAPA E1001a)

CRM	Analito	Valor certificado (mg kg^{-1})	UAE (mg kg^{-1}) ¹	RSD (%)	Recuperação (%) ²	$t_{\text{calculado}}$
NIST 1515 (Apple leaves)	Cu	5,69 ± 0,13	5,41 ± 0,34	2,5	95	3,51
	Fe	82,7 ± 2,6	73,2 ± 11,0	6,0	89	3,73
	Mn	54,1 ± 1,1	50,9 ± 3,9	3,1	94	3,56
	Zn	12,45 ± 0,43	12,25 ± 0,79	2,6	98	1,10
EMBRAPA E1001a (Marandu)	Cu	4,0 ± 0,7	3,8 ± 0,4	4,2	95	2,48
	Fe	91 ± 13	88 ± 14	6,6	97	0,96
	Mn	76,0 ± 18,5	72,2 ± 10,4	5,8	95	1,58
	Zn	9,9 ± 1,6	9,1 ± 1,5	6,6	92	2,19

Fonte: Elaborada pelo autor; EMBRAPA (2013); NIST (2017).

UAE – Extração assistida por ultrassom; RSD – Desvio padrão relativo.

¹ média ± U_{med} , n=3, 95% confiança; ² Recuperação (%) = $\left(\frac{\text{UAE}}{\text{Valor certificado}}\right) \times 100$; t_{tabelado} n=3 (4,30).

As recuperações quantitativas variaram de 89–98% e confirmam a eficiência da extração. As determinações não apresentam diferença significativa, em comparação aos valores certificados, considerando que todos os valores $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ($n=3$). Além disso, a exatidão do procedimento de CAD foi verificada aplicando a mesma estratégia (Tabela 13). As recuperações quantitativas variaram de 90–99%. O teste t de *Student* indicou que não existe diferença significativa entre os valores obtidos experimentalmente e certificados, confirmando a eficiência da CAD.

Tabela 13 – Aplicação da digestão ácida convencional (CAD) na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em material de referência certificado (NIST 1515) e em material de referência (EMBRAPA E1001a)

CRM	Analito	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	CAD (mg kg ⁻¹) ¹	RSD (%)	Recuperação (%) ²	$t_{\text{calculado}}$
NIST 1515 (Apple leaves)	Cu	5,69 ± 0,13	5,48 ± 0,91	6,7	96	0,98
	Fe	82,7 ± 2,6	74,1 ± 9,6	5,2	90	3,87
	Mn	54,1 ± 1,1	53,8 ± 5,8	4,4	99	0,21
	Zn	12,45 ± 0,43	11,82 ± 1,92	6,5	95	1,41
EMBRAPA E1001a (Marandu)	Cu	4,0 ± 0,7	3,6 ± 0,7	8,5	90	2,37
	Fe	91 ± 13	83 ± 9	4,2	91	3,90
	Mn	76,0 ± 18,5	70,9 ± 11,1	6,3	93	1,94
	Zn	9,9 ± 1,6	9,4 ± 1,8	7,5	95	1,29

Fonte: Elaborada pelo autor; EMBRAPA (2013); NIST (2017).

CAD – Digestão ácida convencional; RSD – Desvio padrão relativo.

¹ média ± u_{med} , $n=3$, 95% confiança; ² Recuperação (%) = $\left(\frac{\text{CAD}}{\text{Valor certificado}}\right) \times 100$; $t_{\text{tabelado}} n=3$ (4,30).

A comparação direta entre UAE e CAD, aplicadas na análise de CRM, evidencia que a UAE obteve resultados comparáveis aos obtidos na CAD, verificado pelas recuperações na faixa de 95–106%, e não apresentaram diferença significativa (95% de confiança), visto que $t_{\text{calculado}}$ variou de 0,35–3,24 < t_{tabelado} (4,30).

Ademais, a comparação entre os dois procedimentos (UAE/CAD) foi feita utilizando amostras reais (Tabela 14). A avaliação por meio do teste t de *Student* indicou que não existe diferença significativa, ao nível de confiança de 95%, e sugere que ambos os procedimentos são equivalentes, quando comparados a sua exatidão e eficiência de extração, reforçado pelas recuperações obtidas na faixa de 91–106% (folha) e 90–107% (caule).

Tabela 14 – Comparação entre extração assistida por ultrassom (UAE) e digestão ácida convencional (CAD) aplicados na determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de folha e caule (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn)

	Analito	UAE (mg kg ⁻¹) ¹	CAD (mg kg ⁻¹) ¹	RSD (%)	Recuperação (%) ²	t _{calculado}	
A	Folha	Cu	2,86 ± 0,30	2,71 ± 0,13	4,3	106	2,13
		Fe	126,5 ± 14,9	132,9 ± 11,1	4,7	95	1,87
		Mn	30,9 ± 1,8	29,7 ± 0,5	2,4	104	2,87
		Zn	5,59 ± 0,27	5,57 ± 0,11	1,9	100	0,32
	Caulo	Cu	2,11 ± 0,34	2,29 ± 0,27	6,6	92	2,25
		Fe	33,7 ± 4,9	37,5 ± 4,4	5,9	90	3,34
		Mn	43,9 ± 3,6	43,0 ± 2,9	3,3	102	1,08
		Zn	4,47 ± 0,28	4,17 ± 0,32	4,4	107	2,67
B	Folha	Cu	11,47 ± 0,97	10,88 ± 1,11	3,4	105	2,62
		Fe	42,6 ± 4,9	46,7 ± 4,9	4,6	91	3,64
		Mn	266,2 ± 13,2	265,4 ± 4,7	2,0	100	0,26
		Zn	4,90 ± 0,31	4,96 ± 0,18	2,6	99	0,82
	Caulo	Cu	1,73 ± 0,28	1,82 ± 0,20	6,6	95	1,36
		Fe	45,4 ± 4,9	47,6 ± 4,0	4,3	95	1,98
		Mn	154,3 ± 7,5	152,4 ± 6,0	1,9	101	1,12
		Zn	6,14 ± 0,28	5,91 ± 0,20	1,8	104	3,56

Fonte: Elaborada pelo autor.

UAE – Extração assistida por ultrassom; CAD – Digestão ácida convencional; RSD – Desvio padrão relativo. ¹ média ± u_{med}, n=3, 95% confiança; ² Recuperação (%) = $\left(\frac{UAE}{CAD}\right) \times 100$; t_{tabelado} n=3 (4,30).

O ensaio de recuperação foi realizado com uma amostra de cada tecido estudado (Tabela 15). As recuperações obtidas foram na faixa de 78–104% (folha) e 88–107% (caule). No geral, para o Fe, a eficiência da extração variou de acordo com o nível de concentração. Embora sejam recuperações parcialmente adequadas aos níveis de concentração encontrados (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016), este comportamento pode sugerir limitações do procedimento em relação a sua eficiência em concentrações elevadas do metal.

Tabela 15 – Ensaio de recuperação em dois níveis de concentração realizado com amostras de folha e caule aplicando procedimento de extração assistida por ultrassom (UAE)

		Cu			Fe			Mn			Zn		
		Ad.	Rec.	%									
		mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%
A	Folha	0	2,86	–	0	126,5	–	0	30,9	–	0	5,59	–
		4	7,03	104	12	135,9	78	16	46,5	97	4	9,26	92
		8	10,93	101	28	149,4	82	32	62,2	98	8	13,70	101
	Caule	0	2,11	–	0	33,7	–	0	43,9	–	0	4,47	–
		4	6,16	102	12	45,5	98	8	59,8	99	4	7,98	88
		8	9,96	98	28	63,7	107	32	74,6	96	8	12,95	106
B	Folha	0	11,47	–	0	42,6	–	0	266,2	–	0	4,90	–
		4	15,31	96	12	54,1	96	16	281,6	97	4	8,87	99
		8	19,10	95	28	69,1	94	32	298,1	100	8	12,52	95
	Caule	0	1,73	–	0	45,4	–	0	154,3	–	0	6,14	–
		4	5,54	95	12	57,5	101	16	170,1	99	4	9,93	95
		8	9,79	101	28	72,3	96	32	186,6	101	8	14,32	102

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ad. – Total adicionado; Rec. – Total recuperado.

5.2.4 Avaliação da Precisão

A precisão foi avaliada com base no desvio padrão relativo (RSD) obtido nas determinações quantitativas das amostras (Tabela 16). Os RSDs (n=3) variaram de 0,8–6,6%, nas determinações realizadas com as amostras reais.

No estudo da repetibilidade (n=10), cujas etapas de preparo e determinação elementar foram realizadas sob mesmas condições, a variação do RSD foi de 4,2–6,7%. De modo geral, o banho ultrassônico pode apresentar variações na distribuição de energia ultrassônica no meio aquoso. Esta condição pode favorecer a intensificação da formação de bolhas de cavitação em pontos localizados, podendo comprometer a extração dos analitos de forma homogênea nas amostras (ALEIXO et al., 2004; BENDICHO; LAVILLA, 2000a; KRUG, 2006). Embora o uso do banho ultrassônico na UAE apresente esta desvantagem, observa-se que os RSDs são menores que 11% e estão em conformidade com a norma de referência,

considerando os níveis médios de concentrações obtidos que admite RSDs na faixa de 3,7–11% (INMETRO, 2018; LATIMER, 2016).

Tabela 16 – Desvio padrão relativo obtido nas determinações de Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de folha e caule aplicando procedimento de extração assistida por ultrassom (UAE)

Analito	RSD% (n=3)		RSD% (n=10)	
	Folha	Caule	Folha	Caule
Cu	3,2–4,8	3,6–6,6	5,7	6,7
Fe	2,5–4,7	4,3–6,2	5,9	6,6
Mn	2,0–5,9	0,8–5,3	4,2	5,3
Zn	1,2–2,6	1,1–4,4	5,1	5,7

Fonte: Elaborada pelo autor.
RSD – Desvio padrão relativo.

5.3 APLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

O procedimento de UAE foi aplicado na determinação de cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em amostras de folha e caule (*R. mangle* L. e *L. racemosa*) coletadas no Estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, cujas concentrações determinadas são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Concentração (mg kg^{-1} , média $\pm u_{\text{med}}$, n=3, 95% confiança) de Cu, Fe, Mn e Zn determinados em amostras de caule e folha (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) aplicando extração assistida por ultrassom (UAE)

Ponto	Parte	Cu	Fe	Mn	Zn
A (LR)	Folha	2,86 \pm 0,30	126,5 \pm 14,9	30,9 \pm 1,8	5,59 \pm 0,27
	Caule	2,11 \pm 0,34	33,7 \pm 4,9	43,9 \pm 3,6	4,47 \pm 0,28
B (RM)	Folha	11,47 \pm 0,97	42,6 \pm 4,9	266,2 \pm 13,2	4,90 \pm 0,31
	Caule	1,73 \pm 0,28	45,4 \pm 4,9	154,3 \pm 7,5	6,14 \pm 0,28
C (RM)	Folha	1,53 \pm 0,18	29,2 \pm 1,8	201,0 \pm 19,6	6,54 \pm 0,36
	Caule	1,45 \pm 0,21	30,9 \pm 4,7	130,1 \pm 2,6	7,36 \pm 0,27
D (RM)	Folha	1,74 \pm 0,14	84,0 \pm 6,8	306,9 \pm 16,9	5,66 \pm 0,22
	Caule	1,95 \pm 0,21	40,0 \pm 5,5	191,3 \pm 6,7	9,60 \pm 0,27
E (RM)	Folha	1,85 \pm 0,21	38,4 \pm 3,0	348,4 \pm 51,3	9,85 \pm 0,29
	Caule	1,52 \pm 0,14	34,2 \pm 4,7	150,0 \pm 19,7	5,49 \pm 0,24

Fonte: Elaborada pelo autor.

RM – *Rhizophora mangle* L.; LR – *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn.

As menores concentrações observadas foram para o cobre em ambas as espécies, variando de 1,45–11,47 mg kg⁻¹. No ponto B, a concentração encontrada no tecido foliar foi consideravelmente superior aos demais pontos.

Na *L. racemosa* o ferro apresentou maior concentração no tecido foliar (126,46 mg kg⁻¹) e pode ser relacionada com a deposição de material particulado atmosférico retido nas folhas. Embora as amostras tenham sido coletadas na mesma região, a estrutura morfológica da folha da *L. racemosa* é diferenciada, principalmente por apresentar rugosidades que podem reter uma maior quantidade de material particulado e por apresentar estruturas para liberação de sais que podem facilitar a absorção do metal (ARRIVABENE et al., 2015, 2016). Na *R. mangle* L. a concentração de Fe variou de 29,20–84,01 mg kg⁻¹ na folha e 30,92–45,39 mg kg⁻¹ no caule.

Na *R. mangle* L., o Mn apresentou as maiores concentrações em ambos os tecidos, variando de 200,9–348,38 e 130,12–191,30 mg kg⁻¹ na folha e caule, respectivamente. Observou-se uma tendência crescente da concentração no tecido foliar do ponto B–E, podendo ser relacionada a alterações do perfil sedimentar que podem favorecer a absorção do metal. A *L. racemosa* apresentou menor concentração de Mn, em comparação com a *R. mangle* L. Resultados semelhantes foram constatados por Cuzzuol e Rocha (2012), sendo atribuídos a mecanismos de controle iônico que impedem a absorção do metal nesta espécie.

As concentrações do Zn variaram de 4,90–9,85 mg kg⁻¹ na folha e 5,49–9,60 mg kg⁻¹ no caule. Foi observada maiores concentrações de Zn no caule nas amostras coletadas nos pontos B, C e D, em comparação com as concentrações na folha.

A tendência geral foi Mn > Fe > Zn > Cu em ambas as espécies, sendo semelhante às tendências observadas em outros relatos (BERNINI et al., 2010; CUZZUOL; ROCHA, 2012; MADI; BOEGER; REISSMANN, 2015), exceto para o tecido foliar da *L. racemosa* (Fe > Mn > Zn > Cu), mesmo perfil relatado por Madi, Boeger e Reissmann (2015).

5.4 AVALIAÇÃO DE RISCO POTENCIAL

As concentrações de metais foram determinadas (Tabela 18) em amostras de sedimento coletadas na área de manguezal no Estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, BA. As maiores concentrações observadas foram do Fe, que variou de 12,0–29,5 g kg⁻¹, e as menores foram para Cu (4,59–20,25 mg kg⁻¹). As concentrações dos metais, no geral, são similares às relatadas em outros estudos correlatos (MACHADO et al., 2002; SOUZA et al., 2014).

Tabela 18 – Concentração de Cu, Fe, Mn e Zn em sedimento superficial coletado na área de manguezal do estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia

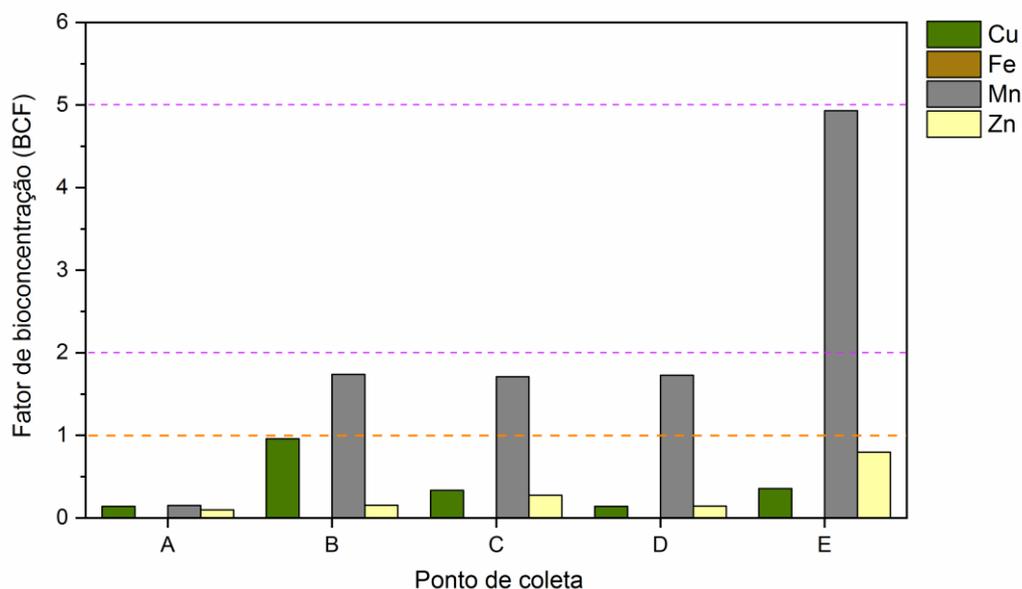
Ponto de coleta	Cu (mg kg ⁻¹)	Fe (g kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
A	20,25 ± 2,16	29,5 ± 1,4	207,4 ± 4,9	58,09 ± 7,99
B	11,97 ± 1,4	19,5 ± 0,7	153,2 ± 33,9	31,68 ± 4,62
C	4,59 ± 0,39	15,6 ± 0,7	117,5 ± 17,1	23,75 ± 2,43
D	12,51 ± 1,4	21,2 ± 1,5	177,8 ± 7,3	39,2 ± 3,07
E	5,22 ± 0,77	12,0 ± 0,5	70,7 ± 4,9	12,37 ± 2,31

Fonte: Elaborada pelo autor.

O Mn e Cu apresentaram menores concentrações no sedimento em pontos em maior proximidade com o oceano. Mesma tendência foi observada no relato de Santos, Souza e Santos (2013), que reportaram concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn em sedimentos superficiais coletados no Rio Cachoeira.

A partir das concentrações dos metais no sedimento e no tecido vegetal, foram calculados os BCFs (Figura 10).

Figura 10 – Fatores de bioconcentração para Cu, Fe, Mn e Zn em amostras de tecido foliar (*Rhizophora mangle* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn) coletadas na área de manguezal do estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia



Fonte: Elaborada pelo autor.

O Mn apresentou os maiores BCFs, variando de 0,15–4,93 e este comportamento pode ser associado à sua elevada mobilidade (MACFARLANE; KOLLER; BLOMBERG, 2007), embora possa ser relacionado a características biológicas das espécies, tendo em vista, que o BCFs em *R. mangle* L. foram consideravelmente superiores ao BCF apresentado na *L. racemosa*. A variação do BCFs ao longo dos pontos de coleta também pode sugerir que este metal é proveniente de fontes antrópicas, relacionadas principalmente ao despejo de efluentes domésticos e industriais no estuário.

Os menores BCFs observados são para o ferro (BCFs < 0,01). Embora o ferro tenha apresentado concentrações elevadas no sedimento, o enriquecimento deste metal para biota é relativamente baixo. As características redutoras do sedimento e o elevado teor de matéria orgânica pode favorecer a baixa disponibilidade do Fe (LACERDA et al., 1991). Além disso, a maior parte do metal pode ser retida nos tecidos radiculares, reduzindo a translocação para outras partes da planta por meio de mecanismos fisiológicos, como a formação de placas de ferro nas raízes, que controlam e reduzem significativamente a adsorção de ferro e de outros metais (MACHADO et al., 2005).

Para o Cu, os BCFs variaram de 0,14–0,96, e para Zn, de 0,10–0,80. A forte complexação com a matéria orgânica presente na fração sedimentar e a retenção

nos tecidos radiculares são fatores que podem impedir que estes metais cheguem aos tecidos superiores, incorrendo em baixos BCFs (MACFARLANE; PULKOWNIK; BURCHETT, 2003; MADI; BOEGER; REISSMANN, 2015). Os BCFs encontrados neste estudo são concordantes com o relato de Bernini et al., (2010), que observaram $BCF < 1$ para Fe e variando de 1 a 3,7 para Cu, Mn e Zn, no Estuário do Rio São Mateus (Espírito Santo).

Ademais, foram estabelecidas correlações entre as concentrações dos metais nos tecidos em estudo da espécie *R. mangle* L. (Tabela 19). Verificou-se correlações positivas do Fe na folha com Cu e Mn no caule, $R=0,94$ e $0,98$, respectivamente. Embora o ferro seja de pouca relevância ecotoxicológica, este metal pode ser responsável pela regulação indireta da absorção de metais, competindo pelos sítios ligantes nos organismos (SARIKA, 2005). Além disso, verificou-se correlação positiva ($R=0,95$) entre Cu e Mn no caule, sugerindo que estes metais compartilham os mesmos mecanismos de absorção e transporte na planta. Correlações entre metais no sedimento e nos tecidos foram encontradas. Zn (folha) com Fe e Mn (sedimento), ambas $R=-0,91$, Cu e Fe (caule) com Cu (sedimento), $R=0,93$ e $0,91$, respectivamente. Estas correlações podem indicar que as concentrações dos metais nos tecidos da espécie *R. mangle* L. podem refletir o perfil encontrado no sedimento.

Tabela 19 – Matriz do coeficiente de correlação de *Pearson* para concentração de metais em tecidos vegetais (*Rhizophora mangle* L.) e sedimento

	Cu-F	Fe-F	Mn-F	Zn-F	Cu-C	Fe-C	Mn-C	Zn-C	Cu-S	Fe-S	Mn-S	Zn-S
Cu-F	1,00											
Fe-F	-0,15	1,00										
Mn-F	-0,13	0,41	1,00									
Zn-F	-0,55	-0,35	0,55	1,00								
Cu-C	0,20	0,94 ^c	0,33	-0,56	1,00							
Fe-C	0,82	0,44	0,21	-0,63	0,72	1,00						
Mn-C	-0,04	0,98 ^b	0,54	-0,29	0,95 ^b	0,54	1,00					
Zn-C	-0,38	0,80	-0,15	-0,51	0,68	0,07	0,67	1,00				
Cu-S	0,54	0,74	0,18	-0,72	0,93 ^c	0,91 ^c	0,79	0,47	1,00			
Fe-S	0,39	0,71	-0,19	-0,91 ^c	0,85	0,71	0,67	0,70	0,91 ^c	1,00		
Mn-S	0,33	0,71	-0,24	-0,91 ^c	0,83	0,65	0,65	0,75	0,87	0,99 ^a	1,00	
Zn-S	0,28	0,74	-0,22	-0,89	0,84	0,63	0,68	0,78	0,86	0,99 ^a	0,99 ^a	1,00

Fonte: Elaborada pelo autor.
F – Folha; C – Caule; S – Sedimento.
^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$; ^c $p < 0,1$.

A magnitude dos impactos causados por fontes de poluição nos diferentes pontos dentro da área de estudo foi determinada utilizando o PLI (TOMLINSON et al., 1980). Os PLIs variaram de 0,05 (Ponto A) a 0,26 (Ponto E), indicando que o local pode ser afetado de forma mais intensa por tensores antrópicos, comparado com os demais pontos, embora seja de baixo risco.

Os metais de origem antropogênica podem ser inseridos no manguezal por diferentes fontes de poluição: transportados pelas águas dos rios ou pela entrada de água oceânica, despejo de efluentes e deposição atmosférica. O manguezal, entretanto, pode reter eficientemente grandes quantidades de metais nos sedimentos na biota, impedindo a mobilização destes para ecossistemas adjacentes.

Os BCFs obtidos sugerem baixo risco e depleção mínima associada a presença dos metais considerando as concentrações determinadas nos tecidos em estudo das respectivas das espécies. Embora existam diversas fontes tensoras no ecossistema, os impactos relacionados a dispersão dos metais, aparentemente são mínimos, não indicando efeitos de risco a curto prazo, para as espécies em estudo, embora represente pressões sobre a biodiversidade, relacionado com a inexistência de esgotamento sanitário adequado, destinação inadequada de resíduos sólidos urbanos e a presença de indústrias com potencial poluidor das águas (SEMA, 2017b, 2017c), podendo se traduzir numa degradação das condições de suporte a biodiversidade. Possíveis impactos a longo prazo devem ser estudados para melhor compreensão dos riscos ao ecossistema e minimizar possíveis danos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi desenvolvido e avaliado um procedimento de extração assistida por ultrassom para determinação de metais em matriz de interesse ambiental. A validade da metodologia foi confirmada aplicando os procedimentos recomendados e os resultados foram compatíveis com a necessidade analítica exigida.

As estratégias de otimização utilizadas e os modelos matemáticos obtidos foram satisfatórios. A otimização das condições aplicadas no preparo de amostra favoreceu a obtenção dos pontos de máxima resposta analítica, conduzindo a obtenção de resultados quantitativos adequados, compatíveis com os valores de LOD e LOQ, apropriados às necessidades analíticas para aplicação na determinação dos metais em estudo em amostras de natureza ambiental.

A metodologia proposta é adequada e foi capaz de fornecer dados confiáveis para a determinação de metais em tecido vegetal. A eficiência do procedimento é comparável aos protocolos convencionais, associado a redução do consumo de reagentes, material e tempo, podendo ser considerada uma alternativa válida aos métodos de digestão ácida convencional.

A aplicação do procedimento na determinação de metais nas amostras de tecido vegetal, mostrou que as concentrações variaram ao longo dos pontos de coleta, como resultado de fatores e mecanismos fisiológicos que controlam a absorção de metais pelas plantas, além das características próprias do ambiente. Os fatores de bioconcentração obtidos sugerem baixo risco de danos ou depleção associados a presença dos metais (Cu, Fe, Mn e Zn) nos tecidos (folha e caule) das espécies em estudo. O índice de carga de poluição indicou baixo impacto na área, advindo de atividades antrópicas. Isso sugere que os mecanismos de retenção de metais no ecossistema de manguezal atuam eficientemente, reduzindo a dispersão e transporte para ecossistemas adjacentes.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a contaminação do ambiente, especialmente de um ecossistema sensível e importante por múltiplos aspectos socioeconômicos, como o manguezal, requer investigações além das que foram conduzidas neste estudo. Nessa ótica, algumas abordagens são sugeridas:

- a) investigar sua aplicação na determinação de outros metais em matrizes de interesse ambiental de igual importância;
- b) determinar níveis de concentração de possíveis contaminantes em tecidos vegetais provenientes de outros pontos localizados na área de estudo;
- c) avaliar a distribuição e translocação nos diferentes tecidos da planta (raízes, partes reprodutivas e folhas senescentes);
- d) efetuar estudos de especiação das diferentes formas de distribuição dos metais no ecossistema.

REFERÊNCIAS

- AGORAMOORTHY, G.; CHEN, F.; HSU, M. J. Threat of heavy metal pollution in halophytic and mangrove plants of Tamil Nadu, India. **Environmental Pollution**, v. 155, n. 2, p. 320–326, 2008.
- ALEIXO, P. C. et al. Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, n. 2, p. 329–337, 2004.
- ALLOWAY, B. J. (ED.). **Heavy Metals in Soils**. 3. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013.
- ANDERSON, K. A. EXTRACTION: Analytical Inorganic Extractions. In: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. London: Academic Press, 2000. p. 1383–1389.
- ARAIN, M. B. et al. Hazardous impact of toxic metals on tobacco leaves grown in contaminated soil by ultrasonic assisted pseudo-digestion: Multivariate study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, n. 1–2, p. 216–224, 2008.
- ARRIVABENE, H. P. et al. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. **Science of The Total Environment**, v. 476–477, p. 496–504, 2014.
- ARRIVABENE, H. P. et al. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. **Chemosphere**, v. 127, p. 27–34, 2015.
- ARRIVABENE, H. P. et al. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 302–313, 2016.
- ARRUDA, S. C. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; ARRUDA, M. A. Z. Ultrasound-assisted extraction of Ca, K and Mg from in vitro citrus culture. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 470–474, 2003.
- ASHLEY, K. et al. Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 16, n. 10, p. 1147–1153, 2001.
- ASHOKKUMAR, M.; MASON, T. J. Sonochemistry. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley & Sons, 2007. p. 1–34.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, n. 1–4, p. 643–654, 1981.
- BARNES, R. M.; JÚNIOR, D. S.; KRUG, F. J. Introduction to Sample Preparation for Trace Element Determination. In: FLORES, É. M. DE M. (Ed.). **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier B.V., 2014.

p. 1–58.

BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BENDICHO, C. et al. Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50–60, 2012.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I. EXTRACTION: Ultrasound Extractions. In: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. London: Academic Press, 2000a. p. 1448–1454.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I. Ultrasound-assisted metal extractions. In: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. London: Elsevier, 2000b. p. 4421–4426.

BERNINI, E. et al. Spatial and temporal variation of the nutrients in the sediment and leaves of two Brazilian mangrove species and their role in the retention of environmental heavy metals. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 177–187, 2010.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BEZERRA, M. A. et al. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941–959, 2019.

BICKING, M. K. L. EXTRACTION: Analytical Extractions. In: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. London: Academic Press, 2000. p. 1371–1382.

CALLE, I. DE LA et al. Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 234–241, 2013.

COSTA, V. C. et al. Multivariate Optimization for the Development of a Fast and Simple Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for Multielemental Determination in Tea Leaves by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES). **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2004–2012, 2018a.

COSTA, V. C. et al. Use of mixture design with minimal restrictions to optimize an extraction procedure employing diluted acids assisted by ultrasound and microwave for nutrient element determination in vegetal samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1190–1198, 2018b.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105–126, 1999.

CUZZUOL, G. R. F.; ROCHA, A. C. Interaction of the water regime with nutrients

relations in a mangrove ecosystem. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 11–19, 2012.

DEFEW, L. H.; MAIR, J. M.; GUZMAN, H. M. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 5, p. 547–552, 2005.

EMBRAPA. **Certificado de Análises: material de referência RM-Agro E1001a (*Brachiaria brizantha* cv Marandu)**. São Carlos, Brasil: Embrapa Pecuária Sudeste, 2013.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 2–14, 2007a.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179–186, 2007b.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry – an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

FILGUEIRAS, A. V. et al. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, n. 2, p. 433–441, 2000.

FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted solubilization of trace and minor metals from plant tissue using ethylenediaminetetraacetic acid in alkaline medium. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, n. 5, p. 451–456, 2001.

GEMPERLINE, P. (ED.). **Practical Guide To Chemometrics**. 2. ed. Nova York: CRC Press, 2006.

GONÇALVES, M. R. M.; GERALDO, L. P. Avaliação das espécies de plantas *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* como bioindicadoras de poluição por metais pesados em ambientes de mangues. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 440–445, 2007.

HOGARTH, P. J. **The Biology of Mangroves and Seagrasses**. 3. ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2015.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization. **Anais...** Geneva: Harmonised Tripartite Guideline: International Conference on Harmonization, 2005

INMETRO. **Orientação sobre validação de Métodos Analíticos**. INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação, jul. 2018.

IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II. data interpretation Analytical chemistry division. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 33, n. 6, p. 241–245, 1978.

JAMALI, M. K. et al. Heavy Metal Contents of Vegetables Grown in Soil, Irrigated with Mixtures of Wastewater and Sewage Sludge in Pakistan, using Ultrasonic-Assisted Pseudo-digestion. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 3, p. 218–228, 2007.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. 4. ed. Nova York: CRC Press, 2011.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. **Advances in marine biology**, v. 40, p. 81–251, 2001.

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**, v. 161, n. 2–3, p. 1391–1398, 2009.

KRUG, F. J. (ED.). **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 6. ed. Santa Maria: UFSM, 2006.

LACERDA, L. D. et al. Iron and chromium transport and accumulation in a mangrove ecosystem. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 57–58, n. 1, p. 513–520, 1991.

LATIMER, G. W. (ED.). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: **Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th Edition, 2016**. 20. ed. Rockville: AOAC International, 2016. p. 18.

LAVILLA, I.; PEREZ-CID, B.; BENDICHO, C. Leaching of Heavy Metals from an Aquatic Plant (*Lagarosiphon Major*) used as Environmental Biomonitor by Ultrasonic Extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 47–57, 1998.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1–2, p. 3–40, 1998.

MACFARLANE, G. R.; KOLLER, C. E.; BLOMBERG, S. P. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: A synthesis of field-based studies. **Chemosphere**, v. 69, n. 9, p. 1454–1464, 2007.

MACFARLANE, G. R.; PULKOWNIK, A.; BURCHETT, M. D. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. **Environmental Pollution**, v. 123, n. 1, p. 139–151, 2003.

MACHADO, W. et al. Trace metal retention in mangrove ecosystems in Guanabara

- Bay, SE Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 11, p. 1277–1280, 2002.
- MACHADO, W. et al. Trace metals in mangrove seedlings: role of iron plaque formation. **Wetlands Ecology and Management**, v. 13, n. 2, p. 199–206, 2005.
- MADI, A. P. L. M.; BOEGER, M. R. T.; REISSMANN, C. B. Distribution of Cu, Fe, Mn, and Zn in two Mangroves of Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 970–976, 2015.
- MAITI, S. K.; CHOWDHURY, A. Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. **Journal of Environmental Protection**, v. 04, n. 12, p. 1428–1434, 2013.
- MARCHAND, C.; FERNANDEZ, J. M.; MORETON, B. Trace metal geochemistry in mangrove sediments and their transfer to mangrove plants (New Caledonia). **Science of The Total Environment**, v. 562, p. 216–227, 2016.
- MARKERT, B. et al. The German heavy metal survey by means of mosses. **Science of The Total Environment**, v. 182, n. 1–3, p. 159–168, 1996.
- MARTINS, P. T. A.; SANTOS, L. L.; COUTO, E. C. G. Descrição estrutural do manguezal do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2013.
- MITRA, S. (ED.). **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy Metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment**. New York: Springer-Verlag New York, 1984.
- MOUNIER, S. J. L.; MARINS, R. V.; LACERDA, L. D. Determining the influence of urbanization on mangrove zones of northeastern Brazil: characterization of Ceará State coastal zone organic matter inputs. In: MAKOWSKI, C.; FINKL, C. (Eds.). **Threats to Mangrove Forests. Coastal Research Library**. Cham: Springer, 2018. p. 199–222.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, C. W.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- NASCENTES, C. C.; KORN, M.; ARRUDA, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, v. 69, n. 1, p. 37–43, 2001.
- NIST. **Certificate of analysis: Standard Reference Material 1515 (Apple Leaves)**. Gaithersburg, Estados Unidos: National Institute of Standards and Technology, 2017.
- NOLTING, R. F.; RAMKEMA, A.; EVERAARTS, J. M. The geochemistry of Cu, Cd, Zn, Ni and Pb in sediment cores from the continental slope of the Banc d'Arguin (Mauritania). **Continental Shelf Research**, v. 19, n. 5, p. 665–691, 1999.
- NOVAES, C. G. et al. A Multiple Response Function for Optimization of Analytical

Strategies Involving Multi-elemental Determination. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 94–101, 2016.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Resposta – Parte I: Variáveis do processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Resposta – Parte II: Variáveis de Mistura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, 2018.

PADILHA, C. C. F. et al. Evaluation of Cu, Mn, and Se in Vegetables Using Ultrasonic Extraction and GFAAS Quantification. **Food Analytical Methods**, v. 4, n. 3, p. 319–325, 2011.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EduFSCar, 2017.

PEREIRA, S. et al. Comparative study between probe focussed sonication and conventional stirring in the evaluation of cadmium and copper in plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 5, p. 2315–2324, 2010.

PERONICO, V. C. D.; RAPOSO, J. L. Ultrasound-assisted extraction for the determination of Cu, Mn, Ca, and Mg in alternative oilseed crops using flame atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1287–1292, 2016.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. DE. Calibration: a review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 114–121, 2012.

PRANCE, G. T. et al. Revisão taxonômica das espécies amazônicas de Rhizophoraceae. **Acta Amazonica**, v. 5, n. 1, p. 5–22, 1975.

PRESCOTT, P. et al. Mixture Experiments: ILL-Conditioning and Quadratic Model Specification. **Technometrics**, v. 44, n. 3, p. 260–268, 2002.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, M. D. L. DE. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 644–653, 2004.

SANTOS, J. S.; SOUZA, F. M.; SANTOS, M. L. P. Distribution of Zn, Pb, Ni, Cu, Mn and Fe in superficial sediment fractions of the Cachoeira River in the south of Bahia, Brazil. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 230–236, 2013.

SANTOS JÚNIOR, D. et al. Currents on Ultrasound-Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 3, p. 305–321, 2006.

SANTOS, W. P. C. et al. Application of multivariate optimization in the development

of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 153–158, 2009.

SARIKA, P. R. **Biogeoorganics and Trace Metal Speciation in Mangroves**. 2005. 261 f. Tese (Doctor of Philosophy In Environmental Chemistry) – Cochin University of Science and Technolog, 2005.

SEKABIRA, K. et al. Assessment of heavy metal pollution in the urban stream sediments and its tributaries. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 7, n. 3, p. 435–446, 2010.

SEMA. **Plano Estratégico para Revitalização da Bacia do Rio Cachoeira: Relatório final**. Salvador, Brasil: SEMA – Secretaria do Meio Ambiente, 2017a.

SEMA. **Plano Estratégico para Revitalização da Bacia do Rio Cachoeira: RP4 – Mapeamento da degradação da bacia**. Salvador, Brasil: SEMA – Secretaria do Meio Ambiente, 2017b.

SEMA. **Plano Estratégico para Revitalização da Bacia do Rio Cachoeira: RP1 – Diagnóstico Ambiental**. Salvador, Brasil: SEMA – Secretaria do Meio Ambiente, 2017c.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SOUZA, C. A. et al. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica. In: PINHEIRO, M. A. A.; TALAMONI, A. C. B. (Eds.). **Educação Ambiental sobre Manguezais**. 1. ed. São Vicente: UNESP, 2018. p. 16–56.

SOUZA, I. DE C. et al. Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 335–348, 2014.

SUMAN, D. O. Mangrove Management: Challenges and Guidelines. In: PERILLO, G. M. E. et al. (Eds.). **Coastal Wetlands**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 1055–1079.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295–326, 1999.

SUTHERLAND, R. A. Bed sediment-associated trace metals in an urban stream, Oahu, Hawaii. **Environmental Geology**, v. 39, n. 6, p. 611–627, 2000.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v. 110, n. 2, p. 195–205, 2000.

TOMLINSON, D. L. et al. Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. **Helgoländer**

Meeresuntersuchungen, v. 33, n. 1–4, p. 566–575, 1980.

VÄISÄNEN, A. et al. Determination of mineral and trace element concentrations in pine needles by ICP-OES: Evaluation of different sample pre-treatment methods. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 1005–1016, 2008.

VANNUCCI, M. What is so special about mangroves? **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 599–603, 2001.

WALSH, G. E.; AINSWORTH, K. A.; RIGBY, R. Resistance of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings to Lead, Cadmium, and Mercury. **Biotropica**, v. 11, n. 1, p. 22–27, 1979.

WANG, Z.-H. et al. Environmental changes in Jiaozhou Bay of northern China during the past 90 years using metals and biogenic elements in sediments. **Journal of Environmental Sciences**, v. 53, p. 301–312, 2017.

WU, Q. et al. Ecological risk and pollution history of heavy metals in Nansha mangrove, South China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 143–151, 2014.

YASUI, K. **Acoustic Cavitation and Bubble Dynamics**. Cham: Springer International Publishing, 2018.