



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MILANA ABOBOREIRA SIMÕES BATISTA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE Cu,
Fe, Zn E S EM TAINHA (*Mugil cephalus*) POR ICP OES**

ILHÉUS - BAHIA

2017

MILANA ABOBOREIRA SIMÕES BATISTA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE Cu,
Fe, Zn E S EM TAINHA (*Mugil cephalus*) POR ICP OES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Santa Cruz - Campus Soane Nazaré, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica Aplicada

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos Analíticos

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Novaes Santos

ILHÉUS – BAHIA

2017

B333

Batista, Milana Aboboreira Simões.

Desenvolvimento de método analítico para determinação de Cu, Fe, Zn e S em tainha (*Mugil cephalus*) por ICP OES / Milana Aboboreira Simões Batista – Ilhéus, BA: UESC, 2017.

55f. : il.

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

Inclui referências.

1. Química analítica – Métodos ópticos. 2. Misturas (Química). 3. Metais – Toxicologia. 4. Peixes – Efeito dos metais pesados. I. Título.

CDD 543.085

MILANA ABOBOREIRA SIMÕES BATISTA

Desenvolvimento de método analítico para determinação de Cu, Fe, Zn e S em
Tainha (*Mugil cephalus*) por ICP OES

Ilhéus-BA, 07 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
Orientador(a)



Prof(a). Dr. Cleber Galvão Novaes (UESB)
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)



Prof(a). Dr. Ivon Pinheiro Lôbo (UESC)
Doutor em Química - UFBA
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Dedico esta dissertação aos meus pais Marlene e Edinaldo, por serem meus maiores incentivadores e grande exemplo de vida, ao meu irmão Edimarlen, por estar sempre me apoiando e acreditando no meu potencial, a minha sobrinha Emily por todo amor e carinho e ao meu noivo Mauricio Alan pelo companheirismo e compreensão.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, por me proporcionar o fim de mais uma etapa, pelos sonhos que se concretizaram. Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas.

Aos meus pais **Edinaldo** e **Marlene**, meu irmão **Edimarlen** e minha sobrinha **Emily** por estarem sempre ao meu lado, por todo amor e cuidado, por acreditarem no meu potencial e serem meus maiores incentivadores. Vocês são mais que essenciais em minha vida!

Ao meu noivo **Mauricio Alan**, pelo companheirismo, compreensão e apoio dado durante toda caminhada.

Ao **Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva**, por ter aceitado ser meu orientador, me dando assim, oportunidade de ingressar na pesquisa acadêmica. Pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

A **Prof^a. Dr^a. Luana Novaes Santos**, pela co-orientação, por sua valorosa contribuição, dedicação, sinceridade e todo apoio ao trabalho desenvolvido.

Ao **Prof. Dr. Raildo Mota de Jesus**, por toda disponibilidade, apoio e ensinamentos de grande importância para meu aprendizado. Muito obrigada pela paciência e por todo incentivo para que tudo desse certo.

Ao **Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim**, pelos ensinamentos passados durante minha formação, disponibilidade de materiais de seu laboratório de pesquisa, contribuição e participação durante o Exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Ivon Pinheiro Lôbo**, pelos ensinamentos passados durante minha formação, por contribuições de grande importância ao meu trabalho, avaliação e participação durante o Exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Anderson**, por conceder a oportunidade de utilizar seu laboratório para realização de parte dos experimentos em seu laboratório na Universidade Federal da Bahia (UFBA) Vitória da Conquista.

Aos demais **professores do PPGQuim**, que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação e desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, **Clissiane**, **Luana**, **Luiz Henrique**, **André**, **Karolaine**, **Janclei**, **Herick** e **José Lucas**, pelo conhecimento compartilhado, por toda ajuda e descontração no laboratório.

As minhas colegas amigas **Rândilla** e **Ohana**, por todos os momentos que pudemos estar juntas, desde o almoço aos dias e noites de estudo. Muito obrigada por compartilharem conhecimento e a amizade.

Em especial as amigas **Clissiane** e **Luana**, por todas as conversas, conselhos, ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Por serem inteiramente presentes e dedicadas no desenvolvimento do meu trabalho. Sem a ajuda e experiência de vocês não conseguiria realizar e cumprir com a minha missão. Muito obrigada por tudo!

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo acolhimento, juntamente com seus colaboradores, e oportunidade de fazer o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa de estudo concedida.

Aos demais que não foram citados mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!!

RESUMO

Os peixes são importantes fontes de proteína, tornando-os muito significativos na dieta humana. Embora o consumo deste alimento seja benéfico à saúde das pessoas, é fundamental que o produto não apresente concentração de componentes inorgânicos acima dos limites recomendados. Desta maneira, foi realizado planejamento de mistura Simplex centróide com restrição para digestão de amostras de Tainha (*Mugil cephalus*) em bloco com sistema de refluxo com dedo frio, para avaliar a melhor proporção entre os reagentes HNO₃, H₂O₂ e H₂O. As respostas foram avaliadas por sinais de intensidade destes elementos. Os valores otimizados, obtidos para a mistura digestora foram 0,4 mL de peróxido de hidrogênio; 3,6 mL de ácido nítrico e 6,0 mL de água. O software Statistica 7.0 foi utilizado para processar os resultados. A ANOVA indicou que os dados obtidos estão sendo satisfatoriamente descritos. O teste F foi aplicado para verificar o ajuste do modelo proposto, no qual o valor de F calculado para o modelo foi de 20,7; enquanto que o F tabelado foi de 9,01. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,924936$) evidenciou uma correlação satisfatória. O método foi validado com CRM de tecido de ostra (NIST 1566b) com RSD de 3,54%; 3,82%; 4,81% e 3,50% de Zn, Fe, Cu e S, respectivamente. Os limites de detecção obtidos foram 0,002 mg kg⁻¹ para Cu e Zn e 0,02 mg kg⁻¹ para Fe e S, e de quantificação 0,008 mg kg⁻¹ para Cu e Zn, 0,07 mg kg⁻¹ para Fe e 0,08 mg kg⁻¹ para S. O método proposto foi aplicado para a determinação de cobre, ferro, zinco e enxofre em quinze amostras de peixe, cujas concentrações encontradas variaram de 0,5 a 3026,2 mg kg⁻¹; 59,3 a 422,8 mg kg⁻¹; 37,5 a 92 mg kg⁻¹ e 5451,2 a 14088,7 mg kg⁻¹, respectivamente. Rede Neural Artificial de Kohonen foi utilizada para verificar a formação de grupos entre as amostras e melhor visualizar a separação dos grupos.

Palavras chaves: Tainha, planejamento de mistura, metais essenciais, ICP OES.

ABSTRACT

Fish are important sources of protein, making them very significant in the human diet. Although the consumption of this food is beneficial to the health of people, it is essential that the product does not present concentration of metals above the recommended limits. In this way, it was carried out a simplex centroid mixture with restriction for the digestion of samples of Mullet (*Mugil cephalus*) in block with reflux system with cold finger, to evaluate a better proportion between the reagents HNO₃, H₂O₂ and H₂O. The responses were evaluated by signs of intensity of these elements. The optimized experimental values obtained for the mixture were 0,4 mL of hydrogen peroxide; 3,6 mL of nitric acid and 6,0 mL of water. Statistica 7.0 software was used to process the results. ANOVA indicated that the data obtained are being satisfactorily described. The F test was applied to verify the fit of the proposed model, in which the calculated F value for the model was 20,7, while the table F was 9,01. The coefficient of determination ($R^2 = 0,924936$) showed a satisfactory correlation. The method was validated with CRM of oyster tissue (NIST 1566b) with RSD of 3,54%; 3,82%; 4,81% and 3,50% of Zn, Fe, Cu and S, respectively. The limits of detection were 0,002 mg kg⁻¹ for Cu and Zn and 0,02 mg kg⁻¹ for Fe and S, and quantification 0,008 mg kg⁻¹ for Cu and Zn, 0,07 mg kg⁻¹ for Fe and 0,08 mg kg⁻¹ for S. The proposed method was applied for the determination of copper, iron, zinc and sulfur in fifteen fish samples whose concentrations found ranged from 0,5 to 3026,2 mg kg⁻¹; 59,3 To 422,8 mg kg⁻¹; 37,5 to 92,0 mg kg⁻¹ and 5451,2 to 14088,7 mg kg⁻¹, respectively. Kohonen's Artificial Neural Network was used to verify the formation of groups between the samples and to better visualize the separation of the groups.

Keywords: Mullet, mixture design, essential metals, ICP OES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Baía do Pontal, Ilhéus-Ba	6
Figura 2- Cadeia alimentar do ecossistema aquático constituída por representantes de 4 níveis tróficos	7
Figura 3 - Peixe da espécie <i>Mugil cephalus</i>	9
Figura 4 - Esquema simplificado da circulação geral do cobre no corpo humano ...	10
Figura 5 - Diagrama esquemático do sistema de digestão. a) dedo frio, b) tubo de digestão, c) dedo frio acoplado ao tubo de digestão	15
Figura 6 - Espaço fatorial restrito para misturas com 2 e 3 componentes	18
Figura 7 - Sistema de coordenadas Simplex centroide	19
Figura 8 – Modelo não linear de um neurônio	23
Figura 9 – Modelo de Kohonen para um mapa auto-organizável	24
Figura 10 - Pontos de coleta na Baía do Pontal, Ilhéus – BA	25
Figura 11 - Bloco digestor com tubos de digestão e dedo frio	30
Figura 12 - Diagrama da mistura para o modelo quadrático	34
Figura 13 - Superfície de resposta para otimização do planejamento de mistura ...	34
Figura 14 - Gráfico U-matix	42
Figura 15 - Planos de componentes dos dados analisados	42
Figura 16 - Disposição das amostras no mapa da rede	43
Figura 17 – Gráfico com os valores do índice de Silhueta	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da técnica ICP OES	22
Tabela 2 - Pontos de coleta na região da Baía do Pontal	25
Tabela 3 - Parâmetros operacionais e instrumentais utilizados no ICP OES	28
Tabela 4 - Matriz experimental do planejamento de mistura para otimização da mistura digestora	29
Tabela 5 - Planejamento de mistura usado para a construção da superfície de contorno ..	33
Tabela 6 - Dados do planejamento de misturas para otimização do processo de digestão por sistema de refluxo	35
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA)	35
Tabela 8 - Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura	35
Tabela 9 - Parâmetros das curvas de calibração analíticas: coeficiente de correlação (R^2) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos por ICP OES	36
Tabela 10 - Valores de concentração de Cu, Fe, Zn e S encontrados no CRM por ICP OES (média \pm desvio padrão, n=3) através do processo de digestão com ácido diluído em sistema de refluxo	37
Tabela 11 - Comparação de método deste trabalho com trabalhos da literatura	38
Tabela 12 - Resultados de concentração de Zn, Fe, Cu e S (mg kg^{-1}) determinados por ICP OES em amostras de peixe (média \pm intervalo de confiança, n=3)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS – Atomic Absorption Spectrometry (Inglês), Espectrometria de Absorção Atômica (Português)

ANOVA - Análise de Variância

CCD - Charge-coupled Device (Inglês), Dispositivo de Acoplamento de Carga (Português)

CRM – Certified Reference Material (Inglês), Material de Referência Certificado (Português)

FAAS – Flame Atomic Absorption Spectrometry (Inglês), Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Português)

GFAAS – Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Inglês), Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (Português)

ICP OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Inglês), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (Português)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

RM – Resposta múltipla

RNA – Rede Neural Artificial

ART – Adaptive Resonance Theory (Inglês), Teoria da Ressonância Adaptativa (Português)

CNM – Combinatorial Neural Model (Inglês), Modelo Neural Combinatório (Português)

RBF – Radial Basis Function (Inglês), Função de Base Radial (Português)

SOM – Self-organizing Map (Inglês), Mapa Auto-organizador (Português)

NIST – National Institute of Standards and Technology (Inglês), Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Português)

DRI – Dietary Reference Intakes (Inglês), Ingestão Dietética de Referência (Português)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 ESTUÁRIOS	4
3.1.1 Baía do Pontal	4
3.2 INDICADORES BIOLÓGICOS	6
3.3 PEIXE <i>Mugil cephalus</i>	8
3.4 ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS.....	9
3.4.1 Cobre (Cu).....	10
3.4.2 Ferro (Fe).....	11
3.4.3 Zinco (Zn)	11
3.4.4 Enxofre (S)	12
3.5 PREPARO DE AMOSTRA	12
3.5.1 Decomposição da matéria orgânica	13
3.5.2 Decomposição por via úmida utilizando bloco digestor com “dedo frio”.....	14
3.5.3 Ácidos diluídos	15
3.6 PLANEJAMENTO DE MISTURAS	17
3.7 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO - ICP OES	20

3.7.1 Vantagens e desvantagens	21
3.8 REDES NEURAS ARTIFICIAIS	22
3.8.1 Redes de Kohonen	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 ÁREA DE ESTUDO	25
4.2 AMOSTRAS	26
4.3 REAGENTES	26
4.4 EQUIPAMENTOS	27
4.5 OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO DE MISTURA	28
4.6 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS COM DEDO FRIO	29
4.7 ESTRATÉGIAS DE VALIDAÇÃO	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PREPARO DE AMOSTRA	32
5.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO	36
5.2.1 Limites de detecção e quantificação	36
5.2.2 Exatidão	37
5.2.3 Precisão	37
5.2.4 Comparação com outros métodos	38
5.3 APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS	39
5.4 REDES NEURAS ARTIFICIAIS	41
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os hábitos alimentares vêm sendo alterados devido à descoberta de que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados e com baixos níveis de colesterol reduz o risco de doenças cardíacas. Podem diminuir também a probabilidade de alguns tipos de câncer, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias, fazendo então que os consumidores prefiram as carnes brancas, contribuindo para o aumento do consumo de peixes (AGNESE, A. P., OLIVEIRA, E. M., 2001, MACIEL *et al.*, 2014; LUND, 2013; SWANSON e MOUSA, 2012; MOZAFFARIAN e WU, 2011; DOMINGO, 2007; CAHU *et al.*, 2004).

Os peixes são importantes fontes de proteína tornando-os muito significativos na dieta humana. Apresentam baixos teores de colesterol, calorias, gorduras saturadas e sódio e alta quantidade de proteínas, minerais essenciais, tais como cálcio, potássio, iodo, ferro, zinco e selênio (USEPA, 2004 ; DENTON *et al.*, 2010).

Os metais podem ser classificados como essenciais ou não essenciais para os organismos. Os metais essenciais, a exemplo do Cu, Fe, Mn e Zn, são aqueles que possuem função biológica conhecida e são constituintes obrigatórios do metabolismo dos organismos. Estes participam de processos envolvendo compostos enzimáticos fazendo parte do sistema aceptor/doador de elétrons. Estes elementos são geralmente encontrados na natureza em pequenas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm) e são conhecidos também como elementos traço. (LACERDA *et al.*, 1989).

Muitos elementos químicos, apesar de essenciais para os organismos vivos, podem vir a serem tóxicos, caso a ingestão exceda os níveis considerados seguros. Os elementos cromo, cobre e zinco, por exemplo, são considerados micronutrientes essenciais ao metabolismo dos organismos vivos. No entanto, seu déficit pode provocar doenças ou disfunções e o excesso, intoxicações (VIRGA *et al.*, 2007).

Determinar as concentrações dos contaminantes na biota significa monitorar os níveis da fração "biodisponível" destes nos ecossistemas. A toxicidade de metais em organismos aquáticos e seu equilíbrio são influenciados por alguns fatores limnológicos, tais como pH, alcalinidade, dureza, matéria orgânica, sólidos totais e cargas de sedimentação (APRILE, F. M., SIQUEIRA, G. W., PARENTE, A. H., 2005). A determinação de micronutrientes e macronutrientes em Tainha (*Mugil cephalus*), que é uma das espécies de peixe mais comercializadas por pescadores do

município de Ilhéus-Ba, é importante para avaliar a qualidade do pescado quanto às concentrações de elementos químicos essenciais.

A grande maioria das técnicas utilizadas para determinação elementar requer a decomposição das amostras, disponibilizando assim os elementos em solução. A decomposição da matéria orgânica pode ser feita por via úmida, através do aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes ou ácidos diluídos, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio, podendo ser realizada em sistema aberto ou fechado (KRUG, F. J., 2006).

Para realizar a extração, através do planejamento de mistura, dos elementos Cu, Fe, Zn e S em peixes, pode ser aplicada a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A técnica é conceituada na determinação de elementos inorgânicos em diferentes matrizes, pois apresenta muitas vantagens quando comparada com outras técnicas espectrométricas como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). Dentre essas vantagens destaca-se a eficiente ionização ou excitação, dada pelas altas temperaturas alcançadas no plasma, análise multielementar-simultânea, apresenta alta sensibilidade, na ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$ e possibilita a análise de uma ampla faixa de concentrações devido a sua linearidade característica (CIENFUEGOS, F., VAITSMAN, 2000; HOU, X., JONES, B. T., 2000; SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAM, T. A., 1998).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma estratégia analítica para determinar Cu, Fe, Zn e S em amostras do peixe *Mugil cephalus* da Baía do Pontal, em Ilhéus-Bahia, empregando planejamento de mistura aplicada ao preparo de amostra e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e avaliação exploratória por Rede Neural Artificial de Kohonen.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método utilizando digestão com ácido diluído para determinação de Cu, Fe, Zn e S em tecido de músculo de peixe.
- Empregar técnicas de planejamento de mistura na otimização das variáveis envolvidas no processo de digestão da amostra.
- Validar o método analítico empregando a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.
- Aplicar redes neurais artificiais (RNA's) como ferramentas de análise exploratória para estabelecer comparações entre as amostras dos diferentes pontos da Baía do Pontal, Ilhéus-Ba.
- Fornecer dados de alimentos consumidos pela população de Ilhéus-Ba e região.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESTUÁRIOS

O estuário é um ambiente aquático costeiro semifechado com interligação livre com o oceano aberto, no interior do qual ocorre a diluição mensurável da água marinha pela água doce proveniente da drenagem continental (CAMERON, PRITCHARD, 1963; PRITCHARD, 1967). Os estuários são ambientes onde é comum observar impactos ambientais de diversas naturezas, tendo como um dos fatores a concentração do desenvolvimento humano nas zonas costeiras. Estes impactos variam desde o lançamento de efluentes domésticos, agrícolas ou industriais, até a alteração da morfologia da bacia estuarina para que esta se adeque às necessidades humanas, tais como dragagens, aterros e retificações de canais (SCHETTINI, PEREIRA, SPILLERI, 2000).

Segundo Barletta *et al* (2003), a precipitação e o aumento do volume caudal dos rios tributários de áreas estuarinas influenciam diretamente na diversidade e permanência das espécies ao longo do estuário. Outro fator relevante é a variação das marés que, em consonância com a variação sazonal da vazão dos rios, gera mudanças em densidade e diversidade de espécies (SILVA, 2006).

Os estuários também são conhecidos por sua alta produtividade biológica se comparados com os rios ou o oceano que os cercam, fazendo com que essas áreas sejam importantes para a dinâmica ambiental (SILVA, 2015)

3.1.1 Baía do Pontal

A Baía do Pontal é um recôncavo formado a partir do encontro dos rios Cachoeira, Santana e Itacanoeira, localizando-se ao Sul do Estado da Bahia no município de Ilhéus (Figura 1). Esta se limita ao norte com a Avenida Dois de Julho (localizada no centro de Ilhéus); ao sul com a Avenida Lomanto Júnior, a oeste com a Ilha do Frade e a foz dos rios Cachoeira, Itacanoeira e Santana, por fim a leste com o Morro de Pernambuco e Oceano Atlântico (LACERDA, A. F.; AMORIM, R. R.; GÓES, L. M.; DAMACENO FILHO, A. R.; NASCIMENTO, I. B. DO; SOUZA, J. DE; OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, G. B.; ARAUJO, I. C.; SANTOS, M. C. F. DOS, 2006). Apresenta área de aproximadamente 16 km² e uma altura média de maré de 1,8 m. Trata-se de uma

zona de estuário que se caracteriza como a principal feição geomorfológica do município de Ilhéus, sobretudo pela sua importância no decorrer da história econômica da região (SILVA, E. B., 2015).

A vegetação na região de Ilhéus se constitui em: vegetação higrófila (Mata Atlântica) possuindo extrato arbustivo denso, latifoliada, sempre verde; e vegetação litorânea que ocupa a planície costeira sendo do tipo edáfica, a exemplo dos manguezais que vivem em condições salobras, e das restingas que se desenvolvem sobre os depósitos arenosos quaternários (GOUVÊA, 1976).

O clima é classificado como tropical quente e úmido sem estação seca em seus valores médios anuais (ANDRADE, 2003). O litoral do município está situado no domínio dos ventos alísios do nordeste. A média das temperaturas máximas é superior a 24°C e a média das mínimas é de 21°C. Os meses mais quentes são de novembro a março, e os meses mais frios são julho e agosto (HEINE, 2001).

Na região costeira de Ilhéus o regime de maré é do tipo mesomaré, com características semidiurna (dois ciclos de maré vazante e de maré enchente durante 24 horas), que segundo os dados da estação maregráfica situada no Porto do Malhado apresentam marés de sizígia com altura máxima de 2,3 m e mínima de 0,1 m (DHN, 2004).

Serve de habitat para uma diversidade de animais aquáticos que são alvo de exploração regional para fins comerciais e de consumo.

Figura 1: Baía do Pontal, Ilhéus-Ba



Fonte: Google maps

Devido a produtividade da monocultura do cacau, na década de 40, as matas ciliares destes rios foram degradadas, aumentando o escoamento de sedimentos na Baía, gerando seu assoreamento, além do despejo de resíduos oriundos da prática agrícola, como agrotóxicos (MENEZES, S. M. G., 2014). Esses sedimentos podem armazenar grande quantidade de substâncias tóxicas que agem como fonte secundária de poluição quando liberadas para as águas.

A quantidade de efluentes lançados nas bacias dos rios tributários, bem como no estuário da Baía do Pontal, juntamente com as partículas biogeoquímicas oriundas de suas adjacências e do transporte realizado pelo oceano, comprometem a qualidade da água na baía (SILVA, 2015). Consequentemente, esse fato pode ocasionar sérios danos para a fauna e a flora do curso hídrico, podendo provocar, principalmente, a morte de peixes.

3.2 INDICADORES BIOLÓGICOS

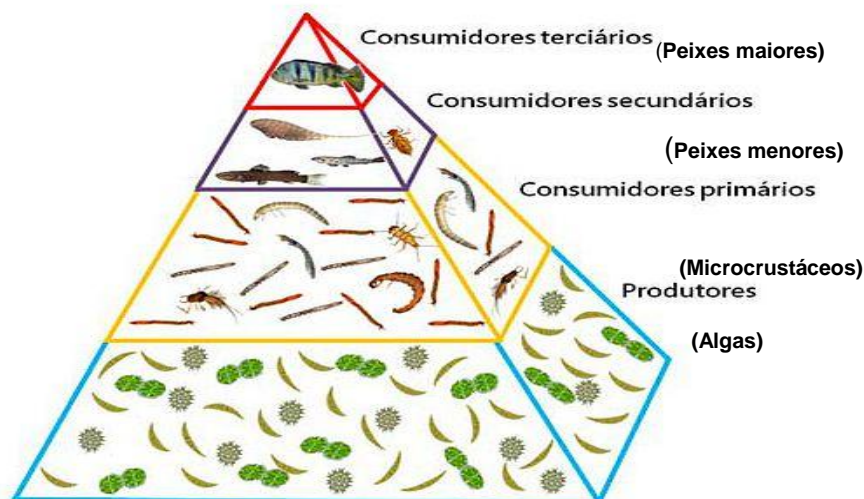
A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, provenientes de diversas fontes de emissão. Dentre

essas substâncias que contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos têm-se os agrotóxicos, efluentes industriais, derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos (compostos orgânicos e inorgânicos, metais tóxicos), lixos domiciliares, entre outros (ARIAS *et al*, 2006).

Importantes características devem ser observadas ao se escolher um bioindicador. Para ser ideal, o mesmo deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa ao contaminante que está exposto. Outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo são a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2004).

Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar (Figura 2) são comumente utilizados por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo (LINS *et al*, 2010).

Figura 2: Cadeia alimentar do ecossistema aquático constituída por representantes de 4 níveis tróficos



Fonte: Adaptado de canto do estudo/biologia

Os peixes são vistos como excelentes indicadores das condições ambientais, uma vez que podem refletir os distúrbios em diversas escalas, devido às suas características de mobilidade, estilo de vida e por sua posição próxima do topo da cadeia alimentar. Além disso, são componentes comum e familiar nos ecossistemas aquáticos (FREITAS, SOUZA, 2009).

Dentre os processos biológicos, como a bioconcentração e biomagnificação, que ocorrem no ambiente aquático, a bioacumulação é um exemplo, onde substâncias dissolvidas e suspensas na água ou contidas no sedimento são absorvidas pelos organismos por difusão de soluções aquosas ou por ingestão. Esse processo ocorre em organismos aquáticos, particularmente o peixe, onde as brânquias e o trato digestivo são potenciais locais de absorção desses elementos (HAYTON, BARRON, 1990; CHAPMAN *et al.*, 1996).

A bioacumulação de metais em peixes pode representar um risco à saúde dos indivíduos que os consomem. De acordo com a literatura, as brânquias, os rins e o fígado são órgãos que apresentam um poder acumulativo maior de metais do que outros tecidos como o muscular (KARADEDE; OYMAK e UNLU, 2004; YILMAZ *et al.*, 2007; DURAL; GOKSU e OZAK, 2007).

Um dos principais motivos pelos quais isto ocorre diz respeito ao fato de que estes órgãos produzem e retêm grandes quantidades de metalotioneínas, que são proteínas que se ligam aos metais e que armazenam estes elementos de forma não tóxica (VIARENGO, 1989; INÁCIO, 2006). As brânquias também possuem elevadas concentrações de metais, e podem ocorrer devido à formação de complexos entre os metais e o muco presente nesta estrutura (YILMAZ *et al.*, 2007).

Os metais absorvidos pelos peixes são distribuídos diferencialmente nos órgãos (por exemplo, fígado, brânquias, músculo e gônadas), provocando deste modo variações de acumulações de metais nesses órgãos (CHI *et al.*, 2007). A análise de peixes ocorre devido às suas diferentes funções na bioacumulação de metais e sua importância na dieta humana (AL-YOUSUF *et al.*, 2000; HENRY *et al.*, 2004; AGUSA *et al.*, 2005; PLOETZ ET AL., 2007; YILMAZ *et al.*, 2010). O músculo é a principal parte comestível do peixe tornando-se uma ferramenta para a avaliação da saúde associada à poluição por metais (REINFELDER *et al.*, 1998; KANEKO E RALSTON, 2007; YI *et al.*, 2011).

3.3 PEIXE *Mugil cephalus*

Os peixes da espécie *Mugil cephalus* (Tainha) (Figura 3) podem ser encontrados em toda a região litorânea do Brasil. Possuem comprimento e peso médios de 50 cm e 5–6 kg respectivamente. Vivem em profundidade de 0–20 m, próximos a costões rochosos, em praias de areia e manguezais, e penetra frequentemente em estuários

e rios onde se alimentam, sobretudo no fundo, a base de algas, detritos orgânicos e pequenos organismos que habitam no lodo. Os meses de inverno são os melhores para encontrá-los, pois é quando procuram os estuários em grandes cardumes para se reproduzir (PESCANDO CON, 2010 e CEBULA, L, 2010).

Figura 3: Peixe da espécie *Mugil cephalus*



Fonte: Autor

3.4 ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS

A ingestão de alimentos é uma das principais fontes de exposição humana a metais traço (BRAGA *et al.*, 2005; IKEM e EGIEBOR, 2005). Desta forma, é imprescindível adotar medidas para garantir que alimentos de qualidade cheguem à população, sendo fundamental intensificar a fiscalização e o controle de qualidade.

Há elementos essenciais para funções fisiológicas adequadas e disponíveis através da ingestão dietética como o cobre, cobalto, ferro, zinco, sódio, cálcio, potássio, magnésio, manganês, selênio e cromo. A cadeia alimentar é a principal fonte de exposição a diferentes elementos. Deficiências de minerais em seres humanos são difundidos no mundo e podem prejudicar no desenvolvimento infantil, gravidez e saúde dos idosos (GRANTHAM-MCGREGOR E ANI, 2001, BLACK, 2003).

Apesar de essenciais para os organismos vivos, muitos elementos químicos, podem vir a ser tóxicos, caso a ingestão exceda os níveis considerados seguros (VIRGA *et al.*, 2007).

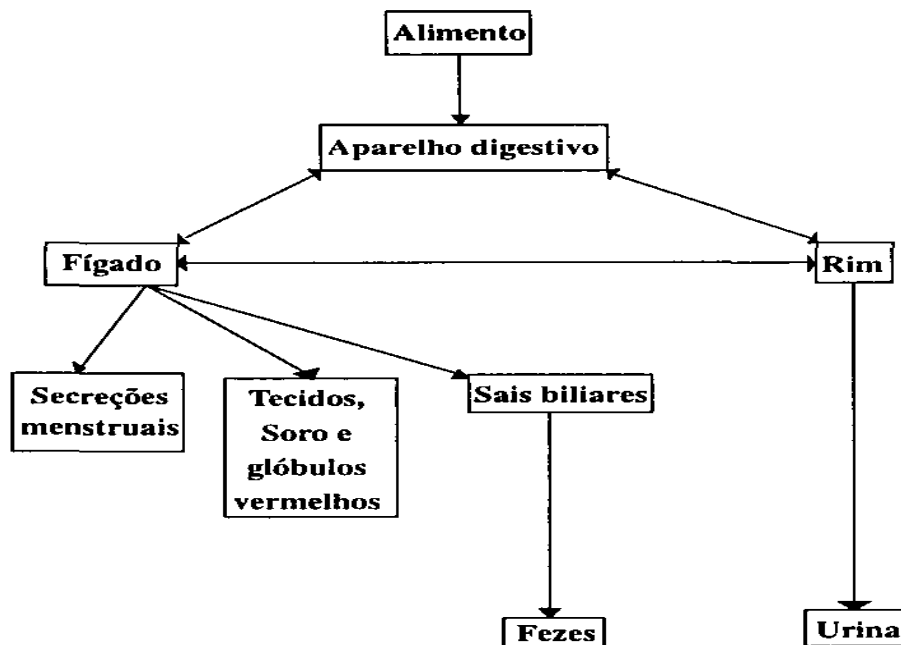
3.4.1 Cobre (Cu)

O cobre é um elemento essencial para todos os organismos vivos conhecidos. O termo cobre não se refere apenas ao metal de cobre, mas também aos compostos de cobre que podem estar no meio ambiente (ATSDR, 2004).

O elemento químico cobre é um dos principais metais de transição presentes no corpo humano. O metal é encontrado em carnes, frutos do mar, vegetais, cereais e nozes (SARGENTELLI, V., MAURO, A. E., MASSABNI, A. C., 1996).

O cobre contido nos alimentos é absorvido (apenas o necessário) através das paredes do estômago e do intestino, do indivíduo, e o excesso excretado através da urina e das fezes nas formas de Cu^{2+} livre e sulfetos, respectivamente. Na mulher a excreção ocorre também através do fluxo menstrual na forma de cátions livres. O cobre assimilado é, então, distribuído para os tecidos, soro, glóbulos vermelhos e fígado (SARGENTELLI, V., MAURO, A. E., MASSABNI, A. C., 1996). A Figura 4 mostra um esquema simplificado da circulação geral do metal cobre no corpo.

Figura 4: Esquema simplificado da circulação geral do cobre no corpo humano.



Fonte: SARGENTELLI, V., MAURO, A. E., MASSABNI, A. C., 1996

O elemento químico cobre é necessário para o funcionamento normal de mais de 30 enzimas. (ATSDR, 2004). O excesso desse mineral pode causar efeitos nocivos ao

organismo, como intoxicação hepática e formação de complexos insolúveis junto a outros minerais, resultando na não absorção. A deficiência de cobre pode causar anemia, má formação óssea, queda no apetite e retardo no crescimento (NRC, 1993).

3.4.2 Ferro (Fe)

O elemento químico ferro é um mineral essencial para o desenvolvimento motor e cognitivo. Caracteriza-se por ser um metal de transição e a extensão de sua utilização biológica está na capacidade de existir em diferentes estados de oxidação, formar muitos complexos, além de agir como um centro catalítico para diversas funções metabólicas. Está presente na hemoglobina sendo um mineral de fundamental importância para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, essenciais à respiração celular aeróbica (CARVALHO, M. C. de, BARACAT, E. C. E., SGARBIERI, V. C, 2006).

A deficiência de ferro pode existir com ou sem anemia, sendo definida como uma condição em que não há estoques de ferro mobilizáveis e em que se observam sinais de um fornecimento comprometido de ferro aos tecidos (GENEVA, SWITZERLAND, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). A deficiência de ferro e a anemia também reduzem a capacidade de aprendizagem e estão associadas a maiores taxas de morbidade (CDC, 2010).

3.4.3 Zinco (Zn)

O elemento químico zinco é um dos mais comuns na crosta terrestre. O zinco é um elemento essencial para o corpo humano em pequenas quantidades. A ingestão diária média de zinco através da dieta no Brasil varia de 5,2 a 16,2 miligramas (ATSDR, 2005).

O zinco desempenha um papel catalítico ou estrutural em muitas enzimas e proteínas contribuindo conseqüentemente para uma variedade de processos biológicos fundamentais (XIAO, G., ZHOU, B., 2016). Está presente em um grande número de proteínas, e também age como um componente oxidante do sistema fisiológico de defesa (SCHERZ e KIRCHHOFF, 2006). A absorção inadequada, as perdas e a deficiência de zinco em seres humanos provocam distúrbios, tais como

diarreia, distúrbios cerebrais, retardo do crescimento, declínio imunológico e lesões de defesa, dos olhos e da pele, má cicatrização de feridas e outras doenças de pele (ROTH e KIRCHGAESSNER, 1991). Além disso, o acúmulo de zinco no organismo pode vir a acarretar em doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), doença Huntington (HD) dentre outras (PERERA, W. S., HOOPER, N. M., 2001 e SVELIEFF, M. G., LEE, S., LIU, Y., LIM, M. H., 2013).

3.4.4 Enxofre (S)

O elemento químico enxofre é um sólido amarelo pálido, inodoro, sem sabor, insolúvel em água, quebradiço e mal condutor de eletricidade (PEIXOTO, E. M. A., 2002). O enxofre é empregado nos processos industriais como, por exemplo, na produção de ácido sulfúrico para baterias, fabricação de pólvora e vulcanização da borracha. Este elemento ainda é usado como fungicida e na manufatura de fosfatos fertilizantes. O enxofre participa da constituição terrestre, sendo o 16º elemento em ordem de abundância, constituindo 0,034% em peso da crosta. Os componentes em que o enxofre é encontrado em grandes quantidades são os sulfetos (galena) e os sulfatos (gesso) (VALADARES, M. de C., OLIVEIRA, D. F. L., SOUSA, P. S., SALES, J. M., 2013).

O enxofre é um elemento químico essencial para todos os organismos vivos, uma vez que, favorece o funcionamento do corpo, pois regula a glicose, auxilia no transporte de minerais, potencializa a ação das vitaminas, entre outros. Sua falta no organismo pode ocasionar problemas como depressão, mau cheiro na saliva, perda da viscosidade da pele, e outros problemas relacionados com os ossos, cabelo e unhas (TODA MATÉRIA, 2017).

3.5 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra é uma das etapas mais importantes de toda sequência analítica. Assim, tal procedimento deve ser criteriosamente observado a fim de garantir a qualidade dos resultados, uma vez que, depende da natureza da amostra, do elemento a ser determinado e a sua concentração, do método de análise, e da precisão e exatidão (BARNES, R. M., JÚNIOR, D. S., KRUG, F. J., 2014).

Diante da evolução das técnicas analíticas novos instrumentos vêm sendo desenvolvidos, no entanto, é necessário que haja tratamento adequado das amostras, convertendo-as de sua forma sólida para solução ocorrendo assim solubilização dos analitos de interesse e destruição da matriz orgânica. (BARNES, R. M., JÚNIOR, D. S., KRUG, F. J., 2014 e SANTOS, W. P. C. dos., 2010).

3.5.1 Decomposição da matéria orgânica

A decomposição da matéria orgânica pode ser via seca (calcinação ou incineração) ou via úmida (digestão). A decomposição por via seca requer temperaturas elevadas e por via úmida requer o uso de ácidos concentrados ou diluídos e cuidadoso monitoramento da digestão por períodos variados (NARDI, E. P.; EVANGELISTA, F. S.; TORMEN, L.; SAINT´PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; SOUZA, S. S.; BARBOSA JÚNIOR, F., 2009).

A decomposição por via seca é um dos procedimentos mais simples de todos os tipos de decomposição. O aquecimento da amostra ocorre em um forno tipo mufla na presença de ar a 400-800°C causando a destruição da matéria orgânica. O resíduo da decomposição é dissolvido em ácido e transferido para um frasco volumétrico. Esse procedimento possibilita trabalhar com uma elevada massa de amostra, para posteriormente ser dissolvida em pequeno volume de ácido antes da determinação, o que possibilita a determinação de elementos presentes em baixas concentrações (KRUG, F. J., NÓBREGA, J. A., NOGUEIRA, A. R. A., OLIVEIRA, P. V., 2001). Devido às perdas por volatilização, a redução a cinzas é aplicável principalmente a analitos metálicos, pois a maioria dos não metais são oxidados a espécies voláteis. Há possibilidade de perda de material por projeção, no caso da escolha errada da programação da temperatura e por diferença de pressão ambiente/forno aquecido. Os elementos que são mais propensos a perdas por volatilização são F, Cl, Br, I, S, Se, P, Sb, Ge, Tl, e Hg (BARNES, R. M., JÚNIOR, D. S., KRUG, F. J., 2014).

A decomposição por via úmida é de extrema importância para a determinação de elementos em baixas concentrações. Esse preparo pode ser realizado em sistemas fechados (forno de micro-ondas, bombas de digestão) e/ou em sistemas abertos (placa de aquecimento, bloco digestor) por um ácido ou pelas misturas de ácidos. Em comparação com a calcinação, a decomposição via úmida apresenta como

principal vantagem as baixas temperaturas de reação, o que reduz o risco de perdas por volatilização (BARNES, R. M., JÚNIOR, D. S., KRUG, F. J., 2014).

3.5.2 Decomposição por via úmida utilizando bloco digestor com “dedo frio”

A decomposição das amostras com alto teor de compostos orgânicos, utilizando bloco digestor, possui diferentes parâmetros que podem afetar sua eficiência: volume de ácido, quantidade de amostra utilizada, tempo e temperatura de decomposição. Esta eficiência na decomposição é um fator para deixar os analitos livres na solução, ou seja, sem interferir ou perder analito e reagente por volatilização (DE OLIVEIRA, R. M., ANTUNES, A. C. N, VIEIRA, M. A., MEDINA, A. L., RIBEIRO, A. S., 2016).

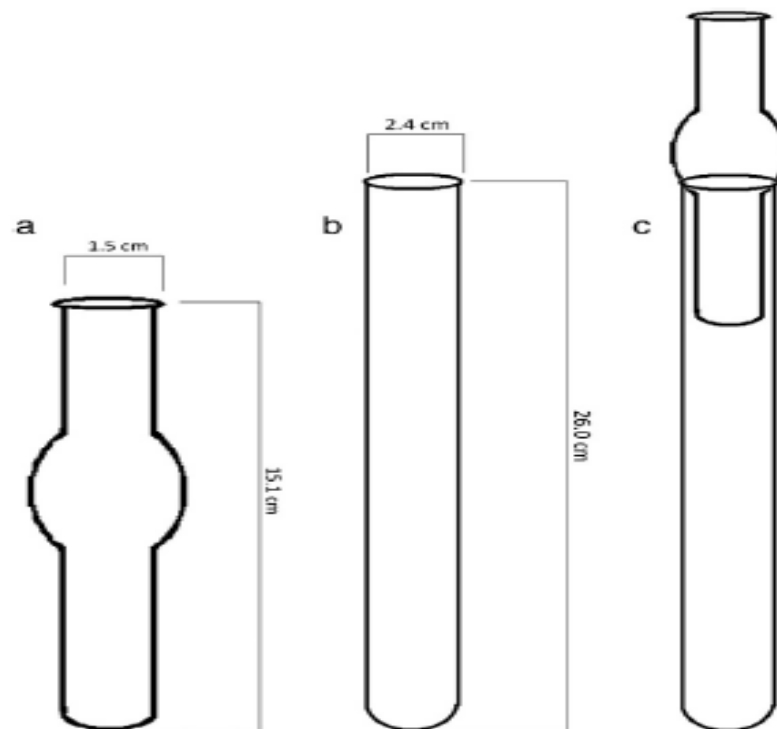
A técnica de preparo da amostra envolvendo sistema de dedo frio permite procedimentos de digestão de amostras para diversos elementos. A perda por volatilização é evitada devido à condensação da espécie volátil, sob o sistema de refluxo formado pelo dedo frio. Esta técnica combina as vantagens da técnica de aspersão, que são: massas de amostras e volumes de reagentes não são parâmetros críticos para as experiências, o risco de explosão é mínimo, e aplicação de mineralização de vários tipos de amostras, incluindo matrizes orgânicas e inorgânicas (FERREIRA, S. L. C., SILVA, L. O. B., SANTANA, F. A., JUNIOR, M. M. S., MATOS, G. D., DOS SANTOS, W. N. L., 2013).

A utilização de sistemas de refluxo no preparo das amostras vem se apresentando como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de digestão ácida (PINHEIRO, A. C. de A., LISBOA, M. T., RIBEIRO, A. S., NUNES, A. M., YAMASAKI, A, 2014).

Os ácidos condensados dentro do tubo de digestão evita a necessidade de reposição destes reagentes durante o processo de digestão das amostras, o que normalmente é necessário quando sistemas de digestão abertos são utilizados. Diante disso, menores quantidades de reagentes são consumidos e o risco de contaminação por estes pode ser consideravelmente diminuído, o que justifica o uso destes sistemas de refluxo em procedimentos de preparo das amostras para determinação de elementos como Cu, Fe, Mn, Zn, dentre outros (PINHEIRO, A. C. de A., LISBOA, M. T., RIBEIRO, A. S., NUNES, A. M., YAMASAKI, A, 2014).

O “dedo frio” é um tubo de vidro em forma de dedo (Figura 5) que é colocado sobre o tubo digestor durante o procedimento de digestão ácida com aquecimento. No tubo do dedo frio é colocada água fria para resfriar a parte superior do tubo digestor, provocando assim o refluxo e condensação de espécies voláteis evitando a perda por volatilização (FERREIRA, S.L.C., *et al.*, 2013).

Figura 5: Diagrama esquemático do sistema de digestão. a) dedo frio, b) tubo de digestão, c) dedo frio acoplado ao tubo de digestão



Fonte: FERREIRA, S.L.C., *et al.*, 2013

3.5.3 Ácidos diluídos

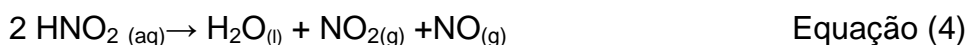
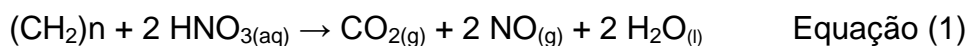
O uso de ácidos concentrados é bastante comum para decomposição por via úmida. No entanto, de acordo aos princípios modernos da química verde, o desenvolvimento de métodos alternativos com utilização de condições mais brandas, e menores quantidades de reagentes, vêm sendo amplamente avaliados sem diminuir a eficiência da decomposição (SOUZA, 2013).

A utilização de ácido diluído no processo de digestão de amostras torna-se atrativo devido à possibilidade de se diminuir a quantidade de reagentes adicionados

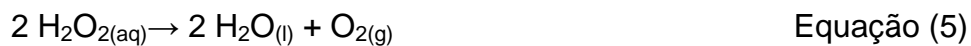
durante a reação, segurança do analista, minimização da quantidade de resíduos gerados, redução nos custos e a diminuição dos valores do branco, resultando em menores limites de quantificação. Além disso, ao se utilizar métodos que empregam sistemas de nebulização para introdução dos digeridos é essencial que a solução esteja com menor acidez prevenindo assim a ocorrência de danos aos equipamentos (CASTRO, J. T., SANTOS, E. C., SANTOS, W. P. C., COSTA, L. M., KORNE, M., NOBREGA, J. A., KORN, M. G. A., 2009).

O ácido mais indicado e utilizado na decomposição de amostras orgânicas é o ácido nítrico (HNO_3), devido sua simples manipulação, facilidade de purificação e capacidade oxidativa (NOGUEIRA, A. R. de A., MORAES, D. P. de, FLORES, E. M. M., KRUG, F. J., KNAPP, G., NOBREGA, J. de A., BARIN, J. S., MESKO, M. F., 2008). Além do ácido nítrico, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é normalmente utilizado como agente oxidante auxiliar durante a decomposição (KINGSTON e HASWALL, 1997).

Com o aumento de pressão dentro do frasco ou tubo de reação há promoção da elevação do ponto de ebulição da mistura de decomposição ácida e a elevação do seu potencial oxidante. Durante a oxidação dos compostos orgânicos da amostra pela ação do HNO_3 ocorre a formação de $\text{NO}_{(g)}$, que por sua vez é removido do meio reacional aquecido e reage com o O_2 presente na fase gasosa do frasco de reação. Em seguida, o NO_2 é gerado e ao reagir com a água, gerando HNO_3 e HNO_2 . Desse modo o HNO_2 decompõe-se em NO_2 e NO dando sequência ao ciclo até que não haja a presença de O_2 na fase gasosa do sistema (NOGUEIRA, A. R. de A., MORAES, D. P. de, FLORES, E. M. M., KRUG, F. J., KNAPP, G., NOBREGA, J. de A., BARIN, J. S., MESKO, M. F., 2008). Os processos químicos descritos são representados pelas equações de 1 - 4:



De acordo com as equações 1 a 4 pode-se observar a regeneração do ácido nítrico no sistema diante da oxidação das espécies nitrogenadas formadas durante a decomposição da matéria orgânica pela ação do O₂. Dessa forma, com o aumento da concentração do oxigênio na fase gasosa ocorre contribuição para a reação de regeneração. Diante disso, o peróxido de hidrogênio pode ser amplamente utilizado em processos de digestão associado com o ácido nítrico, para auxiliar na oxidação da matéria orgânica, pois em sua decomposição catalítica tem-se como produtos a H₂O_(l) e o O_{2(g)}, ou seja, age também como uma fonte alternativa de oxigênio, como pode ser observado na equação 5 (BIZZI, C. A. *et al.*, 2014 e BIZZI, C. A. *et al.*, 2010).



3.6 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

O planejamento de misturas vem sendo usado em diversas áreas da ciência e da indústria, especialmente na química, e tem sido eficiente na obtenção de modelos para uma estimativa e otimização de diferentes parâmetros (GIESE *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011).

O planejamento de mistura é particularmente usado quando o pesquisador tem que lidar com proporções às quais podem ser restritas a certos limites nas possíveis combinações dos fatores (ARAÚJO, P. W.; BRERETON, R. G., 1996). Nos experimentos envolvendo mistura, a soma das proporções dos componentes é sempre igual a 1, como pode ser observado na equação 6, onde q é o número de componentes da mistura e x_i são os componentes. Ao se modificar a formulação no sentido de alterar as propriedades de uma determinada mistura em estudo, as novas proporções devem continuar obedecendo a essa restrição (VIEIRA, A. F. de C., BELLO, L. H. A. D., 2006).

$$\sum_{i=1}^q X_i = X_1 + X_2 + \dots + X_q = 1 \quad \text{Equação (6)}$$

As misturas são ditas como sistemas cujas propriedades dependem das proporções relativas dos seus componentes e não de suas concentrações. Não há restrições

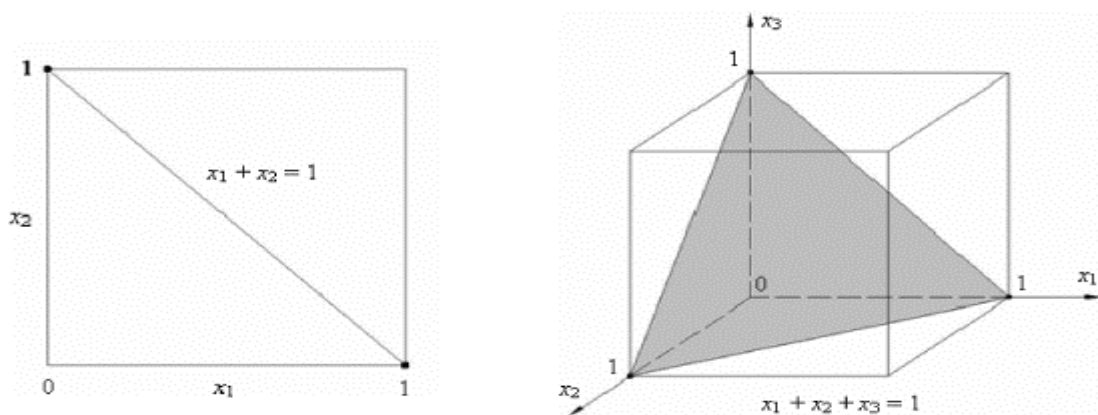
quanto ao estado físico, de modo que os componentes podem ser sólidos, líquidos ou gasosos, desde que as propriedades do sistema químico sejam definidas pela sua proporção na mistura. Diante disso, a quantidade de cada componente do sistema deve ser tratada como uma variável (variável de mistura), que não é independente das demais, pois o somatório das proporções de seus componentes deve ser a unidade (COSCIONE, A., ANDRADE, J. C. de, MAY, G. M., 2005).

Diante da imposição de restrições às proporções dos componentes de uma mistura a escolha de pontos experimentais de forma manual torna a sua realização demorada e suscetível a erros, devido à grande quantidade de restrições, considerações e cálculos envolvidos. Devido a estas dificuldades se justifica a utilização de algoritmos para localização e escolha de pontos experimentais (SPANEMBERG, F. E. M., 2010).

O modelamento das propriedades físicas e químicas dos sistemas de misturas só pode ser feito de maneira multivariada, pois a restrição experimental imposta pela equação 6 torna necessário adaptar os métodos do planejamento fatorial e da análise de superfícies de resposta aos problemas específicos destes sistemas (BARROS NETO, B. ; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E., 2002 e EIRAS, S. P.; CUELBAS, J. C.; DE ANDRADE, J. C, 1994) .

As restrições podem ocorrer para casos de dois ou três componentes, uma vez que mistura de dois componentes é representada por um segmento de reta e para o caso de três componentes é representada por um triângulo, como segue na Figura 6 abaixo.

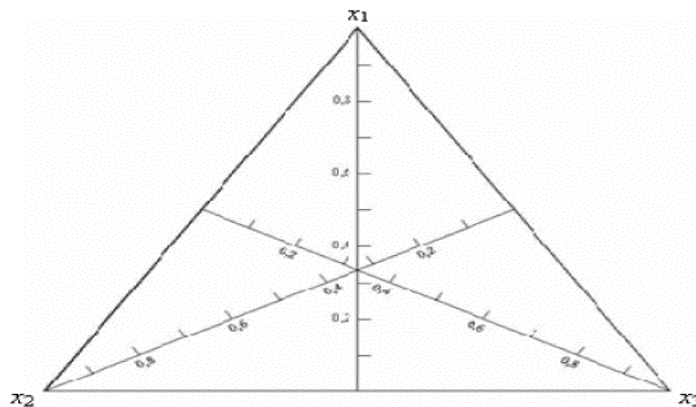
Figura 6: Espaço fatorial restrito para misturas com 2 e 3 componentes



Fonte: VIEIRA, A. F. de C., BELLO, L. H. A. D., 2006

Identificados os vértices, são planejados os pontos experimentais, muitos dos quais consistem dos próprios vértices ou de pontos centrais de lados ou faces. Há uma variedade de estratégias para a construção destes tipos de planejamento, dentre as quais uma estratégia muito utilizada é selecionar os pontos experimentais usando critérios ótimos de planejamento (CORNELL, 1990). A Figura 7 representa o caso de experimentos com misturas de três componentes ($n=3$), o qual a região experimental restrita pode ser representada com a utilização de um sistema de coordenadas simplex.

Figura 7: Sistema de coordenadas simplex



Fonte: VIEIRA, A. F. de C., BELLO, L. H. A. D., 2006

Cada lado do triângulo corresponde a uma mistura binária e os vértices dos triângulos correspondem às formulações de componentes puros. No interior do triângulo, estão situadas as possíveis misturas ternárias. Neste caso, são necessárias apenas duas dimensões para representar graficamente o experimento. Como cada componente é representado por um vértice, uma figura geométrica com três vértices e duas dimensões, ou seja, um triângulo equilátero representa o espaço fatorial restrito de uma mistura ternária (VIEIRA, A. F. de C., BELLO, L. H. A. D., 2006).

Os modelos mais simples possíveis utilizados para o modelamento de misturas, são descritos pelos modelos linear (Equação 7), quadrático (Equação 8) e cúbico especial (Equação 9).

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_0 X_0 = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i \quad \text{Equação (7)}$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_{iq} X_i + \sum_{i>j} \sum_{i,j}^q \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação (8)}$$

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_{iq} X_i + \sum_{i>j} \sum_{i,j}^q \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i<j<k} \sum_{i,j,k}^q \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad \text{Equação (9)}$$

Nas equações representadas acima b_i , b_{ij} e b_{ijk} são os coeficientes de interação de primeira, segunda e terceira ordens calculados para os fatores x_i , x_j e x_k estudados, i indica o número do componente em questão ($i = 1, 2, 3, \dots$) e y é a resposta experimental (COSCIONE, A., ANDRADE, J. C. de, MAY, G. M., 2005).

3.7 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO - ICP OES

Uma das mais antigas ferramentas usadas para análise espectrométrica são as técnicas analíticas baseadas na emissão de energia radiante por átomo. Entre as técnicas espectrométricas disponíveis, o método de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado vem se destacando devido a sua versatilidade e capacidade de detecção (NOVAES, C. G., *et al.*, 2016).

A espectrometria de emissão atômica é fundamentada na emissão espontânea de fótons de átomos e íons que foram excitados em uma descarga de radio frequência. A ionização dos elementos a serem analisados é feita pelo plasma indutivo de argônio (HOU, X., JONES, B. T., 2000). O plasma é uma mistura gasosa condutiva, com temperatura variando entre 7000 K e 10000 K, contendo uma concentração significativa de cátions e elétrons, produzido à partir de uma descarga elétrica em uma corrente de gás inerte e afetado por campo magnético, promovendo a excitação da maioria dos elementos químicos existentes, possibilitando a quantificação de uma ampla faixa de analitos (SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAM, T. A., 1998).

A introdução das amostras em uma fonte de plasma pode ser feita na forma de gás, vapor, aerossol de gotículas finas e partículas sólidas. As amostras na forma de solução facilitam o processo de homogeneização e aplicação de procedimentos de quantificação com soluções padrão, método da adição de analito e diluição isotópica (HOU, X., JONES, B. T., 2000; SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAM, T. A., 1998).

A amostra no equipamento é convertida em um aerossol que é direcionado para o plasma, o qual é convertido em átomos ou íons. Ao retornarem ao estado fundamental, estas espécies emitem fótons, que são característicos da cada espécie química, bem como a quantidade de fótons é proporcional a concentração do analito. Uma lente ou espelho côncavo, coleta uma porção destes fótons. Estes fótons são convertidos em sinais elétricos por um fotodetector, e em um computador o sinal é amplificado e processado (HOU, X., JONES, B. T., 2000; SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAM, T. A., 1998).

Entre todas as técnicas analíticas de espectrometria atômica, comumente utilizadas, o ICP OES é provavelmente o que menos possui interferências. O plasma de argônio é inerte quando comparado com a reatividade química de uma chama (HOU, X., JONES, B. T., 2000).

3.7.1 Vantagens e desvantagens

As vantagens e méritos da técnica ICP OES incluem a quantidade de elementos que podem ser determinados em níveis de concentração abaixo de 1 mg.L^{-1} , seletividade, reprodutibilidade, estabilidade a longo prazo, precisão e exatidão (HOU, X., JONES, B. T., 2000). Devido as altas temperaturas alcançadas no plasma, esta técnica permite a análise de uma grande faixa de elementos que possuem alta energia de dissociação, além de possibilitar a detecção de elementos majoritários, minoritários e traços (HARRIS, D. C., 2011)

O ICP OES apresenta também como vantagens a grande faixa linear de trabalho e baixa vulnerabilidade de interferências, tornando-se uma técnica muito utilizada em aplicações ambientais, conferindo ainda com a facilidade no processo de calibração do equipamento (HOU, X., JONES, B. T., 2000)

A interferência espectral é a mais comum no ICP OES. Esse tipo de interferência surge devido à natureza multielementar da técnica, sendo causada pela sobreposição do sinal do analito por sinais de outros compostos da amostra. Geralmente esses espectros atômicos e de íons podem ser afetados por amostras muito concentradas ou complexas. Nestes casos, técnicas de correção de fundo são empregadas ou um comprimento de onda analítico diferente para o (s) elemento (s) de interesse (GINÉ, M. F., 1998).

Para evitar a interferência de matriz na análise podem ser utilizadas técnicas para a redução de efeitos como a utilização de supressores de ionização para a determinação de elementos muito ionizáveis, como por exemplo, o potássio e também pode ser utilizado o método de adição-padrão (HARRIS, D. C., 2011).

Outro tipo de interferência que pode ocorrer nesta técnica é a interferência química, a qual consiste no efeito de elementos facilmente ionizáveis, como por exemplo, os metais alcalinos. A alta concentração destes elementos pode suprimir ou amplificar o sinal de emissão, dependendo das espécies a serem analisadas (HOU, X., JONES, B. T., 2000).

A Tabela 1 descreve as vantagens e desvantagens da técnica ICP OES.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens da técnica ICP OES

Vantagens	Desvantagens
Análise multielementar	Interferências espectrais
Baixos limites de detecção	Efeitos de espécies na matriz
Baixa interferência de matriz	Efeitos do solvente na matriz
Grande faixa linear	Dificuldade de analisar sólidos não dissolvidos
Alta precisão	Interferência na introdução da amostra
Aplicável para amostras gasosas e em solução	Limite de detecção pode ser muito alto para determinadas aplicações

Fonte: OLESIK, 1991

3.8 REDE NEURAL ARTIFICIAL

As redes neurais artificiais são inspiradas em modelos biológicos, diante disso, algumas características importantes como o reconhecimento de padrões, processamento distribuído e paralelo (PDP) e tolerância a falhas, podem ser encontradas tanto nas redes biológicas como nas redes artificiais (SCHÜLER, J.P.S, 2003).

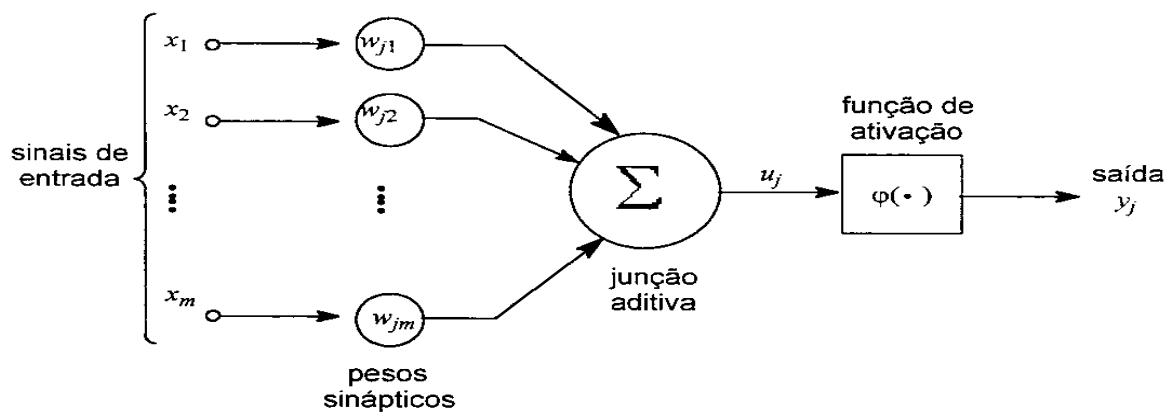
Uma rede neural é considerada uma máquina que é projetada para modelar a maneira como o cérebro realiza uma tarefa particular ou função de interesse. A rede, por sua vez, é simulada por uma programação em um computador. Para alcançarem bom desempenho, as redes neurais empregam uma interligação maciça de células computacionais simples denominadas “neurônios” ou “unidades de processamento”. As redes neurais artificiais são algoritmos que podem ser programados em diversas linguagens. Trata-se de um modelo matemático com diversos parâmetros ajustáveis,

os quais são modificados de acordo com um conjunto de dados que contém informações sobre o comportamento que esta rede deve apresentar (FAUSETT, 1994).

Um neurônio possui um grande número de dendritos/sinapses, portanto, muitos sinais podem ser recebidos por um neurônio simultaneamente. Os sinais individuais são rotulados x_i ($i = 1 \dots m$) e as correspondentes forças sinápticas (pesos), w_{ji} ($j = 1 \dots n$).

A Figura 8 representa o modelo de um neurônio artificial, que forma a base para o projeto de redes neurais.

Figura 8: Modelo não linear de um neurônio



Fonte: HAYKIN, S., 2001

Os sinais de entrada são caracterizados por pesos sinápticos, que são responsáveis pela memorização do padrão, pois são ajustados durante o processo de aprendizado que captura as informações. Pesos e conexões positivos (possuem um valor numérico positivo) são excitatórios e aqueles que são negativos são inibitórios (SCHÜLER, J.P.S, 2003).

A função de ativação restringe a amplitude da saída de um neurônio, ou seja, limita o intervalo permissível de amplitude do sinal de saída a um valor finito (HAYKIN, S., 2001).

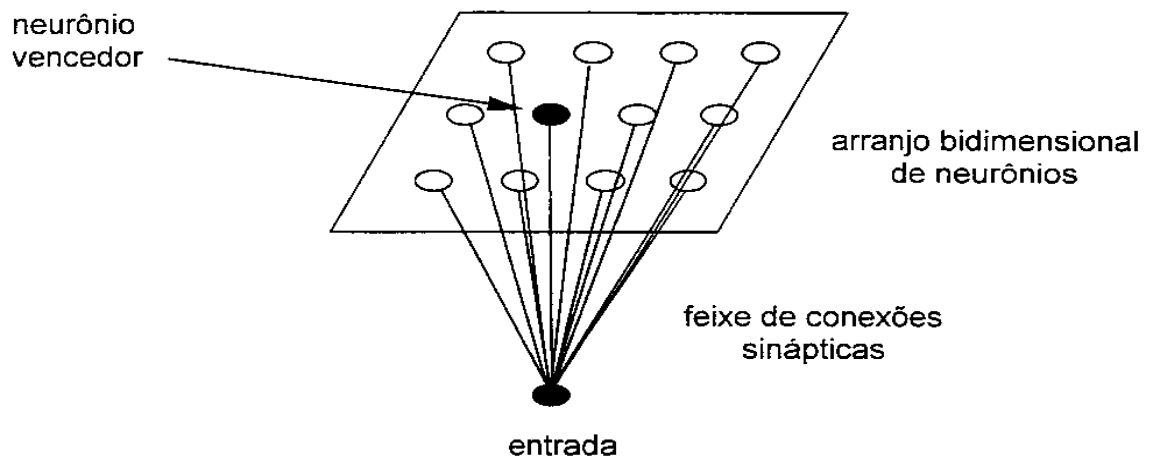
A escolha de um determinado algoritmo de aprendizagem está relacionada com a tarefa que a rede deverá realizar. Os modelos de redes neurais mais conhecidos são: Rede Neural de McCulloch-Pitts, Perceptron de Múltiplas Camadas, Rede de Hopfield, ART (Adaptative Resonance Theory) de Grossberg, CNM (Combinatorial

Neural Model), RBF (Radial Basis Function) e SOM (Self-Organizing Map) de Kohonen.

3.8.1 Rede de Kohonen

As redes de Kohonen são grades neurais baseadas na aprendizagem competitiva, que consiste na competição de neurônios de saída da grade para serem ativados ou disparados, resultando que apenas um neurônio de saída está ligado em um instante de tempo. O modelo de Kohonen (Figura 9) baseia-se também em uma camada única de neurônios dispostos em arranjo monodimensional ou em um plano bidimensional, tendo assim uma topologia bem definida (cada neurônio tem um número definido de neurônios como primeira vizinhança mais próxima, segunda vizinhança mais próxima etc.) (BALBINOT, L. 2003).

Figura 9: Modelo de Kohonen de um mapa auto-organizável



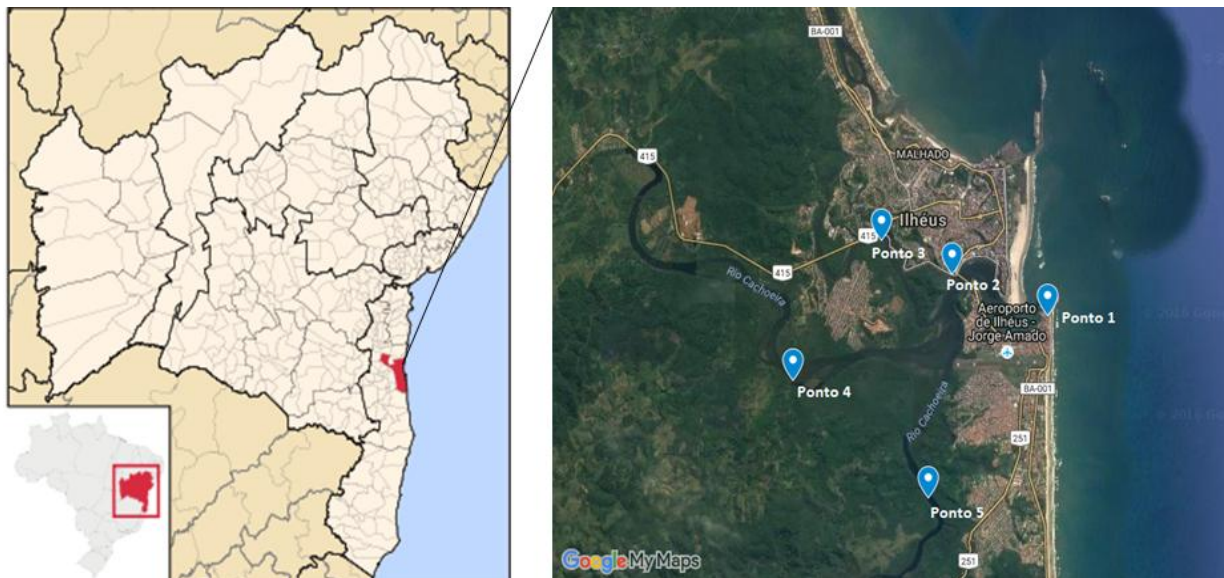
Fonte: BALBINOT, L., 2003

4. METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Na Figura 10, estão representados os pontos que foram selecionados previamente como pontos de coletas, ou seja, áreas dentro da Baía do Pontal, as quais foram consideradas com dificuldades de acesso, existência dos peixes no local e proximidades a áreas com atividades antropogênicas tais como: centros urbanos, esgotos domésticos, dentre outros. A Tabela 2 descreve a localização dos pontos selecionados para as coletas.

Figura 10: Pontos de coleta na Baía do Pontal, Ilhéus-BA



Fonte: Google maps

Tabela 2: Pontos de coleta na região da Baía do Pontal

Pontos	Região	Coordenadas	
		Latitude	Longitude
1	Praia do Pontal	14°48'28.52"S	39° 1'24.49"O
2	Baía do pontal	14°48'7.01"S	39° 2'23.90"O
3	Rio Itacanoeira (Fundão)	14°47'57.12"S	39° 3'7.42"O
4	Rio Cachoeira	14°49'11.91"S	39° 3'53.02"O
5	Rio Santana	14°49'40.80"S	39° 2'57.42"O

4.2 AMOSTRAS

As amostras investigadas, peixes da espécie *Mugil cephalus*, conhecido popularmente como Tainha, foram coletadas nos meses de fevereiro e agosto de 2016 e fevereiro de 2017 com auxílio de um pescador da Baía do Pontal, não levando em consideração o comprimento, o peso, a idade e o estágio de maturação. Este período de coleta foi necessário, pois houve a necessidade de que o procedimento fosse realizado em períodos com características climáticas diferentes como, índice pluviométrico e temperatura.

As amostras foram preparadas de forma cuidadosa. Os peixes foram coletados dos pontos através de tarrafa. As amostras foram identificadas e acondicionadas em sacos plásticos, caixa de isopor com gelo e transportadas até o laboratório. Antes de serem armazenadas sob refrigeração, as amostras foram previamente lavadas com água destilada para remoção de resíduos não desejáveis (areia, algas, etc.), dissecadas com uso de instrumentos cirúrgicos de aço inoxidável, tais como bisturi e tesoura, separando-se uma determinada porção de tecido muscular de cada peixe. Esses procedimentos visam diminuir possíveis contaminações durante todas as etapas de processamento das amostras, desde a amostragem até a análise final.

O músculo dos peixes foram postos em coletores plásticos pequenos e congelados a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Após o congelamento foram liofilizados e triturados em um moinho de bolas, garantindo a homogeneidade das amostras.

4.3 REAGENTES E VIDRARIAS

Todos os reagentes utilizados nesta pesquisa foram de grau analítico. Água ultrapura, com resistividade específica de $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$, de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA) foi utilizada.

Foi utilizado para o preparo de soluções e na etapa de decomposição das amostras o ácido nítrico 65% (v v^{-1}) (Merck, Darmstadt, Germany). Peróxido de hidrogênio 30% (v v^{-1}) (Merck, Darmstadt, Germany) foi usado como fonte de oxigênio.

As soluções de referência utilizadas na curva de calibração do equipamento foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque contendo 1000 mg L^{-1} de Cu, Fe, Zn e S (SpecSol, QuimLab Química e Metrologia, São José dos Campos, Brasil) em meio de ácido nítrico $2,0\text{ mol L}^{-1}$.

A descontaminação de vidrarias, frascos plásticos e materiais em geral, foi realizada em banho ácido contendo HNO_3 10 % ($v v^{-1}$), a partir do ácido nítrico a 65 % (m/m), por no mínimo 24 h. Posteriormente, os materiais foram lavados abundantemente com água deionizada.

4.4 EQUIPAMENTOS

As amostras foram liofilizadas em um liofilizador (Labconco, FreeZone 4,5L) e trituradas em um moinho analítico (KI, Modelo A11 basic), por aproximadamente 30 segundos.

Para pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D) com precisão centésimos de miligramas (0,00001 g).

Para procedimentos de digestão foi utilizado sistema condutivo aberto empregando-se bloco digestor, modelo TE-007MP com controlador de temperatura analógico e capacidade para 40 tubos micro borossilicato com dimensões de 25 x 250 mm.

Sistema de purificação de água utilizado no preparo das soluções (Millipore, Berford, MA, USA com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Capela de fluxo laminar AmazonLab.

Foi empregado o espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) com visão axial, Varian 710-ES, (Varian, Mulgrave, Austrália). O sistema ótico foi calibrado com solução estoque multielementar de padrões rastreados. Os parâmetros instrumentais do ICP OES para determinação de Cu, Fe, Zn e S estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros operacionais e instrumentais utilizados no ICP OES

Parâmetro	Condição
Radiofrequência do gerador (MHz)	40
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400
Câmara de nebulização	Ciclônica (Single Pass)
Nebulizador	OneNeb
Tempo de integração do sinal (s)	5
Vazão do argônio principal (L min ⁻¹)	15
Vazão do argônio auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Pressão de nebulização (kPa)	150
Velocidade da bomba peristáltica (rpm)	15
Detector	CCD
Linhas (nm)	Cu I 327,395
	Fe II 259,940
	Zn II 213,857
	S II 181,972

I - Linha atômica; II - Linha iônica

4.5 OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO DE MISTURA

A otimização do preparo da amostra de músculo de peixe por digestão em bloco digestor com sistema de refluxo foi previamente avaliada através de um planejamento de mistura Simplex centroide com restrição, cujos componentes foram, ácido nítrico (HNO₃), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e água (H₂O). As variáveis mantidas constantes foram: a massa da amostra de 200 mg, a temperatura de 120 °C e o tempo de digestão de 4 h. A mistura foi feita, totalizando um volume de 10,0 mL, para verificar o efeito dos componentes no processo de digestão. O delineamento para três componentes foi composto de 7 ensaios com 3 repetições no ponto central para avaliar o erro experimental. O planejamento foi construído com auxílio do software *Statistica 7.0*, onde foi estabelecido os limites máximos de 4,0, 6,0 e 8,0 (mL) para peróxido de hidrogênio, ácido nítrico e água, respectivamente. Os limites mínimos de volume do peróxido de hidrogênio, ácido nítrico, e água foram 0,0, 2,0 e 4,0 (mL), respectivamente. As respostas avaliadas foram os sinais de intensidade para os elementos Cu, Fe, Zn e S. As proporções e os valores codificados dos componentes foram distribuídos de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Matriz experimental do planejamento de mistura para otimização da mistura digestora

Ensaio	Volume (mL)		
	HNO ₃	H ₂ O ₂	H ₂ O
1	2,0 (0)	0,0 (0)	8,0 (1)
2	6,0 (1)	0,0 (0)	4,0 (0)
3	2,0 (0)	4,0 (1)	4,0 (0)
4	4,0 (1/2)	0,0 (0)	6,0 (1/2)
5	2,0 (0)	2,0 (1/2)	6,0 (1/2)
6	4,0 (1/2)	2,0 (1/2)	4,0 (0)
7 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)
8 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)
9 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)

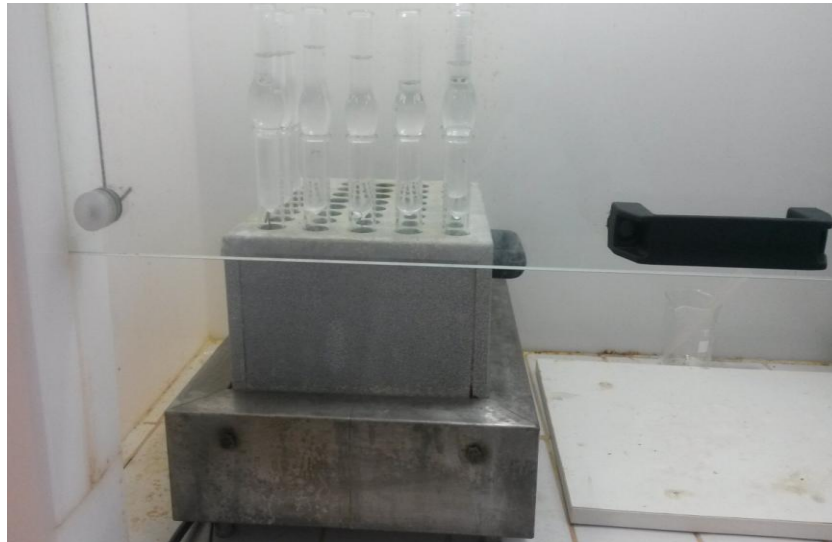
A acidez final dos digeridos foi determinada por titulação com NaOH 0,2000 mol L⁻¹ padronizado e usando-se fenolftaleína como indicador ácido-base.

O planejamento de mistura teve como objetivo determinar a composição ótima da mistura a ser empregada na digestão. A ANOVA foi empregada para o modelo quadrático observando-se os resultados experimentais.

4.6 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

A amostra foi digerida usando bloco digestor (Figura 11). Cerca de 200 mg da amostra do músculo de peixe foi transferida para tubos digestores de vidro, seguido da adição de 3,6 mL de HNO₃ P.A e 6,0 mL de água ultrapura, uma vez que estas condições foram obtidas através da otimização realizada. O dedo frio contendo água em temperatura ambiente foi colocado sobre o tubo contendo a mistura reacional. Os tubos foram aquecidos até a temperatura de 60 °C em um período de 30 min. Em seguida, a temperatura foi aumentada até o ponto de ebulição do HNO₃ (120 °C) por 3 h. Foi adicionado 0,2 mL de H₂O₂. Após 30 min da digestão com o peróxido de hidrogênio, foram adicionados mais 0,2 mL, totalizando 0,4 mL de peróxido de hidrogênio. O tempo total de decomposição da amostra foi equivalente a 4 h e 30 min. As soluções finais foram transferidas para tubos falcon de 50,0 mL e os volumes completados com água ultrapura até 25,0 mL.

Figura 11: Bloco digestor com tubos de digestão e dedo frio



Fonte: Autor

4.7 ESTRATÉGIAS DE VALIDAÇÃO

Após otimização do método, foi realizado procedimento para validá-lo. O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação (SENA, 2000).

A avaliação da exatidão do método proposto foi empregada através do material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) obtido do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Foram utilizados como parâmetros de desempenho os limites de detecção (menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas) e de quantificação (menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas). Os resultados das análises para o LD e LQ foram determinados a partir das equações 10 e 11,

$$LD = 3 \frac{s}{b}$$

Equação (10)

$$LQ = 10 \frac{s}{b} \quad \text{Equação (11)}$$

onde, s é a estimativa de desvio padrão de 10 medidas do branco dos reagentes da curva de calibração e b a inclinação da curva de calibração.

A precisão foi avaliada através da estimativa do desvio padrão relativo da leitura (RSD), calculada pela equação 12,

$$RSD (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (12)}$$

onde: s é igual à estimativa de desvio padrão das medidas; \bar{x} é igual à concentração média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO PREPARO DE AMOSTRA

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito das interações do ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e água no processo de decomposição do músculo de peixe. Um planejamento de mistura Simplex centroide ($n = 3$) foi realizado para verificar quais variáveis têm ou não significância no processo de decomposição da amostra. O método baseia-se na variação das propriedades de uma mistura ternária em função do volume de seus constituintes, cujo tratamento estatístico dos resultados mostra o comportamento desta mistura no domínio experimental estudado.

A Tabela 5 apresenta a matriz com valores reais e a resposta múltipla dos sinais analíticos (Intensidade) dos analitos de interesse (Cu, Fe, Zn e S). As combinações das variáveis foram avaliadas para a digestão de uma massa de amostra de 0,2000 g, são elas: volume de HNO_3 (mL), volume de H_2O_2 (mL) e volume de H_2O (mL). A avaliação final foi feita utilizando uma função de resposta múltipla (RM) a fim de obter uma condição simultânea ideal para decompor toda a matéria orgânica (NOVAES, C. G., et al. 2016). A RM foi calculada pela equação 13:

Equação (13)

$$RM = \frac{\text{Sinal de emissãoCu}}{\text{Sinal de emissão máximoCu}} + \frac{\text{Sinal de emissãoFe}}{\text{Sinal de emissão máximoFe}} + \frac{\text{Sinal de emissãoZn}}{\text{Sinal de emissão máximoZn}} + \frac{\text{Sinal de emissãoS}}{\text{Sinal de emissão máximoS}}$$

Onde Sinal de emissão é o sinal de intensidade medido para cada elemento e o Sinal de emissão máximo são os sinais máximos de intensidade obtidos para Cu, Fe, Zn e S, respectivamente durante os ensaios.

Tabela 5: Planejamento de mistura usado para a construção da superfície de contorno e resultados (intensidade) obtidos

Ensaio	Volume (mL)			Intensidade				Resposta Múltipla
	HNO ₃	H ₂ O ₂	H ₂ O	Cu	Fe	Zn	S	
1	2,0 (0)	0,0 (0)	8,0 (1)	390,2	961,4	4696,3	760,2	3,40
2	6,0 (1)	0,0 (0)	4,0 (0)	449,2	915,5	3756,3	705,0	3,30
3	2,0 (0)	4,0 (1)	4,0 (0)	431,0	984,6	4028,0	720,0	3,33
4	4,0 (1/2)	0,0 (0)	6,0 (1/2)	410,2	1096,1	4731,5	804,4	3,61
5	2,0 (0)	2,0 (1/2)	6,0 (1/2)	388,0	951,2	4073,3	712,2	3,22
6	4,0 (1/2)	2,0 (1/2)	4,0 (0)	450,7	883,0	3497,0	691,5	3,20
7 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)	392,1	1053,3	4587,0	705,0	3,40
8 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)	348,6	1444,2	4378,0	715,2	3,52
9 (PC)	3,3 (1/3)	1,3 (1/3)	5,3 (1/3)	356,0	1555,3	4209,5	703,8	3,60

As Figuras 12 e 13 apresentam os resultados do planejamento de mistura Simplex centroide para os analitos, considerando RM como resposta. Ela mostra uma grande região de máximo, a qual compreende os pontos 4, 8 e 9. Esta região define as condições que favorecem uma melhor mistura para decomposição do músculo de peixe disponibilizando a maior quantidade dos analitos. A mistura então deve ser composta por um maior volume de água, seguido por um aumento no volume de ácido nítrico, sem quase haver necessidade de peróxido de hidrogênio. A Tabela 6 apresenta os dados do planejamento de mistura para otimização do processo de digestão. O valor crítico apresenta o mínimo de peróxido de hidrogênio equivalente a 0,4 mL; significando que o peróxido é essencial apenas para aumentar o potencial oxidante.

De acordo KRUG, J. F., com o maior volume de água na mistura ocorre aumento da temperatura do meio e, conseqüentemente, aumenta a pressão dentro do tubo de reação promovendo a elevação do potencial oxidante. Esse potencial oxidante também é conseguido com a presença do H₂O₂, que a partir da sua reação de decomposição libera O_{2(g)} dentro do tubo de digestão. Esse O_{2(g)} começa a reagir com os produtos da digestão e participa do ciclo de regeneração do HNO₃.

A acidez residual foi avaliada em média de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 12: Diagrama da mistura para o modelo quadrático

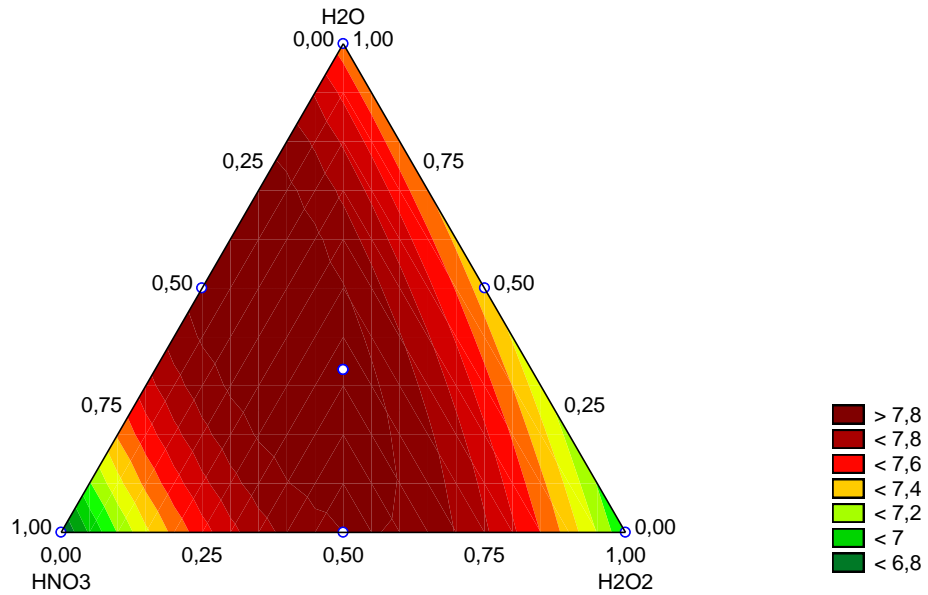


Figura 13: Superfície de resposta para otimização do planejamento de mistura

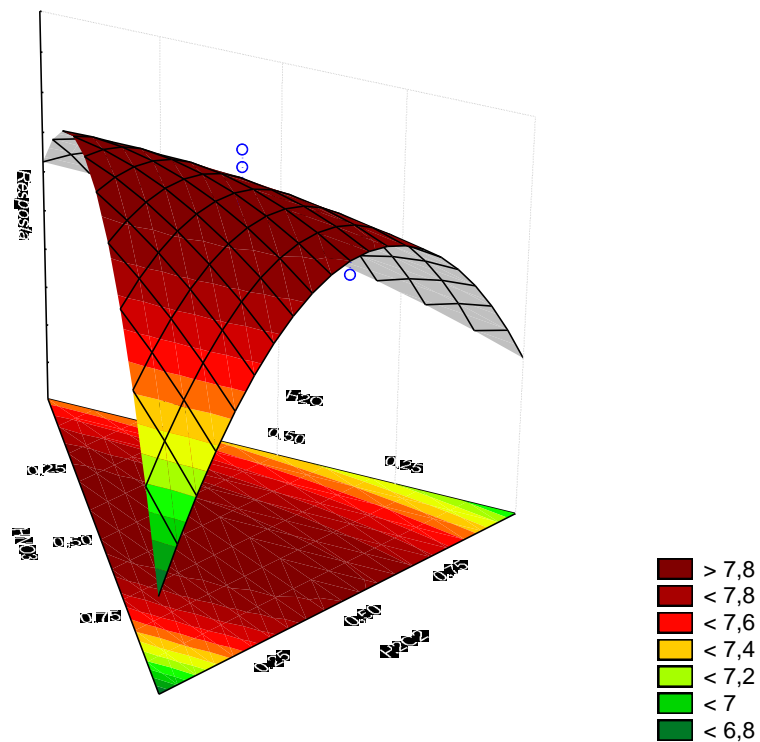


Tabela 6: Dados do planejamento de misturas para otimização do processo de digestão por sistema de refluxo.

Variáveis	Volume (mL)		
	Mínimo observado	Valor crítico	Máximo observado
HNO ₃	2,0	3,6	6,0
H ₂ O ₂	0,0	0,4	4,0
H ₂ O	4,0	6,0	8,0

A avaliação do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais foi feito por meio do teste de falta de ajuste (teste de Fischer), no qual o valor de F calculado para o modelo foi de 20,7, enquanto que o F tabelado foi de 9,01. Já o F calculado para a falta de ajuste foi 1,5 sendo um valor menor que F tabelado de 18,51 ou seja, o modelo proposto não apresenta falta de ajuste e descreve a região experimental adequadamente. Na Tabela 7, pode ser verificado que o valor de p para a falta de ajuste é maior que 0,05, significando que o modelo matemático de segunda ordem não apresenta falta de ajuste e descreve perfeitamente a região experimental estudada.

Outro critério utilizado para a escolha de qual modelo seria o mais adequado foi realizada através do R² ajustado e da menor média quadrática de erro (MQ_E), obtendo-se cerca de 92,5% da variabilidade total dos dados sendo explicado pelo modelo matemático. No presente trabalho, foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial, sendo o modelo quadrático àquele que melhor ajustou o planejamento (Tabela 8).

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA)

Fonte variação	SS	df	MS	F	p	R ² _{ajustado}
Regressão	1,843221	5	0,368644	20,71519	0,015631	0,924936
Resíduo	0,053388	3	0,017796			
Falta de ajuste	0,022651	1	0,022651	1,47389	0,348635	
Erro puro	0,030736	2	0,015368			
Total	1,896608	8	0,237076			

SS – soma dos quadrados df – grau de liberdade MS – média quadrática F – falta de ajuste

Tabela 8: Comparação entre os modelos matemáticos para ajuste do planejamento de mistura

Modelo	SS _{Efeito}	df _{Efeito}	MS _{Efeito}	SS _{Erro}	df _{Erro}	MS _{Erro}	F	p	R ²	R ² _{ajustado}
Linear	0,1164	2	0,0582	1,7802	6	0,29670	0,196	0,8269	0,0614	0,0000
Quadrático	1,7268	3	0,5756	0,0534	3	0,0178	32,345	0,0087	0,9718	0,9249
Cúbico especial	0,0226	1	0,0226	0,0307	2	0,0154	1,4739	0,3486	0,9838	0,9352
Total ajustado	1,8966	8	0,2371							

SS – soma dos quadrados df – grau de liberdade MS – média quadrática F – falta de ajuste

5.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO

5.2.1 Limites de detecção e quantificação

Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir do desvio padrão de 10 brancos analíticos para Cu, Fe, Zn e S após análise por ICP OES, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros das curvas de calibração analíticas: coeficiente de correlação (R²) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos por ICP OES

Elemento	R ²	Limite de detecção (mg kg ⁻¹)	Limite de quantificação (mg kg ⁻¹)
Cu	0,9998	0,002	0,008
Fe	0,9999	0,02	0,07
Zn	0,9998	0,002	0,008
S	1	0,02	0,08

Foi possível verificar, após os resultados, que foram obtidos baixos valores de LD's e LQ's. Essa característica foi associada ao uso de ácido nítrico diluído e consequentemente de menores diluições. Outra avaliação foi realizada considerando o coeficiente de determinação, que evidenciou uma correlação satisfatória para todos os elementos estudados, uma vez que R² apresentou valor maior que 0,999.

5.2.2 Exatidão

A exatidão da análise empregando-se material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b) foi confirmada através das concentrações determinadas pelo método proposto e os resultados obtidos para Cu, Fe, Zn e S, após determinação por ICP OES, são expressos com desvio padrão relativo. Os valores estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de concentração de Cu, Fe, Zn e S encontrados no CRM por ICP OES

Elemento	Concentração (mg kg ⁻¹)		RSD (%)	Teste t pareado	
	Valor	Valor		t tabelado	t calculado
	Certificado	Determinado			
Cu	71,6 ± 1,6	69,7 ± 3,4	4,8	4,3	0,20
Fe	205,8 ± 6,8	196,2 ± 7	3,5		0,42
Zn	1424 ± 46	1436 ± 55	3,8		3,40
S	6890 ± 140	6758 ± 102	3,5		0,02

RSD = Desvio padrão relativo. média ± desvio padrão, n=3

Comparando-se os dados obtidos com os valores certificados, após aplicação do método desenvolvido, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os resultados, o que pôde ser confirmado após comparação estatística usando o teste t pareado. Como o t calculado apresentou valor menor que o t tabelado, não há diferença significativa entre os valores obtidos para o método proposto e os valores certificados.

5.2.3 Precisão

A avaliação da precisão, expressa com desvio padrão relativo do método, foi realizada para amostras de peixe contendo 38,2 mg kg⁻¹ de zinco, 110,6 mg kg⁻¹ de ferro, 1949,8 mg kg⁻¹ de cobre e 9676,5 mg kg⁻¹ de enxofre. Os valores obtidos de desvio foram iguais a 0,11%, 0,20%, 0,31%, e 0,79% para Cu, S, Fe e Zn respectivamente.

5.2.4 Comparação com outros métodos

O método proposto, ao ser comparado com outros trabalhos (Tabela 11), apresenta grandes vantagens. Pode, portanto, ser aplicado conforme os recursos disponíveis para o laboratório. Com relação ao custo de equipamentos e reagentes, a utilização de ácido nítrico diluído e o volume mínimo de peróxido de hidrogênio na digestão em bloco digestor com dedo frio, do músculo de peixe, seguem as normas da química verde com a produção mínima de resíduos utilizando-se menores volumes de reagentes, conseqüentemente diminuindo o custo.

O bloco digestor com dedo frio foi eficiente no processo de digestão diante do que foi observado na otimização, quanto à precisão, exatidão e a frequência analítica.

Tabela 11: Comparação de método deste trabalho com trabalhos da literatura

Amostra	Analito	Método	Reagentes	Tempo de digestão	Técnica	Referência
Peixe (músculo)	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn	Placa de aquecimento	10,0 mL de HNO ₃ concentrado	3 h	ICP OES	Schenone, N. F., Vackova, L. e Cirelli, A. F., 2013
Peixe (músculo)	Al, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	Calcinação	HNO ₃ (25% v/v)	5 h	ICP OES	Sanches Filho, P. J., Da Fonseca, V. K. e Holbig, L., 2013
		Digestão	HNO ₃ concentrado e HClO ₄ (2:1 v/v)	72 h		
Peixe e Camarão (músculo)	Hg	Micro-ondas	8,0 mL de HNO ₃ 65% 2,0 mL de H ₂ O ₂	30 min.	FIA-AAS	Perez, D. E. L., Ángel, M. L. H. A., Gomez, A. S. e Cartagena, C. J., 2014
Peixe (brânquias, fígado e músculo)	Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Pb e Zn	Micro-ondas	4,0 mL de solução 3,5 mol L ⁻¹ HNO ₃ e 4,0 mL de H ₂ O ₂	1 h e 15 min.	GFAAS FAAS	Cruz, A. S., <i>et al</i> , 2015
Peixe (músculo)	As, Cd, Cr, Cu, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb e Se	Bloco digestor	6,0 mL de HNO ₃ 65% e 3,0 mL de H ₂ O ₂	2h	ICP-MS	Silva, E., <i>et al</i> , 2016
Peixe (músculo)	Cu, Fe, S e Zn	Bloco digestor com dedo frio	3,6 mL de HNO ₃ 65%, 6,0 mL de H ₂ O e 0,4 mL de H ₂ O ₂	4h	ICP OES	Este trabalho

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS

O método proposto foi aplicado para avaliar as concentrações de Cu, Fe, Zn e S em 15 amostras de tecido de músculo de peixes da espécie *Mugil cephalus*, coletadas nos meses de fevereiro de 2016 (1A, 2A, 3A, 4A e 5A), agosto de 2016 (1B, 2B, 3B, 4B e 5B) e fevereiro de 2017 (1C, 2C, 3C, 4C e 5C) em 5 pontos diferentes da Baía do Pontal no município de Ilhéus-Ba.

Os resultados obtidos após digestão ácida das amostras em bloco digestor com dedo frio e análise por ICP OES são apresentados na Tabela 12.

Tabela 7: Resultados de concentração de Zn, Fe, Cu e S (mg kg^{-1}), obtidos para diferentes épocas do ano (A – fevereiro/2016, B – agosto/2016 e C – fevereiro/2017), determinados por ICP OES em amostras de peixe (média \pm intervalo de confiança, $n=3$)

Amostras	Zn	Fe	Cu	S
1A	66,0 \pm 1,4	292,8 \pm 5,9	2466,7 \pm 15,8	12698,4 \pm 44
2A	48,5 \pm 0,2	59,3 \pm 0,4	1485,2 \pm 34,5	6157,5 \pm 19,9
3A	37,5 \pm 0,9	109,5 \pm 0,5	1879,6 \pm 24,5	14088,7 \pm 16,2
4A	66,2 \pm 0,2	502,6 \pm 9,2	2083,6 \pm 11,2	9742,0 \pm 67,2
5A	38,2 \pm 0,8	110,6 \pm 0,8	1949,6 \pm 5,3	9676,5 \pm 48,8
1B	92,0 \pm 2,1	134,8 \pm 14,7	2635,6 \pm 43,6	10878,5 \pm 72,6
2B	51,8 \pm 1,8	75,5 \pm 13,0	2826,3 \pm 35,3	11548,7 \pm 25,9
3B	64,4 \pm 1,6	67,8 \pm 16,3	0,5 \pm 0,8	10152,5 \pm 73,9
4B	51,5 \pm 2,5	85,9 \pm 23,9	3026,2 \pm 46,1	11854,7 \pm 75,4
5B	43,3 \pm 1,5	156,9 \pm 11,6	1,0 \pm 0,6	11067,4 \pm 14,9
1C	84,3 \pm 1,2	115,8 \pm 1,8	1645,3 \pm 47,2	5498,9 \pm 60,9
2C	54,5 \pm 0,8	256,1 \pm 8,4	1681,8 \pm 15,9	6186,2 \pm 20,1
3C	74,6 \pm 0,7	85,1 \pm 0,7	1638,7 \pm 95,3	6487,7 \pm 90,0
4C	58,4 \pm 1,4	147,8 \pm 8,4	2401,7 \pm 55	5451,2 \pm 77,3
5C	61,4 \pm 1,9	422,8 \pm 6,0	2578,5 \pm 47,5	5460,4 \pm 91,4

As amostras de tecido de músculo dos peixes *Mugil cephalus* provenientes da Baía do Pontal, investigadas neste trabalho, apresentaram uma variação na faixa de concentração 0,5 a 3026,2 mg kg^{-1} para cobre, 59,3 a 502,6 mg kg^{-1} para ferro, 37,5 a 92 mg kg^{-1} para zinco e 5451,2 a 14088,7 mg kg^{-1} para enxofre. Das 15 amostras de peixes, 11 apresentaram concentração de Zn superior a 50 mg kg^{-1} e 13 apresentaram concentração de Cu chegando a ser 100 vezes superior a 30 mg kg^{-1} , máximas permitidas pela legislação brasileira (Decreto Lei 55.871 ANVISA, 1965).

Outros estudos, como o de Pacheco et al. (2017), concentrações de Cu observadas em *Mugil cephalus* (199,2 mg kg⁻¹) foram pouco mais de 6 vezes maior que o limite máximo permitido, enquanto Viana et al. (2012) também encontraram concentrações elevadas de Cu (159,5 mg kg⁻¹). Elevados valores de Zn e Cu na musculatura demonstram que os mesmos podem estar se acumulando gradativamente nos peixes, provavelmente decorrente de altos valores presentes na água da Baía do Pontal. Para o ferro e o enxofre, não foram encontrados valores de referência estabelecidos para o Brasil.

Os índices pluviométricos, registrados nos períodos de amostragem, de acordo ao INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), foram de 4,0 a 18,0 mm em fevereiro/2016; 2,0 a 98,0 mm em agosto/2016 e 2,0 a 62,0 mm em fevereiro/2017. As temperaturas, em média, registradas nos mesmos períodos foram, de 27 a 28° C em fevereiro/2016; 21 a 24° C em agosto/2016 e 26 a 28° C em fevereiro/2017. Diante disso, as maiores concentrações dos elementos químicos no músculo dos peixes foram encontradas em períodos de maior índice pluviométrico. Ou seja, quanto maior a lixiviação, provocada pela precipitação da água da chuva, maior a quantidade de elementos químicos disponibilizados na água dos rios. Pode-se verificar, por exemplo, que no ponto 2 (Baía do Pontal) houve um aumento significativo da concentração de cobre no período chuvoso. Neste ponto, também pode ser observado que há uma maior concentração de despejos antrópicos, uma vez que, é uma região formada pelo encontro dos rios Cachoeira, Santana e Itacanoeira.

O ponto 1 (Praia do Pontal), também apresentou concentrações elevadas de cobre e zinco, embora esteja localizado em região de praia, sofre contribuições do rio Almada, que nasce em Almadina e passa por cidades vizinhas (Coaraci, Itajuípe, Uruçuca), chegando a desaguar em Ilhéus.

Ao avaliar os pontos de coleta, quanto a elevadas concentrações dos metais trabalhados, os que sofrem maior impacto devido as ações antrópicas, além do ponto 2 já citado anteriormente, são os pontos 4 (rio Cachoeira) e 5 (rio Santana). O rio Cachoeira sofre bastante influência da cidade de Itabuna, que pelo seu porte, impacta com maior intensidade nas águas desse rio, através de despejos e lançamentos de lixos e esgotos.

A contaminação das águas pode levar ao acúmulo de metais em tecidos de diferentes espécies de peixes, incluindo os destinados ao consumo humano (ARAIN

et al.,2008; PALANIAPPAN et al., 2010). A concentração de metais nos peixes será maior em locais contaminados, especialmente em áreas de grande atividade industrial e agrícola o que demonstra o impacto da atividade humana sobre o meio ambiente (KOSANOVIC et al., 2007; MENDIL et al., 2010).

Ao comparar as concentrações totais de Cu, Fe e Zn presentes nas amostras de peixe com os valores de referência para ingestão de nutrientes, obtidos a partir da “Dietary Reference Intakes (DRI)” e adotados pelos Estados Unidos, estima-se que ao consumir cerca de 100 g de músculo de peixe haverá o fornecimento de 0,5% a 3026% de Cu, 9,4% a 23% de Zn e 13,2% a 94% de Fe, para a manutenção diária das necessidades nutricionais humanas. Porém, a determinação do conteúdo total de um nutriente presente em um alimento não revela o seu valor nutricional, devido ao processo de digestão humana, apenas uma fração desse nutriente é liberada para absorção pelo organismo. Diante disso, para se ter conhecimento sobre a quantidade de um nutriente que será absorvido pelo organismo é necessário que se empreguem ensaios *in vitro* ou *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade destes analitos (NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. 2010).

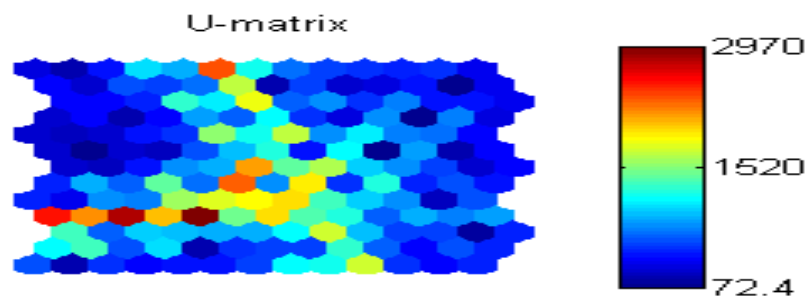
5.4 REDES NEURAS ARTIFICIAIS

As redes neurais artificiais foram empregadas no conjunto de dados do presente trabalho, uma vez que, a geração de mapas topológicos da rede Kohonen pode traduzir informações menos visíveis a outras ferramentas, como PCA e HCA.

A rede neural foi construída à partir do pacote SOM TOOLBOX de rede Kohonen (LABORATORY OF COMPUTER AND INFORMATION SCIENCE, 2015) modificada pelo algoritmo k-means (XINDONG WU et al, 2008) à partir dos grupos indicados pelo Kohonen para potencializar a separação dos grupos e calcular os parâmetros de validação, índice Davies-Bouldin (DB) e Silhueta (Sil). Os parâmetros da rede na qual foram feitos inúmeros treinamentos com diferentes dimensões de matrizes e outros parâmetros, foram realizados após otimização, a fim de reduzir o índice de DB e maximizar o valor médio das silhuetas, obtendo índices de 0,5374 e 0,8541, respectivamente. A rede neural treinada utilizou os seguintes parâmetros: matriz 7x7, vizinhança gaussiana, camadas hexagonais, raio inicial 4>2, raio aperfeiçoado 1.

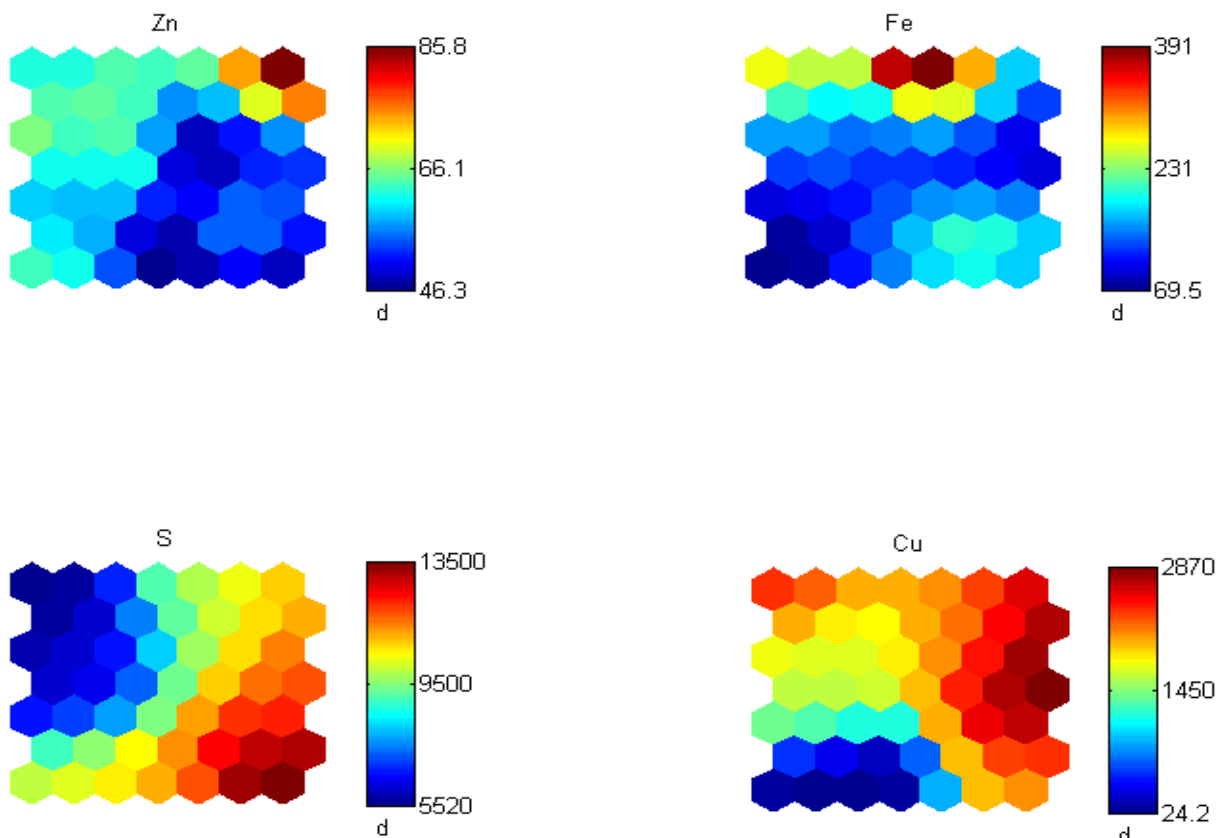
A clusterização do mapa U-matrix foi verificada após implementação de um programa de partição ao algoritmo de Kohonen, tornando possível estimar a quantidade de cluster e obter uma melhor percepção de onde os grupos estão presentes. A Figura 14 apresenta o gráfico U-matrix obtido após aplicação de algoritmo.

Figura 14: Gráfico U-matrix



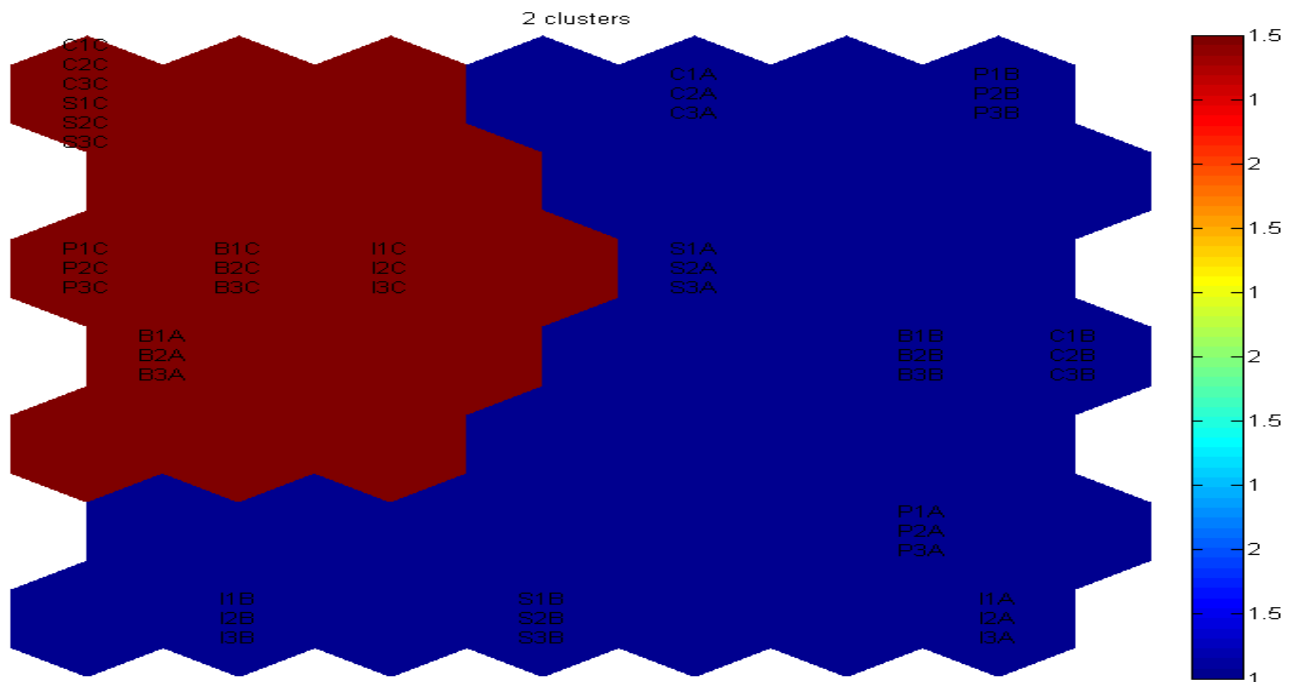
Na sequência, foram plotados os planos de componente das variáveis analisadas (Figura 15).

Figura 15: Planos de componentes dos dados analisados



Para melhor visualização, foi montada uma figura (Figura 16) relativa à distribuição das amostras no mapa topológico.

Figura 16: Disposição das amostras no mapa da rede



É possível constatar que nos gráficos (Figura 15) de cobre e enxofre, na divisa entre os agrupamentos, as amostras apresentam concentração próxima a média e ao passo que se avança para as extremidades nota-se uma mudança gradual de cores se intensificando, significando uma boa separação dos grupos, ou seja, amostras de maior e menor concentração.

Em direção ao lado esquerdo, nos gráficos dos elementos químicos da Figura 15, as concentrações vão diminuindo, enquanto que para o lado direito as concentrações vão aumentando. Pode-se deduzir que o grupo em azul, da Figura 16, corresponde às amostras com as menores concentrações de cobre e enxofre. Em destaque as amostras 4C e as amostras 3B e 5B, que estão relacionadas com o neurônio do canto inferior e superior esquerdo, o qual se observa (na Figura 15) a cor azul mais intensa, cuja concentração de Cu foi de aproximadamente $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e de S próximo a $5421,2 \text{ mg kg}^{-1}$.

O grupo em vermelho selecionou as amostras com as maiores concentrações de Cu e S, sendo que no canto lateral direito, as amostras de 4B e 2B representam as de maior concentração de Cu, em torno de $2826,3 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3026,2 \text{ mg kg}^{-1}$. E as do

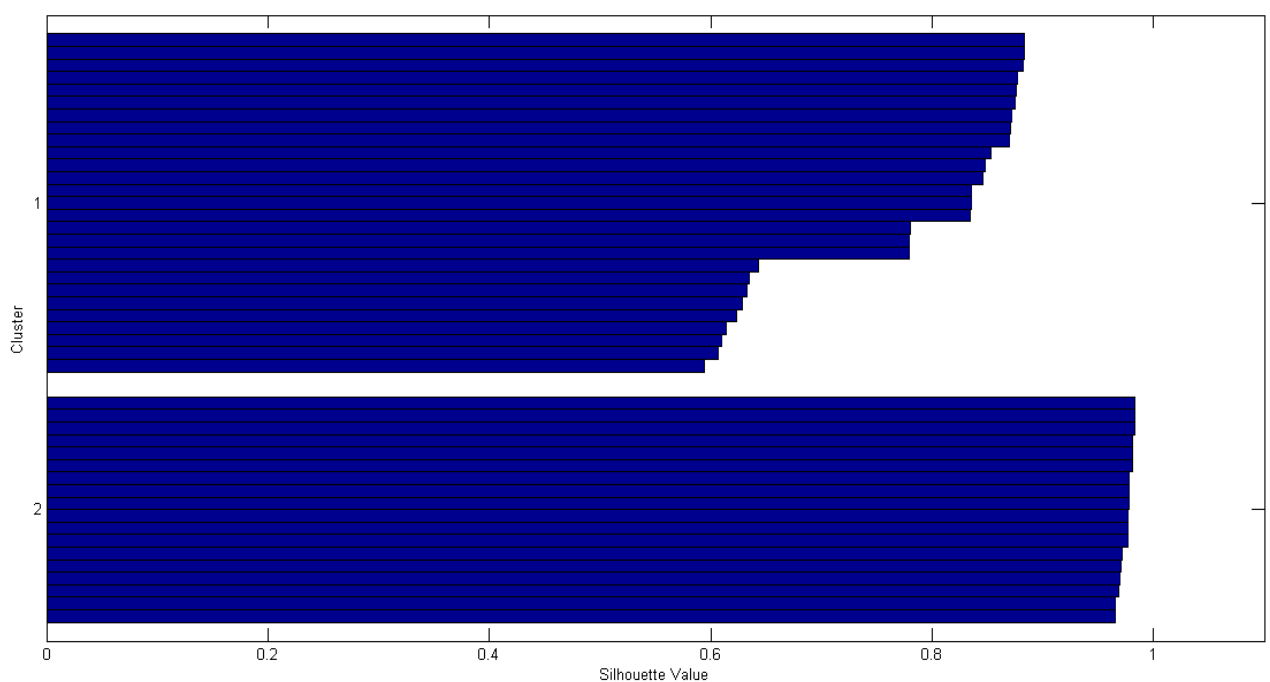
canto inferior direito, as maiores concentrações de S, representadas por 3A e 1A, com cerca de 12698,4 mg kg⁻¹ e 14088,7 mg kg⁻¹, respectivamente.

No plano de componentes do Fe e Zn, as maiores concentrações situam-se nas zonas superior da figura, principalmente do lado direito. O grupo em vermelho selecionou as amostras com maiores concentrações de Fe e Zn, sendo que no canto superior direito destacam-se as amostras 4A e 1B com concentrações de 502,6 mg kg⁻¹ e 92,0 mg kg⁻¹ para Fe e Zn, respectivamente. Já no grupo azul, as menores concentrações para Fe estão nas amostras 2A, 3B e 2B mg kg⁻¹ com 59,3 mg kg⁻¹; 67,8 mg kg⁻¹ e 75,5 mg kg⁻¹, respectivamente. Para o Zn, as menores concentrações estão nas amostras 3A, 5A e 5B com 37,5 mg kg⁻¹; 38,2 mg kg⁻¹ e 43,3 mg kg⁻¹, respectivamente.

Analisando em termos de divisão dos pontos por coleta, foi possível determinar que no grupo azul estão presentes todas as amostras da coleta C (fevereiro de 2017) e apenas um ponto da coleta B (agosto de 2016). No grupo vermelho possuem amostras dos demais pontos das coletas A e B (fevereiro e agosto de 2016).

O índice de Silhueta foi utilizado para verificar a qualidade da separação, avaliando a pertinência da amostra classificada em seu respectivo grupo. Um gráfico com os índices de cada amostra foi plotado, obtendo-se a resposta apresentada na Figura 17.

Figura 17: Gráfico com os valores do índice de Silhueta



A média dos índices ficou em torno de 0,8541, indicando uma separação bastante satisfatória dos grupos. Ainda pode ser observado que algumas amostras apresentaram valores menores que 0,5. Estas amostras estão situadas na divisa dos grupos no mapa SOM e possuem concentrações medianas dos elementos estudados. Apesar deste valor de 0,5, não houve amostra incorretamente classificada dentro dos grupos.

6. CONCLUSÃO

O planejamento de mistura Simplex centroide utilizado como ferramenta quimiométrica foi eficaz para o estabelecimento de uma mistura satisfatória entre os reagentes HNO_3 , H_2O_2 e H_2O para a extração de elementos essenciais em músculo de peixe.

O método de decomposição da amostra por via úmida utilizando bloco digestor com sistema refluxo (dedo frio) usando ácido nítrico diluído foi considerado adequado para a decomposição das amostras de músculo de peixe. A decomposição dessas amostras resultou em digeridos finais sem partículas dispersas, límpidos e com baixa acidez residual. Diante disso, é possível avaliar um baixo custo quanto ao volume de reagentes e aos materiais utilizados, comparando-se a outros métodos.

A validação se deu através do emprego de material de referência certificado de tecido de ostra (NIST 1566b), apresentando concentrações de Cu, Fe, S e Zn muito próximas do valor de referências em mg kg^{-1} .

A avaliação do teor de nutrientes forneceu informações acerca da composição elementar da amostra, porém, o valor nutricional deste alimento só pode ser verificado quando se realizam ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

Os resultados apresentados nas amostras indicam que houve influência espacial e temporal sobre as concentrações dos elementos determinados. Uma vez que, em período com índice pluviométrico mais elevado, as concentrações foram maiores. Além disso, pôde-se observar que em pontos com maiores ações antrópicas, as concentrações dos elementos também foram elevadas.

As redes neurais são importantes ferramentas para o auxílio no tratamento de dados, principalmente por trazer alternativas de respostas não tão convencionais (como PCA e HCA). Particularmente, a rede K-means adaptada de Kohonen é uma das que oferecem o melhor recurso, onde os mapas topológicos podem traduzir informações menos visíveis do que os apresentados por métodos estatísticos. Para qualificar a separação, utilizou-se os índices DB e SIL. O menor valor de DB encontrado foi 0,5374, juntamente com maior SIL 0,8541. Indicando assim uma separação satisfatória, visto que, o valor máximo para o índice SIL é 1.

A partir dos dados fornecidos pelas redes neurais é possível extrair informações a respeito das influências temporal e espacial sobre os resultados.

Portanto, o método proposto neste trabalho para a determinação de Cu, Fe, Zn e S em músculo de peixe por ICP OES foi considerado adequado, empregando a decomposição ácida por bloco digestor com dedo frio com ácido nítrico diluído.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 19:164–174.

Agnese, A. P., Oliveira, E. M. (2001). Contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas mesófilas e a enumeração de coliformes totais e fecais, em peixe fresco comercializados no município de Seropédica-RJ. *Revista Higiene Alimentar.* 15:88.

Andrade, M. P. (2003). *Ilhéus: passado e presente.* Ilhéus: Editus, 143.

ANVISA 1965. Limite máximo de tolerância de contaminantes inorgânicos em alimentos. Decreto No 55.871, de 26 de Março de 1965, Brasil.

Aprile, F. M. Siqueira, G. W., & Parente, A. H. (2005). Occurrence and potentially toxic of heavy metals in aquatic ecosystems and their effects on organisms health. *Quim. Tecnol.* 2:40-47.

Arain, M. B., Kazi, T. G., Jamali, M. K., Jalbani, N., Afrid, H. I., Shah, A. (2008). Total dissolved and bioavailable metals in water and sediment samples and their accumulation in *Oreochromis mossambicus* of polluted Manchar Lake. *Chemosphere*, 70:1845–1856.

Araújo, P. W.; Brereton, R. G. (1996). *Trends in Anal. Chem.* 15:63.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2004). A toxicological profile for copper. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service. Atlanta, Geórgia.

Barletta, M., Barletta-Bergan, A., Saint-Paul, U., Hubold, G. (2003). Seasonal changes in density, biomass, and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (northern Brazilian coast, east Amazon). *Marine Ecology Progress Series.* 256:217-228.

Barnes, R. M., Júnior, D. S., Krug, F. J. (2014). Introduction to sample srepARATION for trace elements determination. Elsevier. Cap.1, 1-58.

Barra, C. M., Santelli, R. E., Abrão, J. J., Guardia, M. L. (2000). Especificação de arsênio - Uma revisão. *Quim. Nova*, 23:58.

Barros Neto, B., Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E. (2002). Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Ed. da Unicamp: Campinas. 85-114

Baselt, R. C. (2004). Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Foster City: Biomedical Publications.

Beard, J. L., Connor, J. R. (2003). Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr.* 23:41–58.

Bizzi, C. A., Fores, E. L. M., Nóbrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mortari, S. R. (2014). Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H_2O_2 for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 29:332-338.

Cahu, C.; Salen, P.; De Lorgeril M. (2004). Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases: assessing possible differences in lipid nutritional values review article. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 14:34–41.

Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF. (1999). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 261:225-232.

Campos, M. F. G. (1999). Musgos aquáticos como indicadores da contaminação das águas superficiais por metais pesados. Aplicação à bacia hidrográfica do Rio Ave. 132 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Carvalho, M. C. de, Baracat, E. C. E., Sgarbieri, V. C. (2006). Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: Distúrbios do metabolismo de ferro. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 13:54-63.

CDC. Breastfeeding Report Card, United States: Outcome Indicators (Publication, from Centers for Disease Control and Prevention, National Immunization Survey.

2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/breastfeeding/data/index.htm>> . Acessado em: dezembro de 2016.

Cebula, L. O Portal do Pescador. Disponível em: <<http://peska.com.br/peixes-de-agua-salgada/109-tainha-mugil-cephalus>>. Acessado em: janeiro de 2017.

Cienfuegos, F., Vaitsman (2000). Análise instrumental. Rio de Janeiro: Interferências.

Cornell, J. A. (1990). Experiments with mixture-designs, models and the analysis of mixture data. New York: Wiley, 2:432

Coscione, A., Andrade, J. C. de, May, G. M. (2005). O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. Quím. Nova. 28:6.

Cruz, A. S., Pereira Junior, J. B., Carvalho, F. I. M., Nunes, P. O., Alves, B. S. F., Palheta, D. C., Dantas Filho, H. A., Dantasa, K. G. F. (2015) Estudo da Distribuição de Metais em Tecidos de Peixes da Região Amazônica. Revista virtual de química. 7:6.

Curr. Biol. (2011) 11:519 e 523. Metals in Alzheimer's disease, ACS Chem. Biol. (2013) 8:856 e 865.

Denton, G. R. W., Trianni, M. S., Tenorio, M. C. (2010). Impact of land-based sources of pollution on coastal water quality of Saipan, Commonwealth of the Northern Mariana Islands (CNMI): arsenic, mercury and PCBs in popular table fish from Saipan Lagoon. Technical Report . Water and Environmental Research Institute, Western Pacific University of Guam, 130:115.

DHN. Diretoria de Hidrografia e Navegação. Tábuas de marés. Marinha do Brasil. Disponível em: <<http://www.dhn.mar.mil.br/>>. Acessado em: julho de 2016.

DIETARY REFERENCE INTAKES (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes (2001). United States: United States Department of Agriculture (USDA).

Domingo, J. L. (2007). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold? *Environment International*, 33:993–998

D'ulivo, A., Dedina, J., Mester, Z., Sturgeon, R. E., Wang, Q., Welz, B. (2011). Pure Appl. Chem. 83:1283-1340.

Eiras, S. P.; Cuelbas, J. C.; De Andrade, J. C. (1994). Quim. Nova. 17:216.

Failla, M. L. (2003). Trace elements and host defense: Recent advances and continuing challenges. J Nutr.133:1443-7.

Ferrari, J. E. C., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Gonçalves, G. S., Hisano, H. e Kleemann, G. K. (2004). Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Acta Scientiarum. Animal Sciences . Maringá, 26:429-436.

Ferreira, S. L. C., Silva, L. O. B., Santana, F. A., Junior, M. M. S., Matos, G. D., Dos Santos, W. N. L. (2013). A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. Microchemical Journal. 106:307–310

GENEVA: SWITZERLAND: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2001. WHO/UNICEF/UNU. Iron Deficiency Anemia Assessment, Prevention, and Control; 114.

Giese, E. C.; Dekker, R. F. H.; Scarminio, I. S.; Barbosa, A. M.; Silva, R. (2011). Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. Biochemical Engineering Journal. 53:239-243.

Giné, M. F. (1998). Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente. Piracicaba: CENA.

Gouvêa, J. B. S. (1976). Recursos florestais. Rio de Janeiro: Cartográfica Cruzeiro do Sul, Diagnóstico socioeconômico da região cacauzeira. 246:1976.

Harris, D. C. (2011). Explorando a Química Analítica. Rio de Janeiro. LTC.

Heine, M. L. (2001). História de Ilhéus. Ilhéus: Fundação Cultural de Ilhéus – FUNDACI.

Hou, X., Jones, B. T. (2000). Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry. In Meyers, R. A. Encyclopedia of analytical chemistry: applicationstheory end instrumentation. Jhon Wiley e Sons: Chichester, 9468-9485.

Hurrell. R. F. (1997). Bioavailability of iron. Eur J Clin Nutr. 51:4–8.

Ikem, A., Egiebor, N.O. (2006). Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). Journal of Food Composition and Analysis 18:771–787.

Internationa Agency for Research on Cancer. IARC; Working Group on the evaluation of carcinogenics risks to humans (2004). Iarc Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.

Kingston, H. M., Haswall, S. J. (1997). Microwave-enhanced Chemistry. Washington: American Chemical Society, 772.

Kosanovic, M., Hasan, M. Y., Subramanian D., Al Ahbabi A. A., Al Kathiri O. A., Aleassa, E. M., Adem, A. (2007). Influence of urbanization of the western coast of the United Arab Emirates on trace metal content in muscle and liver of wild Red-spot emperor (*Lethrinus lentjan*). Food and Chem. Toxicol. 45:2261–2266

Krug, F. J. (2006). Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. In: VI Workshop sobre Preparo de Amostras, Santa Maria, 6ª edição.

Krug, F. J., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A., Oliveira, P. V. (2001). Plasma em química analítica e preparo de amostra. 35.

LABORATORY OF COMPUTER END INFORMATION SCIENCE. Disponível em: <<http://www.cis.hut.fi/somtoolbox/>> Acessado em: junho de 2017.

Lacerda, A. F; Amorim, R. R.; Góes, L. M.; Damaceno Filho, A. R.; Nascimento, I. B. Do; Souza. J. De; Oliveira, M. P.; Franco, G. B.; Araujo, I. C.; Santos, M. C. F. Dos. (2006). Fragilidade ambiental e ação antrópica no entorno Baía do Pontal (Ilhéus-Bahia). Goiânia: VI Simpósio Nacional de Geomorfologia.

Lacerda, L. D., Carvalho, C. E. V., Gomes, M. P. (1989). Nota sobre a distribuição de Mn, Zn e Cu em siris da Baía de Sepetiba. *Revista Brasileira de Biologia*, 49:847 – 849.

Lee, J. D. (1999). *Química inorgânica não tão concisa*, Edgard Blucher, 537.

Lund, E. K. (2013). Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? *Food Chemistry*, 140:413–420.

Maciel, J. V., Knorr, C. L., Flores, E. M. M., Müller, E. I., Mesko, M. F., Primel, E. G., Duarte, F. A. (2014). Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chemistry*, 145:927–931.

MARES E OCEANOS. Disponível em: <<http://mares-oceanos.blogspot.com.br/2009/04/carapeba.html>> Acessado em: janeiro de 2017.

Mcdowell, L. R. (2003). Amsterdam: Elsevier Science. *Minerals in Animal And Human Nutrition*, 660.

Mendil, D., Ünal, Ö. F., Tüzen, M., Soylak, M. (2010). Determination of trace metals in different fish species and sediments from the River Yes ilirmak in Tokat, Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 48:1383–1392.

Mozaffarian, D., WU, J.H. (2011). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, 58:2047–2067.

Muckenthaler, M. U., Andlill, R. (2012). “Cellular Iron Physiology,” in *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*, eds G.J .Anderson and G.D. McLaren.(NewYork,NY:HumanaPress), 27–50

Nardi, E. P.; Evangelista, F. S.; Tormen, L.; Saint´pierre, T. D.; Curtius, A. J.; Souza, S. S.; Barbosa Júnior, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, 112:727-732.

Nascimento, A. N.; Naozuka, J.; Oliveira, P. V. (2010). *In vitro* evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by *off-line* coupled SEC-UV and SIMAAS. *Microchemical Journal*, 96:58-63.

Nogueira, A. R. A., et al (2010). Microwave-assisted digestion in closed vessels: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid. *Analytical Methods*. 2:734-738

Nogueira, A. R. de A., Moraes, D. P. de, Flores, E. M. M., Krug, F. J., Knapp, G., Nobrega, J. de A., Barin, J. S., Mesko, M. F. (2008). Decomposição assistida por radiação micro-ondas. 306-309.

Novaes, C. G., Bezerra, M. A., da Silva, E. G. P., Santos, A. M. P. dos, Romão, I. L. da S., Neto, J. H. S. (2016). A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). *Microchemical Journal*, 128:331–346.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL Nutrient requirements of fish. Washington: National Academy Press, 1993.

Olesik, J. W. (1991). Elemental analysis using an evaluation and assessment of remaining problems. *Analytical Chemistry*. 63:12-21.

Oliveira, R. M., Antunes, A. C. N, Vieira, M. A., Medina, A. L., Ribeiro, A. S. (2016). Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. *Microchemical Journal*. 124:402–409.

Pacheco, C. S. V., da Silva, E. G. P., Hauser-Davis, R. A., Dias, F., Amorim, F. A. C., de Jesus, R. M., Novaes, C. G., Santos, A. M. P. dos, Saint'pierre, T. D. (2017). Determination and Evaluation of Metallothionein and Metals in *Mugil cephalus* (Mullet) from Pontal Bay, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*. 98:84–90.

Palaniappan, L. R. M., Nishanth, T., Renju, V. B. (2010) Bioconcentration of zinc and its effect on the biochemical constituents of the gill tissues of *Labeo rohita*: An FT-IR study. *Infrar. Physics Technol*. 53:103–111.

Peixes esportivos do mundo. Pescando Con Disponível em: <<http://peixesdesportivosdomundo.blogspot.com.br/2010/03/tainha-olhalvo-mugil-cephalus.html>>. Acessado em: janeiro de 2017.

Peixoto, E. M. A. (2002). Elemento químico enxofre. *Química Nova na Escola*. 16:51.

- Perez, D. E. L., Ángel, M. L. H. A., Gomez M. A. S., Cartagena, C. J. (2014). Validation of an analytical method for the determination of mercury in shrimp and fish. *Lasallista Investig.* 11:2.
- Pinheiro, A. C. de A., Lisboa, M. T., Ribeiro, A. S., Nunes, A. M., Yamasaki, A. (2014). Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. *Quim. Nova*, 37:6-9
- Roth, H., Kirchgaessner, H. (1991). In: Holtmeier, H.J., Kruse-Jarres, J. (Eds.), *Zink, Biochemie, Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Stoffwechsels des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 67–101.
- Sanches Filho, P. J., da Fonseca, V. K., Holbig, L. (2013). Avaliação de metais em pescado da região do Pontal da Barra, Laguna dos Patos, Pelotas-RS. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8:105-111.
- Santos, W. P. C. dos. (2010). Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES. *Microchemical Journal*, 95:169–173.
- Sargentelli, V., Mauro, A. E., Massabni, A. C. (1996). Aspectos do metabolismo do cobre no homem. Instituto de Química de Araraquara-SP.
- Schenone, N. F., Vackova, L., Cirelli, A. F., (2013). Differential tissue accumulation of arsenic and heavy metals from diets in three edible fish species. *Aquaculture Nutrition*. 20:364-371.
- Scherz, H., Kirchhoff, E. (2006). Trace elements: in foods: zinc contents of raw foods— a comparison of data originating from different geographical regions of the world. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:420–433.
- Sena, M. M., Poppi, R. J., Frighetto, R. T. S., Valarini, P. J. (2000). Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. *Química Nova*. 23:547 – 556.
- Silva, E. B. (2015). Caracterização do ambiente no município de Ilhéus (BA): o caso da Baía do Pontal. *Boletim Goiano de Geografia*. 35:157-175.

- Silva, E., Costa, F. N., Souza, T. L., Viana, Z. C. V., Souza, A. S., Korn, M. G. A., Ferreira, S. L. C., Braz, J. (2016). Assessment of Trace Elements in Tissues of Fish Species: Multivariate Study and Safety Evaluation *Chem. Soc.* 27:2234-2245.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (1998). Principles of instrumental analysis. 5. Ed., Australia: Thomson Learning Academic Resource Center.
- Soares, D. X.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. (2011). Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: An efficient column chromatographic strategy. *Analytica Chimica Acta.* 702:288-294.
- Soto-peña, G. A., Luna, A. L., Acosta-saavedra, L., Conde, P., López-carrillo, L., Cebrián, M. E. (2006). Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *FASEB.* 20:779-81
- Souza, S. N. P. et al. (2013). Validation of a microwave-assisted digestion procedure of pâté sample using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS. *Analytical Methods.* 5:6411-6415.
- Spanemberg, F. E. M. (2010). Planejamento de experimentos com mistura no estudo da vida útil de balas duras. Enegep, São Carlos-SP.
- Swanson, D., Block, R., Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition.* 3:1–7.
- Thompson, M., Brown, D. W., Fearn, T., Gardner, M. J., Greenhow, E. J., Howarth, R., Miller, J. N., Newman, E. J., Ripley, B. D., Swan, K. J., Williams, A., Wood, R., Wilson, J. J. (1994). Is my calibration linear, *Analyst.* 119:2363-2366.
- TODA MATÉRIA. Disponível em: < <https://www.todamateria.com.br/elemento-químico-enxofre/> > Acessado em: janeiro de 2017.
- Tupler, R., Perini, G., Green, M. R. (2001). Expressing the human genome. *Nature.* 409:832–833.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>> Acesso em 20 dez. 2016.

UM NOVO ESTILO DE ESTUDO. Disponível em: <<http://gallerymine2013.wixsite.com/cantodoestudo/biologia>> Acessado em: outubro de 2016.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2004). What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-F-04-009, p. 2.0. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waterscience/fish/MethylmercuryBrochure.pdf>> Acessado em: outubro de 2015.

Valadares, M. de C., Oliveira, D. F. L., Sousa, P. S., Sales, J. M. (2013). As reações do elemento enxofre no organismo humano. Química ampliando fronteiras. Ed. 53.

Viana, Z. C. V., Da Silva, E., Fernandes, G. B., Korn, D. M. G. A., Santos, V. L. C. S. (2012). Estudo da absorção de elementos químicos no músculo de peixes do litoral da Bahia. Rev Cien Med Bio. 11:27–34.

Vieira, A. F. de C., Bello, L. H. A. D. (2006). Experimentos com mistura para otimização de processos: uma aplicação com respostas não normais. Pesqui. Oper. 26:3.

Virga, R. H. P., Geraldo, L. P., Santos, F. H. (2007). Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis, Ciências e Tecnologia de Alimentos. 27:779-785.

Xiao, G., Zhou, B. (2016). What can flies tell us about zinc homeostasis? Archives of Biochemistry and Biophysics. 611:134-141.

Xindong, W., Vipin, K. J., Ross, Q., Joydeep, G., Qiang, Y., Hiroshi, M., Geoffrey, J. M., Angus, N., Bing, L., Philip, S. Y., Zhi-hua, Z., Michael, S., David, J. H., Dan, S. (2008). Top 10 algorithms in data mining. Knowledge and Information Systems. 14:1-37.

Zhao, L., Xia, Z., Wang, F. (2014). Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc and copper) metabolism. 5:33.